

Université de Montréal

**Détermination *in-vivo* du rôle direct de l'angiotensine II  
dans l'hypertrophie et l'insuffisance cardiaques**

Présenté par:

Nassim Dali-Youcef  
En vue de l'obtention du grade  
de Maître ès Sciences (M.Sc.) en pharmacologie  
devant la faculté des études supérieures

© Nassim Dali-Youcef, 2000



W

4

U58

2002

v.067

Université de Montréal

**Détermination *in-vivo* du rôle direct de l'angiotensine II  
dans l'hypertrophie et l'insuffisance cardiaques**

Mémoire présenté par:

Nassim Dali-Youcef  
En vue de l'obtention du grade  
de Maître ès Sciences (M.Sc.)  
en pharmacologie

Faculté des études supérieures

Président-Rapporteur

.....Dr René Cardinal.....

Directeur de recherche

..... Dr Mona Nemer.....

Membre du jury

.....Dr Timothy Reudelhuber.....

## SOMMAIRE

L'angiotensine II (AII) est un puissant déterminant de l'homéostasie cardiovasculaire et de la régulation de la pression artérielle. Le rôle de l'AII dans l'hypertrophie cardiaque a été démontré dans de nombreuses études en utilisant les inhibiteurs de l'enzyme de conversion de l'angiotensine I (ACE) ou les antagonistes des récepteurs de l'AII de type 1 (AT<sub>1</sub>). Cependant, étant donné que ces traitements bloquent l'action de l'AII aussi bien au niveau vasculaire que cardiaque et diminuent la pression artérielle, il n'est pas clair que les effets hypertrophiques de l'AII sont médiés par les récepteurs AT<sub>1</sub> cardiaques ou via une surcharge de pression. Pour tester cette hypothèse, on a généré des souris transgéniques (Tg) qui surexpriment spécifiquement les récepteurs AT<sub>1</sub> dans les cardiomyocytes sous le contrôle du promoteur de la chaîne lourde de la myosine  $\alpha$ . La surexpression du transgène a entraîné un phénotype d'hypertrophie et de remodelage cardiaque similaire à ce qui est observé chez les humains et les mammifères. Par ailleurs, nous avons observé une augmentation de l'expression du facteur natriurétique auriculaire (ANF), un marqueur de l'hypertrophie cardiaque, au niveau du RNA messager et de la protéine. L'hypertrophie cardiaque était accompagnée d'une perte de cardiomyocytes et d'un dépôt de collagène interstitiel dans les ventricules des souris Tg par rapport à leurs contrôles. Les souris mourraient à environ 140 jours d'insuffisance cardiaque congestive. Ce phénotype n'était pas accompagné de changements de pression artérielle et d'augmentation de fréquence cardiaque suggérant un effet direct de l'AII dans l'induction de l'hypertrophie cardiaque médiée par les récepteurs AT<sub>1</sub> cardiaques. D'autre part, nous avons montré que la perte de cardiomyocytes est due aussi bien à l'apoptose qu'à la nécrose, observées dans le cœur des souris Tg présentant des signes d'insuffisance

cardiaque congestive. Ces résultats démontrent pour la première fois un rôle direct de l'AII dans le développement de l'hypertrophie, du remodelage et de l'insuffisance cardiaque, et suggèrent que l'apoptose et la nécrose des cardiomyocytes pourraient médier la transition d'un état de compensation hypertrophique à un état d'insuffisance cardiaque décompensée.

<b>SOMMAIRE.....</b>	<b>i</b>
<b>TABLE DES MATIÈRES.....</b>	<b>iii</b>
<b>DEDICACE.....</b>	<b>v</b>
<b>LISTE DES ABRÉVIATIONS.....</b>	<b>vi</b>
<b>LISTE DES FIGURES.....</b>	<b>viii</b>
<b>LISTE DES TABLEAUX.....</b>	<b>ix</b>

## TABLE DES MATIÈRES

<b><u>I. CHAPITRE 1. INTRODUCTION</u></b>	<b><u>1</u></b>
<b>I.1. ÉPIDÉMIOLOGIE DE L' HYPERTROPHIE ET DE L' INSUFFISANCE CARDIAQUE</b>	<b>1</b>
<b>I.2. DÉVELOPPEMENT DE L' HYPERTROPHIE ET DE L' INSUFFISANCE CARDIAQUES</b>	<b>3</b>
I.2.1. MODÈLES EXPÉRIMENTAUX D' HYPERTROPHIE ET D' INSUFFISANCE CARDIAQUES	3
1.2.1.1. Modèles génétiques spontanés	3
1.2.1.2. Modèles expérimentaux	6
1.2.1.3. Modèles par manipulations génétiques et transgéniques	11
I.2.2. FACTEURS INFLUENÇANT LE DÉVELOPPEMENT DE L' HYPERTROPHIE CARDIAQUE	14
I.2.3. HYPERTROPHIE CARDIAQUE ET PATRON D' EXPRESSION GÉNÉRIQUE	16
I.2.4. HYPERTROPHIE CARDIAQUE ET SYSTÈMES VASOPRESSEURS	19
<b>I.3. LE SYSTÈME RÉNINE-ANGIOTENSINE</b>	<b>24</b>
I.3.1. COMPOSANTES DU SYSTÈME RÉNINE-ANGIOTENSINE ET RÔLE PHYSIOLOGIQUE	24
I.3.2. L' ANGIOTENSINE II ET SES RÉCEPTEURS	34
I.3.2.1. Structure et distribution tissulaire	34
I.3.2.2. Pharmacologie des récepteurs AT <sub>1</sub> et AT <sub>2</sub>	37
I.3.2.3. Voies de signalisation des récepteurs à l' angiotensine II	40
I.3.2.4. Régulation des récepteurs AT <sub>1</sub> et AT <sub>2</sub>	42
I.3.3. LE SYSTÈME RÉNINE-ANGIOTENSINE ET L' HYPERTROPHIE CARDIAQUE	43
<b>I.4. L' APOPTOSE DANS LE CŒUR ET L' INSUFFISANCE CARDIAQUE</b>	<b>46</b>
I.4.1. APOPTOSE ET PATHOLOGIE CARDIAQUE	46
I.4.2. APOPTOSE ET INSUFFISANCE CARDIAQUE	51
<b>I.5. BUT DU TRAVAIL ET PLAN EXPERIMENTAL</b>	<b>53</b>

<b>II. CHAPITRE 2. ARTICLE 1.</b>	<b>55</b>
<b>ABSTRACT</b>	<b>56</b>
<b>INTRODUCTION</b>	<b>57</b>
<b>MATERIAL AND METHODS</b>	<b>59</b>
<b>RESULTS</b>	<b>61</b>
<b>DISCUSSION</b>	<b>64</b>
<b>ACKNOWLEDGMENTS</b>	<b>68</b>
<b>REFERENCES</b>	<b>69</b>
<b>III. CHAPITRE 3. ARTICLE 2.</b>	<b>82</b>
<b>ABSTRACT</b>	<b>83</b>
<b>INTRODUCTION</b>	<b>85</b>
<b>MATERIAL AND METHODS</b>	<b>88</b>
<b>RESULTS</b>	<b>91</b>
<b>DISCUSSION</b>	<b>94</b>
<b>ACKNOWLEDGMENTS</b>	<b>98</b>
<b>REFERENCES</b>	<b>99</b>
<b>IV. CHAPITRE 4. DISCUSSION</b>	<b>112</b>
<b>V. CHAPITRE 5. CONCLUSION</b>	<b>127</b>
<b>VI. REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES</b>	<b>129</b>
<b>REMERCIEMENTS</b>	<b>156</b>

*À mes parents*  
*Et*  
*Mes frères, Amine et Riad*

## LISTE DES ABRÉVIATIONS

**$\alpha$ -MHC** : chaîne lourde de la myosine de type  $\alpha$

**$\beta$ -MHC** : chaîne lourde de la myosine de type  $\beta$

**Ang II** : angiotensine II

**ANF** : "*atrial natriuretic factor*"

**Ang** : angiotensinogène

**AT<sub>1</sub>** : récepteur à l'angiotensine II de type 1

**AT<sub>2</sub>** : récepteur à l'angiotensine II de type 2

**AVP** : arginine vasopressine

**BNP** : "*Brain natriuretic peptide*"

**DNA** : "*desoxyribonucleic acid*"

**ECA** : enzyme de conversion de l'angiotensine I

**ET-1** : endothéline-1

**ET<sub>A</sub>** : récepteur à l'endothéline de type A

**ET<sub>B</sub>** : récepteur à l'endothéline de type B

**IECA** : inhibiteur de l'enzyme de conversion de l'angiotensine I

**IGF-1** : *insulin growth factor type-1*

**MAPK** : *mitogen activated protein kinase*

**MEK-1** : *mitogen extracellular kinase-1*

**NPY** : neuropeptide Y

**ppET-1** : préproendothéline-1

**RNA** : “*ribonucleic acid*”

**SERCA** :  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase du réticulum endoplasmique

**SRA** : système rénine-angiotensine

**Tg** : transgénique

**TGF- $\beta$**  : “*Transforming growth factor-  $\beta$* ”

**TUNEL** : “*terminal UDP-nick end labeling assay*”

**LISTE DES FIGURES**

<b>Figure 1.</b> Rôle du système rénine-angiotensine dans la régulation de la pression artérielle.....	28
<b>Figure 2.</b> Le système rénine angiotensine et production de son peptide effecteur l'angiotensine II.....	29
<b>Figure 3.</b> Représentation schématique des récepteurs à l'angiotensine II AT1 (A) et AT2(B).....	39
<b>Figure 4.:</b> Voies intracellulaires de l'apoptose.....	49

## LISTE DES TABLEAUX

**Tableau 1:** Modèles expérimentaux d'hypertrophie et d'insuffisance cardiaque.....4

**Tableau 2.** Caractéristiques différentielles entre les sous-types de récepteur à l'AI. ....38

## I. CHAPITRE 1. INTRODUCTION

### I.1. Épidémiologie de l'hypertrophie et de l'insuffisance cardiaque:

Les maladies cardio-vasculaires sont considérées comme étant la principale cause de décès dans les pays industrialisés. Ceci a des répercussions importantes sur le système de santé canadien puisque ces maladies représentent le taux le plus important de séjours hospitaliers comparé à n'importe quelle autre maladie. Outre les morts subites attribuées aux arythmies cardiaques et aux infarctus du myocarde aigus, l'insuffisance cardiaque congestive représente le stade final d'une maladie cardio-vasculaire chronique qui peut s'étendre sur plusieurs années. Malgré les traitements disponibles actuellement pour améliorer et prolonger la durée de vie des patients atteints, en 1996, les maladies cardio-vasculaires ont causé le décès de 79 447 personnes au Canada soit 37 % de tous les décès dans ce pays contre 79 117 en 1995. Même si en chiffres absolus, ce nombre a augmenté légèrement, le pourcentage demeure sensiblement le même et ceci est attribuable en partie à la croissance démographique et à une population âgée grandissante (*Statistiques Canada*). Néanmoins, ces taux sont en diminution depuis le début des années 70 et ceci est dû à l'amélioration des procédés médicaux et des techniques chirurgicales mais aussi à la prise en conscience par la population des facteurs de risque des maladies cardio-vasculaires comme le tabagisme, l'hygiène alimentaire, une diminution de la sédentarité, et à un meilleur contrôle de la pression artérielle, une des principales causes d'insuffisance cardiaque congestive.

Récemment, aux États-Unis le NHANES-I (National Health and Nutrition Examination Survey) a décrit la prévalence d'insuffisance cardiaque dans la population américaine à

20 pour 1000 patients (Schocken *et al.*, 1992). Aussi, Parameshwar *et al.* (1992) ont déterminé la prévalence d'insuffisance cardiaque chez les patients hospitalisés. Sur 30204 patients, 117 étaient diagnostiqués avec une insuffisance cardiaque et la prévalence était de 3.9 pour 1000 patients. La prévalence d'insuffisance cardiaque était de 0.6 pour 1000 patients chez les moins de 65 ans et atteignait 27.7 pour 1000 patients chez les plus de 65 ans. L'âge moyen des patients était de 74 ans. Les mêmes auteurs ont déterminé l'incidence d'insuffisance cardiaque dans un hôpital de Londres servant une population approximative de 155000 personnes. Durant une période de 6 mois, l'incidence d'insuffisance cardiaque était de 4.9 % et le taux de mortalité des cas hospitalisés pour insuffisance cardiaque était de 30 %. Il est intéressant de noter que des études récentes ont montré que l'usage de nouvelles thérapies comme les inhibiteurs de l'enzyme de conversion (IECA) chez des patients en insuffisance cardiaque (Classes II et III de la *New York Heart Association*), réduisait significativement la mortalité de 4.2 % en comparaison avec les patients qui recevaient un placebo en plus de la médication conventionnelle (*the SOLVD investigators*, 1991). Enfin, dans l'étude Framingham qui s'intéressait au taux de survie de patients atteints d'insuffisance cardiaque congestive entre 1948 et 1988, les auteurs concluent que la survie des patients était meilleure chez les femmes par rapport aux hommes, mais la mortalité augmentait avec l'âge dans les 2 sexes. Le taux de survie sur 1 et 5 ans était de 57% et 25 % chez les hommes et de 64% et 38% chez les femmes respectivement. Quant à la prévalence d'insuffisance cardiaque congestive, elle était de 1 à 2% chez les adultes d'âge moyen, 2 à 3% chez des patients de plus de 65 ans et atteignait 5 à 10 % chez des patients de plus de 75 ans (Ho *et al.*, 1993)

## **I.2. Développement de l'hypertrophie et de l'insuffisance cardiaques:**

### **I.2.1. Modèles expérimentaux d'hypertrophie et d'insuffisance cardiaques:**

Pour avancer dans la compréhension des mécanismes d'hypertrophie et d'insuffisance cardiaques, plusieurs modèles animaux ont été développés. La plupart de ces études ont été effectuées chez le rat pour le coût relativement faible et la courte période de gestation permettant d'obtenir un grand nombre d'animaux servant à des études de survie à long terme (Sakai *et al.*, 1996). Les différents modèles expérimentaux d'hypertrophie et d'insuffisance cardiaques peuvent être divisés en 3 groupes: 1) modèles génétiques spontanés, 2) modèles expérimentaux et 3) modèles par manipulations génétiques et transgéniques (tableau 1).

#### **I.2.1.1. Modèles génétiques spontanés:**

Parmi les modèles génétiques spontanés on retrouve principalement les cardiomyopathies héréditaires qui miment la cardiomyopathie familiale humaine. Certaines souches de Hamsters Syriens développent génétiquement une cardiomyopathie et une insuffisance cardiaque et cette maladie est transmise de façon autosomale récessive. Jasmin et Proschek (1982) ont décrit la chronologie et les événements pathologiques dans le coeur et les muscles d'une souche de hamster cardiomyopathique UM-X7.1. Les animaux présentent une nécrose du myocarde, entre 50 et 100 jours après la naissance selon le degré de sévérité, et qui subsiste au delà de cet âge. Plus de la moitié des animaux meurent d'insuffisance cardiaque avant l'âge de 250 jours. Récemment, Sakamoto *et al.*

**Tableau 1:** Modèles expérimentaux d'hypertrophie et d'insuffisance cardiaques

<i>Modèles expérimentaux</i>	<i>Références</i>	<i>Commentaires</i>
<u>Modèles génétiques</u>		
Hamster cardiomyopathique	Jasmin et Proschek, 1982	Cardiomyopathie par nécrose du myocarde.
Hypertension chez les rats Dahl sensibles au sel	Inoko <i>et al.</i> , 1994	Hypertrophie cardiaque concentrique puis dilatation ventriculaire gauche et insuffisance
Hypertension chez les rats SHR	Boluyt <i>et al.</i> , 1994	Hypertrophie biventriculaire et insuffisance
<u>Modèles expérimentaux</u>		
Ligature de l'artère coronarienne gauche ACG chez le rat	Kajstura <i>et al.</i> , 1994 Litwin <i>et al.</i> , 1994	ligature incomplète produisant une ischémie myocardique chronique Occlusion complète de l'ACG produisant un infarctus aigu
Microembolisations de l'ACG chez le chien	Sabbah <i>et al.</i> , 1991	Ischémie myocardique chronique sans thoracotomie
Sténose de l'aorte ascendante chez le rat	Feldman <i>et al.</i> , 1993	Surcharge de pression chronique
Sténose aortique chez le cobaye	Malhotra <i>et al.</i> , 1992	Surcharge de pression chronique
Fistule aorto-cavale chez le rat	Hatt <i>et al.</i> , 1980	Surcharge de volume
Régurgitation mitrale chez le chien	Kleaveland <i>et al.</i> , 1994	Surcharge de volume sans thoracotomie
Régurgitation aortique chez le Lapin	Magid <i>et al.</i> , 1994	Surcharge volumique sans thoracotomie
Stimulation ventriculaire rapide chez le chien	Armstrong <i>et al.</i> , 1986 Wilson <i>et al.</i> , 1987	Insuffisance cardiaque par dilatation des chambres sans hypertrophie cardiaque Insuffisance cardiaque par affaiblissement non ischémique de la contractilité- dilatation bi-ventriculaire
Injection intraveineuse de doxorubicine chez le rat	Mettler <i>et al.</i> , 1977	Cardiomyopathie et insuffisance cardiaque
Injection intraveineuse de doxo-rubicine chez le lapin	Dodd <i>et al.</i> , 1993	Cardiomyopathie et insuffisance cardiaque
Myocardite virale	Matsumori et Kawai, 1982	Hypertrophie-amincissement des chambres- Insuffisance cardiaque
<u>Modèles par manipulations génétiques et transgéniques</u>		
Transgénique pour $\alpha$ -MHC <sup>Arg403</sup>	Geisterfer-Lowrance <i>et al.</i> , 1996	Hypertrophie et fibrose cardiaque
Transgénique pour H-ras	Hunter <i>et al.</i> , 1995	Hypertrophie et fonction diastolique altérée
Transgénique pour calmoduline	Gruver <i>et al.</i> , 1993	Hypertrophie et hyperplasie à un stade précoce
Transgénique pour IL-6 +IL-6R	Hirota <i>et al.</i> , 1995	gp-130 hyperactive, hypertrophie cardiaque
Transgénique pour $\alpha$ 1b-AR	Milano <i>et al.</i> , 1996	Hypertrophie cardiaque, ANF augmenté
Transgénique pour G $\alpha$ q	Adams <i>et al.</i> , 1998	Hypertrophie cardiaque, fibrose, insuffisance
Transgénique pour $\beta$ 1-AR	Bisognano <i>et al.</i> , 2000	Hypertrophie, fibrose, insuffisance (IC)
Transgénique pour MEK-1	Bueno <i>et al.</i> , 2000	hypertrophie physiologique, pas d'IC.
Souris déficientes en Ant1	Graham <i>et al.</i> , 1997	Hypertrophie cardiaque et prolifération mitochondriale.
Souris déficientes en MLP	Arber <i>et al.</i> , 1997	Hypertrophie et insuffisance cardiaques
Souris déficientes en GLUT4 au niveau du coeur	Abel <i>et al.</i> , 1999	hypertrophie cardiaque compensée, ANF $\uparrow$ pas de fibrose
Souris déficientes en carnitine	Horiuchi <i>et al.</i> , 1993	Hypertrophie et dilatation cardiaque

(1997) ont déterminé le défaut génétique, chez la souche de hamster cardiomyopathique UM-X7.1, commun aux 2 lignées de cardiomyopathie, hypertrophique et dilatée. Il s'agit d'une délétion du gène qui code pour le delta-sarcoglycan, une protéine ayant un rôle important dans la stabilisation du sarcolemme cardiaque. La délétion touche le site majeur d'initiation de la transcription ce qui résulte en un déficit en transcrits delta-sarcoglycan avec pour conséquence une perte de la protéine delta-sarcoglycan chez tous les hamsters cardiomyopathiques. Il est important de souligner, qu'il existe une autre souche de hamster cardiomyopathique, la souche Bio 14.6. Plusieurs études ont été effectuées chez ce modèle incriminant les canaux calciques dans le développement de la pathologie chez ce modèle (Finkel *et al.*, 1987; Kuo *et al.*, 1992; Hatem *et al.*, 1994). Finkel *et al.*, 1987 ont montré que le début de la cardiomyopathie à 4 mois est lié à une augmentation des sites de liaison des canaux calciques et que l'insuffisance cardiaque à 10 mois est associée à une diminution relative de ces sites. Le modèle génétique de hamster cardiomyopathique présente les avantages suivants: absence de procédures chirurgicales, relativement peu coûteux et la possibilité d'étudier un grand nombre d'animaux. Un des inconvénients de ce modèle est la différence qui existe entre les souches et lignées de hamster. Le manque d'informations génétiques suffisantes limite l'étude des mécanismes moléculaire de la maladie dans ce modèle.

L'hypertrophie et l'insuffisance cardiaques ont également été décrites dans 2 modèles génétiques d'hypertension: les rats hypertendus sensibles au sel (*Salt-sensitive hypertension or Dahl-salt sensitive rats*) et les rats spontanément hypertendus (*SHR*). Dans le premier modèle, Inoko *et al.* (1994) ont montré que des rats sensibles au sel exhibent, après une diète de NaCl (8 %) une hypertrophie cardiaque concentrique suivie

par une dilatation ventriculaire gauche 4 à 9 semaines plus tard par rapport aux animaux résistants aux sel. Les rats meurent finalement d'insuffisance cardiaque congestive avec une congestion pulmonaire massive. Dans le modèle SHR, Boluyt *et al.* (1994) ont démontré une hypertrophie biventriculaire chez les animaux SHR compensés et chez les SHR en insuffisance cardiaque par rapport aux animaux normotendus Wistar Kyoto (WKY), ainsi qu'une augmentation significative de l'expression des gènes de la matrice extracellulaire chez les SHR décompensés mais pas les SHR non insuffisants cardiaques. Ces modèles génétiques d'hypertension miment certaines formes d'hypertension chez l'homme. Cependant, la divergence génétique des souches normotendue et hypertendue, et la difficulté à dissocier les conséquences de l'hypertension de l'hypertrophie congénitale soulèvent souvent des questions quant à la pertinence de ces modèles.

#### **1.2.1.2. Modèles expérimentaux:**

Ces modèles comprennent les modèles de surcharge de pression, d'infarctus du myocarde, de surcharge volumique, de cardiomyopathie médicamenteuse et de cardiomyopathie virale.

La ligature incomplète de l'artère coronarienne chez le rat produit une surcharge de pression, une hypertrophie cardiaque et ultérieurement une insuffisance cardiaque. La constriction de l'artère coronarienne gauche chez des rats Sprague-Dawley produit une hypertrophie des cardiomyocytes 3 mois après l'intervention; dans ce modèle, l'insuffisance cardiaque étant une conséquence de l'ischémie myocardique chronique (Kajstura *et al.*, 1994).

Par ailleurs, Sabbah *et al.* (1991) ont décrit un modèle canin d'hypertrophie et d'insuffisance cardiaque après ischémie myocardique chronique. Ils ont, en effet, produit l'ischémie, chez des chiens, par de multiples microembolisations intracoronariennes successives sans thoracotomie à 1-3 semaines d'intervalle. Douze semaines après la dernière embolisation, l'activité sympathique ainsi que l'ANF plasmatique sont augmentés, alors que la rénine plasmatique demeure inchangée. Les animaux présentent des signes d'insuffisance cardiaque chronique et l'examen post-mortem montre une fibrose myocardique et une hypertrophie du ventricule gauche.

Un autre modèle intéressant d'hypertrophie cardiaque par surcharge de pression peut être obtenu par sténose de l'aorte ascendante. Huit semaines après l'intervention, les rats développent une hypertrophie ventriculaire gauche due à une surcharge de pression chronique. Vingt semaines après la sténose, certains rats demeurent en hypertrophie compensatoire alors que d'autres montrent des signes d'insuffisance cardiaque (Feldman *et al.*, 1993). Le traitement des rats avec sténose aortique avec un IECA, le fosinopril, entraîne une régression de l'hypertrophie ventriculaire gauche et une amélioration de la fonction cardiaque, par rapport aux animaux non traités, malgré la persistance d'une pression ventriculaire gauche élevée (Weinberg *et al.*, 1994). Un autre modèle d'hypertrophie et d'insuffisance cardiaque par surcharge de pression a été obtenu par sténose aortique chez le cobaye. Les animaux présentent le même phénotype d'hypertrophie et de dysfonctionnement cardiaque avec insuffisance cardiaque que celui observé chez le rat avec sténose aortique (Malhotra *et al.*, 1992). Un inconvénient non négligeable de ces modèles est que souvent on obtient une insuffisance cardiaque modérée. Les modèles canins, même s'ils produisent le phénotype d'hypertrophie et

d'insuffisance cardiaques, s'avèrent coûteux, longs à effectuer et sont associés à une mortalité élevée et une haute incidence d'arythmie. De plus, le cœur canin possède une circulation collatérale importante par rapport à l'homme.

L'occlusion complète de l'artère coronarienne gauche chez des rats Sprague-Dawley produit un infarctus du myocarde de tailles variables avec une insuffisance cardiaque 3 à 6 semaines post-infarctus chez les animaux avec une large zone infarctée (Litwin *et al.*, 1994; Hasenfuss, 1998). Afin d'obtenir une taille d'infarctus plus large et plus uniforme, Liu *et al.* (1997) ont utilisé des rats "Lewis inbred" qui sont caractérisés par une plus faible mortalité (16 %) par rapport aux rats Sprague-Dawley (36 %) pour des raisons mal comprises.

L'hypertrophie cardiaque peut être produite également suite à une surcharge de volume. Un des premiers modèles expérimentaux développés est celui de la surcharge de volume induite chirurgicalement par fistule aorto-cavale infra-rénale chez le chien (McCullagh *et al.*, 1972) entraînant une augmentation progressive de la taille du ventricule gauche et une diminution progressive de la fonction diastolique. Ce modèle de surcharge volumique a été expérimenté également chez le rat. Un mois après l'intervention, les animaux développent une hypertrophie cardiaque significative, le poids du cœur étant le double de celui des animaux contrôles et les changements hypertrophiques sont plus prononcés dans le myocarde sous-endocardique par rapport au myocarde et l'épicarde (Hatt *et al.*, 1980). Un autre modèle de surcharge de volume a été expérimenté chez des chiens par régurgitation mitrale en déchirant par voie artérielle les feuillets de la valve mitrale sans thoracotomie. Après une période de 3 mois, les chiens présentent une hypertrophie cardiaque excentrique et par la suite décompensent (Kleaveland *et al.*, 1994). D'une

façon similaire, un modèle de surcharge de volume a été produit chez les lapins avec régurgitation aortique obtenue par perforation à l'aide d'un cathéter de la valve aortique. Ceci produit ainsi une hypertrophie ventriculaire gauche suivie d'un dysfonctionnement systolique et une insuffisance cardiaque après une période de 7 à 27 mois (Magid *et al.*, 1994). Les modèles par surcharge de volume ont été surtout utilisés pour l'étude des changements neurohumoraux lors de l'hypertrophie et l'insuffisance cardiaques et l'effet du blocage chronique des récepteurs  $\beta$ -adrénergiques dans l'amélioration de la fonction cardiaque.

Armstrong *et al.*, 1986 ont décrit un modèle d'insuffisance cardiaque par stimulation ventriculaire rapide ou "rapid ventricular pacing" à 250 battements/min. Ce modèle est caractérisé par une augmentation de la taille des chambres cardiaques (dilatation), une réduction de la pression artérielle moyenne, une diminution du débit cardiaque, une augmentation significative de la pression de remplissage ventriculaire gauche ainsi qu'une augmentation de la pression auriculaire droite. Après 3 semaines de stimulation seule l'activité sympathique (norepinephrine) plasmatique est élevée chez les animaux non insuffisants cardiaques. Dans un deuxième groupe d'animaux, après un délai moyen de 5.3 semaines de stimulation les chiens décompensent et l'activité sympathique ainsi que la rénine plasmatique sont élevées. Wilson *et al.* (1987) ont décrit un modèle canin d'insuffisance cardiaque par stimulation ventriculaire rapide caractérisé par une diminution importante du débit cardiaque, un dysfonctionnement biventriculaire de la pompe, une dilatation biventriculaire du cœur et un affaiblissement non ischémique de la contractilité du ventricule gauche. Les animaux stimulés présentent également une augmentation de la masse du ventricule droit mais pas de changement au niveau du

ventricule gauche. Des modèles similaires de stimulation ventriculaire rapide ont été également expérimentés chez le lapin (Masaki *et al.*, 1993) et le porc (Spinale *et al.*, 1991). Le modèle de stimulation ventriculaire chronique présente l'avantage de produire une insuffisance cardiaque chronique après quelques semaines seulement. Un des inconvénients majeurs de ce modèle est la réversibilité de l'insuffisance cardiaque après l'arrêt de la stimulation ce qui limite certaines interventions pharmacologiques à long terme sur ce modèle. Aussi, Helmer *et al.*, 1996 ont rapporté une ischémie myocardique relative durant la stimulation ventriculaire chez le porc ce qui pourrait contribuer au développement de l'insuffisance cardiaque.

La doxorubicine, un agent anticancéreux très efficace, induit malheureusement des cardiomyopathies et les patients décèdent d'insuffisance cardiaque. En effet, Mettler *et al.* (1977) ont rapporté que l'injection à des rats de doxorubicine à des doses de 1 à 2 mg/kg/semaine pendant 10 à 14 semaines provoque une cardiomyopathie 3 à 23 semaines après la dernière injection. Quarante à 70 % des rats cardiomyopathiques présentent des signes d'insuffisance cardiaque congestive (épanchement pleural, ascite, hépatomégalie et cardiomégalie). Dodd *et al.* (1993) ont également montré que l'injection intraveineuse 2 fois par semaine pendant 6 à 9 semaines de doxorubicine chez des lapins résulte en une insuffisance cardiaque probablement due à une diminution importante des récepteurs à la ryanodine, impliqués dans la relâche du  $Ca^{2+}$ . Ce modèle est très intéressant pour comprendre la cardiotoxicité de cet agent puisqu'il reproduit la cardiomyopathie induite par la doxorubicine chez l'homme.

Il est important de souligner que des modèles de myocardite expérimentale ont été rapportés avec des caractéristiques d'insuffisance cardiaque. C'est le cas de souris

inoculées avec un variant du virus de l'encéphalomyocardite développent une dilatation importante, un amincissement des chambres cardiaques et une insuffisance cardiaque congestive (Matsumori et Kawai, 1982). Ce modèle est utile pour élucider les mécanismes par lesquels le virus induit la cardiomyopathie.

### **1.2.1.3. Modèles par manipulations génétiques et transgéniques:**

Récemment, des études utilisant des techniques de ciblage génétique ont permis de générer des modèles d'hypertrophie et d'insuffisance cardiaques chez des souris en manipulant un gène spécifique. Ces études ont identifié et/ou confirmé des gènes impliqués dans des maladies cardiaques. C'est le cas, notamment, de souris transgéniques (Tg) présentant une mutation de l'Arg<sup>403</sup> en Gln dans le gène de la chaîne lourde de la myosine de type  $\alpha$  ( $\alpha$ -MHC). Les souris Tg présentent une hypertrophie cardiaque et une fibrose avançant avec l'âge (Geisterfer-Lowrance *et al.*, 1996). Ces souris qui miment l'hypertrophie cardiomyopathique familiale chez l'humain ont confirmé le rôle causal de mutations de la MHC qui avaient été associées à des cardiomyopathies congénitales pour MHC muté chez l'humain (Marian *et al.*, 1995). L'approche transgénique a également confirmé l'implication de certains récepteurs et molécules de signalisation dans l'hypertrophie cardiaque. Ainsi, des souris homozygotes pour le transgène décèdent 1 semaine après la naissance, alors que les souris hétérozygotes survivent jusqu'à 1 an. Aussi, des souris Tg surexprimant le gène *H-ras* dans les ventricules démontrent une hypertrophie cardiaque et une altération de la fonction diastolique du ventricule gauche (Hunter *et al.*, 1995). Gruver *et al.*, 1993 ont montré un phénotype d'hypertrophie cardiaque et une hyperplasie cardiaque à un stade précoce du développement, lorsqu'ils

surexpriment la calmoduline chez des souris. D'autre part, des souris Tg issues d'un croisement d'animaux Tg pour l'interleukine-6 (IL-6) et des souris Tg pour le récepteur de l'IL-6 présentent une activité constitutive de la gp-130 et exhibent une hypertrophie cardiaque et un épaississement de la paroi des ventricules (Hirota *et al.*, 1995). La surexpression d'une forme constitutivement active du récepteur  $\alpha_{1b}$ -adrénergique dans le cœur résulte en une hypertrophie cardiaque avec augmentation de l'ANF ventriculaire (Milano *et al.*, 1994). Enfin, la surexpression du récepteur  $\beta_1$ -adrénergique (Bisognano *et al.*, 2000) spécifiquement dans le cœur produit chez les souris Tg une hypertrophie marquée, une fibrose interstitielle et les animaux décèdent d'insuffisance cardiaque congestive. Aussi Adams *et al.* (1998) ont documenté une hypertrophie cardiaque chez des souris Tg qui surexpriment dans le cœur la sous-unité  $G\alpha_q$  alors que des souris Tg surexprimant une forme mutée constitutivement active de  $G\alpha_q$  ont un phénotype plus prononcé et développent une hypertrophie cardiaque qui rapidement progresse vers une apoptose des cardiomyocytes et insuffisance cardiaque. Enfin Bueno *et al.*, 2000 ont montré que la surexpression de MEK-1 dans le cœur de souris entraîne une hypertrophie cardiaque concentrique avec une augmentation de la fonction cardiaque sans signes de cardiomyopathie ou de léthalité au delà d'un an suggérant un rôle de la voie des MEK-1/ERK dans l'hypertrophie physiologique comme celle observée chez les athlètes.

Par ailleurs, Graham *et al.*, 1997 ont décrit, dans un modèle de souris déficientes (K.O.) pour l'isoforme musculaire (Muscle squelettique/cœur) du gène translocateur du nucléotide adénine (*adenine nucleotide translocator Ant1*), une hypertrophie cardiaque avec prolifération mitochondriale, des défauts des fibres musculaires squelettiques et une acidose métabolique. L'inactivation génique a également mis en évidence le rôle de

nouvelles protéines dans le développement pathologique du cœur. Aussi Arber *et al.* (1997) ont récemment décrit un phénotype d'hypertrophie et d'insuffisance cardiaques chez des souris déficientes en la protéine musculaire MLP (*Muscle LIM Protein*) qui est une protéine des muscles striés différenciés. Cette protéine est exprimée à des niveaux élevés dans le cœur adulte. Les souris déficientes en MLP ont des caractéristiques similaires à la cardiomyopathie dilatée idiopathique chez l'humain. Les animaux présentent un défaut important de l'organisation des myofibrilles dans les cardiomyocytes avec une hypertrophie des oreillettes et des ventricules ainsi qu'une dilatation du ventricule gauche progressant vers l'insuffisance cardiaque. Par ailleurs, l'inactivation complète du gène du transporteur de glucose GLUT4 chez des souris entraîne une hypertrophie cardiaque marquée, une réduction sévère de dépôt de graisses dans les tissus et les animaux meurent prématurément (Katz *et al.*, 1995). Cependant, l'inactivation ciblée de GLUT4 dans le cœur produit une hypertrophie cardiaque compensée avec une élévation de l'expression de l'ANF et du BNP (*Brain natriuretic peptide*) dans les ventricules mais les souris ne développent pas de fibrose (Abel *et al.*, 1999). Enfin des souris déficientes en carnitine au niveau systémique développent une hypertrophie cardiaque entre 2 et 3 mois d'âge et l'administration de carnitine permet de prévenir ce phénotype (Horiuchi *et al.*, 1993). Les modèles de souris transgéniques ont certains avantages très intéressants puisqu'ils permettent l'identification de nouveaux gènes causant l'insuffisance cardiaque. Ils peuvent être étudiés en grand nombre vue la relative rapidité de reproduction et la possibilité de croisements entre différents phénotypes afin d'observer, par exemple, le phénotype obtenu de la surexpression de 2 gènes différents.

Ces modèles permettent aussi l'étude de l'effet d'agents pharmacologiques à n'importe quel stade de la maladie.

### **I.2.2. Facteurs influençant le développement de l'hypertrophie cardiaque:**

Même si les maladies cardio-vasculaires représentent toujours la première cause de décès dans les pays développés, leur incidence a connu une baisse importante durant les 20 dernières années et ce grâce à une meilleure compréhension des facteurs de risque influençant le développement de l'hypertrophie et de l'insuffisance cardiaques. Parmi ces facteurs, on compte l'hypertension, le tabagisme, le manque d'exercice, un taux plasmatique élevé de cholestérol, le diabète et l'obésité (Levy *et al.*, 1988). Savage *et al.* (1990) ont montré dans l'étude Framingham entre 1979 et 1983 que l'âge, la pression artérielle et l'index de masse corporelle (mesure d'obésité) sont des facteurs de risque indépendants et corrélient significativement avec la masse du ventricule gauche, indice d'hypertrophie cardiaque, déterminée par échocardiographie dans une population d'hommes et de femmes d'âge moyen de 51 ans. Les auteurs ont conclu qu'une normalisation du poids corporel et de la pression artérielle pourrait contribuer à la prévention de l'hypertrophie cardiaque et de ses conséquences. D'autre part Gardin *et al.* (1987) ont rapporté l'influence de l'âge, du sexe, et de la surface corporelle sur le développement de l'hypertrophie cardiaque dans 2 groupes de personnes normales âgées et jeunes. Ils ont conclu que dans les 2 groupes les femmes ont une masse ventriculaire gauche légèrement inférieure à celle des hommes et que la masse ventriculaire gauche varie linéairement avec la surface corporelle et augmente avec l'âge.

Par ailleurs, les différences raciales ont également une influence sur l'hypertrophie cardiaque. Chapman *et al.* (1999) ont montré que la prévalence d'hypertrophie cardiaque est plus élevée chez les sujets hypertendus de race noire que ceux de race blanche.

D'autres facteurs génétiques héréditaires influencent le développement de l'hypertrophie cardiaque. En effet, Maron *et al.* (1984) ont étudié la transmission de la cardiomyopathie hypertrophique chez 367 sujets de 70 familles. Ils ont déterminé que la cardiomyopathie hypertrophique est transmise génétiquement dans 39 familles (56 %) et est probablement sporadique dans 31 familles (44 %). Parmi les 39 pédigrés avec une cardiomyopathie à composante familiale, 30 ont un patron héréditaire plus consistant d'une transmission autosomale dominante. Cependant, le patron de transmission génétique ne suit pas le concept de transmission Mendélienne d'un gène dans toutes les familles suggérant que qu'il n'existe pas un mode d'hérédité typique de l'hypertrophie cardiomyopathique même si la transmission autosomale dominante est la plus commune et que dans l'hypertrophie cardiomyopathique une variété d'expressions phénotypiques se produisent ayant aussi bien des causes génétiques que non génétiques ou idiopathiques.

Enfin Harshfield *et al.* (1990) ont exploré, les influences génétiques et environnementales dans le développement de l'hypertrophie ventriculaire gauche chez des jumeaux de race noire normotendus. La masse ventriculaire gauche a été mesurée par échocardiographie chez 7 paires de jumeaux monozygotiques et 15 paires de jumeaux dizygotiques, ajustée à la surface corporelle. L'étude suggérait que des facteurs génétiques ainsi qu'environnementaux sont des déterminants importants de la masse ventriculaire gauche indépendamment de l'âge, du sexe et de la pression artérielle.

### **I.2.3. Hypertrophie cardiaque et patron d'expression génique:**

L'hypertrophie cardiaque est une augmentation de la taille des cellules sans division, un phénomène d'adaptation employé par les cellules cardiaques postmitotiques caractérisé par une augmentation de leur contenu en protéines contractiles.

L'hypertrophie cardiaque récapitule un phénotype de reprogrammation génique par l'induction dans le myocarde de gènes à réponse immédiate dont les protooncogènes *c-fos*, *c-jun* et *c-myc* et les gènes des protéines du choc thermique (Hsp-70). Ces gènes sont dits à réponse immédiate puisque leur expression est augmentée dans les 30 minutes suivant l'exposition de cardiomyocytes à un stimulus hypertrophique (Izumo *et al.*, 1988; Komuro *et al.*, 1988).

Dans un deuxième temps le myocarde réinduit dans les ventricules le programme foetal à savoir une réexpression des gènes exprimés normalement durant la vie foetale. Ceci concerne le gène du facteur natriurétique auriculaire (ANF) qui est exprimé aussi bien dans les oreillettes que dans les ventricules durant la vie foetale mais qui est régulé négativement dans les ventricules après la naissance. Deux autres gènes, l' $\alpha$ -actine squelettique et l'isoforme  $\beta$  de la chaîne lourde de la myosine ( $\beta$ -MHC) sont aussi induits dans l'hypertrophie (Chien *et al.*, 1993; Hefti *et al.*, 1997).

Par ailleurs, l'expression de nombreux gènes se trouve modifiée durant l'hypertrophie cardiaque. En effet, certains gènes qui codent pour certains composants du SRA sont régulés positivement lors d'un stimulus hypertrophique comme l'Aog dont l'expression se trouve augmentée dans l'hypertrophie des cardiomyocytes induite par l'AIL (Sadoshima et Izumo, 1993 (b)) ou par l'étirement des cardiomyocytes (Tamura *et al.*, 1998).

Aussi, Ohtani *et al.* (1997) ont rapporté *in vivo* une augmentation de l'expression du gène du récepteur AT<sub>1</sub> dans des coeurs pathologiques humains et que cette surexpression est associée à une hypertrophie des cardiomyocytes et à une fibrose interstitielle.

D'autre part, l'hypertrophie cardiaque est souvent associée à la fibrose et l'augmentation de l'expression de certains gènes de facteurs de croissance a été documentée. C'est le cas notamment du facteur de croissance transformant TGF- $\beta$ 1 (*Transforming Growth Factor- $\beta$* ) dont l'expression est augmentée aussi bien *in vitro* suite à un stimulus hypertrophique des cardiomyocytes par l'Angiotensine II (Sadoshima et Izumo, 1993 (b)) que *in vivo* dans l'hypertrophie cardiaque induite par une constriction aortique (Li et Brooks, 1997).

Aussi l'expression du gène cardiaque IGF-I (*Insulin-like Growth factor I*) est induite dans l'hypertrophie cardiaque due à une surcharge de pression et l'IGF-I pourrait avoir un rôle dans la réponse à l'augmentation du stress de la paroi ventriculaire et contribuer à l'hypertrophie du cœur (Hanson *et al.*, 1993; Donohue *et al.*, 1994).

D'autre part, l'expression des gènes de certains facteurs de transcription cardiaques tels GATA-4 et Nkx-2.5 est élevée dans l'hypertrophie cardiaque suite à une stimulation  $\beta$ -adrénergique et ce de façon indépendante de la pression artérielle (Saadane *et al.*, 1999).

Aussi, l'expression d'un autre facteur de transcription MEF2 (*Myocyte Enhanced Factor 2*), nécessaire pour la différenciation de toutes les lignées musculaires, est augmentée durant l'hypertrophie cardiaque alors que des souris transgéniques exprimant un dominant négatif de MEF2C présentent un arrêt de croissance du myocarde après la naissance (Kolodziejczyk *et al.*, 1999).

Il a été noté également, dans l'hypertrophie cardiaque, que l'expression d'autres gènes impliqués dans certaines voies de signalisation est modifiée. C'est le cas notamment du

gène de la  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase du réticulum sarcoplasmique (SERCA) cardiaque qui contrôle le processus de relaxation myocardique. En effet, Hashida *et al.* (1999) ont montré que l'expression du gène SERCA est significativement diminuée de même que l'expression des gènes du phospholamban et des récepteurs à la ryanodine dans l'hypertrophie induite par une surcharge volumique résultant en un dysfonctionnement cardiaque. Ceci a été confirmé dans l'hypertrophie cardiaque suite à une surcharge de pression où l'expression du gène SERCA2 se trouve diminuée par une baisse de la transcription de ce gène (Takizawa *et al.*, 1999).

Étant donné le rôle important des canaux ioniques dans les phénomènes de contraction-excitation des fibres cardiaques, un dysfonctionnement de ces canaux ou une modification à la hausse ou à la baisse de l'expression de ces gènes peut résulter en une altération du fonctionnement du cœur. Ainsi, dans l'hypertrophie ventriculaire droite induite par une hypertension pulmonaire chez des rats, l'expression du gène des canaux  $\text{K}^+$  voltage-dépendants se trouve diminuée suggérant un rôle prépondérant de ces canaux dans l'altération de la repolarisation ventriculaire à un stade avancé de l'hypertrophie (Lee *et al.*, 1999). Aussi, Matsubara *et al.* (1993) ont examiné l'expression des gènes des canaux potassiques « Shaker-related » Kv1.4 qui est très augmentée et « delayed rectifier shaker » Kv1.5 qui est significativement diminué dans des cœurs hypertrophiés. Les niveaux d'expression de ces gènes reviennent à la normale après normalisation de l'hypertrophie ce qui suggère un contrôle non approprié de ces canaux potassiques dans les arythmies ventriculaires dans les cœurs hypertrophiés. Un autre gène dont l'expression est augmentée dans l'hypertrophie cardiaque est celui des canaux calciques  $\text{Ca}^{2+}$  de type T. En effet, l'expression de ce gène est observée seulement dans les cardiomyocytes

foetaux et néonataux et pas dans les cardiomyocytes adultes. Ainsi leur présence dans les cœurs hypertrophiés pourrait entraîner des arythmies spontanées (Nuss *et al.*, 1993). En outre, l'expression du gène de la  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase est diminuée par des mécanismes pré- et post -traductionnels dans l'hypertrophie ventriculaire gauche due à une hypertension reovasculaire chez les rats (Book *et al.*, 1994).

L'ostéopontine, étant identifiée dans des cultures de fibroblastes où elle contribue au remodelage induit par l'Angiotensine II et dans des macrophages dans le cœur avec inflammation, trouve son expression très élevée dans des cœurs hypertrophiés alors que des quantités à peine détectables sont observées dans les cœurs normaux. Ce qui suggère une forte association de l'ostéopontine avec l'hypertrophie ventriculaire (Graf *et al.*, 1997).

Finalement, l'augmentation de l'expression des gènes des isoformes  $\beta 1$ - et  $\beta 2$ -tubuline serait responsable de l'augmentation de la densité des microtubules des myofilaments et de l'hypertrophie cardiaque conséquente, suite à une surcharge de pression (Narishige *et al.*, 1999).

#### **I.2.4. Hypertrophie cardiaque et systèmes vasopresseurs :**

Outre le système rénine-angiotensine-aldostérone connu pour ses effets sur l'hypertrophie cardiaque et qui va être traité plus en détail ci après, plusieurs systèmes vasopresseurs contribuent au développement de l'hypertrophie cardiaque.

Le système adrénergique joue un rôle important dans l'hypertrophie cardiaque puisque c'est le premier système à être activé après un stimulus hypertrophique. En effet, les niveaux plasmatiques de catécholamines sont rapidement élevés dans plusieurs maladies cardio-vasculaires aussi bien chez les humains que dans des modèles expérimentaux.

Cependant, dans l'insuffisance cardiaque les niveaux de récepteurs  $\beta$ 1-adrenergiques (AR) sont diminués avec un découplage des récepteurs  $\beta$ 2-AR et une augmentation de l'activité fonctionnelle de la protéine G inhibitrice. Ces effets sont probablement dus à l'augmentation de l'activité sympathique cardiaque et des taux de neurotransmetteurs libérés dans le coeur durant la phase de compensation (Bristow *et al.*, 1990). Par ailleurs, il a été démontré que la stimulation de cardiomyocytes ventriculaires de rats adultes avec un agoniste des récepteurs  $\beta$ 1-AR (isoproterenol) a un effet hypertrophique, par un mécanisme indépendant de l'AMPc mais dépendant d'une tyrosine kinase et de l'ornithine décarboxylase (Schafer *et al.*, 2000). Aussi, Bogoyevitch *et al.*, 1996 ont montré une hypertrophie des cardiomyocytes de rats nouveaux-nés avec une stimulation de la synthèse protéique, une augmentation de l'activité du promoteur du gène de l'ANF et une activation des MAPK, suite à une stimulation des récepteurs  $\alpha$ 1-AR (phényléphrine et noradrénaline) et  $\beta$ -AR (isoprénaline) et que l'augmentation du  $\text{Ca}^{2+}$  apparaît importante dans l'activation des MAPK par l'agoniste  $\beta$ -AR, isoprénaline. L'induction d'hypertrophie cardiaque a été également rapportée *in vivo* dans des modèles animaux. Ainsi, la surexpression d'un récepteur  $\alpha_{1B}$ -AR constitutivement actif dans le coeur de souris transgéniques entraîne une hypertrophie cardiaque et une augmentation de l'expression du gène de l'ANF (Milano *et al.*, 1994) de même que la surexpression du récepteur  $\beta$ 1-AR dans le coeur de souris transgéniques produit une hypertrophie cardiaque massive ainsi qu'une fibrose interstitielle et une insuffisance cardiaque (Bisognano *et al.*, 2000). Malgré un effet bénéfique des bloqueurs des récepteurs adrenergiques dans l'hypertension et la regression de l'hypertrophie, il ne semble pas que ces agents aient un avantage supplémentaire sur les inhibiteurs de l'enzyme de conversion

et les antagonistes des récepteurs à l'AII et d'autres études sont nécessaires pour déterminer la place de la stimulation adrénergique dans la pathologie cardio-vasculaire.

Vers la fin des années 80, un nouvel agent vasoconstricteur, l'endothéline, un peptide de 21 acides aminés, a été isolé du supernatant de cultures de cellules endothéliales aortiques (Yanagisawa *et al.*, 1988). Trois peptides de l'endothéline provenant de trois gènes différents ont été identifiés jusqu'à présent, ET-1, ET-2 et ET-3, avec des affinités différentes pour les 2 types de récepteurs connus et exprimés dans plusieurs organes dont le coeur, ET<sub>A</sub> et ET<sub>B</sub>. L'endothéline-1 (ET-1) est considéré comme le plus puissant agent vasoconstricteur existant. En plus de son action pressive sur les vaisseaux, on attribue à l'ET-1 un effet inotrope positif direct sur l'oreillette gauche lié à un influx de Ca<sup>2+</sup> extracellulaire (Ishikawa *et al.*, 1988 (b)), un effet chronotrope positif en augmentant l'automatisme cardiaque (Ishikawa *et al.*, 1988 (a)) et un effet bronchoconstricteur puissant (Uchida *et al.*, 1988). L'ET-1 joue également un rôle important dans la physiopathologie de certaines maladies cardio-vasculaires puisqu'on a décelé des niveaux plasmatiques élevés d'ET-1 chez des patients atteints d'infarctus du myocarde (Stewart *et al.*, 1991), de cardiomyopathie dilatée (Hiroe *et al.*, 1991) et d'insuffisance cardiaque congestive symptomatique (Wei *et al.*, 1994). L'ET-1 a également des effets sur la croissance de cellules musculaires lisses des vaisseaux (Hirata *et al.*, 1989) et des fibroblastes (Takuwa *et al.*, 1989). Fait important, l'ET-1 a aussi un effet hypertrophique sur les cardiomyocytes de rats nouveaux-nés avec une augmentation de l'expression du protooncogène c-fos et du mRNA des protéines contractiles de la chaîne légère de la myosine MLC-2, de l' $\alpha$ -actine et de la troponine I, 6 heures après la stimulation et l'effet

est prolongé au delà de 24 h (Ito *et al.*, 1991). Il a également été rapporté que l'ET-1 stimule l'expression des MAPK dans des cardiomyocytes en culture (Bogoyevitch *et al.*, 1994).

Récemment, Yamazaki *et al.*(1996) ont montré que l'étirement des cardiomyocytes en culture entraîne une hypertrophie cardiaque ainsi qu'une augmentation de la sécrétion et de la production d'ET-1 dans le milieu de culture. Ces effets hypertrophiques sont complètement inhibés lors d'un traitement préalable par un antagoniste sélectif des récepteurs ET<sub>A</sub>, le BQ123, mais pas par un antagoniste des récepteurs ET<sub>B</sub>, le BQ788. En outre, l'ET-1 et l'AII activent de façon synergique la Raf-1 kinase et les MAPK dans les cardiomyocytes en culture suggérant un effet coopératif entre l'AII et l'ET-1 dans l'hypertrophie cardiaque induite par l'étirement mécanique. Ito *et al.* (1996) ont également décrit une hypertrophie des cardiomyocytes induite par une hypoxie modérée médiée partiellement par l'ET-1. Comme pour l'AII, l'ET-1 induit l'hypertrophie cardiaque durant la phase initiale, dans des modèles animaux *in vivo* de surcharge de pression, après sténose aortique (Ito *et al.*, 1994). Par contre, des animaux soumis à une surcharge de volume après régurgitation aortique et qui développent une hypertrophie excentrique ne montrent ni élévation du mRNA de préproendotheline-1, le précurseur de ET-1, ni augmentation de la concentration plasmatique de ET-1 (Yorikane *et al.*, 1994). D'autre part, il a été démontré qu'un inhibiteur mixte des récepteurs ET<sub>A</sub> et ET<sub>B</sub>, le Bosentan, inhibe l'hypertrophie cardiaque dans l'hypertension induite par le sel chez les rats alors qu'il a un faible effet sur la réduction de la pression artérielle (Karam *et al.*, 1996). Tamamori *et al.* (1996) ont montré que ET-3 peut également induire une hypertrophie des cardiomyocytes via une stimulation des récepteurs ET<sub>B</sub> et une relâche

de ET-1 par les cardiomyocytes. Finalement, Sakai *et al.* (1996) ont montré qu'un traitement prolongé avec un antagoniste des récepteurs à l'ET-1 améliore grandement la survie des rats insuffisants cardiaques chroniques.

L'arginine vasopressine (AVP), un neuropéptide vasoactif contrôlant le tonus vasculaire et stimulant la contractilité joue aussi un rôle dans la pathologie cardiovasculaire. Ainsi Geisterfer *et al.* (1989) ont montré que l'AVP entraîne une hypertrophie des cellules musculaires lisses aortiques en culture de rats. Depuis la découverte de l'effet hypertrophique de l'AVP sur les vaisseaux, d'autres études ont été menées pour déterminer si l'AVP pouvait avoir un effet hypertrophique cardiaque. En effet, Xu *et al.* (1999) ont montré que l'AVP entraîne une hypertrophie cardiaque dans les cardiomyocytes de rats nouveaux-nés d'une façon dépendante de la phospholipase C (PLC) par une augmentation de la synthèse protéique suite à une libération de  $Ca^{2+}$  du réticulum sarcoplasmique médiée par l'IP3. Ces études ont été confirmées par Nakamura *et al.* (2000) qui ont démontré que l'AVP accélère le taux de synthèse protéique dans des cardiomyocytes de rats nouveaux-nés en culture. L'exposition des cardiomyocytes à l'AVP induit une augmentation transitoire du  $Ca^{2+}$  intracellulaire avec un pic à 30 secondes et le taux de  $Ca^{2+}_i$  reste élevé pendant au moins 5 minutes. Autre observation intéressante, l'expression du proto-oncogène c-fos est augmentée après un traitement à l'AVP. Tous ces effets hypertrophiques de l'AVP sont inhibés par un antagoniste spécifique des récepteurs  $V_{1A}$ , le OPC-21268, alors que l'antagoniste des récepteurs  $V_2$  n'a aucun effet. Des modèles transgéniques surexprimant l'AVP dans le cerveau existent, et un modèle surexprimant l'AVP ou le récepteur  $V_{1A}$ , spécifiquement dans le cœur,

pourrait fournir des clarifications supplémentaires quant au rôle de l'AVP dans le développement de l'hypertrophie cardiaque *in vivo*.

Enfin le neuropeptide Y (NPY), un peptide de 36 acides aminés présent dans le cerveau, dans la médulla des glandes surrénales et dans les fibres nerveuses sympathiques périphériques, est souvent relâché avec une augmentation de l'activité sympathique (Walker *et al.*, 1991). A doses élevées le NPY induit une vasoconstriction et une augmentation de la pression artérielle. Millar *et al.* (1994) ont montré pour la première fois un effet hypertrophique du NPY sur les cardiomyocytes ventriculaires de rats adultes par une augmentation de la synthèse protéique. Goldberg *et al.* (1998) ont montré que le NPY induit cette hypertrophie via une activation d'une protéine G sensible à la toxine pertussique et une activation de la PI3-Kinase, de la PKC et des MAPK. Dans ce cas aussi, des études *in vivo* sont nécessaires pour clarifier le rôle du NPY dans l'hypertrophie cardiaque.

Quant au rôle du SRA et plus particulièrement l'AII dans le développement de l'hypertrophie cardiaque, il sera traité en détail dans la section 1.3.3.

### **I.3. Le système rénine-angiotensine:**

#### **I.3.1. Composantes du système rénine-angiotensine et rôle physiologique:**

Depuis la découverte de la rénine il y a plus d'un siècle, le rôle du système rénine-angiotensine (SRA) a été bien étudié dans la régulation de l'homéostasie cardiovasculaire et la physiopathologie. L'angiotensine II (AII), le peptide effecteur et actif du système étant produit suite à une cascade de clivages de ses précurseurs, possède différentes

actions physiologiques dont la première découverte est l'effet presseur et régulateur de la pression artérielle. En effet, au niveau périphérique, lors d'une baisse de la pression artérielle sentie par les barorécepteurs au niveau de l'artère afférente rénale, la rénine, enzyme produite par les cellules juxtaglomérulaires du rein, clive un l'Aog, produit majoritairement par le foie, en un décapeptide l'angiotensine I qui sera converti en l'octapeptide AII par l'enzyme de conversion de l'angiotensine (ECA). L'AII agit rapidement sur les fibres musculaires lisses pour augmenter la pression artérielle. Dans un deuxième temps, l'AII va agir sur les glandes surrénales pour stimuler la sécrétion de l'aldostérone, qui va agir sur les tubules proximaux pour réabsorber le sodium et l'eau et augmenter la volémie, qui contribue à une augmentation soutenue de la pression artérielle jusqu'à son retour à la normale (Figure 1).

L'AII peut être métabolisé sous l'effet d'une aminopeptidase en angiotensine III ou Ang [1-7], un héptapeptide qui pourrait médier certains effets de l'AII en agissant sur les récepteurs  $AT_2$  et probablement d'autres récepteurs atypiques  $AT_x$  (voir section 1.3.2.) (Figure 2). Sous l'effet d'angiotensinases, l'AIII est dégradé en peptides inactifs.

D'autres actions de l'AII ont, par la suite, été reconnues comme la stimulation du système adrénergique par l'augmentation de la sécrétion de catécholamines. En effet, il a été démontré que l'administration par voie intraveineuse d'AII chez des rats Sprague-Dawley entraîne une augmentation de la relâche de norépinéphrine dans la région antéro-ventrale du troisième ventricule cérébral alors que l'injection de phényléphrine n'a pas d'effet sur la relâche du neurotransmetteur (Bealer, 2000). L'AII agit aussi directement sur le cerveau pour augmenter la pression artérielle, stimuler la soif et stimuler la sécrétion de

la vasopressine, un autre peptide vasoactif, et l'hormone hypophysaire l'ACTH (Reid *et al.*, 1978).

La littérature est claire maintenant sur l'existence d'un SRA périphérique ou circulatoire, connu depuis longtemps comme étant un système endocrinien, et un SRA local ou tissulaire comme par exemple au niveau du cœur (Dzau, 1984, 1987; Campbell, 1987). En effet, plusieurs études ont démontré l'existence de composantes du SRA dans plusieurs tissus où les niveaux de AII peuvent être régulés de façon indépendante du SRA circulatoire. Grâce aux techniques de biologie moléculaire et d'immunohistochimie, il est clair que les gènes de la rénine, Aog, ECA, et des récepteurs à l'AII sont co-exprimés dans plusieurs organes (Ganten *et al.*, 1983, Brownfield *et al.*, 1982, Dzau *et al.*, 1987, Bunnemann *et al.*, 1992, Wagner *et al.*, 1996, Leung *et al.*, 1999) dont le coeur (Dostal *et al.*, 1992, Baker *et al.*, 1992, Dzau et Re, 1994, Zhang *et al.*, 1995, Danser *et al.*, 1997). Donc, l'AII peut être produite localement (de Lannoy *et al.*, 1998) et exercer des effets autocrine et paracrine. Jusqu'à récemment, il était admis que la présence de la rénine dans les tissus soit aussi bien due à une production locale (Dzau et Re, 1987) qu'à une séquestration de la circulation sanguine et liaison aux membranes (Loudon *et al.*, 1983; Danser *et al.*, 1997). Cependant, von Lutterotti *et al.* (1994) ont montré récemment que la rénine n'est pas synthétisée par le cœur et par les tissus vasculaires extrarénaux. D'autre part, van Kesteren *et al.* (1997) ont montré que des cardiomyocytes de rats nouveaux-nés peuvent lier et internaliser la rénine et son précurseur la prorénine via le récepteur du mannose 6-phosphate et que la prorénine était activée dans ces cellules. Il a également été montré que les granules de sécrétion de rénine dans les cellules juxtaglomérulaires contenaient de grandes quantités d'AII prouvant une production

intracellulaire du peptide effecteur (Cantin *et al.*, 1984; Mercure *et al.*, 1998). Des études de microscopie électronique ont montré la présence de AII dans les vésicules de sécrétion de cardiomyocytes ventriculaires de rat nouveau-nés (Sadoshima *et al.*, 1993 (a)).

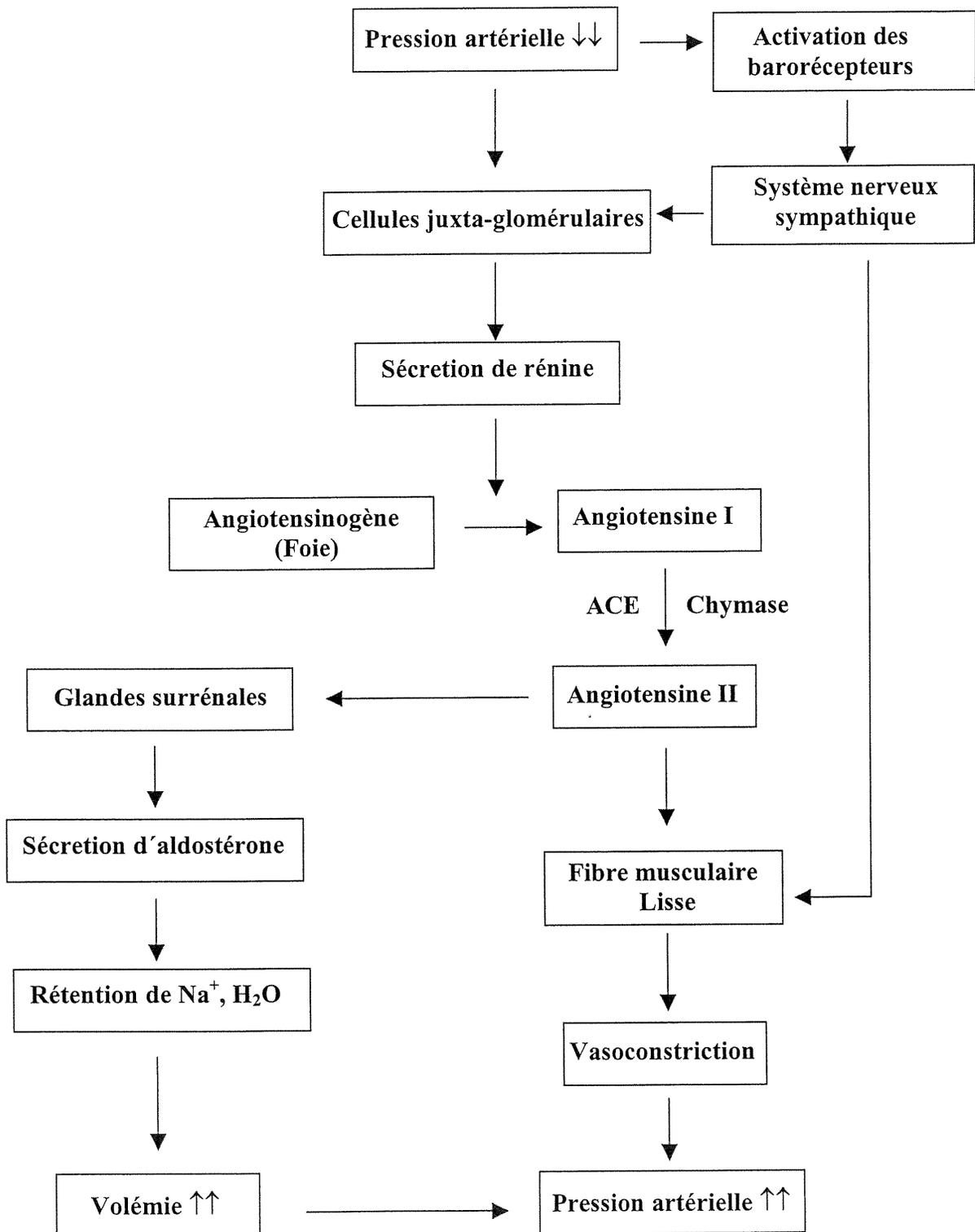
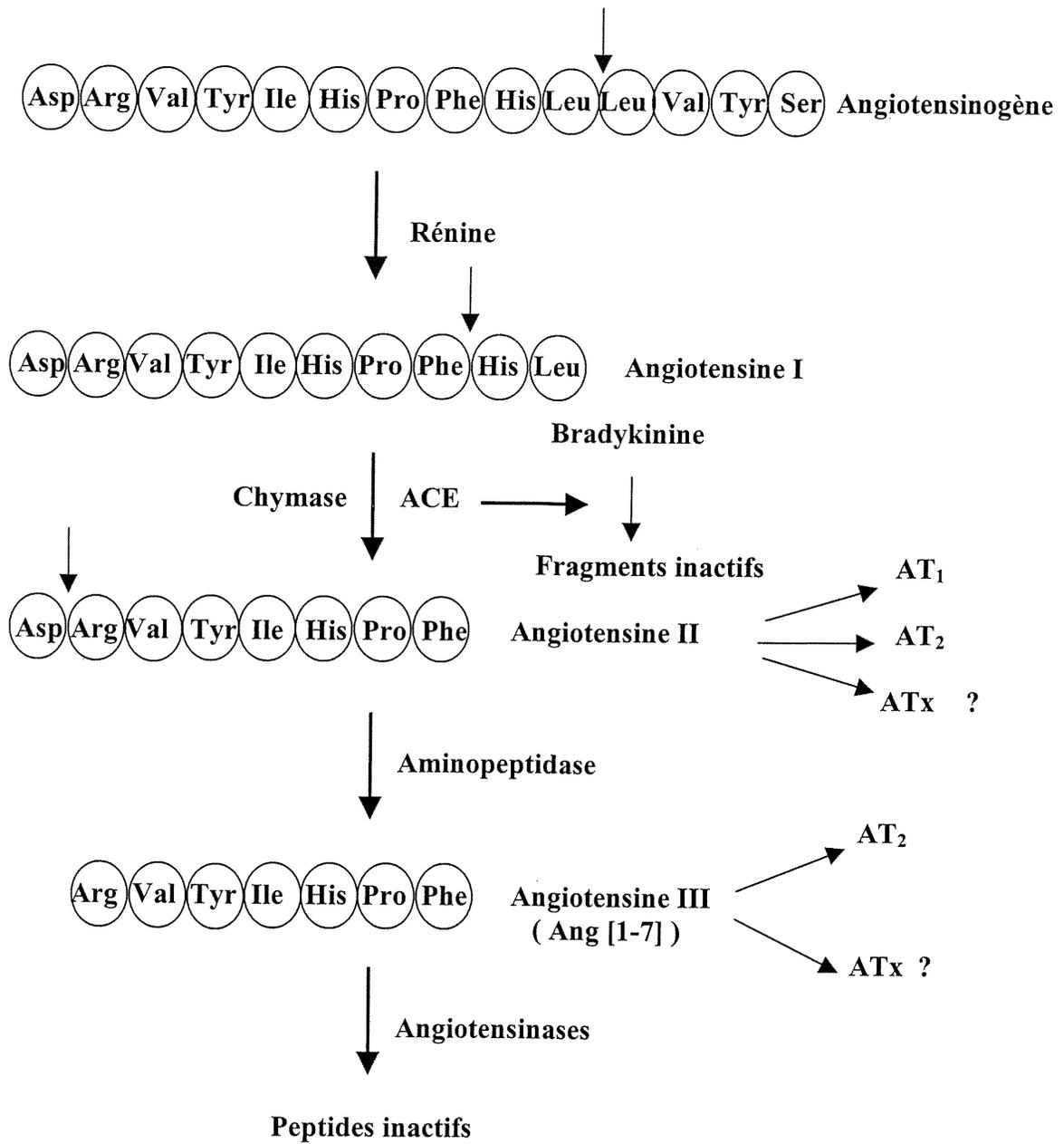


Figure 1. Rôle du système rénine-angiotensine dans la régulation de la pression artérielle.



**Figure 2.** Le système rénine angiotensine et production de son peptide effecteur l'angiotensine II

Enfin, il a été montré, qu'il existait d'autres composantes du SRA "non classiques" dont des sérine protéases comme la tonine et la cathepsine G qui pouvaient hydrolyser les précurseurs d'AII indépendamment de la rénine (Gondo *et al.*, 1989; Klickstein *et al.*, 1982; Ikeda *et al.*, 1988). Par exemple au niveau tissulaire ou local, la chymase cardiaque, une sérine protéase ayant une haute spécificité pour l'AI sans dégrader la bradykinine, pourrait être responsable de la conversion de l'AI en AII dans les ventricules cardiaques canins et humains (Urata *et al.*, 1990). Chez l'humain, les niveaux de ECA sont plus élevés dans les oreillettes alors que ceux de la chymase sont majoritaires dans les ventricules suggérant que ces 2 enzymes pourraient participer à la formation de l'AII dans différentes régions du coeur (Urata *et al.*, 1993). Balcells *et al.* (1997) ont montré que la chymase prédomine l'ECA dans la formation de l'AII dans des membranes de ventricules humains en comparaison avec le chien, le rat, la souris et le lapin. Cependant, Studer *et al.* (1994) ont rapporté que l'expression du gène ECA est augmentée de 3 fois chez des patients en insuffisance cardiaque congestive en comparaison à des sujets normaux alors que l'expression du gène de la chymase restait inchangée ce qui suggèrerait un rôle pour ECA, plutôt que la chymase, dans la pathologie cardiaque.

L'inactivation (*knock-out*) des gènes qui codent pour les différents composants du SRA a permis de définir le rôle physiopathologique de chaque molécule sur le coeur et d'autres tissus pertinents. En effet, Tanimoto *et al.* (1994) ont montré que des souris déficientes en Aog exhibent une réduction de 33 % de la pression artérielle systolique ce qui démontre un rôle essentiel de l'Aog dans le maintien de la pression artérielle. En plus de

la sévère hypotension observée, ces souris ont un retard de croissance ainsi qu'une dysfonction rénale due à des lésions vasculaires et tubulaires sévères au niveau du rein. D'autre part, Yanai *et al.* (2000) ont montré que l'inactivation complète du gène de la rénine résulte en une absence de détection de l'activité rénine plasmatique et de l'AI, une diminution de la pression artérielle de 20 à 30 mmHg par rapport aux animaux contrôles, une polydypsie, une polyurie et une altération de la morphologie rénale comparable à celle observée chez les souris Aog *-/-*. Dans cette étude, afin de prévenir la mort des nouveaux-nés dans la première semaine de la vie, l'injection de saline aux nouveaux nés était indispensable. Cependant, la fonction de la barrière hémato-encéphalique chez ces souris n'est pas altérée comme dans le cas des souris Aog *-/-* suggérant que d'autres enzymes pourraient maturer l'Aog dans le cerveau. Aussi, Sumida *et al.* (1998) ont démontré une augmentation significative des récepteurs AT<sub>1</sub> cardiaques de souris Aog *-/-* qui ne produisent pas d'AII circulant et qui sont hypotendues alors que les niveaux d'AT<sub>2</sub> augmentent légèrement mais pas significativement par rapport aux souris contrôles Aog *+/+*. Ceci suggère que l'absence d'AII circulant pourrait réguler positivement les récepteurs AT<sub>1</sub> par des mécanismes traductionnels et/ou post-traductionnels.

Par ailleurs, des études d'inactivation d'un seul gène de rénine dans certaines souches de souris qui en contiennent deux résultent en une légère diminution de la pression artérielle chez les femelles Ren-1<sup>d</sup> *-/-* mais pas chez les mâles et une altération de la morphologie de la macula densa du tubule distal du rein ainsi qu'une absence complète de la granulation des cellules juxtaglomérulaires (Clark *et al.*, 1997). Des souris déficientes en Ren-2 ne montrent ni changement de pression artérielle ni altération histopathologique

par rapport à leurs contrôles ce qui suggère une redondance du gène Ren-1<sup>d</sup> capable de maintenir une pression artérielle normale (Sharp *et al.*, 1996).

D'autre part, l'inactivation du gène de l'ECA chez des souris homozygotes (-/-) résulte en une diminution marquée de la pression artérielle, des anomalies sévères du rein et une diminution de la fertilité des mâles (Krege *et al.*, 1995; Esther *et al.*, 1996). Dans un cas, les mâles hétérozygotes ont une légère diminution de la pression de 15 à 20 mmHg (Krege *et al.*, 1995) alors que dans l'étude d'Esther *et al.* (1996) les mâles hétérozygotes avaient une pression artérielle normale. La légère diminution de la pression artérielle chez les mâles hétérozygotes dans le premier cas pourrait s'expliquer par l'utilisation d'une lignée de cellules souches embryonnaires 129 dont le gène de la rénine est sensible aux androgènes, ce qui n'est pas le cas de la lignée C57BL/6J.

D'autre part, Sugaya *et al.* (1995) ont montré que l'inactivation du gène du récepteur à l'AII de type 1a (AT<sub>1a</sub>) entraîne une hypotension chronique aussi bien chez les souris homozygotes que chez les hétérozygotes (diminution de 22 mmHg et 10 mmHg respectivement par rapport au contrôles) ainsi qu'une augmentation marquée de la rénine plasmatique. La légère diminution de la pression artérielle pourrait être expliquée par la présence du récepteur AT<sub>1b</sub> qui pourrait compenser pour la perte de l'AT<sub>1a</sub> et réguler la pression artérielle. En effet, Oliverio *et al.* (1997) ont montré que l'infusion d'AII chez les souris AT<sub>1a</sub> -/- prétraitées à l'énalapril (IECA) entraîne une augmentation significative et dose-dépendante de la pression artérielle moyenne. Cette réponse n'est pas bloquée par le prétraitement des souris avec un agent sympatholytique alors qu'elle est complètement inhibée par le prétraitement avec un antagoniste AT<sub>1</sub>, le losartan et le candesartan suggérant que l'effet presseur de l'AII est directement médié par les

récepteurs AT<sub>1b</sub>. L'inactivation du gène AT<sub>1b</sub> n'a aucun phénotype et les souris sont normales. Cependant, l'inactivation des 2 gènes AT<sub>1a</sub> et AT<sub>1b</sub> résulte en un phénotype prononcé identique à celui des souris Aog<sup>-/-</sup> qui ne synthétisent pas d'AII, à savoir, une croissance diminuée, un épaissement des vaisseaux du reins et une atrophie de la médulla rénale ainsi qu'une diminution marquée de la pression artérielle (Oliverio *et al.*, 1998). Ces souris ne répondent pas à l'infusion d'AII alors qu'elles répondent normalement à un autre agent vasoconstricteur, l'épinéphrine. Paradoxalement, l'administration d'IECA entraîne une augmentation de la pression artérielle chez les souris doublement déficientes en AT<sub>1a</sub> et en AT<sub>1b</sub> suggérant une interruption de la signalisation des récepteurs AT<sub>2</sub> et une régulation négative de la pression artérielle par AT<sub>2</sub>. Afin de comprendre mieux le rôle physiopathologique de ce dernier, Ichiki *et al.* (1995) ont généré des souris déficientes en récepteurs AT<sub>2</sub>. Les animaux AT<sub>2</sub><sup>-/-</sup> ont une élévation significative de la pression artérielle et une augmentation de la sensibilité à l'effet presseur de l'AII par rapport aux souris contrôles ce qui suggère que AT<sub>2</sub> contrebalance les effets de AT<sub>1</sub> dans la régulation de la pression artérielle. Les souris AT<sub>2</sub><sup>-/-</sup> présentent également un trouble du comportement explorateur et une température corporelle plus basse par rapport à leurs contrôles. Sakagawa *et al.* (2000) ont montré chez ces mêmes souris une diminution significative du seuil de la douleur c'est à dire une augmentation de la sensibilité à la douleur et une diminution des niveaux de bêta-endorphine dans le cerveau par rapport aux animaux contrôles. Enfin Okuyama *et al.* (1999) ont montré que les souris AT<sub>2</sub><sup>-/-</sup> présentent un comportement anxieux par rapport aux contrôles et qu'un anxiolytique (Diazepam), un antagoniste  $\alpha$ 1-adrénergique

(prazosine) et un IECA (captopril) renversent ce comportement suggérant une médiation noradrénergique dans ce comportement chez les souris AT<sub>2</sub> -/-.

### **I.3.2. L'angiotensine II et ses récepteurs:**

Il existe 2 types majeurs de récepteurs à l'angiotensine II (AII) qui ont été bien caractérisés jusqu'à présent nommément le récepteur de type 1 (AT<sub>1</sub>) et celui de type 2 (AT<sub>2</sub>) selon la nomenclature de la NCCHBP (Nomenclature Committee of the Council for High Blood Pressure) (Bumpus *et al.*, 1991; deGasparo *et al.*, 1995). Cependant, l'existence de 2 autres récepteurs AT<sub>3</sub> et AT<sub>4</sub> a été rapportée basée sur des études de liaison mais ces récepteurs n'ont pas été caractérisés sur le plan moléculaire et leur fonction reste encore mal connue. Tel que discuté dans la partie précédente, la plupart des effets de l'AII dans l'organisme sont médiés par l'AT<sub>1</sub> alors que la fonction de l'AT<sub>2</sub> reste encore mal définie mais semble antagoniser les effets de l'AT<sub>1</sub>. Les récepteurs AT<sub>1</sub> et AT<sub>2</sub> vont être décrits de façon parallèle dans cette section.

#### **I.3.2.1. Structure et distribution tissulaire:**

Les récepteurs AT<sub>1</sub> et AT<sub>2</sub> appartiennent à la famille des récepteurs à 7 domaines transmembrannaires couplés à des protéines G de type Gq. Le cDNA du récepteur AT<sub>1</sub> a été cloné pour la première fois à partir d'une bibliothèque de cDNA de cellules de muscle vasculaire lisse de rat (Murphy *et al.*, 1991). Le cDNA code pour une protéine de 359 acides aminés et de poids moléculaire d'environ 41 kDa. Les cDNA codant pour AT<sub>1</sub> ont été clonés chez l'humain (Bergsma *et al.*, 1992; Furuta *et al.*, 1992; Takayanagi *et al.*,

1992), le lapin (Burns *et al.*, 1993) et le porc (Itazaki *et al.*, 1993). Il existe actuellement 2 sous-types du récepteur AT<sub>1</sub> qui ont été isolés et bien caractérisés AT<sub>1a</sub> et AT<sub>1b</sub> (Elton *et al.*, 1992; Sasamura *et al.*, 1992; Kakar *et al.*, 1992). Les deux sous-types AT<sub>1a</sub> et AT<sub>1b</sub> qui présentent 94 % d'homologie de séquence ont été identifiés seulement chez la souris et le rat et présentent les mêmes propriétés pharmacologiques de liaison et de couplage avec l'effecteur.

Les gènes des récepteurs AT<sub>1a</sub> et celui de l'AT<sub>1b</sub> de rat sont situés sur le chromosome 17 et 2, respectivement et contiennent 3 exons et 4 introns. La région codante se trouve dans le 3<sup>ème</sup> exon (Szpirer *et al.*, 1993). Les gènes AT<sub>1a</sub> et AT<sub>1b</sub> de souris sont situés sur les chromosomes 13 et 3 respectivement (MacTaggart *et al.*, 1997). Le gène AT<sub>1</sub> humain est situé sur le chromosome 3 et contient 4 ou 5 exons (Gemmell *et al.*, 1991). Cette affectation chromosomique des gènes pourrait avoir un intérêt particulier afin de comprendre la génétique de l'hypertension artérielle.

Le récepteur AT<sub>2</sub> a été cloné à partir d'une bibliothèque cDNA de rat fœtal (Mukoyama *et al.*, 1993) et de cellules PC12W (Kambayashi *et al.*, 1993), et plus tard chez l'humain (Martin *et al.*, 1994). Le récepteur AT<sub>2</sub> partage 34 % d'homologie de séquence avec l'AT<sub>1</sub>. Les récepteurs AT<sub>2</sub> murin et humain présentent 92 % d'homologie de séquence avec l'AT<sub>2</sub> de rat. Le gène de l'AT<sub>2</sub> est situé sur le chromosome X (Koike *et al.*, 1994), contient 3 exons, et la région codante se trouve dans l'exon 3 (Ichiki *et al.*, 1995). Il code pour une protéine de 363 acides aminés de poids moléculaire de 41 kDa.

Le récepteur AT<sub>1</sub> contient une partie extracytoplasmique comprenant une extrémité N-terminale et 3 boucles extracellulaires contenant chacune 4 résidus cystéine servant à former des ponts disulfures qui stabilisent la structure tertiaire du récepteur (Griendling *et*

*al.*, 1996) et 3 boucles intracellulaires (Figure 3A). L'extrémité carboxy-terminale est riche en résidus sérine et thréonine servant de sites de phosphorylation potentiels pour des kinases comme les kinases de protéines G (GRK) et la protéine kinase C (PKC).

Le récepteur AT<sub>2</sub> appartient également à la famille des récepteurs à 7 domaines transmembrannaires de structure similaire au AT<sub>1</sub> avec 3 boucles extracellulaires et une extrémité N-terminale plus longue contenant 5 sites de N-glycosylation (Figure 3B). La partie extracellulaire contient 6 résidus cystéine additionnels par rapport à l'AT<sub>1</sub>. La lysine 199, essentielle pour les interactions ligand-récepteur, est conservée dans les récepteurs AT<sub>2</sub> et AT<sub>1</sub> (Yamano *et al.*, 1992). La portion intracellulaire comprend 3 boucles intracytoplasmiques et une extrémité C-terminale. La 2<sup>ème</sup> boucle intracellulaire contient un site potentiel de phosphorylation par PKC et la queue intracytoplasmique contient des séquences consensus de phosphorylation par PKA.

Chez les rongeurs, les récepteurs AT<sub>1a</sub> et AT<sub>1b</sub> sont exprimés de façon comparable dans le foie, les reins et la rate (Kakar *et al.*, 1992a; Sandberg *et al.*, 1992). L'expression de l'AT<sub>1a</sub> est majoritaire dans le muscle, le coeur, les poumons et le cerveau alors que l'expression de l'AT<sub>1b</sub> est plus élevée dans l'hypophyse et les glandes surrénales (Kakar *et al.*, 1992; Sandberg *et al.*, 1992; Kitami *et al.*, 1992; Iwai *et al.*, 1992). Pour ce qui est du récepteur AT<sub>2</sub>, le profil d'expression change durant le développement, son expression est élevée durant la vie foetale (Grady *et al.*, 1991) puis diminue considérablement après la naissance (Viswanathan *et al.*, 1991). Mukoyama *et al.* (1993) ont montré par analyse « northern blot » la présence d'ARN messagers dans le cerveau et l'utérus, alors que de

faibles niveaux de transcrits sont détectables par réaction de polymérisation en chaîne inverse (RT-PCR) dans le coeur, le foie, les reins et les poumons (Ichiki *et al.*, 1995).

### **I.3.2.2. Pharmacologie des récepteurs AT<sub>1</sub> et AT<sub>2</sub>:**

Les récepteurs AT<sub>1</sub> et AT<sub>2</sub> lient l'AII avec une affinité équivalente mais diffèrent par leurs propriétés pharmacologiques, en particulier leur sélectivité pour les antagonistes. En effet, l'AT<sub>1</sub> présente une affinité élevée pour les composés non peptidiques biphénylimidazoles dont le losartan est le chef de file, et une faible affinité pour les composés de type tétrahydroimidazopyridines (PD123177). L'AT<sub>2</sub> présente le profil inverse c'est à dire une grande affinité pour le PD123177 et une faible affinité pour le losartan. Ces récepteurs lient l'AI et l'AII avec une affinité plus grande que l'AIII, et lient des antagonistes non sélectifs Sar1-Ile8-Ang II et Sar1-Ala8-Ang II. Les récepteurs AT<sub>1</sub> trouvent leur affinité et leur capacité de liaison diminuées par des agents réducteurs sulfhydryl comme le dithiothreitol (Chiu *et al.*, 1989), mais l'inverse se produit pour les AT<sub>2</sub> (Ohnishi *et al.*, 1994). La liaison de l'agoniste aux récepteurs AT<sub>1</sub> est grandement affectée par le GTP (Speth *et al.*, 1990) alors que les analogues du GTP n'ont aucun effet sur l'AT<sub>2</sub>. Les principales caractéristiques des récepteurs AT<sub>1</sub> et AT<sub>2</sub> sont résumées dans le tableau 2.

**Tableau 2.** Caractéristiques différentielles entre les sous-types de récepteurs à l'AII.

Récepteurs	AT <sub>1a</sub>	AT <sub>1b</sub>	AT <sub>2</sub>
Structure	7 domaines TM 359 acides aminés 40 855 Da	7 domaines TM 359 acides aminés 40 949 Da	7 domaines TM 363 acides aminés 41 220 Da
Gène (rat)	3 exons, 4 introns Chromosome 17	3 exons, 2 introns Chromosome 2	3 exons Chromosome X
Gène (humain)	4 ou 5 exons Chromosome 3	4 ou 5 exons Chromosome 3	3 exons Chromosome X
Distribution	foie, reins, cœur, cerveau fibre muscul. lisse des vaisseaux, poumon	surrénales, hypophyse cœur	cerveau, tissus foetaux
Ligands	AII > AIII	AII > AIII	AII > ou = AIII
Antagonistes	biphénylimidazoles (losartan, valsartan, ...)	biphénylimidazoles (losartan, valsartan, ...)	tetrahydroimidazopyridines (PD123177, PD123319, ...)
Effet du DTT	liaison ↓↓	liaison ↓↓	liaison ↑↑
Sensibilité au GTP	affinité ↓↓	affinité ↓↓	pas d'effet
Couplage	Gi, Gq	Gi, Gq	Gi ou G <sub>0</sub>
Effecteurs	phospholipase C ↑↑ Phospholipase D ↑↑ Phospholipase A <sub>2</sub> ↑↑ Adénylate cyclase ↓↓ Canaux calciques Voltage-dépendants ↑↑	idem AT <sub>1a</sub>	Phosphotyrosine- phosphatases ↑ guanylate cyclase ↓ canaux potassiques ↑
Effets biologiques	vasoconstriction croissance	vasoconstriction croissance	vasodilatation apoptose



### I.3.2.3. Voies de signalisation des récepteurs à l'angiotensine II:

La voie de transduction du signal des récepteurs AT<sub>1a</sub> et AT<sub>1b</sub> est médiée généralement par une protéine Gq/11 dont l'activation stimule le Ca<sup>2+</sup> intracellulaire et les systèmes dépendants de la protéine kinase C (PKC) (Inagami *et al.*, 1999). La voie de signalisation du récepteur AT<sub>2</sub> semble impliquer une protéine Gi et des protéines phosphatases de type phosphotyrosine (Hayashida *et al.*, 1996).

Le récepteur AT<sub>1</sub> peut être couplé à plusieurs effecteurs. En effet, selon le type cellulaire, les récepteurs AT<sub>1</sub> peuvent activer les phospholipases A<sub>2</sub>, C et D, les canaux calciques voltage-dépendants et inhiber l'adénylate (Ohnishi *et al.*, 1992). Des études de mutagenèse dirigée ont montré que le couplage de AT<sub>1</sub> à la protéine G s'effectue au niveau des deuxième et troisième boucles intracellulaires ainsi qu'à l'extrémité C-terminale de la queue cytosolique (Ohyama *et al.*, 1992).

Le couplage de l'AT<sub>1</sub> à la phospholipase C (PLC)  $\beta$  résulte en la génération de seconds messagers à partir de l'hydrolyse du phosphoinositol-4,5 biphosphate (PIP<sub>2</sub>) en inositol-1,4,5 triphosphate (IP<sub>3</sub>) et en diacylglycérol (DAG). L'IP<sub>3</sub> entraîne une augmentation du Ca<sup>2+</sup> intracellulaire, à partir des réserves du réticulum endoplasmique, stimulant ainsi les kinases dépendantes de la calmoduline (CADKinase) ainsi que la PKC, alors que le DAG ne stimule que cette dernière (Brock *et al.*, 1985, Griendling *et al.*, 1986). Les CADK et PKC médient des fonctions cellulaires spécifiques comme la contraction ou la croissance cellulaire. Le DAG peut aussi être le produit du couplage AT<sub>1</sub>-PLD qui hydrolyse la phosphatidylcholine (PC) en acide phosphatidique (PA) et en choline. Le PA est ensuite converti en DAG (Lassègue *et al.*, 1991). Le récepteur AT<sub>1</sub> peut également être couplé à la PLC $\gamma$  par phosphorylation sur une tyrosine (Marrero *et al.*, 1994) et ce de façon

indépendante d'une protéine G. En outre, l'AT<sub>1</sub> peut être couplé à la PLA<sub>2</sub> qui hydrolyse la PC en acide arachidonique qui est ensuite métabolisé en prostaglandines par la cyclooxygénase, en leucotriènes par la lipooxygénase et en dérivés dihydroxylés et époxy par le cytochrome P450 (Rao *et al.*, 1994). D'autres seconds messagers ont été impliqués, parmi lesquels l'AMPc dont la production se trouve diminuée, ce qui suggère une inhibition de l'adénylate cyclase via un couplage AT<sub>1</sub>-G<sub>0i</sub> (Pobiner *et al.*, 1985; Anand-Srivastava, 1989).

Il a également été démontré que la stimulation de l'AT<sub>1</sub> peut entraîner la phosphorylation sur résidus tyrosine des protéines cellulaires impliquées dans la croissance cellulaire, dont les MAPK (Mitogen Activated Protein Kinase) (Inagami *et al.*, 1999). D'autres kinases comme les Janus Kinases (JAK2), qui activent les facteurs activateurs de la transcription STAT1 et STAT3, peuvent être stimulées par AT<sub>1</sub> (McWhinney *et al.*, 1997).

Quant aux récepteurs AT<sub>2</sub>, il a été montré qu'ils contrebalançaient les effets de la stimulation de l'AT<sub>1</sub> et il est clairement établi actuellement que le récepteur AT<sub>2</sub> est couplé à une protéine G<sub>i</sub> ou G<sub>0</sub> et produit l'activation d'une ou plusieurs protéines phosphotyrosine phosphatases qui inhibent l'activité des P42 et P44 MAPK communément appelées ERK pour *Extracellular Related Kinase* (Yamada *et al.*, 1998 (a)). La 3<sup>ème</sup> boucle intracellulaire de l'AT<sub>2</sub> jouerait un rôle important dans la stimulation des phosphotyrosine phosphatases. Bottari *et al* (1992) ont rapporté que le récepteur AT<sub>2</sub> médie l'inhibition de la guanylate cyclase et diminue ainsi la production de GMPc. Enfin, Kang *et al* (1994) ont montré que la stimulation des récepteurs AT<sub>2</sub> dans des cultures de cellules neuronales activait les canaux potassiques.

#### I.3.2.4. Régulation des récepteurs AT<sub>1</sub> et AT<sub>2</sub> :

Etant donné que AT<sub>1</sub> médie la plupart des effets physiologiques de l'AII, la régulation de son expression a des effets importants sur le système cardiovasculaire. Il a été démontré, par des essais de liaison, que l'AT<sub>1</sub> pouvait être régulé négativement par l'AII dans des vaisseaux de résistance (Gunther *et al.*, 1980). L'AII peut également diminuer l'expression du récepteur AT<sub>1</sub> par des mécanismes transcriptionnels et post-transcriptionnels (Lassègue *et al.*, 1995). La transcription de l'AT<sub>1</sub> est régulé positivement par des facteurs de croissance de type EGF (*Epidermal growth factor*) probablement via le facteur de transcription PEA3 qui lie le promoteur de AT<sub>1</sub> humain (Guo *et al.*, 1994). D'autre part, le traitement de cellules musculaires lisses vasculaires par l'insuline entraîne une augmentation de l'expression et de la densité des récepteurs AT<sub>1</sub>, par des mécanismes posttranscriptionnels, ce qui pourrait expliquer le lien entre l'hyperinsulinémie et l'hypertension (Nickenig *et al.*, 1998 (a)). Une régulation négative des récepteurs AT<sub>1</sub>, par les oestrogènes, a aussi été mise en évidence *in vivo* et *in vitro*. Ainsi, l'expression des récepteurs AT<sub>1</sub> est augmentée chez des rats ovariectomisés (déficients en oestrogènes), et un traitement de ces rats par des oestrogènes entraîne un retour à la normale de l'expression des AT<sub>1</sub>. *In vitro*, le traitement de cellules musculaires lisses vasculaires de rats avec des oestrogènes (oestradiol, 1 µM) entraîne une diminution des ARN messagers et de la densité des récepteurs AT<sub>1</sub> (Nickenig *et al.*, 1998 (b)). Ceci pourrait expliquer le lien entre l'hypertension et la déficience en oestrogènes.

D'autre part, l'expression des récepteurs à l'AII est également régulée dans des conditions pathologiques. Lors d'une surcharge de pression, le promoteur du récepteur

AT<sub>1a</sub> est induit dans le coeur et les facteurs de transcription AP1 et GATA sont requis pour cette activation du promoteur (Herzig *et al.*, 1997). Dans des modèles de remodelage cardiaque dû à l'hypertrophie cardiaque (Suzuki *et al.*, 1993), à l'infarctus du myocarde (Nio *et al.*, 1995) et aux cardiomyopathies, le récepteur AT<sub>1</sub> est surexprimé. Par contre, chez des hamsters cardiomyopathiques en insuffisance cardiaque (Ohkubo *et al.*, 1997) et chez des humains souffrant de cardiomyopathie avec insuffisance cardiaque (Tsutsumi *et al.*, 1998), l'expression de AT<sub>1</sub> se trouve diminuée alors que celle de AT<sub>2</sub> augmente dans les zones de fibrose. En outre, Haywood *et al.* (1997) ont démontré que chez des humains en insuffisance cardiaque le ratio AT<sub>1</sub>/AT<sub>2</sub> est diminué, l'AT<sub>1</sub> étant diminué alors que l'AT<sub>2</sub> ne change pas.

Comme c'est le cas pour les récepteurs β-adrenergiques, les récepteurs de l'AII peuvent être désensibilisés provisoirement par la présence de sites potentiels de phosphorylation des *G-protein Receptor kinases* (GRK) au niveau de la queue C-terminale cytosolique (Tang *et al.*, 1998). Le récepteur AT<sub>1</sub> peut être internalisé lorsque la stimulation par l'AII est prolongée. Ceci a été démontré au moyen de radioligands (Ullian *et al.*, 1989; Griendling *et al.*, 1987) et par microscopie électronique (Anderson *et al.*, 1993). Environ 25 % des récepteurs internalisés sont recyclés à la membrane et le reste est dégradé dans des lysosomes. Après le lavage de l'agoniste, le retour du récepteur à la surface se fait avec une demi-vie de 15 minutes (Griendling *et al.*, 1997).

### **I.3.3. Le système rénine-angiotensine et l'hypertrophie cardiaque :**

L'hypertrophie cardiaque n'est pas seulement un phénomène d'adaptation à une surcharge de travail du coeur mais est considérée comme un facteur de risque important

de mortalité par insuffisance cardiaque. La contribution du système SRA dans le développement de l'hypertrophie cardiaque est bien établie et le nombre d'articles publiés à ce jour sur ce sujet sont nombreux. Plusieurs études *in-vitro* et *in-vivo* ont démontré le rôle de l'AII dans l'hypertrophie cardiaque et le remodelage pathologique.

Ainsi certains rapports ont démontré que les inhibiteurs de l'enzyme de conversion (IECA) et les antagonistes des récepteurs AT1 peuvent prévenir le développement de l'hypertrophie cardiaque et induire sa régression dans des modèles expérimentaux (Baker *et al.*, 1990) et chez des patients hypertendus (Dahlof *et al.*, 1992).

Il a aussi été montré que le système RAS est activé dans le cœur suite à une surcharge hémodynamique et le cœur s'adapte en s'hypertrophiant. En effet, l'activité de l'ECA et son expression au niveau du mRNA sont augmentées dans des cœurs hypertrophiés de rats après une surcharge de pression (Schunkert *et al.*, 1990) ou une surcharge volumique, dans laquelle l'expression du gène de la rénine était aussi augmentée (Iwai *et al.*, 1995). Ainsi l'induction tissu-spécifique du gène ACE pourrait contribuer aux effets délétères du système SRA dans les maladies cardio-vasculaires. Dans le modèle d'hypertrophie induite par une surcharge de pression l'expression des gènes de l'Aog et des récepteurs AT<sub>1a</sub> et AT<sub>1b</sub> est augmentée alors qu'elle reste inchangée lors d'une surcharge volumique. D'autre part, l'activation du récepteur AT1 semble indispensable dans l'hypertrophie de cardiomyocytes néonataux en culture, induite par l'étirement puisque le traitement avec un antagoniste de l'AT<sub>1</sub> bloquait l'hypertrophie (Kojima *et al.*, 1994). Il semble que l'activation des récepteurs AT<sub>1a</sub> peut moduler la croissance des cardiomyocytes puisque l'infusion de doses non-hypertensives d'AII à des souris déficientes en récepteurs AT<sub>1a</sub> ne produit pas d'hypertrophie cardiaque à l'inverse des souris normales (Harada *et al.*,

1998). Cependant, l'activation de l'AT<sub>1a</sub> n'est pas nécessaire pour l'hypertrophie cardiaque induite par une surcharge de pression, puisque des souris déficientes en récepteurs AT<sub>1a</sub> présentent un phénotype d'hypertrophie cardiaque tout comme les souris normales après une surcharge de pression (Harada *et al.*, 1998; Hamawaki *et al.*, 1998). Ceci a été corroboré par l'usage de l'antagoniste mixte des récepteurs AT<sub>1a</sub> et AT<sub>1b</sub>, le losartan, qui est incapable de prévenir l'hypertrophie cardiaque induite par une charge systolique appliquée sur le ventricule gauche (Thienelt *et al.*, 1997) ou lors d'une surcharge de pression appliquée par sténose aortique (Baba *et al.*, 1999).

En outre, la surexpression de l'Aog dans des cardiomyocytes entraîne une augmentation de l'AII cardiaque et une hypertrophie ventriculaire ce qui suggère que l'Aog est un facteur limitant du système RAS dans le cœur (Mazzolai *et al.*, 1998). La surexpression de ACE dans les cardiomyocytes entraîne également une hypertrophie cardiaque et une augmentation du collagène au niveau du cœur. Ces effets sont indépendants de la pression artérielle et sont abolis lorsque les animaux sont traités avec un IECA, le perindopril (Higaki *et al.*, 2000).

Quant aux évidences d'un effet direct de l'AII dans l'induction d'une hypertrophie des cardiomyocytes *in vitro*, Sadoshima *et al.* (1993 (a)) ont montré que l'étirement mécanique de cardiomyocytes *in vitro* entraîne la libération aigüe d'AII après 10 à 30 minutes et une augmentation de l'expression du gène Aog à plus long terme. Ceci suggère une action autocrine d'AII dans la réponse hypertrophique médiée par l'étirement. L'AII peut aussi stimuler la synthèse protéique et induire un effet hypertrophique dans des cardiomyocytes de poulet en culture (Baker et Aceto, 1990). Sadoshima et Izumo (1993 (b)) ont également montré un rôle hypertrophique de AII dans

des cardiomyocytes de rat nouveaux-nés et un effet stimulateur sur la synthèse de protéines et la prolifération de cellules non myocytes, principalement des fibroblastes. Ces actions étaient toutes médiées par le récepteur AT<sub>1</sub> et supporte un effet autocrine et/ou paracrine de l'AII dans l'hypertrophie cardiaque. Enfin, Gray *et al.* (1998) ont démontré que l'AII induit une hypertrophie des cardiomyocytes via la libération paracrine du facteur de croissance TGF- $\beta$  (*transforming growth factor- $\beta$* ) et du peptide vasoactif, endothéline-1, par les fibroblastes cardiaques.

Pour ce qui est du rôle direct de l'AII *in vivo*, nous avons montré dans un modèle de souris transgéniques qui surexpriment le récepteur AT<sub>1</sub> spécifiquement dans les cardiomyocytes, que l'AII induit directement une hypertrophie cardiaque indépendamment de la pression artérielle (voir article, chapitre II).

#### **I.4. L'apoptose dans le cœur et l'insuffisance cardiaque:**

##### **I.4.1. Apoptose et pathologie cardiaque :**

L'apoptose ou mort cellulaire programmée est un phénomène qui se produit en l'absence d'inflammation et qui nécessite de l'énergie. Contrairement à la nécrose, qui est caractérisée par une rupture de la membrane cytoplasmique et un relâchement du contenu cellulaire en présence d'inflammation, l'apoptose se distingue par une série de particularités morphologiques typiques incluant un rétrécissement de la cellule, une condensation et margination de la chromatine, une fragmentation du noyau et une phagocytose des corps apoptotiques formés par les macrophages et les cellules

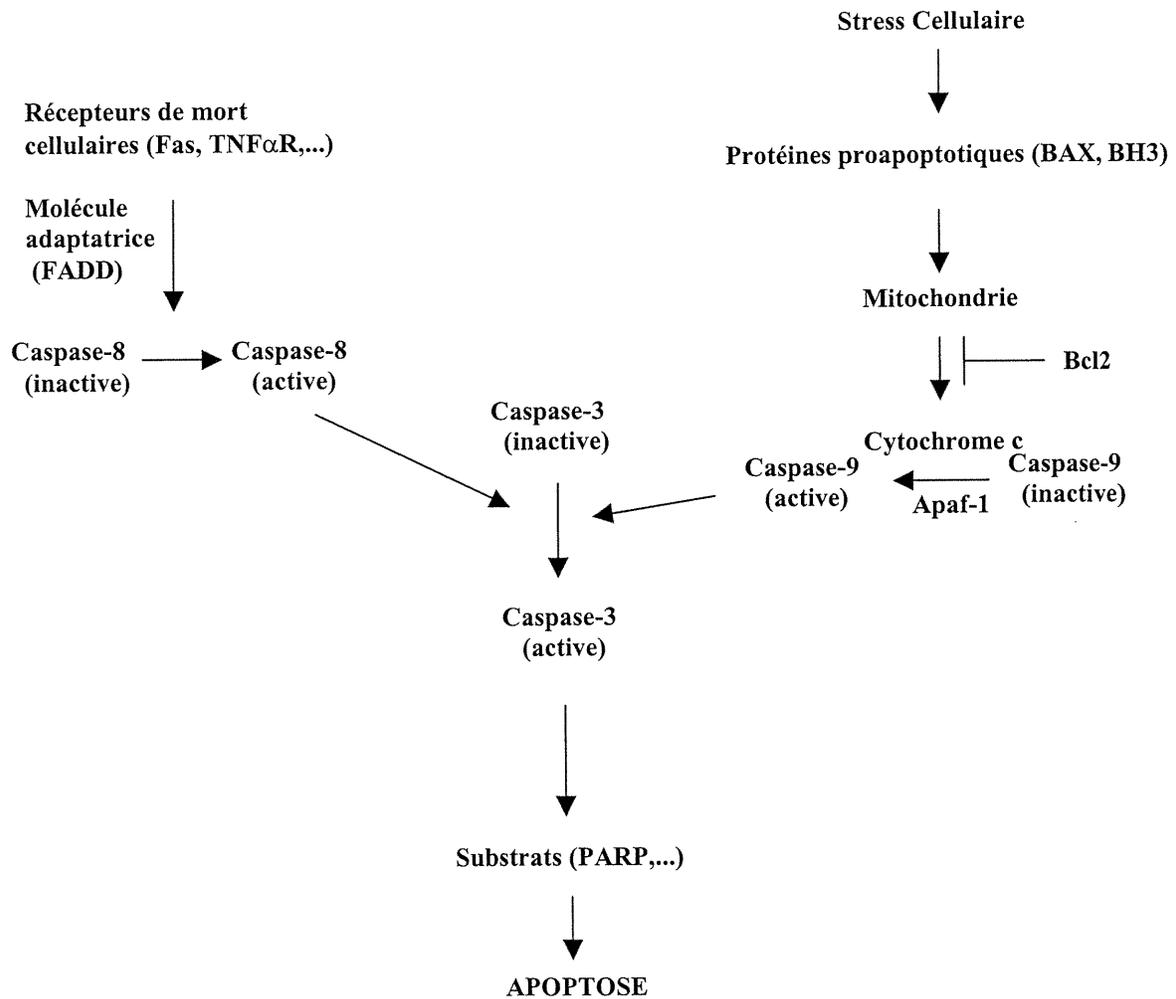
avoisinentes (Kerr *et al.*, 1972; Searle *et al.*, 1982; Majno *et al.*, 1995; Saraste *et al.*, 2000 (a)).

L'apoptose se produit par 2 voies. L'une d'elles implique les récepteurs Fas ou TNF- $\alpha$  (*Tumor Necrosis Factor-alpha*) et leurs ligands avec recrutement, par l'intermédiaire de molécules adaptatrices comme FADD (*Fas Associated Death Domain*), et l'activation de protéases appelées caspases qui clivent leur substrat après un résidu aspartate. Un des substrats des caspases, la poly-(ADP-ribose) polymérase ou PARP, est responsable de la fragmentation internucléosomale sélective de l'ADN et de l'exécution de l'apoptose (Nicholson *et al.*, 1995). La caspase responsable du clivage du PARP est la caspase-3 (CPP32/apopain) qui est une protéase de la famille de la convertase interleukine-1 bêta et homologue à CED-3, une protéine impliquée dans la mort cellulaire chez *Caenorhabditis elegans* (Fernandes-Alnemri *et al.*, 1994). La deuxième voie se produit à la suite d'un stress cellulaire ou oxydatif qui va activer des protéines proapoptotiques de la famille Bcl-2 dont Bax (Adams et Cory, 1998), qui vont se lier à la mitochondrie pour libérer le cytochrome-c. Celui-ci va former un complexe avec Apaf-1 (*Apoptotic protease activating factor-1*) et une procaspase-9 nécessaire pour l'activation de la caspase-9. Celle-ci va activer la caspase-3 qui clive à son tour le PARP et provoque l'apoptose (Figure 4). Les 2 voies peuvent interagir entre elles pour l'exécution de l'apoptose. En effet, Bossy-Wetzels et Green (1999) ont montré que la caspase-8 entraîne la relâche de cytochrome c des mitochondries en clivant la protéine proapoptotique Bid et amplifie ainsi le phénomène d'apoptose.

Plusieurs évidences expérimentales lient l'apoptose à la pathologie cardiaque. En effet Saraste *et al.* (1997 (c)) ont démontré, chez des humains décédés d'infarctus du myocarde

aigu, la présence de nombreux cardiomyocytes apoptotiques dans la zone entourant le myocarde nécrosé alors que seulement quelques cellules en apoptose sont observées dans la partie du myocarde distante de la zone d'infarctus. Ceci suggère qu'un certain nombre de cardiomyocytes partent en apoptose durant l'ischémie-reperfusion et participent ainsi dans le remodelage conséquent à l'infarctus du myocarde. Cependant, Freude *et al.* (2000) ont montré dans un modèle canin que l'apoptose des cardiomyocytes est déclenchée durant l'ischémie par l'activation de la caspase-3, mais que la reperfusion est nécessaire pour compléter la cascade apoptotique puisque des expériences avec 6h d'ischémie sans reperfusion ont montré une absence de fragmentation de l'ADN.

Kavantzias *et al.* (2000) ont rapporté une augmentation significative de l'apoptose en comparaison à des sujets normaux, par une étude à partir de biopsies prélevées chez des patients atteints de cardiomyopathies incluant la cardiomyopathie dilatée, la cardiomyopathie hypertrophique et la dysplasie arythmogénique du ventricule droit maladie caractérisée par une fibrose importante du ventricule droit.



**Figure 4.:** Voies intracellulaires de l'apoptose. Adapté de Green D, *Cell*, Vol 94, 695-698, Sep 1998.

En outre, le processus d'apoptose se déroule également dans un modèle canin de myocardite aigue due à l'infection expérimentale par *Trepanosoma cruzi*. Zhang *et al.* (1999) ont décrit l'apoptose de cardiomyocytes, de cellules endothéliales des capillaires et des venules qui non infectées par *Trepanosoma cruzi* et les cellules effectrices du système immunitaire incluant les macrophages, lymphocytes et cellules dendritiques présentatrices d'antigènes.

Il a été démontré également que l'administration chronique de doxorubicine (Adriamycine) induit une cardiomyopathie chez des rats et que l'apoptose est responsable de la perte de cardiomyocytes et de la détérioration de la fonction cardiaque (Nakamura *et al.*, 2000).

Fortuno *et al.* (1998) ont rapporté une augmentation de l'expression de la protéine proapoptotique Bax et de l'apoptose dans le ventricule gauche de rats spontanément hypertendus (SHR) et que ces effets sont bloqués par un antagoniste du récepteur AT<sub>1</sub>, le losartan, suggérant un rôle important du SRA et de l'AII, en particulier, dans l'apoptose chez les rats SHR.

Finalement, l'apoptose pourrait être un mécanisme additionnel, en plus de la nécrose tissulaire, dans les dommages cardiaques observés lors des rejets d'allogreffes cardiaques (Puig *et al.*, 2000)

D'autre part, l'apoptose jouerait un rôle important dans le développement des lésions athéromateuses dans un modèle expérimental d'athérosclérose. Hasdai *et al.* (1999) ont observé des cellules en apoptose dans l'intima et l'adventice d'artères coronariennes de porcs hypercholestérolémiques avant la formation de la lésion athéromateuse mais pas

dans les animaux contrôles. Ceci suggère un rôle important de l'apoptose à un stade précoce de l'athérosclérose. Chez l'humain, Cai *et al.* (1997) ont montré la présence de cellules apoptotiques, dans la néointima d'artères coronariennes de patients atteints d'ischémie myocardique au moment de la transplantation, et ce durant tous les stades de l'athérosclérose. Le nombre de cellules en apoptose est faible dans les lésions initiales alors que dans les lésions avancées plusieurs cellules sont en apoptose incluant des cellules musculaires lisses, des macrophages et des cellules endothéliales.

En ce qui concerne le type de récepteur impliqué dans l'apoptose au niveau des vaisseaux, Yamada *et al.* (1998 (a)) ont rapporté, dans une étude de transfert de gène, que les récepteurs AT<sub>2</sub> médiaient l'apoptose des cellules musculaires lisses vasculaires de rats alors que la stimulation des récepteurs AT<sub>1</sub> l'inhibait. Aussi, Horiuchi *et al.* (1998) ont montré que les AT<sub>2</sub> avaient des effets proapoptotiques dans certaines lignées cellulaires, dont les cellules musculaires lisses vasculaires par une activation de phosphatases (MKP-1 ou *MAPK phosphatase-1*) et une inactivation des ERK; ce qui entraînait une déphosphorylation de Bcl-2 et une augmentation de l'expression de la protéine proapoptotique Bax.

#### **I.4.2. Apoptose et insuffisance cardiaque:**

A l'heure actuelle, il existe plusieurs données expérimentales chez les animaux et chez des humains liant la perte de cardiomyocytes par apoptose à l'insuffisance cardiaque. Dans un modèle d'insuffisance cardiaque congestive chronique produite par microembolisations intracoronariennes multiples chez le chien, Sharov *et al.* (1996) ont

déecté par TUNEL (*Terminal UDP Nick End Labeling assay*) et par microscopie electronique l'apoptose de cardiomyocytes dans le ventricule gauche. Il est intéressant de noter que l'AII pourrait être impliquée dans l'induction de l'apoptose au cours de l'insuffisance cardiaque. En effet, Goussev *et al.* (1998) ont montré que le traitement de ces chiens dans le même modèle par un IECA, l'énalapril, permettait de réduire considérablement le taux de cardiomyocytes apoptotiques chez les chiens en insuffisance cardiaque et préservait la fonction globale du ventricule gauche chez ces animaux. D'autre part il a été suggéré que l'augmentation de l'apoptose et la diminution conséquente de la masse de myocytes pourraient être à l'origine de la transition d'un état de compensation à un état d'insuffisance cardiaque décompensée chez des rats spontanément hypertendus (Li *et al.*, 1997).

L'apoptose a été observée également dans certains modèles de souris transgéniques présentant un phénotype d'insuffisance cardiaque. C'est le cas notamment de souris transgéniques surexprimant la sous-unité  $G\alpha_q$  de la protéine G. En effet, la surexpression de niveaux modérés de  $G\alpha_q$  dans les cardiomyocytes résulte en une hypertrophie cardiaque alors que la surexpression de hauts niveaux de  $G\alpha_q$  entraîne une apoptose des cardiomyocytes et une progression vers l'insuffisance cardiaque (Adams *et al.*, 1998).

Récemment, Bisognano *et al.* (2000) ont réussi à surexprimer le récepteur  $\beta_1$ -adrénergique humain spécifiquement dans le cœur. Ces souris présentent une hypertrophie cardiaque, un remodelage important et les souris meurent d'insuffisance cardiaque. Ces auteurs ont noté une augmentation de l'index apoptotique mesuré par TUNEL chez les animaux présentant un remodelage important. Par ailleurs, Yamada *et al.* (1999 (b)) ont rapporté de l'apoptose dans un modèle animal d'insuffisance cardiaque

induite par une myocardite virale chez la souris. Cependant, la plupart des cellules en apoptose semblent être des cellules mononucléaires qui infiltrent le myocarde.

D'autres études effectuées chez les humains, ont observé l'apoptose dans les explants de coeurs de patients insuffisants cardiaques et recevant un transplant cardiaque mais pas dans les coeurs contrôles de personnes décédées dans un accident de la circulation (Narula *et al.*, 1996; Olivetti *et al.*, 1997).

Notre étude corrobore les études citées ci-dessus et montre que l'apoptose des cardiomyocytes induite par la surexpression du récepteur AT<sub>1</sub> n'est pas liée à la phase hypertrophique compensatoire mais plutôt à la phase décompensée et pourrait être un mécanisme de transition de l'hypertrophie cardiaque à l'insuffisance cardiaque congestive (voir article, chapitre III).

### **I.5. But du travail et plan experimental:**

Le peptide vasoactif AII a un rôle important dans l'homéostasie cardiovasculaire. Plusieurs études ont déjà démontré le rôle de l'AII dans le développement de l'hypertrophie cardiaque à la suite de maladies cardiovasculaires comme l'hypertension, l'infarctus du myocarde et certaines cardiomyopathies. La présence de récepteurs de l'AII au niveau de la vasculature et de certains organes comme le coeur ne permet pas de déterminer si l'AII exerce ses effets trophiques sur le coeur de façon indirecte, par augmentation de la pression artérielle, ou directe via ses récepteurs cardiaques. Notre hypothèse de travail était que l'AII entraîne une hypertrophie cardiaque par un effet direct sur le coeur, et ce de façon indépendante des changements hémodynamiques.

Pour répondre à cette question, nous avons surexprimé spécifiquement le récepteur AT<sub>1</sub> dans le coeur dans un modèle de souris Tg. Les résultats de cette étude ont abouti à la rédaction d'un article, déjà publié, et d'un manuscrit dont je suis l'auteur principal.

La première partie de l'étude a permis de démontrer un rôle direct de l'AII dans l'hypertrophie cardiaque. Ainsi, la surexpression du récepteur AT<sub>1</sub> dans le coeur induisait un phénotype d'hypertrophie cardiaque avec remodelage et fibrose interstitielle évoluant vers une insuffisance cardiaque, et ce en l'absence de changements hémodynamiques. Nous avons étudié par immunohistochimie et par analyse "northern" l'expression du facteur natriurétique auriculaire ou ANF, marqueur de l'hypertrophie cardiaque. Par ailleurs, le traitement des souris Tg avec un antagoniste des récepteurs AT<sub>1</sub>, le losartan, a permis de prévenir le phénotype observé.

Dans la deuxième partie de ce travail, nous avons montré par des techniques TUNEL et de microscopie électronique que la perte de cardiomyocytes observée chez des animaux en insuffisance cardiaque était due aussi bien à l'apoptose qu'à la nécrose des cellules cardiaques. Par ailleurs, nous avons étudié par immunohistochimie l'expression de certains marqueurs apoptotiques comme la caspase-3 active et la protéine proapoptotique bax. Nous avons également analysé par RT-PCR l'expression de certains gènes qui pourraient médier les effets d'hypertrophie, de fibrose et d'apoptose observés dans ce modèle comme l'ET-1, le TGFβ1 et le récepteur AT<sub>2</sub>.

**II. CHAPITRE 2.****ARTICLE****OVEREXPRESSION OF ANGIOTENSIN II TYPE I RECEPTOR IN  
CARDIOMYOCYTES INDUCES CARDIAC HYPERTROPHY AND REMODELING**

Pierre Paradis, Nassim Dali-Youcef, François W. Paradis, Gaétan Thibault and Mona Nemer\*

Proc Natl Acad Sci U S A, 2000 Jan 18;97(2):931-6

\*Corresponding author: Dr Mona Nemer  
Laboratory of Cardiac Growth and Differentiation  
Institut de recherches cliniques de Montréal  
110 des Pins Ouest  
Montréal, Québec Canada H2W 1R7  
Tel: 514-987-5680  
Fax: 514-987-5575  
E-mail: nemerm@ircm.qc.ca

## ABSTRACT

Angiotensin II (AII) is a major determinant of arterial pressure and volume homeostasis mainly due to its vascular action via the AII type 1 receptor (AT1R). AII has also been implicated in the development of cardiac hypertrophy because angiotensin I converting enzyme inhibitors and AT1R antagonists prevent or regress ventricular hypertrophy in animal models and in human. However, as these treatments impede the action of AII at cardiac as well as vascular levels, and reduce blood pressure, it has been difficult to determine whether AII action on the heart is direct or a consequence of pressure-overload. In order to determine whether AII can induce cardiac hypertrophy directly via myocardial AT1R in the absence of vascular changes, transgenic (Tg) mice overexpressing the human AT1R under the control of the mouse  $\alpha$ -myosin heavy chain ( $\alpha$ MHC) promoter were generated. Cardiomyocyte-specific overexpression of AT1R induced, in basal conditions, morphologic changes that mimic those observed during the development of cardiac hypertrophy in human and in other mammals. These mice displayed significant cardiac hypertrophy and remodeling with increased expression of ventricular atrial natriuretic factor (ANF) and interstitial collagen deposition and died prematurely of heart failure. Neither the systolic blood pressure nor the heart rate were changed. The data demonstrate for the first time a direct myocardial role for AII in the development of cardiac hypertrophy and failure and provide a novel model to elucidate the mechanisms of action of AII in the pathogenesis of cardiac diseases.

## INTRODUCTION

The growth response of the adult heart to mechanical overload is enlargement of terminally differentiated cardiomyocytes resulting in heart hypertrophy. This phenotypic change is associated with reprogramming of cardiac gene expression including re-induction of a set of fetal genes for which ANF is a hallmark (1,2). Cardiac hypertrophy is often accompanied by cardiac remodeling characterized by cardiomyocyte loss, proliferation of interstitial fibroblasts and collagen deposition, leading to decreased compliance and increased risk for heart failure (3-6). Although the exact mechanisms involved in initiating and/or maintaining cardiac hypertrophy remain unknown, many neurohumoral systems, particularly the renin-angiotensin system (RAS) have been implicated in the hypertrophic process [reviewed in (7)].

RAS is a major determinant of arterial pressure and volume homeostasis in mammals through the action of the vasoactive peptide AII on vascular AT1R (8). The activity of RAS is increased in several cardiovascular diseases, such as myocardial infarction, myocarditis, cardiomyopathy and hypertension. It is now well established that angiotensin converting enzyme (ACE) inhibitors prevent the development of pressure-overload cardiac hypertrophy in animal models, and in hypertensive human patients, and more recently, AT1R antagonists were found to be effective at repressing cardiac hypertrophy in hypertensive patients (9), and are currently undergoing larger clinical trials in patients with cardiovascular diseases. However, as these treatments impede the action of AII at cardiac as well as vascular levels, reducing blood pressure, and thus preventing pressure-overload-induced cardiac hypertrophy, it has been difficult to determine whether AII can act directly on cardiomyocytes, independently of vascular changes. Indeed, while enhanced AII levels may in some instances be compensatory for the decrease in cardiac output and help to normalize blood pressure, the increase in AII may have a

parallel effect on the heart leading to hypertrophy. Several studies support a role for AII on the heart: *in vivo*, the infusion of subpressor doses of AII induced cardiac hypertrophy in rats and mice (10-12) and *in vitro*, addition of AII to cultured neonatal cardiomyocytes increased protein synthesis and induced expression of genes that are hallmark of cardiac hypertrophy such as the immediate early and cardiac fetal genes *c-fos* and ANF (13,14).

Interestingly, many RAS components, namely angiotensinogen, ACE, and both type 1 and 2 AII receptors are expressed in cardiomyocytes and are up-regulated in cardiac hypertrophy, raising the possibility for an autocrine or paracrine role of AII in the heart (15,16). Moreover, AII receptors are also present on both cardiac fibroblasts (17) and endothelial cells (18) - which normally contaminate primary cardiomyocyte cultures - and AII was shown to induce secretion of growth factors from these cells (18,19). Interestingly, fibroblasts were shown to be required for maximal cardiomyocytes response to AII- and stretch-induced myocyte hypertrophy (20,21). Thus, even at the level of the heart, it remains unclear whether AII-induced hypertrophy occurs via a direct action on cardiomyocytes or by a paracrine mechanism involving non-cardiomyocytes.

In order to determine whether AII can act directly on cardiomyocytes to cause cardiac hypertrophy, Tg mice expressing the human AT1R specifically in cardiomyocytes under the control of the mouse  $\alpha$ MHC promoter were generated. These Tg mice developed significant cardiomyocyte hypertrophy, and cardiac fibrosis leading to congestive heart failure in the absence of blood pressure change. These data demonstrate that myocardial action of AII is sufficient to trigger hypertrophy and remodeling of the heart, and support a role for AII in the pathogenesis of cardiac hypertrophy and failure.

## MATERIAL AND METHODS

**Generation of Tg mice.** The  $\alpha$ MHC-AT1R transgene was constructed using a 1.23 kbp fragment of the fifth exon of the human AT1R gene (22) containing the entire coding sequences, and minimal amount of 5' and 3' untranslated sequences (kindly provided by Dr. S. Meloche, CHUM, QC Canada) cloned between the 5.4 kbp mouse  $\alpha$ MHC promoter [described in (23), a kind gift of Dr. J. Robbins, University of Cincinnati, OH USA] and the Simian virus 40 (SV40) poly adenylation sequence (Fig. 1A). The transgene was microinjected into the pronucleus of fertilized eggs from C57BL/6 X C3H mice. Genomic DNA was isolated from tail biopsies taken from 3 weeks old pups, digested with *Eco*RI. Pups were screened for the transgene using either Southern blot or PCR. Southern blots were hybridized with the  $^{32}$ P labeled full length  $\alpha$ MHC-AT1R transgene. Blots were washed at 65°C in 0.1 x SSC. For PCR detection, a forward (5'- ACC CTT ACC CCA CAT AGA C) and reverse (5'- ACC ATC TTC AGT AGA AGA GTT G) primers from the second intron of the mouse  $\alpha$ MHC gene and the 5' coding region of the human AT1R gene were used. Tg founders were mated with wild type (Wt) C3H mice. Animals were handled in accordance with institutional guidelines.

**Northern blot analysis.** Total RNA (20  $\mu$ g) was denatured with formaldehyde and formamide and size fractionated on a 1.2% agarose gel as previously described (24), transferred to nylon membranes (MSI, Westborough, MA) and UV crosslinked using the Stratalinker 2400 (Stratagene). Blots were first stained with methylene blue to control for transfer and loading, and then hybridized with  $^{32}$ P labeled human exon 5 AT1R probe and rat cDNA probes for ANF, GATA-4 and GAPDH as previously described (25).

**Radioligand binding assays.** The density of AT1R was determined by radioligand binding assay as previously described (26). Briefly, crude plasma membranes were prepared from Wt and Tg mice ventricles and membrane protein concentration was determined by the method of Bradford. The competitive binding assays were carried out using increasing concentration ( $10^{-12}$  to  $10^{-5}$  mol/L) of [Sar<sup>1</sup>, Ile<sup>8</sup>]AII, losartan (an AT1R selective antagonist) or PD 123319 (an AT2 receptor-specific ligand), and 100 to 120 pmol/L of <sup>125</sup>I-[Sar<sup>1</sup>, Ile<sup>8</sup>]AII (2200 Ci/mmol). Binding data were analyzed using EBDA-LIGAND program software of McPherson (Biosoft). Receptor densities are expressed as pmol of sites per mg of protein.

**Tissue weights and gross morphometric analysis.** Age-matched Wt and Tg mice were sacrificed and their body weights determined. The heart, liver, kidneys and spleen were isolated. Hearts were further dissected to isolate the left and right ventricular free walls, and the left and right atria. Tissue weights were measured with an analytical scale. Hearts isolated from Wt and Tg 27 mice were fixed with neutral formaldehyde for determination of morphometric changes. After fixation, hearts were cleaned up of connective tissue under a dissection microscope, photographed, sectioned in half and photographed again at the same magnification.

**Histology.** Hearts were first washed and stopped in diastolic by perfusion with phosphate buffered saline containing 50 mM KCl and then fixed by perfusion with Bouin solution followed by an overnight incubation at 4°C with agitation in the same fixative. Hearts were cut longitudinally, embedded in paraffin and serial cuts of 5  $\mu$ m were performed. Sections were stained with Mason's trichrome. For immunohistochemical analysis, rehydrated sections were blocked with 10% normal goat serum in tris buffered saline (TBS) containing 0.3% Tween 20 (TBT) for 10 min, and then exposed for 24 to 48 h to a rabbit polyclonal anti-ANF (99-126) antibody diluted 1:1000 in the blocking solution at 4°C. Sections were washed in TBT, blocked

for 1 h and then incubated with a goat anti-rabbit IgG coupled to biotin diluted 1:250 in the blocking solution for 1 h. Sections were washed, blocked for 1 h and exposed to streptavidin coupled to peroxidase diluted 1:500 in the blocking solution for 45 min. Exposure of heart sections to 0.03% di-aminobenzidine and 0.03% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in TBS for 3 min resulted in a visible immunoreaction. Sections were counterstained with methyl green.

**Physiologic measurements.** Systolic blood pressure and heart rate were determined by tail-cuff technique using the Visitech systems BP-2000 (NC, USA) after 6 days of training sessions (unrecorded measurements) from 9 to 11 am daily.

**Statistics.** Results are expressed as mean  $\pm$  SEM. Homogeneity of variance was tested using a F-test and then statistical significance was estimated using the appropriate Student's t-test for unpaired observations using the Analysis ToolPak of Microsoft Excel. A  $P < 0.05$  was considered significant.

## RESULTS

To determine whether AII can induce cardiac hypertrophy through a direct action on cardiomyocytes, Tg mice overexpressing the human AT1R specifically in cardiomyocytes using the mouse  $\alpha$ MHC promoter were generated (Fig. 1a). This promoter has been shown to confer cardiac-specific expression to many separate transgene lines (27-31), and (29-31) two independent groups have shown that transgene expression is restricted to cardiomyocytes (27,32). Ten out of thirty-seven mice screened were found positive (Table 1). Eight founders showed the expected 50% transmission, typical of a Mendelian inheritance.

Tissue-specific transgene expression was assessed at the mRNA level by Northern blot analysis using 80 days old mice. As expected, expression of the transgene was restricted to the

atria and ventricles. No expression was detected in the kidneys, liver, brain or skeletal muscle (Fig. 1B). Next, the density of AT1R was determined in membranes isolated from the ventricles of Wt and Tg mice using  $^{125}\text{I}$ -[Sar<sup>1</sup>, Ile<sup>8</sup>]AII as ligand and [Sar<sup>1</sup>, Ile<sup>8</sup>]AII, losartan and PD 123319 as competitors. In Wt mice, the ligand was completely displaced by [Sar<sup>1</sup>, Ile<sup>8</sup>]AII and losartan but not by PD 123319, indicating that in postnatal hearts, AII receptors were exclusively type 1 (data not shown). The density of AT1R was increased by over 200-fold in 4 out of 5 Tg lines analyzed (data not shown) and were respectively 450- and 200-fold higher in the ventricles of Tg 20 and Tg 27, the two lines that were further characterized, as compared to Wt mice (Fig. 1C).

One of the first phenotypes noted in Tg 20 and Tg 27 was spontaneous death starting at 80 days of age. The spontaneous death rate was about 20 times higher in Tg mice compared to age matched control (20% vs. 0.5%). The average age of death was  $140 \pm 1$  days (n=30) for Tg 27 and  $238 \pm 4$  days (n=17) for Tg 20; most Tg 27 mice did not survive past one year. Necropsy of these mice revealed dilatation of the heart, fibrotic tissue especially in the left atrium and pleural effusion and/or ascites, suggesting that they died of congestive heart failure. Animals were also sacrificed at various ages to assess cardiac changes prior to heart failure. Gross examination of 120 days and older Tg hearts revealed significant hypertrophy (Fig. 2). The ventricles and atria were extremely enlarged and dissection of the hearts revealed significant remodeling of Tg as compared to Wt hearts. Consistently, the left ventricle was elongated and the free wall was thinner toward the apex. The size of the right ventricle cavity was significantly increased. Fibrotic tissue was also observed in the left atrium appendix that could have resulted from an accumulation of blood in the left atrium due to a left ventricular failure.

The tissue weights of the different cardiac compartments, liver, kidneys and spleen were determined in Wt, Tg 20 and Tg 27 mice (Table 2). The weights of the left and right ventricular free walls and of left and right atria isolated from Tg 27 mice were increased 1.3-, 1.7-, 3.9- and 3-fold, respectively, as compared to age matched Wt mice. The same changes were obtained whether the data was expressed as heart weight relative to body weights or relative to femur length. No difference in body, kidneys and spleen weights were noted. In contrast, the liver weight was increased 33%, suggesting the presence of congestive heart failure. Similar changes were observed in Tg 20 mice with cardiac hypertrophy increasing with time. Left ventricular/body weights were 2.5-fold higher in 130 day old Tg 20 relative to Wt mice, and 3.7-fold higher in older 400 day old animals compared to age matched Wt. It is noteworthy that cardiac hypertrophy was induced in a hemodynamic independent fashion in Tg mice as systolic blood pressure and heart rate were not altered by AT1R overexpression (Table 2).

Age-dependent morphologic changes were examined in Mason's trichrome stained left ventricular sections of age matched Wt and Tg 27 mice (Fig. 3). No gross changes were detected before 41 days postnatal; at 65 days, the interstitial space was more prominent in Tg 27 hearts suggesting the loss of some cardiomyocytes and cardiomyocytes in Tg 27 began to be enlarged when compared to Wt mice (Fig. 3F vs. B). At 111 days, the cardiomyocytes were significantly hypertrophied and interstitial fibrosis started to be evident in Tg mice (Fig. 3G vs. C). Interstitial fibrosis was also prominent in both atria (data not shown and Figure 5C vs A). At later stages (158 days old), several empty spaces filled with collagen were observed in the Tg ventricles, suggesting further cardiomyocyte loss. Similar findings were observed in the ventricles of Tg 20 mice (data not shown).

Classic biochemical features that accompany cardiac hypertrophy were also observed in Tg mice. Northern blot analysis revealed that ANF expression was increased in the ventricles of Tg 20 and Tg 27 mice as compared to age matched Wt mice (Fig. 4) while the expression of transcription factor GATA-4 was not significantly altered. Increased expression of ANF was also observed at the protein level as evidenced by immunohistochemical studies. ANF was increased throughout the ventricles of Tg mice reaching nearly atrial levels whereas in Wt ventricles, it is detected only in few cardiomyocytes. Interstitial fibrosis was again evident in the atria and ventricles of Tg. Thus, overexpression of AT1R in cardiomyocytes induced, under steady state conditions, morphologic changes over a 4 to 5 months period that mimic those observed during the development of cardiac hypertrophy and congestive heart failure in classical animal models of pressure-overload hypertrophy and in human.

## DISCUSSION

The vasoactive peptide hormone angiotensin II (AII) has been implicated in the development of cardiac hypertrophy. Moreover, AII has been postulated to be the humoral mediator of mechanical stretch-induced cardiac hypertrophy. However, whether the cardioregulatory function of AII is due to activation of myocardial AII receptors (ATRs) or is a consequence of peripheral vascular changes remains uncertain.

In the present work, we provide evidence for a role of myocardial AT1R receptors in cardiac hypertrophy and remodeling independently of hemodynamic changes. Indeed, myocardial-specific overexpression of the human AT1R produced initially cardiomyocyte hypertrophy followed by interstitial collagen deposition, myolysis and cardiac remodeling. This in turn was accompanied by increased incidence of premature death due to congestive heart

failure. The pronounced cardiac changes observed in this study contrast with the absence of morphological changes in the heart of Tg mice overexpressing the type 2 angiotensin receptor under the control of the same  $\alpha$ MHC promoter (28); thus AII can directly induce classical features of cardiac hypertrophy, remodeling and failure via its myocardial type 1 receptor.

AT1 receptors were shown to be upregulated in several models of cardiac hypertrophy (16), (33,34) although the functional significance of this change was not clear. The cardiac changes described in this study in mice with targeted overexpression of the AT1R show that increased receptor number is sufficient to initiate and maintain cardiac hypertrophy and remodeling. Interestingly, despite the increased receptor density cell signaling could be further stimulated by exogenous AII; in preliminary experiments, infusion of a subpressor dose of AII (100 ng/kg/day) for two days lead to sudden death and further increase in cardiac mass in AT1R Tg but not in Wt mice. Hoffmann et al. (35) also observed enhanced pressure-overload-induced hypertrophy in Tg rats overexpressing the human AT1R although cardiac changes were minimal in basal conditions, a result possibly of a lower level of transgene expression. In contrast, Hein et al (36) reported prenatal lethality in Tg mice overexpressing the mouse AT1R from the  $\alpha$ MHC promoter although postnatal survival up to 7 days could be achieved by administration of ACE inhibitor or AT1R antagonist during pregnancy. The strain of mice used by Hein et al. was an outbred of swiss strain which has two renin genes – as opposed to the strain used in the present study which has only one renin gene; since mice with two renin genes have enhanced RAS activity and are more sensitive to cardiac manipulation of the angiotensin system (37), the more severe phenotype observed by Hein et al. may reflect hyperstimulation of the already increased AT1R levels in transgenic animals. Importantly, and irrespective of the qualitative changes noted in these different Tg models, myocardial overexpression of the AT1R

consistently leads to cardiac hypertrophy and enhanced mortality be it under basal or stress conditions. It is therefore tempting to speculate that enhanced expression of AT1R may contribute to the progression of cardiac hypertrophy and the onset of heart failure in other experimental animal models and in human.

The mechanisms by which myocardial AT1R causes biochemical and morphologic alterations in myocytes and non-myocytes remain uncertain. In isolated cardiomyocytes, AT1Rs have been shown to be coupled to the G $\alpha$ q protein (38); in this respect it is interesting to note that Tg mice overexpressing G $\alpha$ q from the same  $\alpha$ MHC promoter develop a similar phenotype as the one described in this study (31). However, in cultured cardiomyocytes, G $\alpha$ q overexpression also leads to cardiac hypertrophy (39) in contrast to the absence of hypertrophy in cardiomyocyte cultures deprived of fibroblasts stimulated with AII which had led to the hypothesis that AT1R-dependent alterations of myocytes require interactions with other cardiac cell types (20,21). The similar cardiac phenotype that results from either G $\alpha$ q or AT1R overexpression *in vivo* suggests that other G-coupled myocardial receptors may cooperate with AT1R to activate G $\alpha$ q dependent cell signaling pathways required for initiating and/or maintaining cardiac hypertrophy and remodeling. In this respect, it is especially noteworthy that endothelin type A receptors are also coupled to G $\alpha$ q protein (40) and can apparently act synergistically with AT1R in myocyte signaling, at least *in vitro* (41). Moreover, the vasoactive peptide hormone endothelin-1 which is secreted from both myocytes and non-myocytes, is a potent inducer of cardiomyocyte hypertrophy and endothelin antagonists can block *in vitro* stretch-induced myocyte hypertrophy as effectively as AII antagonists (21,41). Whether *in vivo*, AII action on the heart involves endothelin-1 can now be addressed using the AT1R Tg mice. Finally, the increased collagen deposition may reflect the action on non-myocytes of a myocyte-

derived growth factor such as AII, endothelin-1 and/or TGF $\beta$ , all of which are up-regulated in hypertrophied cardiomyocytes (42-48), and are known promoters of non-myocyte proliferation and/or inducers of collagen synthesis (42-45). The availability of the AT1R Tg model will allow further elucidation of the exact function of these and other growth factors in the cross-talk between the various cardiac cell types at specific stages of cardiac disease progression.

## ACKNOWLEDGMENTS

The authors are grateful to Lise Laroche for expert secretarial assistance, Dr. Mieczyslaw Marcinkiewicz for advises on the immunohistology protocol and to members of the Nemer's laboratory and the MRC Hypertension Group for helpful discussions. This work was supported by a grant from the Medical Research Council of Canada (MT-13056). MN is a MRC Scientist.

## REFERENCES

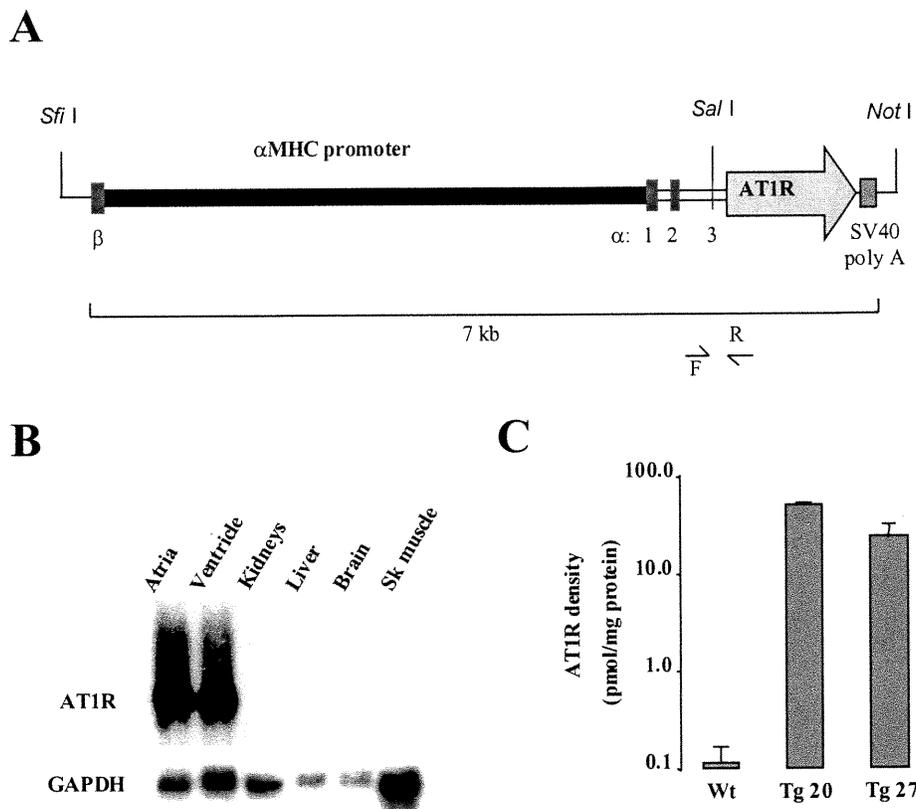
1. Chien, K.R., Zhu, H., Knowlton, K.U., Miller-Hance, W., van-Bilsen, M., O'Brien, T.X. & Evans, S.M. (1993) *Annu.Rev.Physiol.* **55**, 77-95.
2. Hefti, M.A., Harder, B.A., Eppenberger, H.M. & Schaub, M.C. (1997) *J.Mol.Cell.Cardiol.* **29**, 2873-2892.
3. Anversa, P., Kajstura, J. & Olivetti, G. (1996) *Curr.Opin.Cardiol.* **11**, 245-251.
4. Swynghedauw, B. (1998) *Bull.Acad.Natl.Med.* **182**, 665-682.
5. Colucci, W.S. (1997) *Am.J.Cardiol.* **80**, 15L-25L.
6. Bishop, J.E. (1998) *Molecular Medicine Today* **4**, 69-75.
7. Zhu, Y.C., Zhu, Y.Z., Gohlke, P., Stauss, H.M. & Unger, T. (1997) *Am.J.Physiol.* **80**, 110A-117A.
8. Hall, J.E. (1986) *Am.J.Physiol.* **250**, R960-R972
9. Thurmann, P.A., Kenedi, P., Schmidt, A., Harder, S. & Rietbrock, N. (1998) *Circulation* **98**, 2037-2042.
10. Harada, K., Komuro, I., Shiojima, I., Hayashi, D., Kudoh, S., Mizuno, T., Kijima, Matsubara, H., Sugaya, T., Murakami, K. & Yazaki, Y. (1998) *Circulation* **97**, 1952-1959.
11. Kim, S., Ohta, K., Hamaguchi, A., Yukimura, T., Miura, K. & Iwao, H. (1995) *Hypertension* **25**, 1252-1259.
12. Susic, D., Nunez, E., Frohlich, E.D. & Prakash, O. (1996) *Hypertension* **28**, 265-268.
13. Booz, G.W. & Baker, K.M. (1996) *Hypertension* **28**, 635-640.
14. Sadoshima, J., Xu, Y., Slayter, H.S. & Izumo, S. (1993) *Cell* **75**, 977-984.

15. Ogiku, N., Ishida, R., Saeki, K. & Sugiura, M. (1996) *Hypertension Research* **19**, 179-187.
16. Suzuki, J., Matsubara, H., Urakami, M. & Inada, M. (1993) *Circ.Res.* **73**, 439-447.
17. Crabos, M., Roth, M., Hahn, A.W. & Erne, P. (1994) *J.Clin.Invest.* **93**, 2372-2378.
18. Fischer, T.A., Ungureanu-Longrois, D., Singh, K., de Zengotita, J., DeUgarte, D., Alali, A., Gadbut, A.P., Lee, M.A., Balligand, J.L., Kifor, I., Smith, T.W. & Kelly, R.A. (1997) *Am.J.Physiol.* **272**, H958-H968
19. Booz, G.W. & Baker, K.M. (1995) *Cardiovasc.Res.* **30**, 537-543.
20. Sil, P. & Sen, S. (1997) *Hypertension* **30**, 209-216.
21. Harada, M., Saito, Y., Nakagawa, O., Miyamoto, Y., Ishikawa, M., Kuwahara, K., Ogawa, E., Nakayama, M., Kamitani, S., Hamanaka, I., Kajiyama, N., Masuda, I., Itoh, H., Tanaka, I. & Nakao, K. (1997) *Heart & Vessels* **Suppl 12**, 198-200.
22. Curnow, K.M., Pascoe, L., Davies, E., White, P.C., Corvol, P. & Clauser, E. (1995) *Mol.Endocrinol.* **9**, 1250-1262.
23. Palermo, J., Gulick, J., Colbert, M., Fewell, J. & Robbins, J. (1996) *Circ.Res.* **78**, 504-509.
24. Paradis, P., Dumont, M., Belichard, P., Rouleau, J.L., Lemaire, S. & Brakier-Gingras, L. (1992) *Biochem.Cell Biol* **70**, 593-598.
25. Charron, F., Paradis, P., Bronchain, O., Nemer, G. & Nemer, M. (1999) *Mol.Biol.Cell* **In press**,
26. Fareh, J., Touyz, R.M., Schiffrin, E.L. & Thibault, G. (1996) *Circ.Res.* **78**, 302-311.
27. Agah, R., Frenkel, P.A., French, B.A., Michael, L.H., Overbeek, P.A. & Schneider, M.D. (1997) *J.Clin.Invest.* **100**, 169-179.

28. Masaki, H., Kurihara, T., Yamaki, A., Inomata, N., Nozawa, Y., Mori, Y., Murasawa, S., Kizima, K., Maruyama, K., Horiuchi, M., Dzau, V.J., Takahashi, H., Iwasaka, T., Inada, M. & Matsubara, H. (1998) *J.Clin.Invest.* **101**, 527-535.
29. Akhter, S.A., Milano, C.A., Shotwell, K.F., Cho, M.C., Rockman, H.A., Lefkowitz, R.J. & Koch, W.J. (1997) *J.Biol.Chem.* **272**, 21253-21259.
30. Robbins, J. (1997) *Trends Cardiovasc.Med.* **7**, 185-191.
31. D'Angelo, D.D., Sakata, Y., Lorenz, J.N., Boivin, G.P., Walsh, R.A., Liggett, S.B. & Dorn, G.W. (1997) *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* **94**, 8121-8126.
32. Soonpaa, M.H. & Field, L.J. (1998) *Circ.Res.* **83**, 15-26.
33. Fujii, N., Tanaka, M., Ohnishi, J., Yukawa, K., Takimoto, E., Shimada, S., Naruse, M., Sugiyama, F., Yagami, K. & Murakami, K. (1995) *Biochem.Biophys.Res.Commun.* **212**, 326-333.
34. Nio, Y., Matsubara, H., Murasawa, S., Kanasaki, M. & Inada, M. (1995) *J.Clin.Invest.* **95**, 46-54.
35. Hoffmann, S., Krause, T., Pinto, Y., Bulkema, H., Bohlender, J., Nishimura, H., Inagami, T., Ganten, D. & Urata, H. (1998) *Hypertension* **28**, 535 abstract.
36. Hein, L., Stevens, M.E., Barsh, G.S., Pratt, R.E., Kobilka, B.K. & Dzau, V.J. (1997) *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* **94**, 6391-6396.
37. Mazzolai, L., Nussberger, J., Aubert, J.F., Brunner, D.B., Gabbiani, G., Brunner, HR & Pedrazzini, T. (1998) *Hypertension* **31**, 1324-1330.
38. Sadoshima, J. & Izumo, S. (1996) *EMBO J.* **15**, 775-787.
39. Adams, J.W., Sakata, Y., Davis, M.G., Sah, V.P., Wang, Y., Liggett, S.B., Chien, K.R., Brown, J.H. & Dorn, G.W. (1998) *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* **95**, 10140-10145.

40. Hilal-Dandan, R., Ramirez, M.T., Villegas, S., Gonzalez, A., Endo-Mochizuki, Y., Brown, J.H. & Brunton, L.L. (1997) *Am.J.Physiol.* **272**, H130-H137
41. Yamazaki, T., Komuro, I., Kudoh, S., Zou, Y., Shiojima, I., Hiroi, Y., Mizuno, T., Maemura, K., Kurihara, H., Aikawa, R., Takano, H. & Yazaki, Y. (1996) *J.Biol.Chem.* **271**, 3221-3228.
42. Butt, R.P., Laurent, G.J. & Bishop, J.E. (1995) *Eur.J.Cell Biol.* **68**, 330-335.
43. Brilla, C.G., Zhou, G., Matsubara, L. & Weber, K.T. (1994) *J.Mol.Cell.Cardiol.* **26**, 809-820.
44. Eghbali, M., Tomek, R., Sukhatme, V.P., Woods, C. & Bhambi, B. (1991) *Circ.Res.* **69**, 483-490.
45. Guarda, E., Katwa, L.C., Myers, P.R., Tyagi, S.C. & Weber, K.T. (1993) *Cardiovasc.Res.* **27**, 2130-2134.
46. Rizvi, M.A., Katwa, L., Spadone, D.P. & Myers, P.R. (1996) *J.Mol.Cell.Cardiol.* **28**, 243-252.
47. MacLellan, W.R., Brand, T. & Schneider, M.D. (1993) *Circ.Res.* **73**, 783-791.
48. Kobayashi, T., Miyauchi, T., Sakai, S., Kobayashi, M., Yamaguchi, I., Goto, K. & Sugishita, Y. (1999) *Am.J.Physiol.* **276**, H1197-H1206

## **FIGURES**



**Figure 1.** **A)** Schematic representation of the  $\alpha$ MHC-AT1R transgene,  $\beta$ ,  $\alpha$ :1, 2 and 3 denote the position of the last exon of  $\beta$ MHC gene and of the three first exons of  $\alpha$ MHC gene. F and R indicate the forward and reverse primers used for screening. **B)** Cardiac-specific expression of the AT1R transgene. The tissue specificity of AT1R transgene expression was determined in total RNA by Northern blot analysis as described in Method section. Blots were rehybridized with rat GAPDH cDNA probe to control for RNA loading (Sk stands for skeletal). **C)** Expression of human AT1R protein. Density of the AT1R was determined in membranes isolated from ventricles of 62 to 140 days old Wt (n=6), 62 days old Tg 20 (n=3) and 140 days old Tg 27 (n=3) as described in Method section using losartan as competitor (data is mean  $\pm$  SEM).

**Table 1.** Transmission rate of  $\alpha$ -MHC-AT1R Tg mice

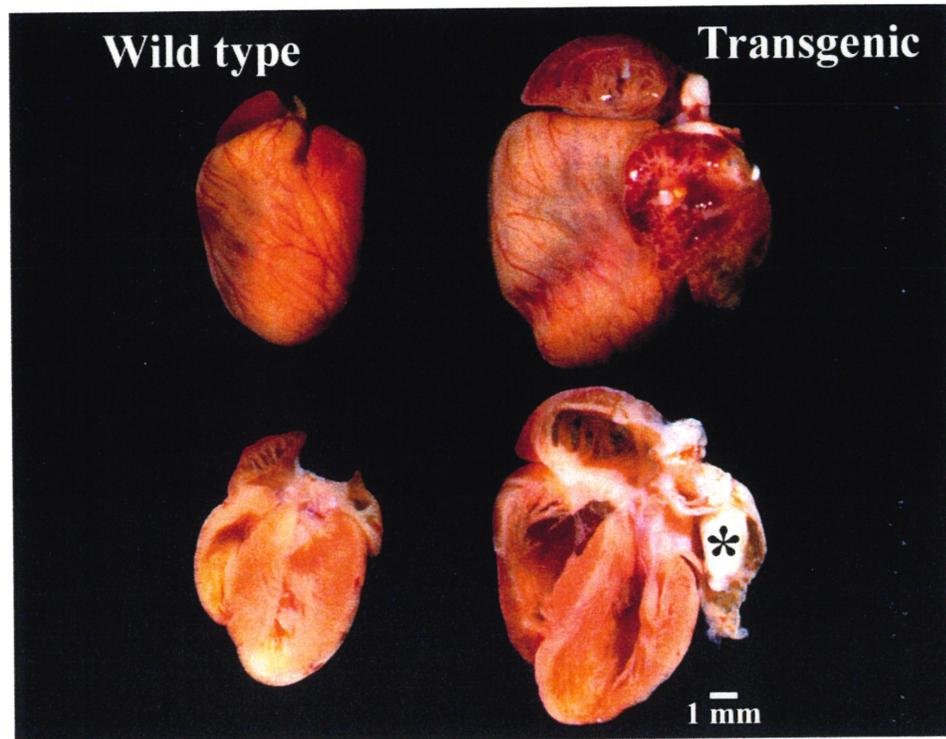
Tg founders	Tg offsprings	
	Fraction of the offsprings	% of the offsprings
3	0/13	0
17	51/86	59
20	65/106	61
21	11/33	33
25	15/20	75
26	10/18	56
27	52/100	52
30	9/26	34
32	4/9	44
35	0/10	0

Tg founder mice were mated with wild-type C3H and transmission frequency of transmission of the  $\alpha$ -MHC-AT1R transgene to their offsprings was determined by Southern blot analysis or PCR as described in METHODS section

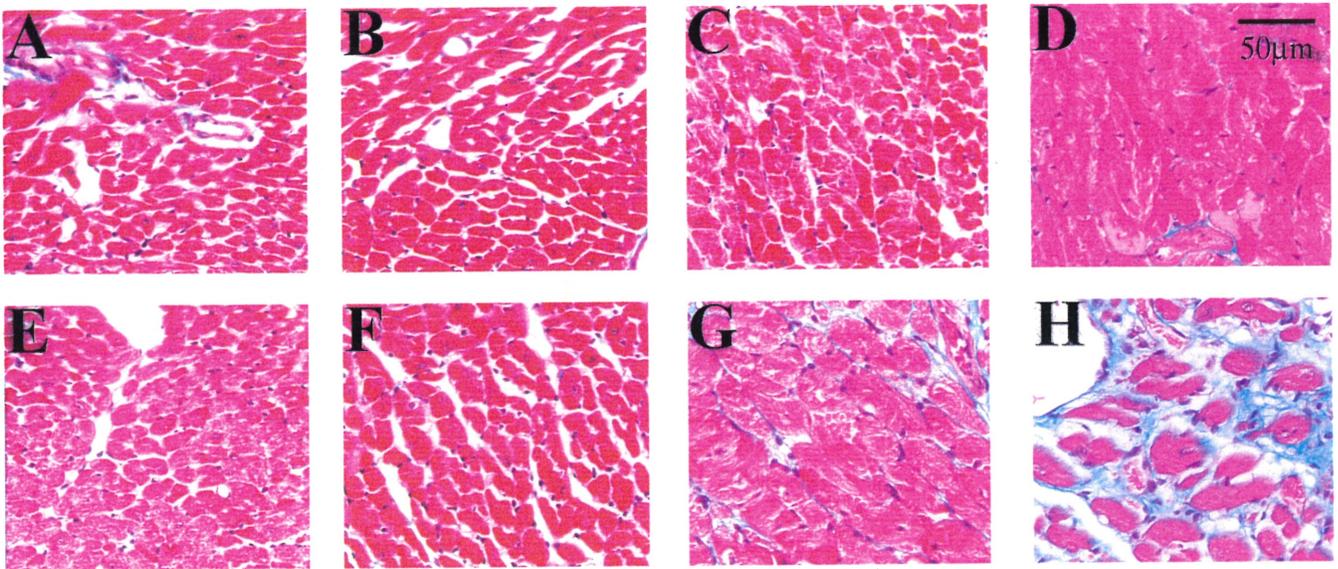
**Table 2.** Systolic blood pressure, heart rate and body, cardiac tissues, liver, kidneys and spleen weights of Wt and Tg 27 mice

	Wt (9)	Tg 27 (11)
Age (days)	125.0 ± 0.3	129.5 ± 8.8
Body weight (BW, g)	29.96 ± 0.30	29.11 ± 1.17
Femur length (FL, mm)	16.23 ± 0.16	15.77 ± 0.27
Left ventricle free wall (LV)		
LV weight (mg)	62.03 ± 2.59	81.97 ± 5.82*
LV/BW (mg/g)	2.07 ± 0.07	2.81 ± 0.18 <sup>†</sup>
LV/FL (mg/mm)	3.83 ± 0.18	5.17 ± 0.33 <sup>§</sup>
Right ventricle free wall (RV)		
RV weight (mg)	25.90 ± 1.17	44.16 ± 3.09 <sup>§</sup>
RV/BW (mg/g)	0.86 ± 0.03	1.51 ± 0.09 <sup>¶</sup>
RV/FL (mg/mm)	1.60 ± 0.07	2.79 ± 0.17 <sup>§</sup>
Left atrium (LA)		
LA weight (mg)	7.62 ± 1.63	29.53 ± 4.89 <sup>†</sup>
LA/BW (mg/g)	0.25 ± 0.05	1.01 ± 0.16 <sup>†</sup>
LA/FL (mg/mm)	0.47 ± 0.10	1.89 ± 0.34 <sup>†</sup>
Right atrium (RA)		
RA weight (mg)	7.66 ± 0.45	23.18 ± 2.63 <sup>‡</sup>
RA/BW (mg/g)	0.26 ± 0.02	0.81 ± 0.10 <sup>‡</sup>
RA/FL (mg/mm)	0.47 ± 0.03	1.47 ± 0.16 <sup>‡</sup>
Liver (L)		
L weight (g)	1.69 ± 0.06	2.24 ± 0.16*
L/BW (g/g)	56.67 ± 1.57	77.15 ± 5.16 <sup>†</sup>
L/FL (g/mm)	104.55 ± 3.83	141.18 ± 8.77 <sup>†</sup>
Kidneys (K)		
K weight (mg)	517.11 ± 32.07	458.70 ± 37.44
K/BW (mg/g)	17.22 ± 0.83	15.66 ± 0.96
K/FL (mg/mm)	31.93 ± 2.07	28.87 ± 1.99
Systolic blood pressure (mmHg)	112.9 ± 4.3	108.9 ± 3.1
Heart rate (beats/min)	578.8 ± 14.7	590.3 ± 11.7

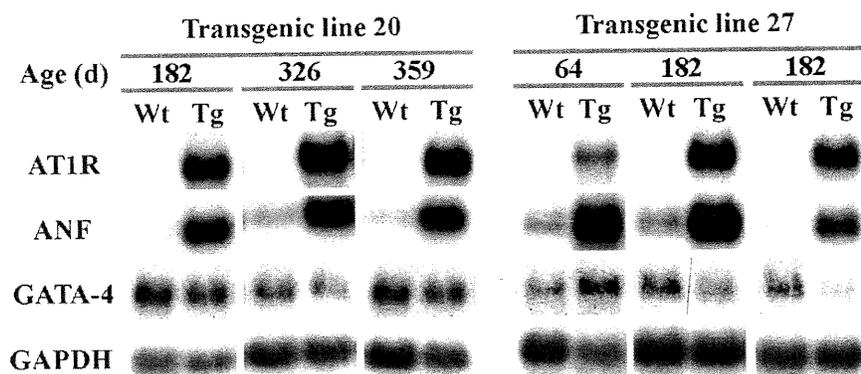
Systolic blood pressure and heart rate were determined in age-matched Wt and Tg 27 mice. Then the animals were sacrificed, the body weight determined and the heart, liver, kidneys and spleen isolated. The heart was further dissected as described in the methods section. The data are mean ± SEM for the number of mice show between (). \* $P < 0.01$ , <sup>†</sup> $P < 0.00$ , <sup>‡</sup> $P < 0.0001$ , <sup>§</sup> $P < 0.00001$ , <sup>¶</sup> $P < 0.000001$ .



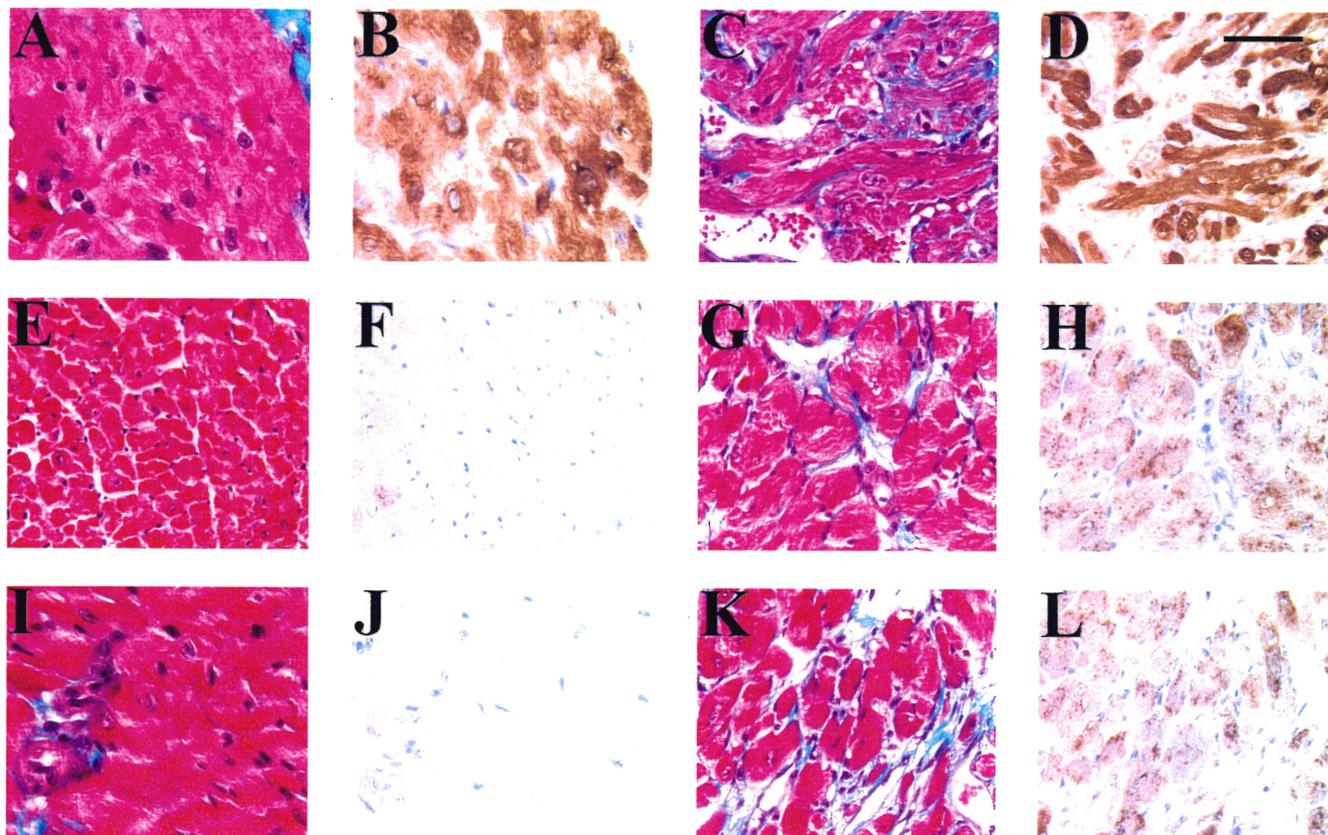
**Figure 2.** Human AT1R overexpression in cardiomyocytes induced massive remodeling of the heart. Hearts from age matched Wt and Tg 27 mice were washed with PBS and fixed in neutral formaldehyde. Hearts were cleaned up of connective tissue, photographed, sectioned in two, cleaned up of blood clots and re-photographed at the same magnification. \* indicates the fibrotic tissue in the left atrium. Bar = 1 mm.



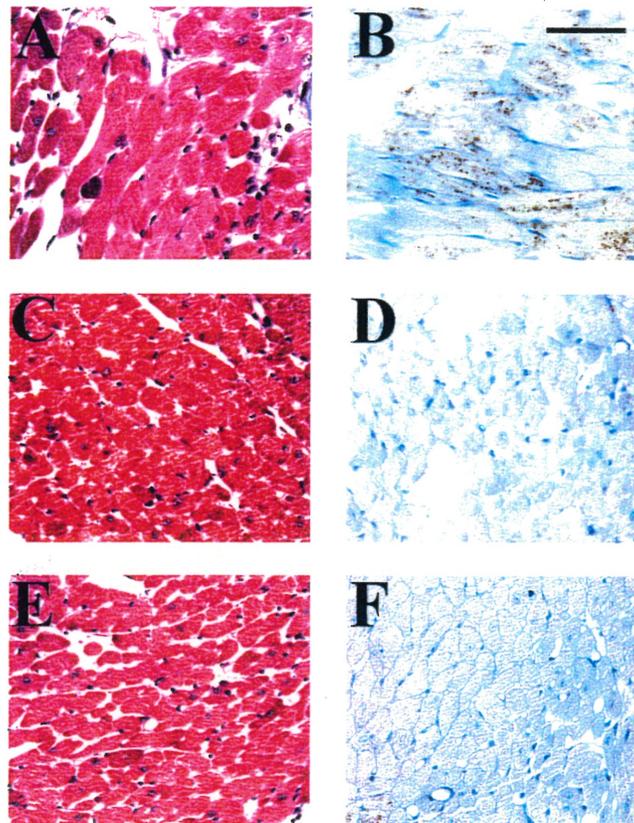
**Figure 3.** Age-dependent morphological changes in the left ventricle of Tg 27 mice. Five  $\mu\text{m}$  heart sections from age-matched Wt (A-D) and Tg (E-F) mice were stained with Masson's. Left ventricular sections of 41 (A), 65 (B), 111 (C) and 182 (D) days old Wt mice were compared to sections of 41 (E), 65 (F), 111 (G) and 152 (H) days old Tg mice. Bar = 50  $\mu\text{m}$ . The blue staining reveals collagen. Note the increase in interstitial space and in myocyte size starting at day 65 and the massive reduction in myocyte number and the enhanced collagen deposition at days 111 and 158.



**Figure 4.** RNA analysis of changes in gene expression in the ventricles of Tg mice. Total RNA was extracted from ventricles of age-matched Wt, Tg 20 and Tg 27 mice. The expression of AT1R, ANF, GATA-4, and GAPDH were determined by Northern blot as described in Method section.



**Figure 5.** Increased expression of ANF and collagen deposition in the ventricles of Tg mice. Five  $\mu\text{m}$  heart sections from 111 days old right atria (A, B) and left (E, F) and right (I, J) ventricles of Wt, and right atria (C, D) and left (G, H) and right (K, L) ventricles of Tg 27 were immunostained with a rabbit polyclonal anti-ANF antibody and counter stained with methylgreen (B, D, F, H, J, L) and collagen deposition (blue) was determined by Masson's trichrome staining (A, C, E, G, I, K). Note the homogeneously increased in ANF in both Tg ventricles. Interstitial fibrosis is detected in both ventricles and atria of Tg as compared to Wt mice. Significant cardiomyocyte hypertrophy is also evident in Tg ventricles. Bar = 50  $\mu\text{m}$ .



**Figure 6.** Prevention of the hypertrophic phenotype by the AT1R antagonist losartan. Five-micrometer heart sections from 120-day-old Tg mice treated with vehicle (A and B) or losartan (C and D) were stained for collagen with Masson's trichrome (A and C) or were immunostained with the anti-ANF antibody (B and D). Control Wt littermates are similarly presented (E and F). (Bar = 50  $\mu$ m).

### III. CHAPITRE 3.

#### ARTICLE

## **BOTH APOPTOSIS AND NECROSIS PLAY A ROLE IN THE TRANSITION FROM COMPENSATED CARDIAC HYPERTROPHY TO HEART FAILURE IN ANGIOTENSIN II TYPE 1 RECEPTOR TRANSGENIC MICE**

Nassim Dali-Youcef, Pierre Paradis and Mona Nemer<sup>\*</sup>

Key words : apoptosis- cardiac hypertrophy- heart failure- transgenic

**\*Corresponding author:** Dr Mona Nemer  
Laboratory of Cardiac Growth and Differentiation  
Institut de recherches cliniques de Montréal  
110 des Pins Ouest  
Montréal, Québec Canada H2W 1R7  
Tel: 514-987-5680  
Fax: 514-987-5575  
nemerm@ircm.qc.ca

## ABSTRACT

We have previously shown that transgenic (Tg) mice overexpressing the angiotensin II (AII) type 1 (AT<sub>1</sub>) receptor in cardiomyocytes developed cardiac hypertrophy, extensive remodeling and died of heart failure. The mechanism by which the transition from compensatory hypertrophy to heart failure occurs remains poorly defined. Interestingly we observed cardiomyocytes loss during the development of cardiac hypertrophy, remodeling and failure in AT<sub>1</sub> receptor Tg mice. Others have shown that AII induced cardiomyocyte loss through apoptosis. Both apoptosis and necrosis have been observed in the heart of human patients with cardiac failure. In order to understand the role of cardiomyocytes loss in the transition from cardiac hypertrophy to heart failure, we analyzed the time course of appearance of apoptosis and necrosis in the heart of AT<sub>1</sub> receptor Tg mice by comparison to control littermates in function of age and presence or absence of heart failure. In this study, we analyzed 3 groups of animals, young (under 100 days of age), mature (under a year of age) and old (over a year of age) non-failing and failing Tg mice and their age-matched littermates. The heart weight/femur length ratio was not changed in young and mature Tg mice and increased by 1.13- and 1.57-fold in old and old failing mice, respectively. The atrial natriuretic factor was augmented by 1.9-, 2.5- and 4.8-fold in young, mature and old failing Tg mice, respectively. Interstitial collagen deposition was not altered in young Tg mice and increased by 2.5-, 2.2- and 6.1-fold in mature, old and old failing Tg mice, respectively. Apoptosis was first assessed by TUNEL analysis. We did not observe any significant changes in apoptosis in the heart of young and mature Tg animals by comparison to their controls. The percentage of TUNEL positive nuclei was increased by 1.2-fold and 1.6-fold increase in the Left (LV) and right

ventricle (RV), respectively, in old Tg mice in comparison to their controls. The percentage of TUNEL positive nuclei was increased by 3.5-fold and 3.1-fold in the LV and RV of old failing Tg animals, respectively, as compared to age-matched control mice. Increase in TUNEL positive nuclei was probably due to apoptosis as immunohistochemistry with antibodies raised against the active caspase 3 or the pro-apoptotic Bax showed staining in the failing hearts of Tg mice but not in control animals. Furthermore, electron microscopy (EM) showed that both apoptosis and necrosis participate in the loss of cardiomyocytes in the failing heart of old failing Tg animals. EM analysis showed a 1.3- and 1.9-fold increase of apoptosis in both non-failing and failing old Tg mice, respectively, whereas an augmentation in necrosis was observed solely in failing old Tg mice as compared to their control littermates. There was no difference in apoptosis or necrosis between Wt and Tg young animals. Finally we observed an increase in endothelin-1 (ET-1) expression in young and old failing animals suggesting a role of this peptide in the development of cardiac hypertrophy and failure. Altogether, these data suggest that apoptosis and necrosis play an important role in the transition from cardiac hypertrophy to heart failure in AT1R overexpressing Tg mice.

## INTRODUCTION

Despite the increasing number of available pharmacological agents, congestive heart failure remains the leading cause of death in the industrialized countries. It is a pathophysiological state that develops following cardiovascular diseases such as hypertension, myocardial infarction and cardiomyopathies. Heart failure occurs after a period of adaptation, namely cardiac hypertrophy followed by remodeling, leading to an impaired cardiac function, decompensation and ultimately death. These changes are accompanied with cardiomyocyte hypertrophy and loss, interstitial collagen deposition and re-expression of fetal genes such as the atrial natriuretic factor (ANF). Although the mechanisms that trigger the passage from a compensatory cardiac hypertrophy to failure remain unknown, factors such as AII have been implicated in this transition.

The transition from compensated cardiac hypertrophy to failure could be triggered, at least in part, by the loss of cardiomyocytes causing a decrease in contractility of the heart. We have observed myocyte loss in the heart of Tg mice overexpressing the human AT<sub>1</sub> receptor with cardiac hypertrophy and failure. Cardiomyocyte loss could occur through apoptosis or necrosis. Apoptosis or programmed cell death is a highly regulated non-inflammatory energy-requiring process. The features of apoptosis are cell shrinkage, blebbing of the membrane, chromatin condensation and margination, internucleosomal DNA fragmentation and macrophage phagocytosis of the apoptotic bodies that result from this process (1-3). Apoptosis occurs during normal fetal development (4) and in some pathological conditions including neurodegenerative (5;6) and cardiovascular diseases (7-9) as well as in some leukemias (10;11). Necrosis, an accidental cell death, occurs in non energy-requiring processes such as ischemia and is characterized by cell

membrane disruption and release of the cellular content. Several authors have reported increased apoptosis in different animal models of cardiac hypertrophy and failure induced by pressure overload (12), myocardial infarction (13) and hypertension (14;15), and in human patients with acute myocardial infarction (16) and dilated cardiomyopathy (17;18).

Interestingly, there are data suggesting that AII might induce progression from compensated hypertrophy to cardiac remodeling and heart failure through induction of cardiomyocyte apoptosis. Indeed, Li *et al.* (19) have observed a marked increase in apoptosis in failing SHR as compared to age-matched non-failing SHR and WKY controls. Moreover, several studies have shown that drugs such as angiotensin converting enzyme (ACE) inhibitors which prevent the development of cardiac hypertrophy and remodeling (20-22) also inhibit apoptosis in the heart of animal models post-myocardial infarction (23) and with hypertension (24). Until recently, all of the growth effects of AII were attributed to the AT<sub>1</sub> receptor, whereas apoptosis was often linked to the AII type 2 receptors (AT<sub>2</sub>) (25;26). AT<sub>2</sub> receptors have been implicated in AII mediated apoptosis in the vascular system but their expression is barely detectable in adult cardiomyocytes of rats and mice (27). Other data support a role for the AT<sub>1</sub> receptor as mediator of cardiomyocyte apoptosis. The laboratory of Piero Anversa showed, using an AT<sub>1</sub> receptor antagonist, that AII caused cardiomyocyte apoptosis *in vitro* via the AT<sub>1</sub> receptors (28;29). The same group has reported that local AII increase and oxidative damage in the heart of diabetic patients and patients with diabetes and hypertension were associated with cardiac cell apoptosis and necrosis probably due to oxidative damage (30). AII might cause cardiomyocytes loss indirectly through an autocrine or paracrine

mechanism. AII has been shown to induce secretion of growth factors such as transforming growth factor  $\beta$ 1 (TGF $\beta$ 1) and ET-1 (31). TGF $\beta$ 1 has been involved in collagen deposition (32), while ET-1 has been shown to induce cardiomyocyte hypertrophy (33). Moreover, ET-1 might cause the loss of cardiomyocytes through an oxidative process. Indeed, Nakahashi *et al.* (34) have shown that ET-1 enhances nitric oxide-induced apoptosis in cultured vascular smooth-muscle cells.

In order to determine the role of cardiomyocytes loss, we examined the time course appearance of myocytes loss by apoptosis and necrosis in the heart of Tg mice by comparison to age-matched wild type mice in function of age and presence or absence of heart failure. Apoptosis was assayed using the TUNEL assay for DNA fragmentation, immunostaining for two pro-apoptotic markers, active caspase-3 and Bax. We have also investigated by electron microscopy the occurrence of apoptosis and necrosis. Our data support the possibility that both apoptosis and necrosis play an important role in the transition from compensatory cardiac hypertrophy to a decompensated state, namely heart failure.

## MATERIAL AND METHODS

### *Animals:*

Animals were handled according to animal care guidelines. Young (under 100 days of age), mature (under a year of age) and old (over a year of age) non-failing and failing AT<sub>1</sub> Tg mice and their age-matched Wt controls were sacrificed for the study. The criteria of inclusion in the failing group were decreased activity in the cage, breathlessness and edema in the lower part of the body, the four limbs. Anesthetized mice were killed for morphometric analysis as previously described (35).

### *Histology and Immunohistochemistry reaction*

Animals were anesthetized with methoflurane or avertin and the hearts were fixed and prepared for histology and immunohistochemical analysis as previously described (35). Immunohistochemistry for ANF, active form of caspase-3 (MF-397, kindly provided by Dr. Donald Nicholson, Merck-Frosst Canada Inc., Pointe Claire, Quebec, Canada) and Bax (calbiochem) were performed at the following dilutions 1:1000, 1:4000 and 1:100, respectively. Interstitial collagen deposition was determined using Sirius red staining of heart sections as previously described by (36). Interstitial collagen deposition was quantified using image analysis software (Northern Eclipse 5.0, EMPIX Imaging Inc.)

### *TUNEL Assay for apoptotic nuclei detection*

Cardiomyocyte apoptosis was detected by terminal deoxynucleotidyl dUTP nick end-labeling technique (TUNEL) on heart sections prepared as described above. Slides were processed as recommended in the Apoptag™ kit (Intergen Company, Purchase, NY, and USA ). A methyl green counterstaining was performed. Normal nuclei stained in blue for

whereas TUNEL positive nuclei stained in brown (Fig. 2A). An average of 100 nuclei from 10 random fields per animal were counted at the magnification of 200 x and data were reported as % of TUNEL positive nuclei.

***Northern blot and RT-PCR analysis in the heart***

Northern blot analysis for ANF and GAPDH was performed as previously described (35). For reverse transcriptase-PCR experiment 5  $\mu$ g of RNA, extracted from heart tissue of young, mature and old failing AT<sub>1</sub> receptor Tg animals and their age-matched controls, were processed. cDNAs were amplified using oligonucleotides for angiotensinogen at an annealing temperature of 56°C (forward ATAAATGATGAGCAGCAGACC and reverse CAGTGAGCTAATTACAGACCC), AII type 2 receptor (AT<sub>2</sub>) at an annealing temperature of 53°C (forward AGACCCAGCAAATGGCAAG and reverse GGTCAGCATCAATCCAGGAAG), TGF $\beta$ 1 at an annealing temperature of 60°C (forward CAACGCCATCTATGAGAAAACC and reverse AAGCCCTGTATTCCGTCTCC), Endothelin type A receptor (ET<sub>A</sub>) at an annealing temperature of 55°C (forward AAGAGCAGAACAACCACAAC and reverse ACCATCATCTCCTTTCTCCC), ET-1 at an annealing temperature of 54°C (forward AGAAGAGGCAGAAAGGCAC and reverse GAAGGAAGGAAACTACGAAGG) and tubulin at an annealing temperature of 56.5°C (forward ATGCTGCCAATAACTATGCTC and reverse TCATTGTCTACCATGAAGGCAC).

PCR products were transferred by capillarity on a nylon membrane and hybridized with <sup>32</sup>P labeled internal oligonucleotide specific for Aog at 55°C (GGGTTTGTGGATACTGG), AT<sub>2</sub> at 55°C (GAACTGTGCCCCAGAAATGC),

TGF $\beta$ 1 at 60°C (GCAACAATTCCTGGCGTTAC), ET<sub>A</sub> at 56°C (GGAAACAACCATTACGCC), ET-1 (TCAATGTGCTCGGTTGTGCG) at 54°C and tubulin at 60°C (GTAGGGCTCAACCACAGCAG).

***Electron transmission microscopy analysis for cardiomyocyte apoptosis***

Animal were anesthetized with methoflurane and the hearts were perfused with a physiological phosphate buffered saline (PBS) solution to wash out the blood then perfused for 10 min with a 2% glutaraldehyde in 0.1 M sodium cacodylate (pH 7.4) buffer. Left ventricles were dissected, finely sliced (pieces of ~ 1-2 mm in diameter) and incubated in the same fixative for 2 h at 4°C. Specimens were rinsed three times with 2 % sucrose in 0.1 M sodium cacodylate for 20 min. Sections were post-fixed for 1 h in 2 % osmic acid in 0.1 M sodium cacodylate and subsequently embedded in LX-112 resin (LADD Research Laboratories, Burlington, USA). Ultrathin sections (90 nm) of tissues were performed using an "Electra e" microtome, collected on nickel grids and stained with uranyl acetate. The ultrastructure and morphological features of cardiac cells were examined and quantification of apoptotic and necrotic nuclei was achieved using a JEM-1200 EX- JEOL electron microscope.

***Statistics*** The data are reported as mean  $\pm$  SEM. Comparisons between 2 groups were made using Student's *t* test, and multiple group comparisons were made using the one way ANOVA test followed by the Student-Newman-Keuls test. Differences were considered to be statistically significant when  $P < 0.05$ .

## RESULTS

In the present study we investigated the occurrence of apoptosis and necrosis in the hearts of Tg mice overexpressing the human AT<sub>1</sub> receptor as a function of age and presence or absence of heart failure. The mice were divided in 3 groups, young, mature and old animals. Tg mice included in the failing group presented signs of congestive heart failure; they had reduced activity in the cage, edema in the four limbs and were breathless. At post-mortem examination, the heart was dilated (data not shown) and pleural effusion and/or ascitis were detected. The heart weight to femur length (HW/FL) was not altered in young and mature Tg mice and was increased by 1.14- and 1.57-fold in old Tg and old-failing Tg mice, respectively, as compared to their age-matched controls (Table 1). The lung weight to femur length was increased by 1.3-fold only in old-failing Tg mice as compared to age-matched Wt mice, supporting the presence of congestive heart failure. The weight of the other organs tested was not altered.

Using Northern blot analysis, we observed an increase in the expression of ANF (normalized to GAPDH) in young (1.9-fold) and mature (2.5-fold) Tg animals and a stronger augmentation in old-failing (4.8-fold) Tg mice as compared to their age-matched controls (Fig .5A). Interstitial collagen deposition in this model was assessed using Sirius red staining (Fig.1). We observed a progression of interstitial collagen deposition with age. In young mice, we find no difference in the amount of interstitial collagen deposition between Wt (Fig. 1A) and Tg (Fig. 1B) mice. However a 2.5- and 2.2-fold increase in interstitial collagen deposition were observed in mature (Fig. 1D vs 1C) and old (Fig. 1F vs 1E) Tg mice as compared to their respective controls. Old-failing Tg mice presented a

greater accumulation of interstitial collagen, it was increased by 6.1-fold when compared to their controls of the same age (Fig. 1G vs 1E). This increase in fibrosis might have resulted from cardiomyocyte loss and replacement with interstitial collagen deposition.

To test whether the loss of cardiomyocytes was a result of apoptosis, we carried out TUNEL assay on heart sections of young, mature, old and old-failing mice and their age-matched controls. No difference in TUNEL positive nuclei was observed between Tg and Wt mice in the left (LV) and right ventricles (RV) of young and mature animals (Fig. 2B). It is noteworthy that the percentage of TUNEL positive nuclei was 46 % lower in the RV than in the LV in Wt mice. The % of TUNEL positive nuclei was significantly higher in LV (1.2-fold) and RV (1.6-fold) of old Tg mice by comparison to their age-matched controls (Fig. 2B). Interestingly, old-failing Tg mice presented a higher increase of TUNEL positive nuclei in the LV (3.5-fold) and RV (3.1-fold) as compared to age-matched Wt mice (Fig. 2B).

As previously observed (35), immunohistochemistry on heart sections from old-failing Tg mice showed important staining for the ANF (Fig. 3 B) as compared to the Wt (Fig. 3A). Staining for two pro-apoptotic markers, the active form of caspase 3 (Fig. 3D) and Bax (Fig. 3F) was observed in old-failing Tg mice and not in the age-matched Wt (Fig. 3C and Fig. 3E). The incidence of active caspase-3 and Bax paralleled the occurrence of TUNEL positive nuclei in the heart of old-failing Tg mice (data not shown).

In order to determine apoptosis and necrosis specifically in cardiomyocytes, we performed electron microscopy (EM) in left ventricular sections of young, old and old-failing Tg and age-matched controls. EM analysis was concentrated on cardiomyocytes and the nuclei were sorted into three groups, normal (fig. 4A), necrotic (Fig. 4B) and

apoptotic (Fig. 4C, D and E) nuclei, in Wt, non-failing and failing Tg. The cardiomyocytes were easily recognized by the myofibrillar organization (Fig. 4A, B and C). One can appreciate the 3 stages of apoptosis i.e. condensation and margination of the chromatin (Fig. 4C), condensation of the chromatin and nucleus shrinkage (Fig. 4D) and apoptotic bodies formation (Fig. 4E). Necrosis of cardiomyocytes occurs by nucleus fragmentation without nucleus condensation (Fig. 4B). Moreover, the size of apoptotic nuclei (Fig. 4C, D and E, bar = 0.5 $\mu$ m) appear to be smaller than normal (Fig. 4A, bar = 1 $\mu$ m) or necrotic nuclei (Fig. 4B, bar=1 $\mu$ m). The percentage of EM apoptotic nuclei was not changed in young Tg mice as compared to their age-matched controls (Fig. 4F). However it was increased by 1.3- and 1.9-fold in old and old-failing Tg mice as compared to old Wt mice. Interestingly, the rate of necrotic nuclei was 2.2-fold higher in old-failing Tg mice in comparison to Wt mice (Fig. 4G). No change in the percentage of necrotic nuclei was observed between old Tg and Wt mice. As expected, no difference in apoptosis and necrosis was observed between Wt and Tg young animals.

Finally, we investigated by RT-PCR the expression of some genes that might change during different stages of hypertrophy and failure (Fig. 5B). We did not observe any change in the expression of neither angiotensinogen nor AT<sub>2</sub> receptor at different ages suggesting that the AT<sub>2</sub> receptor is not important in the induction of apoptosis in this model. The expression of the growth factor TGF- $\beta$ 1 was increased at all ages suggesting a role for this factor in collagen deposition. The expression of ET-1 was increased in young animals, not changed in mature Tg animals and increased in old-failing Tg mice. The expression of the ET<sub>A</sub> receptor was decreased in young and old-failing Tg mice but not altered in mature Tg mice.

## DISCUSSION

In this study, we investigated the occurrence of apoptosis and necrosis in the transition from cardiac hypertrophy to failure. Our results provide the first evidence that the transition from cardiac hypertrophy to heart failure is accompanied with apoptosis in the compensated hypertrophy and with apoptosis and necrosis in the final stage, heart failure. Apoptosis and necrosis are simultaneously augmented only in Tg animals that displayed signs of heart failure. Significant increase of apoptosis was observed in old Tg mice with cardiac hypertrophy, while no change in the percentage of apoptotic nuclei was observed in young and mature Tg mice when compared to Wt control mice. EM provided evidence that cells undergoing apoptosis and necrosis were of cardiac origin.

Although, there was concordance in the ratio of apoptosis between failing hearts and their age-matched Wt controls by either TUNEL assay or EM, the incidence of apoptotic nuclei were very different in estimates from each technique. Indeed, the rate of apoptotic nuclei was in the range of 0.5 to 1.5 % by TUNEL, whereas the percentage of apoptotic nuclei was about 10-fold higher by EM. This discrepancy could be ascribable, at least in part, to the fact that the percentage of fragmented nuclei by TUNEL was expressed with reference to all the nuclei present in the tissue section without discrimination between myocytes and non-myocytes; and that cardiomyocytes account for about 35 % of all cells in the heart, while by EM, the percentage of fragmented nuclei was expressed with reference to the cardiomyocytes only. This discrepancy could also depend on differences in the technique of fixation.

The occurrence of apoptosis in heart failure varies a lot from a study to another. In a study by Narula *et al.* (37) the percentage of TUNEL positive nuclei was as high as 35 % in the heart of failing patients undergoing cardiac transplant. Given the fact that apoptosis is completed within 24 hours, this estimate seems far too high as it would lead to a rapid organ damage. The values of apoptotic nuclei provided by Olivetti *et al.* (38) appear to be more reliable and are in the range of 0.23 % in patients with heart failure. Saraste *et al.* (18) reported a rate of 0.12 % in patients with dilated cardiomyopathy.

The % of fragmented nuclei detected by EM and TUNEL assay in Wt mice were higher in older than in younger animals. This is in agreement with a report by Nitahara *et al.* (39) showing progressive increase in the occurrence of cardiomyocyte apoptosis with age in Fisher 344 rats. This might be due to an increase in diastolic intracellular  $Ca^{2+}$  and augmented DNase activity in cardiomyocytes with aging. Furthermore, Liu *et al.* (40) reported that cardiomyocytes from old rats were more sensitive to apoptosis than in younger animals after acute occlusion of the coronary artery in both groups.

A recent study by Frustaci *et al.* (41) reported the occurrence of both apoptosis and necrosis in the heart of human diabetic patients and patients with diabetes and hypertension presenting signs of cardiac hypertrophy, cavity dilation and decreased cardiac performance. Indeed, the authors observed a 85-fold increase in cardiomyocyte apoptosis in the heart of patients with diabetes and patients with diabetes and hypertension, whereas a 4-fold and 7-fold increase in myocyte necrosis was observed in the heart of patients with diabetes and patients with diabetes and hypertension, respectively. This phenotype was associated with a local augmentation of AII and protein

peroxynitration in the heart of diabetic and hypertensive patients. AII might have caused oxidative damage and subsequent apoptosis and necrosis of cardiac cells.

The mechanisms by which apoptosis are triggered in cardiomyocytes leading to chronic loss of cardiomyocytes and heart failure remain poorly understood. Some possibilities could be addressed. Given the increased number of AT<sub>1</sub> receptors in our Tg mice, an exacerbation of the receptors signaling pathway could be responsible for an increase in intracellular Ca<sup>2+</sup> and subsequent activation of endonucleases triggering apoptosis. Interestingly, an *in vitro* study by Cigola *et al.* (28) showed a 37 % increase in intracellular Ca<sup>2+</sup> and an activation of endogenous calcium-dependent endonucleases without a change in the activity of pH-dependent endonucleases in AII induced apoptosis in neonatal rat cardiomyocytes.

Since an increase in the expression of ET-1 was observed in failing animals in our study, it is possible that endothelin-1 could induce apoptosis of cardiomyocytes via nitric oxide release. To support this possibility, Nakahashi *et al.* (42) have shown that increase in ET-1 expression in the atherosclerotic plaque enhanced nitric oxide-induced apoptosis of vascular smooth muscle cells. Moreover, we did observe a decrease in the expression of the endothelin type A receptor (ET<sub>A</sub>R) in old-failing Tg mice. This downregulation of the ET<sub>A</sub>R could be due to a desensitization of the receptor after an increase in the binding of the agoniste ET-1. However, this hypothesis should be verified by the measurement of ET<sub>A</sub>R density in ventricular membranes. An increase in TGFβ1 expression in Tg mice could be responsible for the interstitial collagen deposition. The expression of the AT<sub>2</sub> receptor was not significantly altered suggesting that the AT<sub>2</sub> receptor is not involved in cardiac cell apoptosis in our model.

Our results are in agreement with the study by Li *et al.* (19) reporting a strong increase in the apoptotic index in failing SHR as compared to non-failing SHR and WKY age-matched animals. Similarly to our results, the authors have reported a slight but significant increase in apoptosis in non-failing animals in comparison to their age-matched controls. Taken together, our data suggest that apoptosis and necrosis could mediate the transition from compensated cardiac hypertrophy to decompensated heart failure in AT<sub>1</sub> receptor Tg mice.

It has been shown that cell death could result from a combination of pro-apoptotic and pro-necrotic signals through a common pathway and the target of both signals is mitochondria. Thus, it remains uncertain whether therapeutic interventions inhibiting apoptosis could prevent cell death by necrosis. Further studies are necessary to determine whether treatment of non failing AT<sub>1</sub> Tg mice with a caspase inhibitor or an anti-oxidant could prevent cardiomyocyte cell loss (apoptosis and necrosis) and thus impede the transition to heart failure.

## ACKNOWLEDGMENTS

Our gratitude to Lise Laroche for expert secretarial assistance, to Christian Charbonneau for his help with the electron microscopy protocol and to the members of the Nemer's laboratory and the MRC multidisciplinary group in hypertension for helpful discussions. This study was supported by a grant from the Medical Council of Canada. MN is a MRC scientist.

## REFERENCES

- (1) Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Canc* 1972; 26(4):239-257.
- (2) Searle J, Kerr JF, Bishop CJ. Necrosis and apoptosis: distinct modes of cell death with fundamentally different significance. *Pathology Annual* 1982; 17 Pt 2:229-259.
- (3) Majno G, Joris I. Apoptosis, oncosis, and necrosis. An overview of cell death. *Am J Pathol* 1995; 146(1):3-15.
- (4) Haanen C, Vermes I. Apoptosis: programmed cell death in fetal development. *European Journal of Obstetrics, Gynecology, & Reproductive Biology* 1996; 64(1):129-133.
- (5) Pender MP, Nguyen KB, McCombe PA, Kerr JF. Apoptosis in the nervous system in experimental allergic encephalomyelitis. *J Neurol Sci* 1991; 104(1):81-87.
- (6) Li M, Ona VO, Guegan C, Chen M, Jackson-Lewis V, Andrews LJ, Olszewski, AJ, Stieg PE, Lee JP, Przedborski S, Friedlander RM. Functional role of caspase-1 and caspase-3 in an ALS transgenic mouse model. *Science* 2000; 288(5464):335-339.
- (7) 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(1):141-149.

- (8) Mallat Z, Tedgui A, Fontaliran F, Frank R, Durigon M, Fontaine G. Evidence of apoptosis in arrhythmogenic right ventricular dysplasia. *N Engl J Med* 1996; 335:1190-1196.
- (9) Saraste A, Pulkki K, Kallajoki M, Henriksen K, Parvinen, M, Voipio-Pulkki LM. Apoptosis in human acute myocardial infarction. *Circulation* 1997; 95(2):320-323.
- (10) Bellosillo B, Dalmau M, Colomer D, Gil J. Involvement of CED-3/ICE proteases in the apoptosis of B-chronic lymphocytic leukemia cells. *Blood* 1997; 89(9):3378-3384.
- (11) Estrov Z, Thall PF, Talpaz M, Estey EH, Kantarjian HM, Andreeff M, Harris D, Van Q, Walterscheid M, Kornblau SM. Caspase 2 and caspase 3 protein levels as predictors of survival in acute myelogenous leukemia. *Blood* 1998; 92(9):3090-3097.
- (12) Teiger E, Than VD, 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(12):2891-2897.
- (13) Black SC, Huang JQ, Rezaiefar P, Radinovic S, Eberhart, A, Nicholson DW, Rodger IW. Co-localization of the cysteine protease caspase-3 with apoptotic myocytes after in vivo myocardial ischemia and reperfusion in the rat. *J Mol Cell Cardiol* 1998; 30(4):733-742.

- (14) Fortuno MA, Ravassa S, Etayo JC, Diffley JF. Overexpression of Bax protein and enhanced apoptosis in the left ventricle of spontaneously hypertensive rats. Effects of AT<sub>1</sub> blockade with losartan. *Hypertension* 1998; 32:280-286.
- (15) Li Z, Bing OH, Long X, Robinson KG, Lakatta EG. Increased cardiomyocyte apoptosis during the transition to heart failure in the spontaneously hypertensive rat. *Am J Physiol* 1997; 272(5 Pt 2):H2313-H2319.
- (16) Saraste A, Pulkki K, Kallajoki M, Henriksen K, Parvinen M, Voipio-Pulkki LM. Apoptosis in human acute myocardial infarction. *Circulation* 1997; 95(2):320-323.
- (17) 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(8):1137-1141.
- (18) Saraste A, Pulkki K, Kallajoki M, Heikkila P, Laine P, Mattila S, Nieminen MS, Parvinen M, Voipio-Pulkki LM. Cardiomyocyte apoptosis and progression of heart failure to transplantation. *Eur J Clin Invest* 1999; 29(5):380-386.
- (19) Li Z, Bing OH, Long X, Robinson KG, Lakatta EG. Increased cardiomyocyte apoptosis during the transition to heart failure in the spontaneously hypertensive rat. *Am J Physiol* 1997; 272(5 Pt 2):H2313-H2319.
- (20) Pfeffer JM, Pfeffer MA, Mirsky I, Braunwald E. Regression of left ventricular hypertrophy and prevention of left ventricular dysfunction by captopril in the spontaneously hypertensive rat. *Proc Natl Acad Sci USA* 1982; 79:3310-3314.

- (21) Baker KM, Chernin MI, Wixson SK, Aceto JF. Renin-angiotensin system involvement in pressure-overload cardiac hypertrophy in rats. *Am J Physiol* 1990; 259:H324-H332.
- (22) Pfeffer MA, Lamas GA, Vaughan DE, Parisi AF, Braunwald E. Effect of captopril on progressive ventricular dilatation after anterior myocardial infarction. *N Engl J Med* 1988; 319:80-86.
- (23) Goussev A, Sharov VG, Shimoyama H, Tanimura M, Lesch M, Goldstein S, Sabbah HN. Effects of ACE inhibition on cardiomyocyte apoptosis in dogs with heart failure. *Am J Physiol* 1998; 275(2 Pt 2):H626-H631.
- (24) 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(5):1029-1034.
- (25) Nakajima M, Hutchinson HG, Fujinaga M, Hayashida W, Morishita R, Zhang L, Horiuchi M, Pratt RE, Dzau VJ. The angiotensin II type 2 (AT2) receptor antagonizes the growth effects of the AT1 receptor: gain-of-function study using gene transfer. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995; 92(23):10663-10667.
- (26) Yamada T, Akishita M, Pollman MJ, Gibbons GH, Dzau VJ, Horiuchi M. Angiotensin II type 2 receptor mediates vascular smooth muscle cell apoptosis and antagonizes angiotensin II type 1 receptor action: an in vitro gene transfer study. *Life Sci* 1998; 63(19):L289-L295.

- (27) 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(3):527-535.
- (28) Cigola E, Kajstura J, Li BS, Meggs LG, Anversa P. Angiotensin II activates programmed myocyte cell death in vitro. *Exp Cell Res* 1997; 231(2):363-371.
- (29) 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(3):859-870.
- (30) Frustaci A, Kajstura J, Chimenti C, Jakoniuk I, Leri A, Maseri A, Nadal-Ginard B, Anversa P. Myocardial cell death in human diabetes. *Circ Res* 2000; 87(12):1123-1132.
- (31) Gray MO, Long CS, Kalinyak JE, Li HT, Karliner JS. Angiotensin II stimulates cardiac myocyte hypertrophy via paracrine release of TGF-beta 1 and endothelin-1 from fibroblasts. *Cardiovasc Res* 1998; 40(2):352-363.
- (32) Kupfahl C, Pink D, Friedrich K, Zurbrugg HR, Neuss M, Warnecke C, Fielitz J, Graf K, Fleck E, Regitz-Zagrosek V. Angiotensin II directly increases transforming growth factor beta1 and osteopontin and indirectly affects collagen mRNA expression in the human heart. *Cardiovasc Res* 2000; 46(3):463-475.

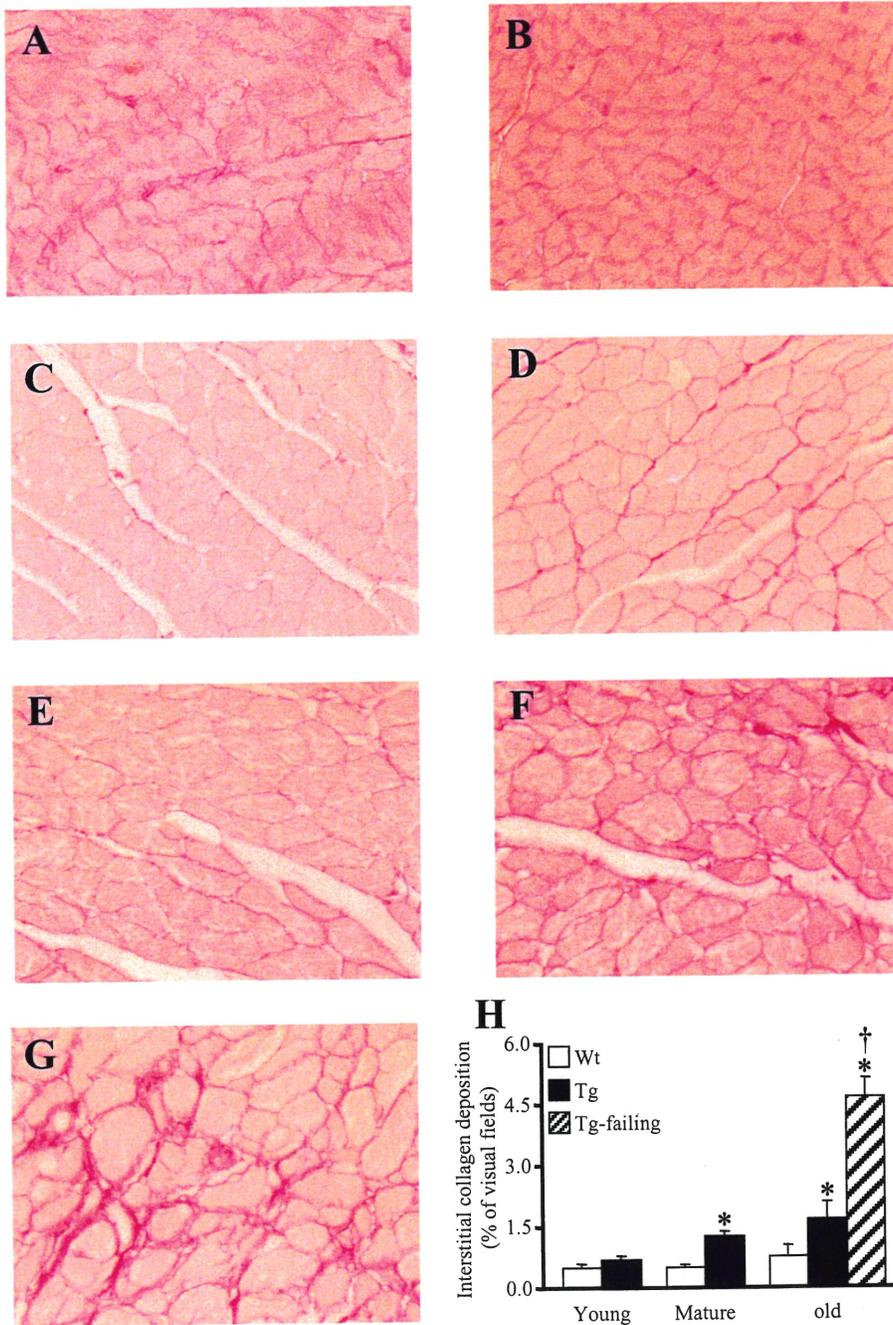
- (33) Ito H, Hirata Y, Adachi S, Tanaka M, Tsujino M, Koike A, Nogami A, Murumo F, Hiroe M. Endothelin-1 is an autocrine/paracrine factor in the mechanism of angiotensin II-induced hypertrophy in cultured rat cardiomyocytes. *J Clin Invest* 1993; 92:398-403.
- (34) Nakahashi T, Fukuo K, Nishimaki H, Hata S, Shimizu M, Suhara T, Takimoto M, Morimoto S, Ogihara T. Endothelin-1 enhances nitric oxide-induced cell death in cultured vascular smooth-muscle cells. *J Cardiovasc Pharmacol* 1998; 31 Suppl 1:S351-S353.
- (35) Paradis P, Dali-Youcef N, Paradis FW, Thibault G, Nemer M. Overexpression of angiotensin II type 1 receptor in cardiomyocytes induces cardiac hypertrophy and remodeling. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000; 97(2):931-936.
- (36) Prescott G, Silversides DW, Chiu SM, Reudelhuber TL. Contribution of circulating renin to local synthesis of angiotensin peptides in the heart. *Physiol Rev* 2000; 4(1):67-73.
- (37) Narula J, Haider N, Virmani R, DiSalvo TG, Kolodgie FD, Hajjar RJ, Schmidt U, Semigran MJ, Dec GW, Khaw BA. Apoptosis in myocytes in end-stage heart failure. *N Engl J Med* 1996; 335:1182-1189.
- (38) 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 human heart. *N Engl J Med* 1997; 336(16):1131-1141.

- (39) Nitahara JA, Cheng W, Liu Y, Li B, Leri A, Li P, Mogul, D, Gambert SR, Kajstura J, Anversa P. Intracellular calcium, DNase activity and myocyte apoptosis in aging Fischer 344 rats. *J Mol Cell Cardiol* 1998; 30(3):519-535.
- (40) Liu L, Azhar G, Gao W, Zhang X, Wei JY. Bcl-2 and Bax expression in adult rat hearts after coronary occlusion: age-associated differences. *Am J Physiol* 1998; 275(1 Pt 2):R315-R322.
- (41) Frustaci A, Kajstura J, Chimenti C, Jakoniuk I, Leri A, Maseri A, Nadal-Ginard B, Anversa P. Myocardial cell death in human diabetes. *Circ Res* 2000; 87(12):1123-1132.
- (42) Nakahashi T, Fukuo K, Nishimaki H, Hata S, Shimizu M, Suhara T, Takimoto M, Morimoto S, Ogihara T. Endothelin-1 enhances nitric oxide-induced cell death in cultured vascular smooth-muscle cells. *J Cardiovasc Pharmacol* 1998; 31 Suppl 1:S351-S353.

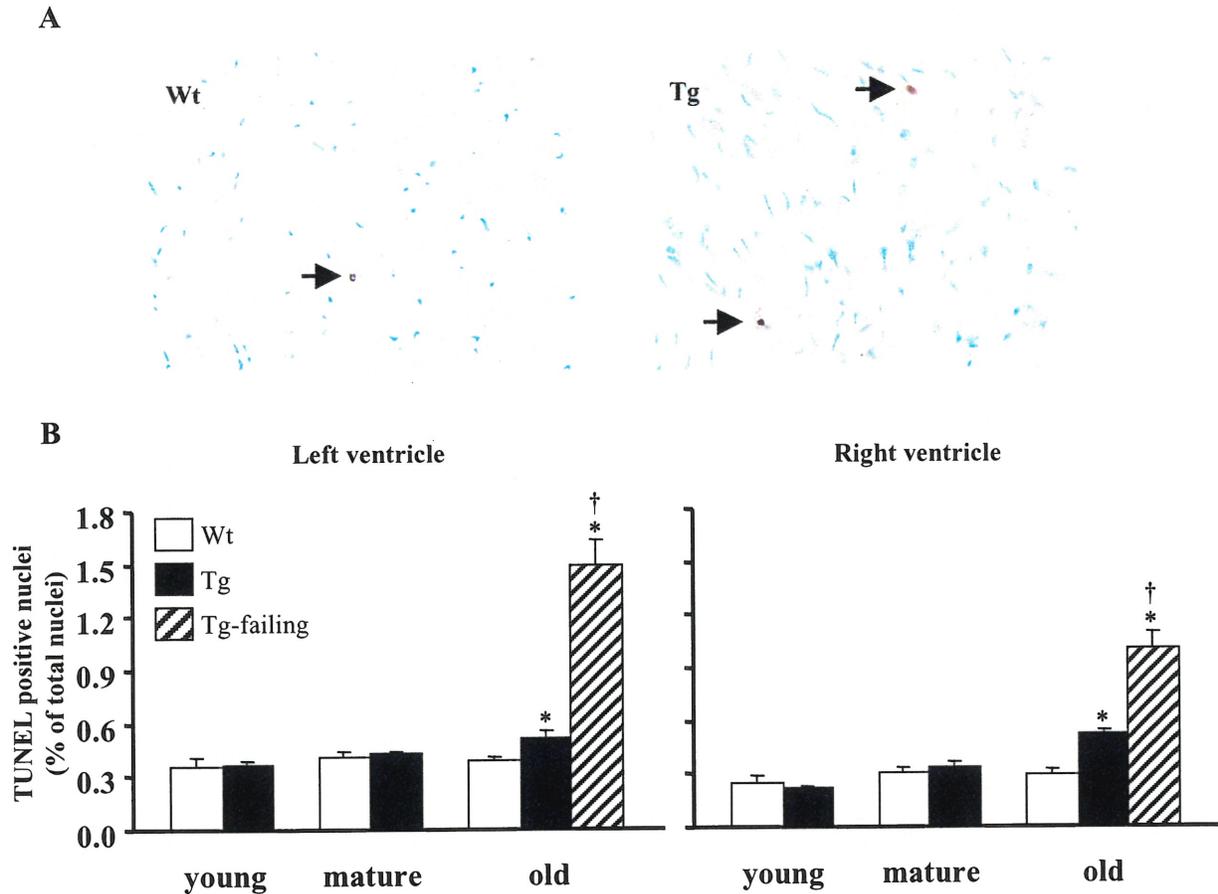
**Table 1.** Body, heart, liver, kidneys, lung and spleen weights of Wt, Tg and failing Tg mice.

	Wt-young	Tg-young	Wt-mature	Tg-mature	Wt-old	Tg-old	Tg-old-failing
n	7	8	11	10	11	9	5
Age (days)	63.1 ± 2.7	62.9 ± 2.8	239.7 ± 13.0	230.8 ± 15.2	643.7 ± 45.7	651.3 ± 41.8	603.4 ± 51.5
FL (mm)	14.719 ± 0.170	14.818 ± 0.152	16.290 ± 0.168	16.495 ± 0.094	16.807 ± 0.132	16.579 ± 0.176	16.324 ± 0.310
BW (g)	22.7 ± 0.8	21.5 ± 0.7	29.5 ± 1.8	29.6 ± 1.3	32.2 ± 1.5	31.1 ± 0.8	39.9 ± 7.2
BW/FL (g/mm)	1.54 ± 0.05	1.45 ± 0.05	1.81 ± 0.10	1.79 ± 0.08	1.92 ± 0.09	1.88 ± 0.06	2.42 ± 0.41
HW (mg)	120.6 ± 4.5	126.4 ± 7.0	146.3 ± 8.1	149.5 ± 7.0	183.6 ± 6.6	205.1 ± 7.1*	279.9 ± 15.4*†
HW/FL ratio (mg/mm)	8.19 ± 0.26	8.52 ± 0.43	8.96 ± 0.46	9.06 ± 0.41	10.93 ± 0.42	12.41 ± 0.56 *	17.11 ± 0.66 *†
LiW (g)	1.22 ± 0.04	1.188 ± 0.03	1.60 ± 0.11	1.58 ± 0.10	1.83 ± 0.14	1.62 ± 0.06	2.15 ± 0.30
LiW/FL ratio (mg/mm)	82.80 ± 2.84	80.26 ± 2.46	97.94 ± 6.47	95.89 ± 5.99	109.07 ± 8.41	97.83 ± 4.71	132.01 ± 18.61
KW (mg)	377.9 ± 35.0	351.6 ± 26.7	498.1 ± 41.7	522.9 ± 41.1	576.3 ± 51.9	566.9 ± 41.1	529.2 ± 33.2
KW/FL ratio (mg/mm)	25.66 ± 2.31	23.73 ± 1.77	30.55 ± 2.50	31.71 ± 2.52	34.34 ± 3.12	34.38 ± 2.74	32.41 ± 1.92
LuW (mg)	154.3 ± 6.4	151.8 ± 5.7	235.4 ± 21.8	214.1 ± 10.5	254.4 ± 12.3	234.6 ± 8.7	320.6 ± 27.7 *
LuW/FL ratio (mg/mm)	10.48 ± 0.40	10.25 ± 0.37	14.41 ± 1.25	12.97 ± 0.61	15.14 ± 0.72	14.17 ± 0.55	19.70 ± 1.91 *
SW (mg)	110.3 ± 8.6	101.3 ± 7.0	106.3 ± 7.4	102.2 ± 4.9	132.6 ± 5.7	111.5 ± 8.6	109.1 ± 9.3
SW/FL ratio (mg/mm)	7.50 ± 0.58	6.84 ± 0.46	6.51 ± 0.42	6.19 ± 0.27	7.90 ± 0.35	6.74 ± 0.54	6.6 ± 0.49

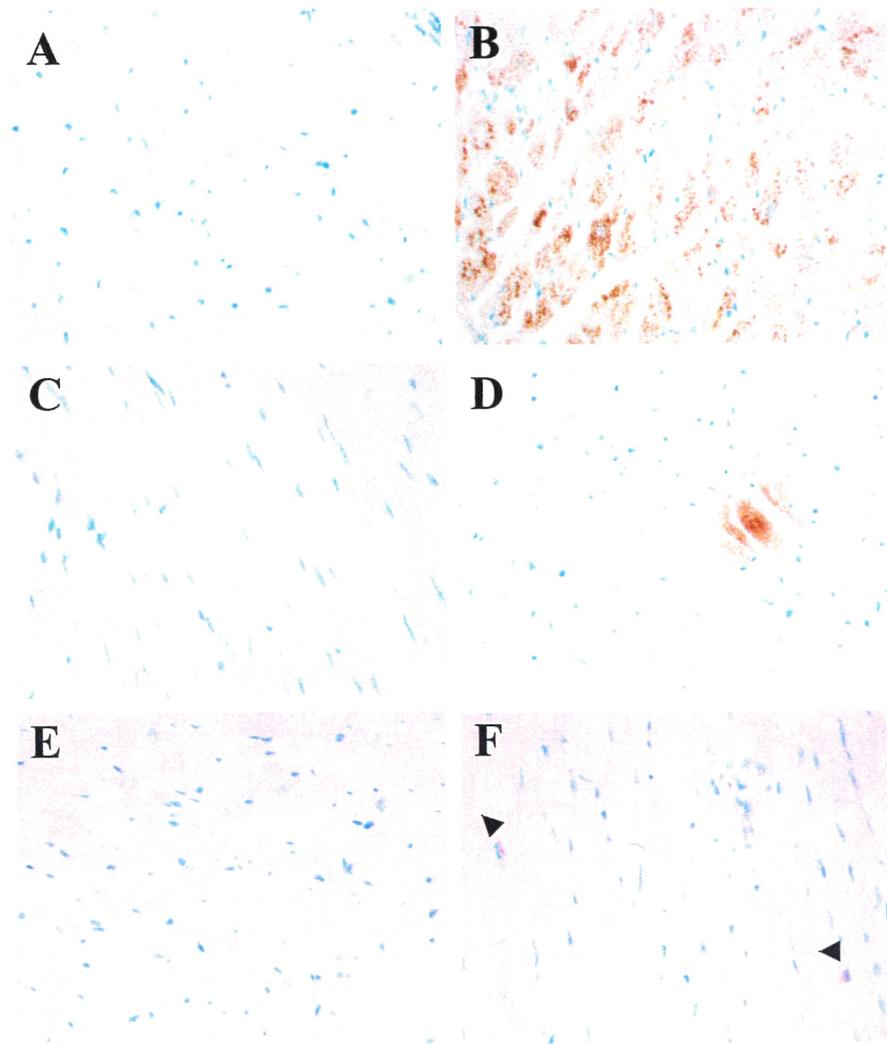
Failing and non-failing Tg mice and age-matched Wt were sacrificed, the body weight was determined, and the heart, liver, kidneys, spleen and lungs were isolated and their weights were measured. Femur length, FL, body weight, BW, heart weight, HW, liver weight, LiW, kidney weight, KW, lung weight, LuW, spleen weight, SW. Data are mean ± SEM. \*  $P < 0.05$  vs age-matched Wt. †  $p < 0.05$  vs Tg-old.



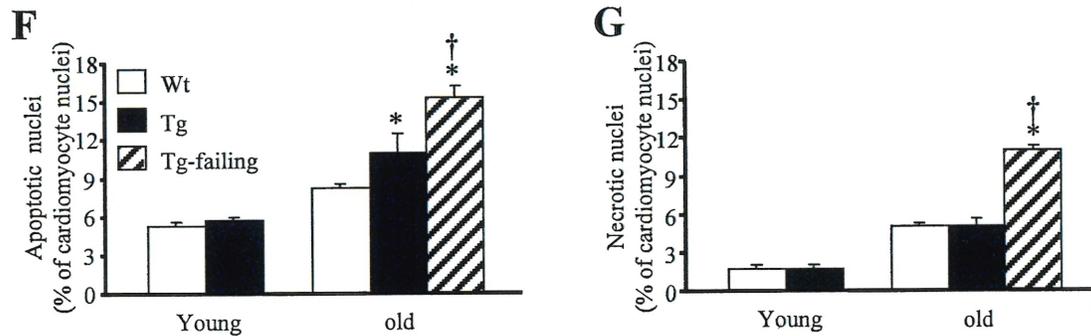
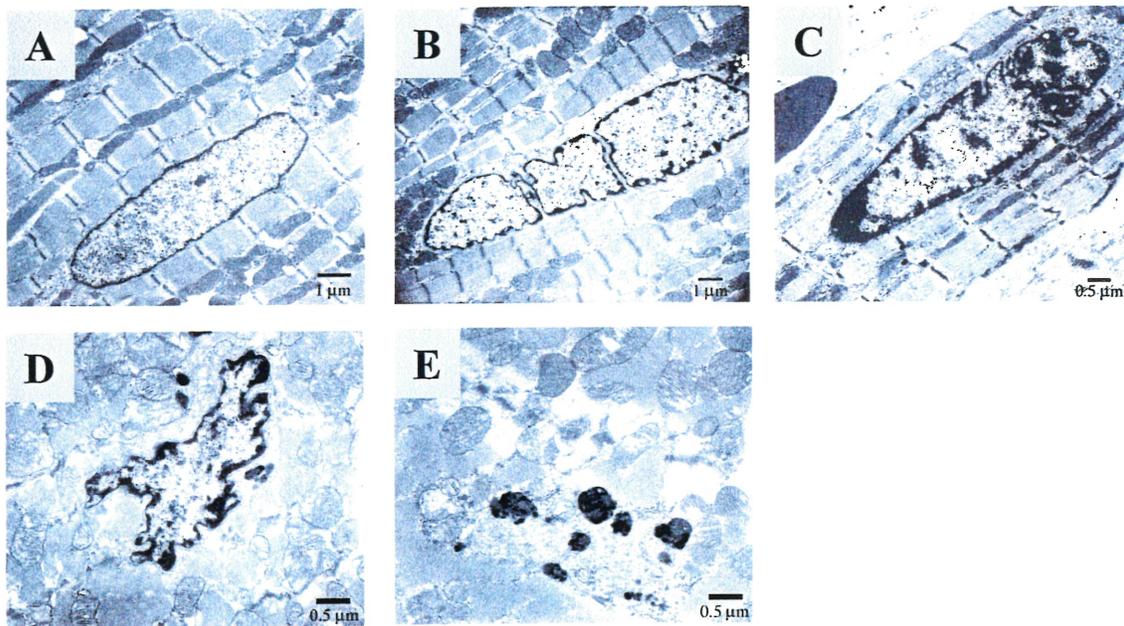
**Figure 1.** Sirius red staining for interstitial collagen deposition in heart sections of Wt and AT<sub>1</sub> Tg mice. A and B are left ventricular (LV) sections of young Wt and Tg animals respectively. C and D are LV sections of mature Wt and Tg mice respectively. E, F and G are LV sections of old Wt, old Tg and old-failing Tg mice respectively. (H) quantification of interstitial collagen content in LV sections of young, mature, old Tg and old-failing Tg animals mice and their age-matched controls. \* $P < 0.05$  vs age-matched Wt. †  $P < 0.05$  vs old-Tg.



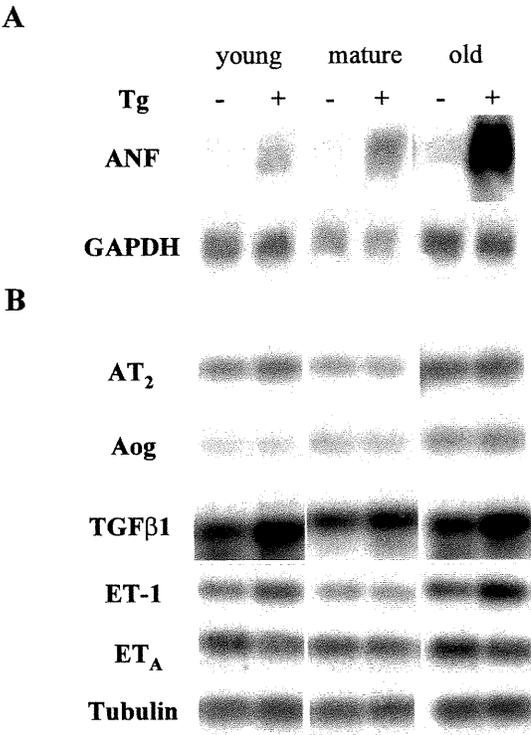
**Figure 2.** (A) TUNEL positive nuclei in the hearts of old-failing Tg and Wt mice as shown by the brown staining of the nuclei. (B) TUNEL assay quantification of apoptosis in the left and the right ventricle of young (n=2), mature(n=5), old (n=3) and old-failing Tg (n=5) mice and their age-matched controls. No significant difference was observed over age between young and mature Tg and their age-matched Wt controls. Data are mean  $\pm$  SEM. \* $P < 0.05$  vs age-matched Wt. † $P < 0.05$  vs old-Tg.



**Figure 3.** Increased immunostaining in the hearts of old-failing Tg for ANF (B) and the proapoptotic proteins caspase-3 (D) and Bax (arrowheads in F) as compared to age-matched Wt mice (A, C and E). Sections were counterstained with methyl green.



**Figure 4.** Electron microscopy micrographs of the left ventricle of Wt and  $AT_1$  receptor Tg mice. Note a normal nucleus (A) as shown by its regular shape and the homogeneity of the chromatin. A necrotic nucleus (B) can be recognized by its fragmentation without condensation of the chromatin whereas apoptotic nuclei (C and D) can be recognized by their smaller size, irregular shape and the condensation of their chromatin. Apoptotic bodies (E) were found in some fields. Numerous fields were scanned by EM and the percentages of apoptotic (F) and necrotic (G) nuclei in cardiomyocytes were determined in old Wt (n=5), old Tg (n=3) and old-failing Tg (n=5) mice. The same quantification was achieved in younger Wt and Tg mice (n=3). Data are mean  $\pm$  SEM. \* $P$ <0.05 vs age-matched Wt. †  $P$ <0.05 vs old-Tg



**Figure 5.** Changes in Gene expression in the ventricles of young, mature and old-failing Tg and their age-matched Wt mice. The expression of ANF and GAPDH was determined by Northern blot analysis(A)and the expression of AT<sub>2</sub> receptor, Aog, TGFβ1, ET-1,ET<sub>A</sub> receptor and tubulin was determined by RT-PCR analysis (B) as described in methods.

#### IV. CHAPITRE 4. DISCUSSION

L'angiotensine II (AII) est un puissant agent vasoconstricteur et joue un rôle important dans le maintien d'une pression artérielle normale et dans l'homéostasie cardiovasculaire en général. Les actions de l'AII sont multiples incluant des effets sur la croissance cellulaire (hyperplasie et hypertrophie) ainsi que la régulation du volume et de la balance électrolytique. L'AII et le système rénine-angiotensine (SRA) ont été impliqués dans de nombreuses maladies cardiovasculaires comme l'infarctus du myocarde, l'athérosclérose, l'hypertension, l'hypertrophie cardiaque et l'insuffisance cardiaque congestive.

Dans notre étude, nous avons tenté de répondre à la question suivante: l'AII induit-il l'hypertrophie cardiaque indirectement suite à une surcharge de pression via son action sur ses récepteurs périphériques? ou bien encore agit-il directement sur le cœur et entraîne-t-il, via les récepteurs cardiaques et des mécanismes autocrine et/ou paracrine, une hypertrophie des cardiomyocytes et par conséquent une hypertrophie du cœur entier? Pour tester cette hypothèse, on a généré des souris transgéniques (Tg) qui surexpriment spécifiquement dans le cœur, grâce au promoteur de l' $\alpha$ -MHC ( *$\alpha$ -Myosin Heavy Chain*), le récepteur AT<sub>1</sub> humain. Les résultats montrent clairement que l'AII induit directement une hypertrophie du cœur avec un remodelage important, une fibrose interstitielle et une perte de cardiomyocytes sans changements hémodynamiques puisque ni la pression artérielle, ni la fréquence cardiaque ne sont augmentées. Les animaux meurent prématurément d'insuffisance cardiaque congestive (Paradis *et al.*, 2000). D'autre part nous avons démontré que la perte des cardiomyocytes observée dans notre phénotype est due à l'apoptose (Voir chapitre.3). Cependant, le phénomène d'apoptose des

cardiomyocytes, démontré aussi bien par TUNEL que par microscopie électronique, est uniquement lié à la transition vers la phase terminale de la maladie, en l'occurrence, l'insuffisance cardiaque. En effet, les animaux Tg qui sont en phase compensatoire d'hypertrophie cardiaque montrent des taux d'apoptose faibles et comparables aux animaux contrôles du même âge. Tous ces effets sont probablement dus à l'action directe de l'AII sur le cœur, via les récepteurs AT<sub>1</sub> cardiaques en nombre élevé, puisqu'un modèle de souris Tg surexprimant les récepteurs AT<sub>2</sub> dans les cardiomyocytes sous le contrôle du même promoteur ne donne aucun phénotype hypertrophique (Masaki *et al.*, 1998 (b)).

D'autres modèles de souris Tg surexprimant le récepteur  $\beta$ 1-AR (Bisognano *et al.*, 2000) ou encore la sous unité G $\alpha$ q (Adams *et al.*, 1998) spécifiquement dans les cardiomyocytes présentent un phénotype d'hypertrophie cardiaque avec fibrose interstitielle et apoptose des cardiomyocyte, similaire au nôtre. Ceci suggère que d'autres récepteurs couplés aux protéines G, les récepteurs à l'endothéline-1 entre autres, pourraient participer en coopération avec le récepteur AT<sub>1</sub> pour produire l'hypertrophie et l'insuffisance cardiaque.

D'autre part, il semble que les cellules autres que les cardiomyocytes, notamment les fibroblastes, joueraient un rôle primordial dans l'induction de l'hypertrophie des cardiomyocytes. En effet, Sil et Sen (1997) ont montré que le pré-traitement des cardiomyocytes de rats nouveaux-nés et adultes avec un inhibiteur de la prolifération des fibroblastes, le bromodeoxyuridine, réduit significativement le taux de synthèse protéique après stimulation des cardiomyocytes avec le facteur trophique, l'AII. Aussi l'ajout du surnageant d'une culture pure de fibroblastes à une préparation de cardiomyocytes

entraîne une augmentation de la synthèse protéique; la stimulation préalable de ces fibroblastes résulte en une hypertrophie supplémentaire des myocytes et tous ces effets sont complètement bloqués par l'antagoniste des récepteurs  $AT_1$ , le losartan. Ces données suggèrent que l'hypertrophie des myocytes induite par l'AII résulte, au moins en partie, de la libération par des non-myocytes de facteurs qui agiraient sur les cardiomyocytes par un mécanisme paracrine. Par ailleurs, Harada *et al.* (1997) ont montré que la co-culture de myocytes avec des non-myocytes (en majorité des fibroblastes) ventriculaires induit une augmentation de la taille des cardiomyocytes et une libération dans le milieu de l'ANF et du BNP, marqueurs de l'hypertrophie cardiaque. Par ailleurs, la stimulation d'une culture de cardiomyocytes par des facteurs hypertrophiques, en l'occurrence l'AII et le TGF- $\beta$ , n'entraîne aucun changement dans la taille des myocytes alors que la stimulation d'une co-culture de myocytes et de fibroblastes par ces 2 facteurs entraîne une augmentation de la taille des cardiomyocytes et une augmentation de la production d'ANF et de BNP dans le milieu. Ces effets sont potentialisés par la production d'ET-1 mesurée dans la co-culture et un antagoniste spécifique des récepteurs  $ET_A$ , le BQ-123 bloque significativement l'hypertrophie cardiaque induite par l'AII et le TGF- $\beta$ . Ceci permettrait d'incriminer l'ET-1 comme étant un médiateur et un facteur paracrine de l'hypertrophie cardiaque induite par la stimulation des myocytes par l'AII et expliquerait le rôle des cellules non-myocytaires (fibroblastes cardiaques) dans ce processus. Une autre étude par Ito *et al.* (1993) démontre que l'introduction d'une séquence antisens dirigée contre la région codante du mRNA de la ppET-1 dans les cardiomyocytes ou le pré-traitement des myocytes avec l'inhibiteur sélectif de  $ET_A$ , BQ-123, résultent en une inhibition complète de la synthèse

protéique après stimulation par l'AII, suggérant que l'ET-1 serait un facteur autocrine/paracrine de l'hypertrophie des cardiomyocytes induite par l'AII.

Évidemment, un modèle *in vivo* de surexpression de l'ET-1 ou de son récepteur ET<sub>A</sub> spécifiquement dans le cœur fournirait des informations intéressantes sur le rôle de ce peptide dans l'hypertrophie cardiaque et validerait ainsi le modèle *in vitro*. Par ailleurs, nous avons montré récemment que le traitement des souris Tg AT<sub>1</sub> à un âge précoce (60 jours) pendant 2 mois avec l'antagoniste des récepteurs AT<sub>1</sub>, losartan, prévient l'hypertrophie des cardiomyocytes et la fibrose interstitielle (Paradis *et al.*, 2000). Le traitement des Tg AT<sub>1</sub> avec un antagoniste des récepteurs ET<sub>A</sub> permettrait de savoir si l'ET-1 médie l'hypertrophie cardiaque induite par une surexpression des récepteurs AT<sub>1</sub> dans le cœur.

Par ailleurs, des études récentes ont montré les effets bénéfiques des inhibiteurs sélectifs des récepteurs ET<sub>A</sub> chez le rat avec ligature de l'artère coronarienne, en réduisant la pression artérielle en limitant la progression du remodelage dans le ventricule gauche et en améliorant la fonction cardiaque (Mulder *et al.*, 1998). En outre, une étude très récente a montré que l'antagoniste des récepteurs ET<sub>A</sub>, LU 135252, et l'antagoniste des récepteurs AT<sub>1</sub>, le losartan à des doses sous-antihypertensives ont des effets synergiques quant à la régression de l'hypertrophie cardiaque et l'amélioration de la survie dans un modèle de rats Tg pour le gène de la rénine humaine et l'angiotensinogène (Bohlender *et al.*, 2000). En effet, le traitement des rats Tg avec le losartan seul ou le LU 135252 seul permet de réduire considérablement la mortalité de 42 % (dans les rats non traités) à 8 % alors que lors du traitement combiné des 2 drogues tous les animaux survivent. Ceci pourrait avoir un intérêt clinique considérable dans la prévention de l'insuffisance

cardiaque conséquent à une maladie cardiovasculaire puisque tous les essais cliniques en cours actuellement considèrent un inhibiteur de l'ECA ou bien un antagoniste des récepteurs AT<sub>1</sub> ou ET<sub>A</sub>, sans les combiner.

Dans notre étude, les niveaux élevés de récepteurs AT<sub>1</sub> dans le cœur seraient responsables de l'hypertrophie cardiaque observée et de sa progression vers une insuffisance cardiaque irréversible. Ceci serait probablement dû à une augmentation de la voie de signalisation des récepteurs AT<sub>1</sub> en grand nombre. En effet une étude préliminaire dans le laboratoire, a montré qu'une stimulation supplémentaire de ces récepteurs par infusion continue de doses sous-hypertensives d'AII, en utilisant des miniosmopommes, entraîne une exacerbation du phénotype, une mort subite des souris Tg avec une hypertrophie cardiaque plus importante, sans affecter les souris contrôles.

Aussi une étude similaire à la nôtre par Hein *et al.* (1997) surexprimant le récepteur AT<sub>1</sub> de souris dans le cœur, a donné un phénotype léthal prénatal. Cependant, les souris survivaient durant les premières semaines après la naissance seulement si leurs mères ont reçu, durant la grossesse, un inhibiteur de l'ECA ou un antagoniste des récepteurs AT<sub>1</sub>. Les souris mouraient d'une hyperplasie auriculaire importante avec bradycardie et bloc auriculo-ventriculaire, et présentaient des défauts de conduction dans le cœur. La différence de phénotype entre cette étude et la nôtre, pourrait s'expliquer par le fait que la souche de souris utilisée par Hein *et al.* contenait 2 gènes de rénine, alors que la nôtre n'en contient qu'un seul. Aussi, leurs animaux présentaient une hyperactivité du SRA en plus du nombre élevé de récepteurs AT<sub>1</sub>, ce qui pourrait être responsable de la léthalité précoce des souris. D'autre part, il a été montré que les récepteurs AT<sub>1</sub> sont surexprimés dans plusieurs maladies cardiovasculaires dont l'hypertension. En effet, les niveaux

d'expression de AT<sub>1</sub> sont augmentés chez les rats spontanément hypertendus (SHR) par rapport aux rats WKY normotendus, et ces niveaux diminuent significativement après traitement avec de hautes doses de losartan qui réduisent significativement le ratio du poids du ventricule gauche/poids corporel (Makino *et al.*, 1997). Aussi Suzuki *et al.* (1993) ont montré une augmentation de 3 fois de l'expression de AT<sub>1</sub> et une augmentation de 2 fois de la densité des récepteurs dans l'hypertrophie cardiaque chez le rat SHR ainsi que dans le modèle d'hypertension rénovasculaire chez le rat (1-kidney, 1-Clip) par rapport aux rats contrôles. Leurs niveaux reviennent à la normale après regression de l'hypertrophie et la normalisation de la pression artérielle. Par ailleurs, Nio *et al.* (1995) ont rapporté une augmentation de l'expression et de la densité des récepteurs AT<sub>1a</sub> et AT<sub>2</sub>, mais pas de celle des AT<sub>1b</sub> dans le cœur après infarctus du myocarde chez le rat, et les niveaux reviennent à la normale après traitement avec un antagoniste AT<sub>1</sub> mais pas avec un antagoniste AT<sub>2</sub>.

La perte de cardiomyocytes observée chez les souris Tg pour les récepteurs AT<sub>1</sub> en insuffisance cardiaque est un autre aspect très important du remodelage cardiaque. En effet, nous avons montré par des études histologiques sur des coupes de cœurs de souris Tg AT<sub>1</sub>, une perte importante de cardiomyocytes et une plus grande fibrose qui occupe désormais tout l'espace laissé libre par la mort des myocytes durant l'insuffisance cardiaque. Il s'est avéré que cette mort des cardiomyocytes était dûe en partie à l'apoptose, ou mort cellulaire programmée, démontrée par l'essai TUNEL qui permet de détecter la fragmentation internucléosomale des noyaux, caractéristique de l'apoptose. Nous avons voulu savoir à quel moment de la vie de la souris ce phénomène apparaissait et la mort des cardiomyocytes était déclenchée. Est-ce que l'apoptose est un processus

concomittant ou secondaire à l'hypertrophie cardiaque? L'apoptose est-elle seulement liée à l'insuffisance cardiaque terminale? Nous avons alors étudié ce processus à tous les stades de la maladie. Nous avons montré par essai TUNEL qu'il n'y avait pas de différence significative dans le pourcentage de noyaux apoptotiques entre les animaux Tg AT<sub>1</sub> et leurs contrôles du même âge chez les animaux jeunes et matures. Nous avons ensuite étudié l'apoptose chez des animaux vieux (au delà d'un an d'âge) contrôles et des Tg du même âge divisés en 2 groupes, les animaux en hypertrophie cardiaque non insuffisants et des animaux en insuffisance cardiaque décompensée. Les souris en insuffisance cardiaque avaient de la difficulté à respirer, une mobilité réduite, un poids élevé dû à une accumulation de liquides dans l'organisme et des oedèmes. Les résultats de l'essai montrent une augmentation du taux de noyaux fragmentés d'environ 3.5 fois dans le ventricule gauche et de 3.1 fois dans le ventricule droit chez les animaux Tg en insuffisance cardiaque par rapport aux animaux contrôles. Les animaux en hypertrophie compensatoire présentaient une élévation du taux de noyaux fragmentés moindre mais significative dans le ventricule gauche (1.2 fois) et droit (1.6 fois) des souris Tg par rapport aux souris contrôles. Ces données ont été confirmées par immunohistochimie en utilisant des marqueurs de protéines impliquées dans l'apoptose dont la caspase-3 et Bax. La caspase-3 et le Bax étaient détectés dans les animaux Tg en insuffisance mais pas dans les animaux en phase d'hypertrophie compensatoire ni dans les animaux contrôles du même âge. Par ailleurs, nous avons confirmé ces résultats par microscopie électronique (ME), technique de référence pour la détection de l'apoptose et de nécrose puisqu'elle permet de visualiser l'ultrastructure des caractéristiques morphologiques des processus de mort cellulaire. La ME nous a permis d'affirmer que les cellules en apoptose sont des

cardiomyocytes et de confirmer les résultats de TUNEL, à savoir, que le processus d'apoptose est observé aussi bien chez des animaux en insuffisance cardiaque que chez des animaux qui compensent. Cependant, le taux de noyaux apoptotiques était plus élevé chez les animaux Tg en insuffisance par rapport aux souris Tg en phase de compensation du même âge. Fait important, nous avons observé aussi par ME une augmentation importante de la nécrose uniquement chez les souris Tg en insuffisance cardiaque. Récemment, Frustaci *et al.* (2000) ont rapporté une augmentation significative de l'apoptose et de la nécrose des cardiomyocytes associée à une élévation d'AII dans le cœur de patients diabétiques et hypertendus. Ces patients présentaient une hypertrophie cardiaque, une dilatation des cavités cardiaques et une détérioration de la fonction cardiaque.

Les taux d'apoptose estimés, par TUNEL sur des coupes de biopsies cardiaques, diffèrent d'une étude à l'autre et les pourcentages varient de 0.002 % (Schaper *et al.*, 1999) jusqu'à 24 % chez des patients avec cardiomyopathie ventriculaire droite arythmogénique (Valente *et al.*, 1998). Cependant, Olivetti *et al.* (1997) ont estimé le taux de myocytes apoptotiques à 0.23 % chez des patients en insuffisance cardiaque et Saraste *et al.* (1999 (b)) comptent 0.12 % des myocytes en apoptose chez des patients atteints de cardiomyopathie dilatée. Dans notre étude, le taux de noyaux fragmentés était de l'ordre de 0.4-0.5 % dans les animaux contrôles et atteignait 1.5 % dans les animaux Tg en insuffisance cardiaque. Ces chiffres peuvent paraître faibles, mais si on tient compte du fait que l'apoptose est un processus qui est complété en 24 heures et que la transition de l'hypertrophie vers l'insuffisance cardiaque se fait en 1 mois chez la souris, alors il y aurait une perte d'environ 45 % de myocytes chez les animaux avec insuffisance

cardiaque établie. Cependant, par ME les pourcentages atteignent les 5 % dans les animaux contrôles et jusqu'à 15 % dans les animaux Tg en insuffisance, chiffres qui paraissent élevés. Pour cette raison, nous avons estimé par ME le taux de noyaux apoptotiques et nécrotiques chez des animaux Tg et contrôles plus jeunes. Les résultats montrent des taux d'apoptose et de nécrose d'environ 5% et 1.67 %, respectivement, dans les 2 groupes d'animaux. Cette différence pourrait être attribuable au vieillissement. En effet, Liu *et al.* (1998) ont montré que le taux d'apoptose dans le cœur de rats âgés après occlusion aiguë de l'artère coronarienne est significativement plus élevé par rapport aux animaux plus jeunes, ce qui montre que les cœurs d'animaux âgés sont plus sensibles à l'apoptose que ceux des animaux plus jeunes. En outre, Nitahara *et al.* (1998) ont rapporté une augmentation de l'apoptose dans le cœur avec l'âge chez des rats Fisher 344, avec une augmentation progressive en fonction de l'âge du taux de  $Ca^{2+}$  diastolique et de l'activité de la DNase I qui serait responsable de l'apoptose des myocytes, et ce indépendamment de l'expression de p53, Bax et Bcl<sub>2</sub>. Néanmoins, une différence subsiste entre les pourcentages des noyaux apoptotiques déterminés par TUNEL (0.5 %) et par ME (5 %). Ceci pourrait s'expliquer par le fait que le comptage des noyaux apoptotiques par TUNEL s'effectue par microscopie optique après contre-coloration dans une population de cellules qui ne distingue pas entre les cardiomyocytes (environ 35 % des cellules dans le cœur) et les non myocytes, alors que le comptage par ME ne tient compte que des noyaux apoptotiques dans une population de cardiomyocytes.

L'augmentation importante du taux de noyaux apoptotiques chez les animaux Tg en insuffisance cardiaque par rapport aux animaux en hypertrophie et aux contrôles du même âge suggère que l'apoptose pourrait être un mécanisme responsable de la transition

d'un état de compensation hypertrophique à une insuffisance cardiaque décompensée. D'autres études impliquent le processus d'apoptose dans l'insuffisance cardiaque. Li *et al* (1997) ont rapporté un taux d'apoptose significativement plus élevé chez les rats SHR en insuffisance par rapport aux SHR qui compensent et aux rats contrôles WKY (avec un taux plus élevé chez les rats SHR qui compensent par rapport aux WKY). Le traitement des SHR insuffisants avec un IECA, le captopril, a permis de réduire le taux de noyaux apoptotiques au même niveau que celui des SHR qui compensent, ce qui suggère un rôle important du système SRA et probablement de l'AII dans le déclenchement du phénomène d'apoptose. Par ailleurs, Narula *et al.* (1996) et Olivetti *et al.* (1997) ont également montré une augmentation de l'apoptose, par TUNEL et par observation de fragments d'ADN de différentes tailles sur gel d'agarose ou « *DNA laddering* », chez des patients en insuffisance cardiaque par rapport aux individus contrôles (tissus cardiaques prélevés chez des personnes décédées à la suite d'accidents de la circulation), chez qui seulement quelques rares cellules isolées étaient fragmentées.

Le mécanisme par lequel l'apoptose est déclenché dans ces maladies cardiovasculaires n'est pas encore bien élucidé. Cependant, certaines études *in vitro* impliquent le  $\text{Ca}^{2+}$  intracellulaire dans le déclenchement de l'apoptose. En effet, Cigola *et al.* (1997) ont montré que l'AII induit l'apoptose de cardiomyocytes ventriculaires de rats nouveaux-nés en culture et que cela passe par une augmentation de 37 % du  $\text{Ca}^{2+}$  intracellulaire et une activation d'endonucléases endogènes calcium-dépendantes alors que les endonucléases endogènes pH-dépendantes ne sont pas augmentées par la stimulation avec l'AII. D'autre part, ces auteurs ont montré que la fragmentation de l'ADN induite par l'AII était inhibée par le traitement des cardiomyocytes avec le losartan et de façon similaire par un

chélateur du calcium, le BAPTA-AM, alors que l'ionophore du calcium A23187 déclenchait la mort cellulaire programmée des cardiomyocytes. Les endonucléases calcium-dépendantes ont déjà été impliquées dans l'apoptose et Giannakis *et al.* (1991) ont clairement montré que des cellules de tissus avec une activité élevée des endonucléases dépendantes du calcium subissent une fragmentation internucléosomale rapide de l'ADN en réponse à un flux calcique. Par ailleurs, une étude par Nakahashi *et al.* (1998) a rapporté que l'augmentation de l'ET-1 au niveau de la plaque athéromateuse et sa liaison aux récepteurs ET<sub>B</sub> serait responsable de l'apoptose des cellules musculaires lisses vasculaires induite par l'oxyde nitrique. Ainsi, dans notre modèle, l'augmentation de l'expression de l'ET-1 pourrait jouer un rôle dans l'apoptose des cardiomyocytes chez les animaux en insuffisance cardiaque par un mécanisme similaire. Par ailleurs, on a observé une diminution de l'expression du récepteur ET<sub>A</sub> chez les souris Tg jeunes et Tg insuffisants par rapport à leurs contrôles du même âge. Ceci pourrait correspondre à une désensibilisation des récepteurs suite à l'augmentation de l'ET-1 dans le coeur et sa liaison aux récepteurs ET<sub>A</sub>. Cette hypothèse pourrait être vérifiée par la mesure de la densité des récepteurs ET<sub>A</sub> au niveau des membranes ventriculaires.

Il était établi que les récepteurs AT<sub>1</sub> médient la croissance alors que les récepteurs AT<sub>2</sub> contrebalancent les effets de AT<sub>1</sub> et induisent l'apoptose. Dans notre modèle il se pourrait que l'apoptose des cardiomyocytes puisse être médiée par le récepteur AT<sub>1</sub> surexprimés dans le coeur, et une exacerbation de la signalisation des récepteurs pourrait être responsable de l'augmentation du Ca<sup>2+</sup> intracellulaire et entraîner une stimulation des endonucléases endogènes. De plus, il n'y avait pas de changement dans l'expression des récepteurs AT<sub>2</sub> chez les souris Tg par rapport aux souris contrôles à tous les âges étudiés.

Jusqu'à présent, l'accent a été mis sur les facteurs qui provoquent et déclenchent le processus d'apoptose mais d'autres facteurs de survie qui s'opposent à ce phénomène tendent à rétablir une balance et empêcher une perte excessive des cardiomyocytes. En effet, le facteur de croissance de l'insuline-1 ou IGF-1 (*Insulin Growth Factor-1*) fait partie de ces facteurs de survie. Wang *et al.* (1998) ont montré *in-vitro* que l'IGF-1 augmente considérablement la viabilité des cellules exposées à la doxorubicine et cultivées en l'absence de sérum, et que l'IGF-1 réduit la fragmentation de l'ADN, atténue l'induction de Bax et supprime l'activation de la caspase-3. Ces données ont été corroborées *in-vivo* dans un modèle de cardiomyopathie dilatée par stimulation ventriculaire chez le chien (*ventricular pacing*). En effet, Lee *et al.* (1999) ont montré que l'injection d'IGF-1 améliore considérablement la fonction cardiaque avec un amincissement moindre de la paroi ventriculaire par rapport aux animaux non traités qui présentaient un taux élevé d'apoptose des cardiomyocytes, supprimée partiellement chez les chiens traités. Cependant, une étude récente par Iwanaga *et al.* (2000) montre que l'administration prolongée d'IGF à des rats hypertendus (rats Dahl sensibles au sel) avec hypertrophie cardiaque existante, avait un effet délétaire sur la fonction cardiaque. Les rats traités à l'IGF-1 présentaient une accentuation de la dilatation du ventricule gauche, et mouraient plus tôt que les rats non traités ou traités avec un IECA. Ceci serait dû à une diminution significative (52 %) de l'expression (ARNm) de l'isoforme  $\alpha$ -MHC chez les rats traités à l'IGF-1 par rapport aux rats contrôles. Par ailleurs, Pauliks *et al.* (1999) ont rapporté une augmentation significative de l'expression de la protéine IGF-1 dans le coeur de patients décédés d'hypertrophie ventriculaire gauche, par rapport à des tissus contrôles. Ceci suggère que l'IGF-1 jouerait un rôle important dans l'hypertrophie

cardiaque chez les humains, et d'autres études sont nécessaires pour déterminer la place exacte de l'IGF-1 dans la physiopathologie de l'hypertrophie et de l'insuffisance cardiaque. D'autre part, un autre facteur, l'hormone de croissance (GH pour *Growth Hormone*), semble avoir un rôle important dans le stress de la paroi ventriculaire et dans l'amélioration de la fonction cardiaque. En effet, Fazio *et al.* (1997) ont rapporté, chez des patients acromégaliques, une diminution significative (20 %) du stress de la paroi du ventricule gauche en fin de systole due à un épaississement de la paroi ventriculaire (26 %), et une augmentation de 20 % du débit cardiaque par rapport à des sujets contrôles. À l'inverse, des patients atteints de déficit congénital en GH présentaient une augmentation importante (38 %) du stress de la paroi ventriculaire en fin de systole, une réduction significative (28 %) de l'épaisseur du ventricule gauche ainsi qu'une diminution de 44 % du débit cardiaque. Un traitement de ces patients avec la GH recombinante humaine corrigeait partiellement l'épaisseur et le stress de la paroi ventriculaire, et améliorait considérablement la fonction cardiaque.

Il est important de mentionner un autre facteur qui semble protéger les cardiomyocytes de l'apoptose induite par la staurosporine. C'est la phosphatase régulée par la calcium-calmoduline ou calcineurine (PP2B) (De Windt *et al.*, 2000). Les mêmes auteurs ont montré aussi *in-vivo* une absence d'apoptose chez les souris Tg en insuffisance cardiaque surexprimant la calcineurine dans le cœur et que le mécanisme de protection d'apoptose passe partiellement par la voie de signalisation du facteur nucléaire d'activation des cellules T-3 (NFAT-3) et partiellement par la protéine kinase B ou Akt. Cependant, le mécanisme de transition de l'hypertrophie cardiaque compensée vers l'insuffisance cardiaque dans ce modèle est encore inconnu.

Une étude intéressante publiée par Li *et al.* (2000) a démontré qu'un modèle de souris Tg pour le gène muté de la superoxyde dismutase de cuivre/zinc, SOD-1, produit une forme de sclérose amyotrophique latérale familiale (ALS), une maladie neurodégénérative fatale. Ces animaux meurent par une perte progressive de neurones moteurs par apoptose, et le traitement de ces animaux avec un inhibiteur des caspases permet de retarder l'apparition de la maladie et réduire la mortalité. Par ailleurs, l'utilisation d'inhibiteurs de caspases, dans des modèles d'ischémie/reperfusion chez le rat (Yaoita *et al.*, 1998) et le lapin (Holly *et al.* 1999), diminuait considérablement la taille de l'infarctus et le taux d'apoptose des cardiomyocytes dans la zone infarctée par rapport aux animaux sham opérés et non traités. Ainsi le traitement des souris Tg AT<sub>1</sub> avec des inhibiteurs de caspases pourrait empêcher ou retarder la transition vers l'insuffisance cardiaque.

Il est maintenant clairement établi que l'apoptose est un facteur clé dans la physiopathologie de l'insuffisance cardiaque dans plusieurs modèles animaux et chez les humains. Les agents inhibant le SRA incluant les IECA et les antagonistes des récepteurs AT<sub>1</sub> se sont avérés efficaces dans la régression de l'hypertrophie cardiaque et l'amélioration de la survie, et leur utilisation clinique s'appuie sur plusieurs grands essais cliniques. Cependant, même si ces agents diminuent considérablement l'incidence de l'insuffisance cardiaque, il ne suppriment pas complètement la mortalité due à l'insuffisance cardiaque congestive. On pourrait imaginer que des agents cités plus haut, notamment, les inhibiteurs de caspases, pourraient être des agents potentiels, de prévention de l'apoptose et de la transition de l'hypertrophie cardiaque vers l'insuffisance cardiaque congestive. De plus, une étude récente a démontré un rôle important du calcium mitochondrial dans la régulation de l'apoptose et de la nécrose. Ainsi Zhu *et al.*

(2000) ont montré qu'une augmentation de la libération du  $\text{Ca}^{2+}$  mitochondrial était associée à une libération du cytochrome c et une activation des caspases alors qu'une surcharge en  $\text{Ca}^{2+}$  mitochondrial entraînait une nécrose des cardiomyocytes. L'inhibition spécifique de l'échangeur Na/Ca mitochondrial (Clonazepam) protégeait les cardiomyocytes de la nécrose alors que des inhibiteurs des pores de transition de perméabilité mitochondriale (cyclosporine A et Bcl-2) inhibaient l'apoptose en empêchant la libération du  $\text{Ca}^{2+}$  mitochondrial. Seulement, les agents cités plus haut doivent encore faire l'objet d'études précliniques approfondies dans différents modèles animaux d'hypertrophie et d'insuffisance cardiaques, avant de passer aux essais cliniques, pour s'assurer de leur efficacité et de leur innocuité.

## V. CHAPITRE 5. CONCLUSION

Dans cette étude nous avons analysé *in vivo* le rôle du récepteur de type 1 de l'AII (AT1) dans l'hypertrophie et l'insuffisance cardiaques. La surexpression du récepteur AT1 spécifiquement dans les cardiomyocytes de souris Tg a entraîné des changements morphologiques et phénotypiques qui miment l'hypertrophie cardiaque chez les humains et autres mammifères. L'hypertrophie cardiaque observée était accompagnée d'une augmentation de l'ANF ventriculaire, de perte de cardiomyocytes et de fibrose interstitielle importante et ce de façon indépendante des changements hémodynamiques démontrant pour la première fois un rôle direct de l'AII dans l'hypertrophie cardiaque médiée par les récepteurs AT1. La perte de cardiomyocytes observée était due aussi bien à l'apoptose qu'à la nécrose des cardiomyocytes chez les animaux en insuffisance cardiaque. Ainsi l'apoptose et la nécrose jouent un rôle important transition d'un état d'hypertrophie cardiaque à un état d'insuffisance cardiaque congestive. Le traitement des animaux Tg plus jeunes avec un antagoniste des récepteurs AT1 a permis de prévenir le développement de la pathologie. Ces expériences sont d'autant plus importantes que des antagonistes des récepteurs AT1 sont actuellement en essai clinique pour la prévention d'hypertrophie ventriculaire chez des patients atteints d'hypertrophie cardiaque. D'autre part, l'endothéline a été suggéré comme étant un médiateur de l'AII dans l'hypertrophie cardiaque, le traitement des animaux Tg AT1 avec un antagoniste des récepteurs à l'endothéline permettrait de déterminer la place de l'endothéline dans le développement de l'hypertrophie cardiaque et la comparaison avec les résultats obtenus avec le traitement avec les antagonistes des récepteurs AT1. Enfin, vue l'importance de

l'apoptose et de la nécrose dans la transition hypertrophie-insuffisance cardiaque, le traitement des animaux avec un inhibiteur de l'apoptose et/ou de la nécrose au stade hypertrophique permettrait de prévenir le passage à l'insuffisance cardiaque congestive. Notre étude nous a permis de mieux comprendre le rôle de l'AII dans l'hypertrophie et l'insuffisance cardiaque et d'autres études sont nécessaires pour développer des interventions thérapeutiques efficaces dépendamment du stade spécifique de la pathologie.

## VI. REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Abel ED, Kaulbach HC, Tian R, Hopkins JC, Duffy J, Doetschman T, Minnemann T, Boers ME, Hadro E, Oberste-Berghaus C, Quist W, Lowell BB, Ingwall JS, Kahn BB.** Cardiac hypertrophy with preserved contractile function after selective deletion of GLUT4 from the heart. *J Clin Invest* 1999 Dec;104(12):1703-14
- Adams JM, Cory S.** The Bcl-2 protein family: arbiters of cell survival. *Science* 1998 Aug 28;281(5381):1322-1326
- Adams JW, Sakata Y, Davis MG, Sah VP, Wang Y, Liggett SB, Chien KR, Brown JH, Dorn GW 2<sup>nd</sup>.** Enhanced Galphaq signaling: a common pathway mediates cardiac hypertrophy and apoptotic heart failure. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998, Aug 18;95(17):10140-5
- Anand-Srivastava MB.** Angiotensin II receptors negatively coupled to adenylate cyclase in rat myocardial sarcolemma. Involvement of inhibitory guanine nucleotide regulatory protein. *Biochem Pharmacol* 1989 Feb 1;38(3):489-496
- Anderson KM, Murahashi T, Dostal DE, Peach MJ.** Morphological and biochemical analysis of angiotensin II internalization in cultured rat aortic smooth muscle cells. *Am J Physiol* 1993 Jan;264(1 Pt 1):C179-C188
- Arber S, Hunter JJ, Ross J Jr, Hongo M, Sansig G, Borg J, Perriard JC, Chien KR, Caroni P.** MLP-deficient mice exhibit a disruption of cardiac cytoarchitectural organization, dilated cardiomyopathy, and heart failure. *Cell* 1997 Feb 7;88(3):393-403
- Armstrong PW, Stopps TP, Ford SE, de Bold AJ.** Rapid ventricular pacing in the dog: pathophysiologic studies of heart failure. *Circulation* 1986 Nov;74(5):1075-84
- Baba HA, Iwai T, Bauer M, Irlbeck M, Schmid KW, Zimmer HG.** Differential effects of angiotensin II receptor blockade on pressure-induced left ventricular hypertrophy and fibrosis in rats. *J Mol Cell Cardiol* 1999 Feb;31(2):445-455
- Baker KM, Aceto JF.** Angiotensin II stimulation of protein synthesis and cell growth in chick heart cells. *Am J Physiol* 1990 Aug;259(2 Pt 2):H610-H618
- Baker KM, Booz GW, Dostal DE.** Cardiac actions of angiotensin II: Role of an intracardiac renin-angiotensin system. *Annu Rev Physiol* 1992;54:227-41

**Baker KM, Chernin MI, Wixson SK, Aceto JF.** Renin-angiotensin system involvement in pressure-overload cardiac hypertrophy in rats. *Am J Physiol* 1990 Aug;259(2 Pt 2):H324-H332

**Balcells E, Meng QC, Johnson WH Jr, Oparil S, Dell'Italia LJ.** Angiotensin II formation from ACE and chymase in human and animal hearts: methods and species considerations. *Am J Physiol* 1997 Oct;273(4 Pt 2):H1769-74

**Bealer SL.** Systemic angiotensin II and volume expansion release norepinephrine in the preoptic recess. *Brain Res* 2000 May 12;864(2):291-7

**Bergsma DJ, Ellis C, Kumar C, Nuthulaganti P, Kersten H, Elshourbagy N, Griffin E, Stadel JM, Aiyar N.** Cloning and characterization of a human angiotensin II type 1 receptor. *Biochem Biophys Res Commun* 1992 Mar 31;183(3):989-995

**Bisognano JD, Weinberger HD, Bohlmeier TJ, Pende A, Raynolds MV, Sastravaha A, Roden R, Asano K, Blaxall BC, Wu SC, Communal C, Singh K, Colucci W, Bristow MR, Port DJ.** Myocardial-directed overexpression of the human beta(1)-adrenergic receptor in transgenic mice. *J Mol Cell Cardiol* 2000 May;32(5):817-30

**Bogoyevitch MA, Andersson MB, Gillespie-Brown J, Clerk A, Glennon PE, Fuller SJ, Sugden PH.** Adrenergic receptor stimulation of the mitogen-activated protein kinase cascade and cardiac hypertrophy. *Biochem J* 1996 Feb 15;314 ( Pt 1):115-21

**Bogoyevitch MA, Glennon PE, Andersson MB, Clerk A, Lazou A, Marshall CJ, Parker PJ, Sugden PH.** Endothelin-1 and fibroblast growth factors stimulate the mitogen-activated protein kinase signaling cascade in cardiac myocytes. The potential role of the cascade in the integration of two signaling pathways leading to myocyte hypertrophy. *J Biol Chem* 1994 Jan 14;269(2):1110-9

**Bohlender J, Gerbault S, Kramer J, Gross M, Kirchengast M, Dietz R.** Synergistic effects of AT(1) and ET(A) receptor blockade in a transgenic, angiotensin II-dependent, rat model. *Hypertension* 2000 Apr;35(4):992-7

**Boluyt MO, O'Neill L, Meredith AL, Bing OH, Brooks WW, Conrad CH, Crow MT, Lakatta EG.** Alterations in cardiac gene expression during the transition from stable hypertrophy to heart failure. Marked upregulation of genes encoding extracellular matrix components. *Circ Res* 1994 Jul;75(1):23-32

**Book CB, Moore RL, Semanchik A, Ng YC.** Cardiac hypertrophy alters expression of Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase subunit isoforms at mRNA and protein levels in rat myocardium. *J Mol Cell Cardiol* 1994 May;26(5):591-600

**Bossy-Wetzel E, Green DR.** Caspases induce cytochrome c release from mitochondria by activating cytosolic factors. *J Biol Chem* 1999 Jun 18;274(25):17484-90

**Bottari SP, King IN, Reichlin S, Dahlstroem I, Lydon N, de Gasparo M.** The angiotensin AT<sub>2</sub> receptor stimulates protein tyrosine phosphatase activity and mediates inhibition of particulate guanylate cyclase. *Biochem Biophys Res Commun* 1992 Feb 28;183(1):206-11

**Bristow MR, Hershberger RE, Port JD, Gilbert EM, Sandoval A, Rasmussen R, Cates AE, Feldman AM.** Beta-adrenergic pathways in nonfailing and failing human ventricular myocardium. *Circulation* 1990 Aug;82(2 Suppl):I12-25

**Brock TA, Rittenhouse SE, Powers CW, Ekstein LS, Gimbrone MA Jr, Alexander RW.** Phorbol ester and 1-oleoyl-2-acetyl-glycerol inhibit angiotensin activation of phospholipase C in cultured vascular smooth muscle cells. *J Biol Chem* 1985 Nov 15;260(26):14158-14162

**Brownfield MS, Reid IA, Ganten D, Ganong WF.** Differential distribution of immunoreactive angiotensin and angiotensin-converting enzyme in rat brain. *Neuroscience* 1982 Jul;7(7):1759-69

**Bueno OF, De Windt LJ, Tymitz KM, Witt SA, Kimball TR, Klevitsky R, Hewett TE, Jones SP, Lefer DJ, Peng CF, Kitsis RN, Molkentin JD.** The MEK1-ERK1/2 signaling pathway promotes compensated cardiac hypertrophy in transgenic mice. *EMBO J* 2000 Dec 1;19(23):6341-50

**Bumpus FM, Catt KJ, Chiu AT, DeGasparo M, Goodfriend T, Husain A, Peach MJ, Taylor DG Jr, Timmermans PB.** Nomenclature for angiotensin receptors. A report of the Nomenclature Committee of the Council for High Blood Pressure Research. *Hypertension* 1991 May;17(5):720-721

**Bunnemann B, Fuxe K, Ganten D.** The brain renin-angiotensin system: localization and general significance. *J Cardiovasc Pharmacol* 1992;19 Suppl 6:S51-62

**Burns KD, Inagami T, Harris RC.** Cloning of a rabbit kidney cortex AT1 angiotensin II receptor that is present in proximal tubule epithelium. *Am J Physiol* 1993 Apr;264(4 Pt 2):F645-F654

**Cai W, Devaux B, Schaper W, Schaper J.** The role of Fas/APO 1 and apoptosis in the development of human atherosclerotic lesions. *Atherosclerosis* 1997 Jun;131(2):177-186

**Campbell DJ.** Tissue renin-angiotensin system: sites of angiotensin formation. *J Cardiovasc Pharmacol* 1987;10 Suppl 7:S1-8

**Cantin M, Gutkowska J, Lacasse J, Ballak M, Ledoux S, Inagami T, Beuzeron J, Genest J.** Ultrastructural immunocytochemical localization of renin and angiotensin II in the juxtaglomerular cells of the ischemic kidney in experimental renal hypertension. *Am J Pathol* 1984 May;115(2):212-24

**Chapman JN, Mayet J, Chang CL, Foale RA, Thom SA, Poulter NR.** Ethnic differences in the identification of left ventricular hypertrophy in the hypertensive patient. *Am J Hypertens* 1999 May;12(5):437-42

**Chien KR, Zhu H, Knowlton KU, Miller-Hance W, van-Bilsen M, O'Brien TX, Evans SM.** Transcriptional regulation during cardiac growth and development. *Annu Rev Physiol* 1993;55:77-95

**Chiu AT, McCall DE, Nguyen TT, Carini DJ, Duncia JV, Herblin WF, Uyeda RT, Wong PC, Wexler RR, Johnson AL, et al.** Discrimination of angiotensin II receptor subtypes by dithiothreitol. *Eur J Pharmacol* 1989 Oct 24;170(1-2):117-118

**Cigola E, Kajstura J, Li B, Meggs LG, Anversa P.** Angiotensin II activates programmed myocyte cell death in vitro. *Exp Cell Res* 1997 Mar 15;231(2):363-71

**Clark AF, Sharp MGF, Morley SD, Fleming S, Peters J, Mullins JJ.** Renin-1 is essential for normal renal juxtaglomerular cell granulation and macula densa morphology. *J Biol Chem* 1997 Jul 18;272(29):18185-90

**Dahlof B, Pennert K, Hansson L.** Reversal of left ventricular hypertrophy in hypertensive patients. A metaanalysis of 109 treatment studies. *Am J Hypertens* 1992 Feb;5(2):95-110

**Danser AH, van Kesteren CA, Bax WA, Tavenier M, Derkx FH, Saxena PR, Schalekamp MA.** Prorenin, renin, angiotensinogen, and angiotensin-converting enzyme

in normal and failing human hearts. Evidence for renin binding. *Circulation* 1997 Jul 1;96(1):220-6

**de Gasparo M, Husain A, Alexander W, Catt KJ, Chiu AT, Drew M, Goodfriend T, Harding JW, Inagami T, Timmermans PB.** Proposed update of angiotensin receptor nomenclature. *Hypertension* 1995 May;25(5):924-927

**de Lannoy LM, Danser AH, Bouhuizen AM, Saxena PR, Schalekamp MA.** Localization and production of angiotensin II in the isolated perfused rat heart. *Hypertension* 1998 May;31(5):1111-7

**De Windt LJ, Lim HW, Taigen T, Wencker D, Condorelli G, Dorn GW 2nd, Kitsis RN, Molkentin JD.** Calcineurin-mediated hypertrophy protects cardiomyocytes from apoptosis in vitro and in vivo: An apoptosis-independent model of dilated heart failure. *Circ Res* 2000 Feb 18;86(3):255-63

**Dodd DA, Atkinson JB, Olson RD, Buck S, Cusack BJ, Fleischer S, Boucek RJ Jr.** Doxorubicin cardiomyopathy is associated with a decrease in calcium release channel of the sarcoplasmic reticulum in a chronic rabbit model. *J Clin Invest* 1993 Apr;91(4):1697-705

**Donohue TJ, Dworkin LD, Lango MN, Fliegner K, Lango RP, Benstein JA, Slater WR, Catanese VM.** Induction of myocardial insulin-like growth factor-I gene expression in left ventricular hypertrophy. *Circulation* 1994 Feb;89(2):799-809

**Dostal DE, Rothblum KN, Chernin MI, Cooper GR, Baker KM.** Intracardiac detection of angiotensinogen and renin: a localized renin-angiotensin system in neonatal rat heart. *Am J Physiol* 1992 Oct;263(4 Pt 1):C838-50

**Dzau VJ, Re R.** Tissue angiotensin system in cardiovascular medicine. A paradigm shift? *Circulation* 1994 Jan;89(1):493-8

**Dzau VJ, Re RN.** Evidence for the existence of renin in the heart. *Circulation* 1987 Jan;75(1 Pt 2):I134-6

**Dzau VJ.** Implications of local angiotensin production in cardiovascular physiology and pharmacology. *Am J Cardiol* 1987 Jan 23;59(2):59A-65A

**Dzau VJ.** Vascular renin-angiotensin: a possible autocrine or paracrine system in control of vascular function. *J Cardiovasc Pharmacol* 1984;6 Suppl 2:S377-82

**Elton TS, Stephan CC, Taylor GR, Kimball MG, Martin MM, Durand JN, Oparil S.** Isolation of two distinct type I angiotensin II receptor genes. *Biochem Biophys Res Commun* 1992 Apr 30;184(2):1067-1073

**Esther CR Jr, Howard TE, Marino EM, Goddard JM, Capecchi MR, Bernstein KE.** Mice lacking angiotensin-converting enzyme have low blood pressure, renal pathology, and reduced male fertility. *Lab Invest* 1996 May;74(5):953-65

**Fazio S, Cittadini A, Sabatini D, Merola B, Colao A, Biondi B, Longobardi S, Lombardi G, Sacca L.** Growth hormone and heart performance. A novel mechanism of cardiac wall stress regulation in humans. *Eur Heart J*. 1997 Feb;18(2):181-4

**Feldman AM, Weinberg EO, Ray PE, Lorell BH.** Selective changes in cardiac gene expression during compensated hypertrophy and the transition to cardiac decompensation in rats with chronic aortic banding. *Circ Res* 1993 Jul;73(1):184-92

**Fernandes-Alnemri T, Litwack G, Alnemri ES.** CPP32, a novel human apoptotic protein with homology to *Caenorhabditis elegans* cell death protein Ced-3 and mammalian interleukin-1 beta-converting enzyme. *J Biol Chem* 1994 Dec 9;269(49):30761-30764

**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 Jul 13;41(2):153-9

**Fortuno MA, 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 Aug;32(2):280-286

**Freude B, Masters TN, Robicsek F, Fokin A, Kostin S, Zimmermann R, Ullmann C, Lorenz-Meyer S, Schaper J.** Apoptosis is initiated by myocardial ischemia and executed during reperfusion. *J Mol Cell Cardiol* 2000 Feb;32(2):197-208

**Frustaci A, Kajstura J, Chimenti C, Jakoniuk I, Leri A, Maseri A, Nadal-Ginard B, Anversa P.** Myocardial cell death in human diabetes. *Circ Res* 2000 Dec 8;87(12):1123-1132

**Furuta H, Guo DF, Inagami T.** Molecular cloning and sequencing of the gene encoding human angiotensin II type 1 receptor. *Biochem Biophys Res Commun* 1992 Feb 28;183(1):8-13

- Ganten D, Hermann K, Unger T, Lang RE.** The tissue renin-angiotensin systems: focus on brain angiotensin, adrenal gland and arterial wall. *Clin Exp Hypertens A* 1983;5(7-8):1099-118
- Gardin JM, Savage DD, Ware JH, Henry WL.** Effect of age, sex, and body surface area on echocardiographic left ventricular wall mass in normal subjects. *Hypertension* 1987 Feb;9(2 Pt 2):II36-9
- Geisterfer AA, Owens GK.** Arginine vasopressin-induced hypertrophy of cultured rat aortic smooth muscle cells. *Hypertension* 1989 Oct;14(4):413-20
- Geisterfer-Lowrance AA, Christe M, Conner DA, Ingwall JS, Schoen FJ, Seidman CE, Seidman JG.** A mouse model of familial hypertrophic cardiomyopathy. *Science* 1996 May 3;272(5262):731-4
- Gemmill RM, Drabkin HA.** Report of the Second International Workshop on Human Chromosome 3 mapping. *Cytogenet Cell Genet* 1991;57(4):162-6
- Giannakis C, Forbes IJ, Zalewski PD.** Ca<sup>2+</sup>/Mg<sup>2+</sup>-dependent nuclease: tissue distribution, relationship to inter-nucleosomal DNA fragmentation and inhibition by Zn<sup>2+</sup>. *Biochem Biophys Res Commun* 1991 Dec 16;181(2):915-20
- Goldberg Y, Taimor G, Piper HM, Schluter KD.** Intracellular signaling leads to the hypertrophic effect of neuropeptide Y. *Am J Physiol* 1998 Nov;275(5 Pt 1):C1207-15
- Gondo M, Maruta H, Arakawa K.** Direct formation of angiotensin II without renin or converting enzyme in the ischemic dog heart. *Jpn Heart J* 1989 Mar;30(2):219-29
- Goussev A, Sharov VG, Shimoyama H, Tanimura M, Lesch M, Goldstein S, Sabbah HN.** Effects of ACE inhibition on cardiomyocyte apoptosis in dogs with heart failure. *Am J Physiol* 1998 Aug;275(2 Pt 2):H626-31
- Grady EF, Sechi LA, Griffin CA, Schambelan M, Kalinyak JE.** Expression of AT<sub>2</sub> receptors in the developing rat fetus. *J Clin Invest* 1991 Sep;88(3):921-933
- Graf K, Do YS, Ashizawa N, Meehan WP, Giachelli CM, Marboe CC, Fleck E, Hsueh WA.** Myocardial osteopontin expression is associated with left ventricular hypertrophy. *Circulation* 1997 Nov 4;96(9):3063-71
- Graham BH, Waymire KG, Cottrell B, Trounce IA, MacGregor GR, Wallace DC.** A mouse model for mitochondrial myopathy and cardiomyopathy resulting from a

deficiency in the heart/muscle isoform of the adenine nucleotide translocator. *Nat Genet* 1997 Jul;16(3):226-234

**Gray MO, Long CS, Kalinyak JE, Li HT, Karlner JS.** Angiotensin II stimulates cardiac myocyte hypertrophy via paracrine release of TGF-beta 1 and endothelin-1 from fibroblasts. *Cardiovasc Res* 1998 Nov;40(2):352-363

**Griendling KK, Rittenhouse SE, Brock TA, Ekstein LS, Gimbrone MA Jr, Alexander RW.** Sustained diacylglycerol formation from inositol phospholipids in angiotensin II-stimulated vascular smooth muscle cells. *J Biol Chem* 1986 May 5;261(13):5901-5906

**Griendling KK, Delafontaine P, Rittenhouse SE, Gimbrone MA Jr, Alexander RW.** Correlation of receptor sequestration with sustained diacylglycerol accumulation in angiotensin II-stimulated cultured vascular smooth muscle cells. *J Biol Chem* 1987 Oct 25;262(30):14555-14562

**Griendling KK, Lassegue B, Alexander RW.** Angiotensin receptors and their therapeutic implications. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 1996;36:281-306

**Gruver CL, DeMayo F, Goldstein MA, Means AR.** Targeted developmental overexpression of calmodulin induces proliferative and hypertrophic growth of cardiomyocytes in transgenic mice. *Endocrinology* 1993 Jul;133(1):376-88

**Gunther S, Gimbrone MA Jr, Alexander RW.** Regulation by angiotensin II of its receptors in resistance blood vessels. *Nature* 1980 Sep 18;287(5779):230-232

**Guo DF, Inagami T.** Epidermal growth factor-enhanced human angiotensin II type 1 receptor. *Hypertension* 1994 Jun;23(6 Pt 2):1032-1035

**Hamawaki M, Coffman TM, Lashus A, Koide M, Zile MR, Oliverio MI, DeFreyte G, Cooper G 4th, Carabello BA.** Pressure-overload hypertrophy is unabated in mice devoid of AT1A receptors. *Am J Physiol* 1998 Mar;274(3 Pt 2):H868-H873

**Hanson MC, Fath KA, Alexander RW, Delafontaine P.** Induction of cardiac insulin-like growth factor I gene expression in pressure overload hypertrophy. *Am J Med Sci* 1993 Aug;306(2):69-74

**Harada K, Komuro I, Zou Y, Kudoh S, Kijima K, Matsubara H, Sugaya T, Murakami K, Yazaki Y.** Acute pressure overload could induce hypertrophic responses in the heart of angiotensin II type 1a knockout mice. *Circ Res* 1998 Apr 20;82(7):779-85

**Harshfield GA, Grim CE, Hwang C, Savage DD, Anderson SJ.** Genetic and environmental influences on echocardiographically determined left ventricular mass in black twins. *Am J Hypertens* 1990 Jul;3(7):538-43

**Hasdai D, Sangiorgi G, Spagnoli LG, Simari RD, Holmes DR Jr, Kwon HM, Carlson PJ, Schwartz RS, Lerman A.** Coronary artery apoptosis in experimental hypercholesterolemia. *Atherosclerosis* 1999 Feb;142(2):317-25

**Hasenfuss G.** Animal models of human cardiovascular disease, heart failure and hypertrophy. *Cardiovasc Res* 1998 Jul;39(1):60-76

**Hashida H, Hamada M, Hiwada K.** Serial changes in sarcoplasmic reticulum gene expression in volume-overloaded cardiac hypertrophy in the rat: effect of an angiotensin II receptor antagonist. *Clin Sci (Colch)* 1999 Apr;96(4):387-95

**Hatem SN, Sham JS, Morad M.** Enhanced Na(+)-Ca<sup>2+</sup> exchange activity in cardiomyopathic Syrian hamster. *Circ Res* 1994 Feb;74(2):253-61

**Hatt PY, Rakusan K, Gastineau P, Laplace M, Cluzeaud F.** Aorto-caval fistula in the rat. An experimental model of heart volume overloading. *Basic Res Cardiol* 1980 Jan-Feb;75(1):105-8

**Hayashida W, Horiuchi M, Dzau VJ.** Intracellular third loop domain of angiotensin II type-2 receptor. Role in mediating signal transduction and cellular function. *J Biol Chem* 1996 Sep 6;271(36):21985-21992

**Haywood GA, Gullestad L, Katsuya T, Hutchinson HG, Pratt RE, Horiuchi M, Fowler MB.** AT1 and AT2 angiotensin receptor gene expression in human heart failure. *Circulation* 1997 Mar 4;95(5):1201-1206

**Hefti MA, Harder BA, Eppenberger HM, Schaub MC.** Signaling pathways in cardiac myocyte hypertrophy. *J Mol Cell Cardiol* 1997 Nov;29(11):2873-92

**Hein L, Stevens ME, Barsh GS, Pratt RE, Kobilka BK, Dzau VJ.** Overexpression of angiotensin AT1 receptor transgene in the mouse myocardium produces a lethal phenotype associated with myocyte hyperplasia and heart block. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997 Jun 10;94(12):6391-6

**Helmer GA, McKirnan MD, Shabetai R, Boss GR, Ross J Jr, Hammond HK.** Regional deficits of myocardial blood flow and function in left ventricular pacing-induced heart failure. *Circulation* 1996 Nov 1;94(9):2260-7

**Herzig TC, Jobe SM, Aoki H, Molkenstin JD, Cowley AW Jr, Izumo S, Markham BE.** Angiotensin II type1a receptor gene expression in the heart: AP-1 and GATA-4 participate in the response to pressure overload. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997 Jul 8;94(14):7543-7548

**Higaki J, Aoki M, Morishita R, Kida I, Taniyama Y, Tomita N, Yamamoto K, Moriguchi A, Kaneda Y, Ogihara T.** In vivo evidence of the importance of cardiac angiotensin-converting enzyme in the pathogenesis of cardiac hypertrophy. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2000 Feb;20(2):428-434

**Hirata Y, Takagi Y, Fukuda Y, Marumo F.** Endothelin is a potent mitogen for rat vascular smooth muscle cells. *Atherosclerosis* 1989 Aug;78(2-3):225-8

**Hiroe M, Hirata Y, Fujita N, Umezawa S, Ito H, Tsujino M, Koike A, Nogami A, Takamoto T, Marumo F.** Plasma endothelin-1 levels in idiopathic dilated cardiomyopathy. *Am J Cardiol* 1991 Oct 15;68(10):1114-5

**Hirota H, Yoshida K, Kishimoto T, Taga T.** Continuous activation of gp130, a signal-transducing receptor component for interleukin 6-related cytokines, causes myocardial hypertrophy in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995 May 23;92(11):4862-6

**Ho KK, Anderson KM, Kannel WB, Grossman W, Levy D.** Survival after the onset of congestive heart failure in Framingham Heart Study subjects. *Circulation* 1993 Jul;88(1):107-15

**Holly TA, Drincic A, Byun Y, Nakamura S, Harris K, Klocke FJ, Cryns VL.** Caspase inhibition reduces myocyte cell death induced by myocardial ischemia and reperfusion in vivo. *J Mol Cell Cardiol* 1999 Sep;31(9):1709-1715

**Horiuchi M, Akishita M, Dzau VJ.** Molecular and cellular mechanism of angiotensin II-mediated apoptosis. *Endocr Res* 1998 Aug;24(3-4):307-314

**Horiuchi M, Yoshida H, Kobayashi K, Kuriwaki K, Yoshimine K, Tomomura M, Koizumi T, Nikaido H, Hayakawa J, Kuwajima M, et al.** Cardiac hypertrophy in juvenile visceral steatosis (jvs) mice with systemic carnitine deficiency. *FEBS Lett* 1993 Jul 12;326(1-3):267-71

**Hunter JJ, Tanaka N, Rockman HA, Ross J Jr, Chien KR.** Ventricular expression of a MLC-2v-ras fusion gene induces cardiac hypertrophy and selective diastolic dysfunction in transgenic mice. *J Biol Chem* 1995 Sep 29;270(39):23173-8

**Ichiki T, Labosky PA, Shiota C, Okuyama S, Imagawa Y, Fogo A, Niimura F, Ichikawa I, Hogan BL, Inagami T.** Effects on blood pressure and exploratory behaviour of mice lacking angiotensin II type-2 receptor. *Nature* 1995 Oct 26;377(6551):748-50

**Ikeda M, Sasaguri M, Maruta H, Arakawa K.** Formation of angiotensin II by tonin-inhibitor complex. *Hypertension* 1988 Jan;11(1):63-70

**Inagami T, Kambayashi Y, Ichiki T, Tsuzuki S, Eguchi S, Yamakawa T.** Angiotensin receptors: molecular biology and signalling. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 1999 Jul;26(7):544-549

**Inoko M, Kihara Y, Morii I, Fujiwara H, Sasayama S.** Transition from compensatory hypertrophy to dilated, failing left ventricles in Dahl salt-sensitive rats. *Am J Physiol* 1994 Dec;267(6 Pt 2):H2471-82

**Ishikawa T, Yanagisawa M, Kimura S, Goto K, Masaki T (a).** Positive chronotropic effects of endothelin, a novel endothelium-derived vasoconstrictor peptide. *Pflugers Arch* 1988 Nov;413(1):108-10

**Ishikawa T, Yanagisawa M, Kimura S, Goto K, Masaki T (b).** Positive inotropic action of novel vasoconstrictor peptide endothelin on guinea pig atria. *Am J Physiol* 1988 Oct;255(4 Pt 2):H970-3

**Itazaki K, Shigeri Y, Fujimoto M.** Molecular cloning and characterization of the angiotensin receptor subtype in porcine aortic smooth muscle. *Eur J Pharmacol* 1993 Apr 15;245(2):147-156

**Ito H, Adachi S, Tamamori M, Fujisaki H, Tanaka M, Lin M, Akimoto H, Marumo F, Hiroe M.** Mild hypoxia induces hypertrophy of cultured neonatal rat cardiomyocytes: a possible endogenous endothelin-1-mediated mechanism. *J Mol Cell Cardiol* 1996 Jun;28(6):1271-7

**Ito H, Hirata Y, Adachi S, Tanaka M, Tsujino M, Koike A, Nogami A, Murumo 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 Jul;92(1):398-403

**Ito H, Hirata Y, Hiroe M, Tsujino M, Adachi S, Takamoto T, Nitta M, Taniguchi K, Marumo F.** Endothelin-1 induces hypertrophy with enhanced expression of muscle-specific genes in cultured neonatal rat cardiomyocytes. *Circ Res* 1991 Jul;69(1):209-15

- Ito H, Hiroe M, Hirata Y, Fujisaki H, Adachi S, Akimoto H, Ohta Y, Marumo F.** Endothelin ETA receptor antagonist blocks cardiac hypertrophy provoked by hemodynamic overload. *Circulation* 1994 May;89(5):2198-203
- Iwai N, Inagami T.** Identification of two subtypes in the rat type I angiotensin II receptor. *FEBS Lett* 1992 Feb 24;298(2-3):257-260
- Iwai N, Shimoike H, Kinoshita M.** Cardiac renin-angiotensin system in the hypertrophied heart. *Circulation* 1995 Nov 1;92(9):2690-2696
- Iwanaga Y, Kihara Y, Yoneda T, Aoyama T, Sasayama S.** Modulation of in vivo cardiac hypertrophy with insulin-like growth factor-1 and angiotensin-converting enzyme inhibitor: relationship between change in myosin isoform and progression of left ventricular dysfunction. *J Am Coll Cardiol* 2000 Aug;36(2):635-642
- Izumo S, Nadal-Ginard B, Mahdavi V.** Protooncogene induction and reprogramming of cardiac gene expression produced by pressure overload. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1988 Jan;85(2):339-43
- Jasmin G, Proschek L.** Hereditary polymyopathy and cardiomyopathy in the Syrian hamster. I. Progression of heart and skeletal muscle lesions in the UM-X7.1 line. *Muscle Nerve* 1982 Jan;5(1):20-5
- Kajstura J, Zhang X, Reiss K, Szoke E, Li P, Lagrasta C, Cheng W, Darzynkiewicz Z, Olivetti G, Anversa P.** Myocyte cellular hyperplasia and myocyte cellular hypertrophy contribute to chronic ventricular remodeling in coronary artery narrowing-induced cardiomyopathy in rats. *Circ Res* 1994 Mar;74(3):383-400
- Kakar SS, Riel KK, Neill JD.** Differential expression of angiotensin II receptor subtype mRNAs (AT-1A and AT-1B) in the brain. *Biochem Biophys Res Commun* 1992 Jun 15;185(2):688-692
- Kambayashi Y, Bardhan S, Takahashi K, Tsuzuki S, Inui H, Hamakubo T, Inagami T.** Molecular cloning of a novel angiotensin II receptor isoform involved in phosphotyrosine phosphatase inhibition. *J Biol Chem* 1993 Nov 25;268(33):24543-6
- Kang J, Posner P, Sumners C.** Angiotensin II type 2 receptor stimulation of neuronal K<sup>+</sup> currents involves an inhibitory GTP binding protein. *Am J Physiol* 1994 Nov;267(5 Pt 1):C1389-97

- Karam H, Heudes D, Hess P, Gonzales MF, Loffler BM, Clozel M, Clozel JP.** Respective role of humoral factors and blood pressure in cardiac remodeling of DOCA hypertensive rats. *Cardiovasc Res* 1996 Feb;31(2):287-95
- Katz EB, Stenbit AE, Hatton K, DePinho R, Charron MJ.** Cardiac and adipose tissue abnormalities but not diabetes in mice deficient in GLUT4. *Nature* 1995 Sep 14;377(6545):151-5
- Kavantzias NG, Lazaris AC, Agapitos EV, Nanas J, Davaris PS.** Histological assessment of apoptotic cell death in cardiomyopathies. *Pathology* 2000 Aug;32(3):176-80
- Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR.** Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer* 1972 Aug;26(4):239-257
- Kitami Y, Okura T, Marumoto K, Wakamiya R, Hiwada K.** Differential gene expression and regulation of type-1 angiotensin II receptor subtypes in the rat. *Biochem Biophys Res Commun* 1992 Oct 15;188(1):446-452
- Kleaveland JP, Kussmaul WG, Vinciguerra T, Diters R, Carabello BA.** Volume overload hypertrophy in a closed-chest model of mitral regurgitation. *Am J Physiol* 1988 Jun;254(6 Pt 2):H1034-41
- Klickstein LB, Kaempfer CE, Wintroub BU.** The granulocyte-angiotensin system. Angiotensin I-converting activity of cathepsin G. *J Biol Chem* 1982 Dec 25;257(24):15042-6
- Koike G, Horiuchi M, Yamada T, Szpirer C, Jacob HJ, Dzau VJ.** Human type 2 angiotensin II receptor gene: cloned, mapped to the X chromosome, and its mRNA is expressed in the human lung. *Biochem Biophys Res Commun* 1994 Sep 30;203(3):1842-1850
- Kolodziejczyk SM, Wang L, Balazsi K, DeRepentigny Y, Kothary R, Megeney LA.** MEF2 is upregulated during cardiac hypertrophy and is required for normal post-natal growth of the myocardium. *Curr Biol* 1999 Oct 21;9(20):1203-6
- 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 May;89(5):2204-2211

**Komuro I, Kurabayashi M, Takaku F, Yazaki Y.** Expression of cellular oncogenes in the myocardium during the developmental stage and pressure-overloaded hypertrophy of the rat heart. *Circ Res* 1988 Jun;62(6):1075-9

**Krege JH, John SW, Langenbach LL, Hodgin JB, Hagaman JR, Bachman ES, Jennette JC, O'Brien DA, Smithies O.** Male-female differences in fertility and blood pressure in ACE-deficient mice. *Nature* 1995 May 11;375(6527):146-8

**Kuo TH, Tsang W, Wang KK, Carlock L.** Simultaneous reduction of the sarcolemmal and SR calcium ATPase activities and gene expression in cardiomyopathic hamster. *Biochim Biophys Acta* 1992 Apr 14;1138(4):343-9

**Lassegue B, Alexander RW, Clark M, Griendling KK.** Angiotensin II-induced phosphatidylcholine hydrolysis in cultured vascular smooth-muscle cells. Regulation and localization. *Biochem J* 1991 May 15;276( Pt 1):19-25

**Lee JK, Nishiyama A, Kambe F, Seo H, Takeuchi S, Kamiya K, Kodama I, Toyama J.** Downregulation of voltage-gated K(+) channels in rat heart with right ventricular hypertrophy. *Am J Physiol* 1999 Nov;277(5 Pt 2):H1725-31

**Lee WL, Chen JW, Ting CT, Ishiwata T, Lin SJ, Korc M, Wang PH.** Insulin-like growth factor I improves cardiovascular function and suppresses apoptosis of cardiomyocytes in dilated cardiomyopathy. *Endocrinology* 1999 Oct;140(10):4831-40

**Leung PS, Chan WP, Wong TP, Sernia C.** Expression and localization of the renin-angiotensin system in the rat pancreas. *J Endocrinol* 1999 Jan;160(1):13-9

**Levy D, Kannel WB.** Cardiovascular risks: new insights from Framingham. *Am Heart J* 1988 Jul;116(1 Pt 2):266-72

**Li JM, Brooks G.** Differential protein expression and subcellular distribution of TGFbeta1, beta2 and beta3 in cardiomyocytes during pressure overload-induced hypertrophy. *J Mol Cell Cardiol* 1997 Aug;29(8):2213-24

**Li M, Ona VO, Guegan C, Chen M, Jackson-Lewis V, Andrews LJ, Olszewski AJ, Stieg PE, Lee JP, Przedborski S, Friedlander RM.** Functional role of caspase-1 and caspase-3 in an ALS transgenic mouse model. *Science* 2000 Apr 14;288(5464):335-9

- Li Z, Bing OH, Long X, Robinson KG, Lakatta EG.** Increased cardiomyocyte apoptosis during the transition to heart failure in the spontaneously hypertensive rat. *Am J Physiol* 1997 May;272(5 Pt 2):H2313-9
- Linz W, Scholkens BA, Ganten D.** Converting enzyme inhibition specifically prevents the development and induces regression of cardiac hypertrophy in rats. *Clin Exp Hypertens A* 1989;11(7):1325-50
- Litwin SE, Katz SE, Morgan JP, Douglas PS.** Serial echocardiographic assessment of left ventricular geometry and function after large myocardial infarction in the rat. *Circulation* 1994 Jan;89(1):345-54
- Liu L, Azhar G, Gao W, Zhang X, Wei JY.** Bcl-2 and Bax expression in adult rat hearts after coronary occlusion: age-associated differences. *Am J Physiol* 1998 Jul;275(1 Pt 2):R315-22
- Liu YH, Yang XP, Nass O, Sabbah HN, Peterson E, Carretero OA.** Chronic heart failure induced by coronary artery ligation in Lewis inbred rats. *Am J Physiol* 1997 Feb;272(2 Pt 2):H722-7
- Loudon M, Bing RF, Thurston H, Swales JD.** Arterial wall uptake of renal renin and blood pressure control. *Hypertension* 1983 Sep-Oct;5(5):629-34
- MacTaggart TE, Ito M, Smithies O, John SW.** Mouse angiotensin receptor genes *Agtr1a* and *Agtr1b* map to chromosomes 13 and 3. *Mamm Genome* 1997 Apr;8(4):294-5
- Magid NM, Opio G, Wallerson DC, Young MS, Borer JS.** Heart failure due to chronic experimental aortic regurgitation. *Am J Physiol* 1994 Aug;267(2 Pt 2):H556-62
- Majno G, Joris I.** Apoptosis, oncosis, and necrosis. An overview of cell death. *Am J Pathol* 1995 Jan;146(1):3-15
- Makino N, Sugano M, Otsuka S, Hata T.** Molecular mechanism of angiotensin II type I and type II receptors in cardiac hypertrophy of spontaneously hypertensive rats. *Hypertension* 1997 Oct;30(4):796-802
- Malhotra A, Siri FM, Aronson R.** Cardiac contractile proteins in hypertrophied and failing guinea pig heart. *Cardiovasc Res* 1992 Feb;26(2):153-61
- Marian AJ, Mares A Jr, Kelly DP, Yu QT, Abchee AB, Hill R, Roberts R.** Sudden cardiac death in hypertrophic cardiomyopathy. Variability in phenotypic expression of beta-myosin heavy chain mutations. *Eur Heart J* 1995 Mar;16(3):368-76

- Maron BJ, Nichols PF 3d, Pickle LW, Wesley YE, Mulvihill JJ.** Patterns of inheritance in hypertrophic cardiomyopathy: assessment by M-mode and two-dimensional echocardiography. *Am J Cardiol* 1984 Apr 1;53(8):1087-94
- Marrero MB, Paxton WG, Duff JL, Berk BC, Bernstein KE.** Angiotensin II stimulates tyrosine phosphorylation of phospholipase C-gamma 1 in vascular smooth muscle cells. *J Biol Chem* 1994 Apr 8;269(14):10935-10939
- Martin MM, Su B, Elton TS.** Molecular cloning of the human angiotensin II type 2 receptor cDNA. *Biochem Biophys Res Commun* 1994 Nov 30;205(1):645-651
- Masaki H, Imaizumi T, Ando S, Hirooka Y, Harada S, Momohara M, Nagano M, Takeshita A.** (a) Production of chronic congestive heart failure by rapid ventricular pacing in the rabbit. *Cardiovasc Res* 1993 May;27(5):828-31
- 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.** (b) Cardiac-specific overexpression of angiotensin II AT2 receptor causes attenuated response to AT1 receptor-mediated pressor and chronotropic effects. *J Clin Invest* 1998 Feb 1;101(3):527-35
- Matsubara H, Suzuki J, Inada M.** Shaker-related potassium channel, Kv1.4, mRNA regulation in cultured rat heart myocytes and differential expression of Kv1.4 and Kv1.5 genes in myocardial development and hypertrophy. *J Clin Invest* 1993 Oct;92(4):1659-66
- Matsumori A, Kawai C.** An experimental model for congestive heart failure after encephalomyocarditis virus myocarditis in mice. *Circulation* 1982 Jun;65(6):1230-5
- Mazzolai L, Nussberger J, Aubert JF, Brunner DB, Gabbiani G, Brunner HR, Pedrazzini T.** Blood pressure-independent cardiac hypertrophy induced by locally activated renin-angiotensin system. *Hypertension* 1998 Jun;31(6):1324-1330
- McCullagh WH, Covell JW, Ross J Jr.** Left ventricular dilatation and diastolic compliance changes during chronic volume overloading. *Circulation* 1972 May;45(5):943-51
- McWhinney CD, Hunt RA, Conrad KM, Dostal DE, Baker KM.** The type I angiotensin II receptor couples to Stat1 and Stat3 activation through Jak2 kinase in neonatal rat cardiac myocytes. *J Mol Cell Cardiol* 1997 Sep;29(9):2513-2524

**Mercure C, Ramla D, Garcia R, Thibault G, Deschepper CF, Reudelhuber TL.** Evidence for intracellular generation of angiotensin II in rat juxtaglomerular cells. *FEBS Lett* 1998 Feb 6;422(3):395-9

**Mettler FP, Young DM, Ward JM.** Adriamycin-induced cardiotoxicity (cardiomyopathy and congestive heart failure) in rats. *Cancer Res* 1977 Aug;37(8 Pt 1):2705-2713

**Milano CA, Dolber PC, Rockman HA, Bond RA, Venable ME, Allen LF, Lefkowitz RJ.** Myocardial expression of a constitutively active alpha 1B-adrenergic receptor in transgenic mice induces cardiac hypertrophy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994 Oct 11;91(21):10109-13

**Millar BC, Schluter KD, Zhou XJ, McDermott BJ, Piper HM.** Neuropeptide Y stimulates hypertrophy of adult ventricular cardiomyocytes. *Am J Physiol* 1994 May;266(5 Pt 1):C1271-7

**Mulder P, Richard V, Bouchart F, Derumeaux G, Munter K, Thuillez C.** Selective ETA receptor blockade prevents left ventricular remodeling and deterioration of cardiac function in experimental heart failure. *Cardiovasc Res* 1998 Sep;39(3):600-8

**Mukoyama M, Nakajima M, Horiuchi M, Sasamura H, Pratt RE, Dzau VJ.** Expression cloning of type 2 angiotensin II receptor reveals a unique class of seven-transmembrane receptors. *J Biol Chem* 1993 Nov 25;268(33):24539-24542

**Nakahashi T, Fukuo K, Nishimaki H, Hata S, Shimizu M, Suhara T, Takimoto M, Morimoto S, Ogihara T.** Endothelin-1 enhances nitric oxide-induced cell death in cultured vascular smooth-muscle cells. *J Cardiovasc Pharmacol* 1998;31:S351-S353

**Nakamura T, Ueda Y, Juan Y, Katsuda S, Takahashi H, Koh E.** Fas-mediated apoptosis in adriamycin-induced cardiomyopathy in rats: In vivo study. *Circulation* 2000 Aug 1;102(5):572-8

**Nakamura Y, Haneda T, Osaki J, Miyata S, Kikuchi K.** Hypertrophic growth of cultured neonatal rat heart cells mediated by vasopressin V(1A) receptor. *Eur J Pharmacol* 2000 Mar 10;391(1-2):39-48

**Narishige T, Blade KL, Ishibashi Y, Nagai T, Hamawaki M, Menick DR, Kuppuswamy D, Cooper G 4<sup>th</sup>.** Cardiac hypertrophic and developmental regulation of the beta-tubulin multigene family. *J Biol Chem* 1999 Apr 2;274(14):9692-7

**Narula J, Haider N, Virmani R, DiSalvo TG, Kolodgie FD, Hajjar RJ, Schmidt U, Semigran MJ, Dec GW, Khaw BA.** Apoptosis in myocytes in end-stage heart failure. *N Engl J Med* 1996 Oct 17;335(16):1182-9

**Nicholson DW, Ali A, Thornberry NA, Vaillancourt JP, Ding CK, Gallant M, Gareau Y, Griffin PR, Labelle M, Lazebnik YA, et al.** Identification and inhibition of the ICE/CED-3 protease necessary for mammalian apoptosis. *Nature* 1995 Jul 6;376(6535):37-43

**Nickenig G, Roling J, Strehlow K, Schnabel P, Bohm M.** (a) Insulin induces upregulation of vascular AT1 receptor gene expression by posttranscriptional mechanisms. *Circulation* 1998 Dec 1;98(22):2453-2460

**Nickenig G, Baumer AT, Grohe C, Kahlert S, Strehlow K, Rosenkranz S, Stablein A, Beckers F, Smits JF, Daemen MJ, Vetter H, Bohm M.** (b) Estrogen modulates AT1 receptor gene expression in vitro and in vivo. *Circulation* 1998 Jun 9;97(22):2197-2201

**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 Jan;95(1):46-54

**Nitahara JA, Cheng W, Liu Y, Li B, Leri A, Li P, Mogul D, Gambert SR, Kajstura J, Anversa P.** Intracellular calcium, DNase activity and myocyte apoptosis in aging Fischer 344 rats. *J Mol Cell Cardiol* 1998 Mar;30(3):519-35

**Nuss HB, Houser SR.** T-type Ca<sup>2+</sup> current is expressed in hypertrophied adult feline left ventricular myocytes. *Circ Res* 1993 Oct;73(4):777-82

**Ohkubo N, Matsubara H, Nozawa Y, Mori Y, Murasawa S, Kijima K, Maruyama K, Masaki H, Tsutumi Y, Shibasaki Y, Iwasaka T, Inada M.** Angiotensin type 2 receptors are reexpressed by cardiac fibroblasts from failing myopathic hamster hearts and inhibit cell growth and fibrillar collagen metabolism. *Circulation* 1997 Dec 2;96(11):3954-3962

**Ohnishi J, Ishido M, Shibata T, Inagami T, Murakami K, Miyazaki H.** The rat angiotensin II AT1A receptor couples with three different signal transduction pathways. *Biochem Biophys Res Commun* 1992 Jul 31;186(2):1094-1101

- Ohnishi J, Tanaka M, Naruse M, Usuki S, Murakami K, Miyazaki H.** Effect of dithiothreitol on angiotensin II receptor type II in rat ovarian cultured granulosa cells. *Biochim Biophys Acta* 1994 Jun 22;1192(2):286-288
- Ohtani S, Fujiwara H, Hasegawa K, Doyama K, Inada T, Tanaka M, Fujiwara T, Sasayama S.** Up-regulated expression of angiotensin II type 1 receptor gene in human pathologic hearts. *J Card Fail* 1997 Dec;3(4):303-10
- Ohyama K, Yamano Y, Chaki S, Kondo T, Inagami T.** Domains for G-protein coupling in angiotensin II receptor type I: studies by site-directed mutagenesis. *Biochem Biophys Res Commun* 1992 Dec 15;189(2):677-683
- Okuyama S, Sakagawa T, Chaki S, Imagawa Y, Ichiki T, Inagami T.** Anxiety-like behavior in mice lacking the angiotensin II type-2 receptor. *Brain Res* 1999 Mar 6;821(1):150-9
- Oliverio MI, Best CF, Kim HS, Arendshorst WJ, Smithies O, Coffman TM.** Angiotensin II responses in AT1A receptor-deficient mice: a role for AT1B receptors in blood pressure regulation. *Am J Physiol* 1997 Apr;272(4 Pt 2):F515-20
- Oliverio MI, Kim HS, Ito M, Le T, Audoly L, Best CF, Hiller S, Kluckman K, Maeda N, Smithies O, Coffman TM.** Reduced growth, abnormal kidney structure, and type 2 (AT2) angiotensin receptor-mediated blood pressure regulation in mice lacking both AT1A and AT1B receptors for angiotensin II. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998 Dec 22;95(26):15496-501
- 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 human heart. *N Engl J Med* 1997 Apr 17;336(16):1131-41
- Paradis P, Dali-Youcef N, Paradis FW, Thibault G, Nemer M.** Overexpression of angiotensin II type I receptor in cardiomyocytes induces cardiac hypertrophy and remodeling. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000 Jan 18;97(2):931-6
- Parameshwar J, Poole-Wilson PA, Sutton GC.** Heart failure in a district general hospital. *J R Coll Physicians Lond* 1992 Apr;26(2):139-42
- Parameshwar J, Shackell MM, Richardson A, Poole-Wilson PA, Sutton GC.** Prevalence of heart failure in three general practices in north west London. *Br J Gen Pract* 1992 Jul;42(360):287-9

- Pauliks LB, Cole KE, Mergner WJ.** Increased insulin-like growth factor-1 protein in human left ventricular hypertrophy. *Exp Mol Pathol* 1999 Apr;66(1):53-58
- Puig M, Ballester M, Matias-Guiu X, Bordes R, Carrio I, Kolodgie FD, Pons C, Garcia A, Aymat MR, Marrugat J, Brossa V, Camprecios M, Padro JM, Caralps JM, Virmani R, Prat J, Narula J.** Burden of myocardial damage in cardiac allograft rejection: scintigraphic evidence of myocardia injury and histologic evidence of myocyte necrosis and apoptosis. *J Nucl Cardiol* 2000 Mar-Apr;7(2):132-9
- Pobiner BF, Hewlett EL, Garrison JC.** Role of Ni in coupling angiotensin receptors to inhibition of adenylate cyclase in hepatocytes. *J Biol Chem* 1985 Dec 25;260(30):16200-16209
- Rao GN, Lassegue B, Alexander RW, Griendling KK.** Angiotensin II stimulates phosphorylation of high-molecular-mass cytosolic phospholipase A2 in vascular smooth-muscle cells. *Biochem J* 1994 Apr 1;299( Pt 1):197-201
- Reid IA, Morris BJ, Ganong WF.** The renin-angiotensin system. *Annu Rev Physiol* 1978;40:377-410
- Rockman HA, Wachhorst SP, Mao L, Ross J Jr.** ANG II receptor blockade prevents ventricular hypertrophy and ANF gene expression with pressure overload in mice. *Am J Physiol* 1994 Jun;266(6 Pt 2):H2468-75
- Ruzicka M, Yuan B, Leenen FH.** Effects of enalapril versus losartan on regression of volume overload-induced cardiac hypertrophy in rats. *Circulation* 1994 Jul;90(1):484-91
- Saadane N, Alpert L, Chalifour LE.** Expression of immediate early genes, GATA-4, and Nkx-2.5 in adrenergic-induced cardiac hypertrophy and during regression in adult mice. *Br J Pharmacol* 1999 Jul;127(5):1165-76
- Sabbah HN, Stein PD, Kono T, Gheorghiade M, Levine TB, Jafri S, Hawkins ET, Goldstein S.** A canine model of chronic heart failure produced by multiple sequential coronary microembolizations. *Am J Physiol* 1991 Apr;260(4 Pt 2):H1379-84
- Sadoshima J, Xu Y, Slayter HS, Izumo S.** (a) Autocrine release of angiotensin II mediates stretch-induced hypertrophy of cardiac myocytes in vitro. *Cell* 1993 Dec 3;75(5):977-84

- Sadoshima J, Izumo S. (b)** Molecular characterization of angiotensin II--induced hypertrophy of cardiac myocytes and hyperplasia of cardiac fibroblasts. Critical role of the AT1 receptor subtype. *Circ Res* 1993 Sep;73(3):413-23
- Sakagawa T, Okuyama S, Kawashima N, Hozumi S, Nakagawasai O, Tadano T, Kisara K, Ichiki T, Inagami T.** Pain threshold, learning and formation of brain edema in mice lacking the angiotensin II type 2 receptor. *Life Sci* 2000 Oct 13;67(21):2577-85
- Sakai S, Miyauchi T, Kobayashi M, Yamaguchi I, Goto K, Sugishita Y.** Inhibition of myocardial endothelin pathway improves long-term survival in heart failure. *Nature* 1996 Nov 28;384(6607):353-5
- Sakamoto A, Ono K, Abe M, Jasmin G, Eki T, Murakami Y, Masaki T, Toyooka T, Hanaoka F.** 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 U S A* 1997 Dec 9;94(25):13873-8
- Sandberg K, Ji H, Clark AJ, Shapira H, Catt KJ.** Cloning and expression of a novel angiotensin II receptor subtype. *J Biol Chem* 1992 May 15;267(14):9455-9458
- Saraste A, Pulkki K. (a).** Morphologic and biochemical hallmarks of apoptosis. *Cardiovasc Res* 2000 Feb;45(3):528-537
- Saraste A, Pulkki K, Kallajoki M, Heikkila P, Laine P, Mattila S, Nieminen MS, Parvinen M, Voipio-Pulkki LM (b).** Cardiomyocyte apoptosis and progression of heart failure to transplantation. *Eur J Clin Invest* 1999 May;29(5):380-6
- Saraste A, Pulkki K, Kallajoki M, Henriksen K, Parvinen M, Voipio-Pulkki LM. (c)** Apoptosis in human acute myocardial infarction. *Circulation* 1997 Jan 21;95(2):320-323
- Sasamura H, Hein L, Krieger JE, Pratt RE, Kobilka BK, Dzau VJ.** Cloning, characterization, and expression of two angiotensin receptor (AT-1) isoforms from the mouse genome. *Biochem Biophys Res Commun* 1992 May 29;185(1):253-259
- Savage DD, Levy D, Dannenberg AL, Garrison RJ, Castelli WP.** Association of echocardiographic left ventricular mass with body size, blood pressure and physical activity (the Framingham Study). *Am J Cardiol* 1990 Feb 1;65(5):371-6
- Schafer M, Frischkopf K, Taimor G, Piper HM, Schluter KD.** Hypertrophic effect of selective beta(1)-adrenoceptor stimulation on ventricular cardiomyocytes from adult rat. *Am J Physiol Cell Physiol* 2000 Aug;279(2):C495-503

**Schaper J, Lorenz-Meyer S, Suzuki K.** The role of apoptosis in dilated cardiomyopathy. *Herz* 1999 May;24(3):219-24

**Schocken DD, Arrieta MI, Leaverton PE, Ross EA.** Prevalence and mortality rate of congestive heart failure in the United States. *J Am Coll Cardiol* 1992 Aug;20(2):301-6

**Schunkert H, Dzau VJ, Tang SS, Hirsch AT, Apstein CS, Lorell BH.** Increased rat cardiac angiotensin converting enzyme activity and mRNA expression in pressure overload left ventricular hypertrophy. Effects on coronary resistance, contractility, and relaxation. *J Clin Invest* 1990 Dec;86(6):1913-1920

**Searle J, Kerr JF, Bishop CJ.** Necrosis and apoptosis: distinct modes of cell death with fundamentally different significance. *Pathol Annu.* 1982;17 Pt 2:229-59

**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 Jan;148(1):141-9

**Sharp MG, Fettes D, Brooker G, Clark AF, Peters J, Fleming S, Mullins JJ.** Targeted inactivation of the Ren-2 gene in mice. *Hypertension* 1996 Dec;28(6):1126-31

**Sil P, Sen S.** Angiotensin II and myocyte growth: role of fibroblasts. *Hypertension* 1997 Aug;30(2 Pt 1):209-16

**SOLVD Investigators.** Effect of enalapril on survival in patients with reduced left ventricular ejection fractions and congestive heart failure. *N Engl J Med* 1991 Aug 1;325(5):293-302

**Speth RC, Kim KH.** Discrimination of two angiotensin II receptor subtypes with a selective agonist analogue of angiotensin II, p-aminophenylalanine<sup>6</sup> angiotensin II. *Biochem Biophys Res Commun* 1990 Jun 29;169(3):997-1006

**Spinale FG, Crawford FA Jr, Hewett KW, Carabello BA.** Ventricular failure and cellular remodeling with chronic supraventricular tachycardia. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1991 Dec;102(6):874-82

**Stewart DJ, Kubac G, Costello KB, Cernacek P.** Increased plasma endothelin-1 in the early hours of acute myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol* 1991 Jul;18(1):38-43

**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 Jul;94(1):301-10

- Sugaya T, Nishimatsu S, Tanimoto K, Takimoto E, Yamagishi T, Imamura K, Goto S, Imaizumi K, Hisada Y, Otsuka A, et al.** Angiotensin II type 1a receptor-deficient mice with hypotension and hyperreninemia. *J Biol Chem* 1995 Aug 11;270(32):18719-22
- Sumida Y, Umemura S, Tamura K, Kihara M, Kobayashi S, Ishigami T, Yabana M, Nyui N, Ochiai H, Fukamizu A, Miyazaki H, Murakami K, Ishii M.** Increased cardiac angiotensin II receptors in angiotensinogen-deficient mice. *Hypertension* 1998 Jan;31(1):45-9
- Suzuki J, Matsubara H, Urakami M, Inada M.** Rat angiotensin II (type 1A) receptor mRNA regulation and subtype expression in myocardial growth and hypertrophy. *Circ Res* 1993 Sep;73(3):439-47
- Szpirer C, Riviere M, Szpirer J, Levan G, Guo DF, Iwai N, Inagami T.** Chromosomal assignment of human and rat hypertension candidate genes: type 1 angiotensin II receptor genes and the SA gene. *J Hypertens* 1993 Sep;11(9):919-25
- Takayanagi R, Ohnaka K, Sakai Y, Ikuyama S, Nawata H.** Molecular cloning and characterization of the promoter for human type-1 angiotensin II receptor gene. *Biochem Biophys Res Commun* 1994 May 16;200(3):1264-1270
- Takizawa T, Arai M, Yoguchi A, Tomaru K, Kurabayashi M, Nagai R.** Transcription of the SERCA2 gene is decreased in pressure-overloaded hearts: A study using in vivo direct gene transfer into living myocardium. *J Mol Cell Cardiol* 1999 Dec;31(12):2167-74
- 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* 1989 May 15;264(14):7856-61
- Tamamori M, Ito H, Adachi S, Akimoto H, Marumo F, Hiroe M.** Endothelin-3 induces hypertrophy of cardiomyocytes by the endogenous endothelin-1-mediated mechanism. *J Clin Invest* 1996 Jan 15;97(2):366-72
- Tamura K, Umemura S, Nyui N, Hibi K, Ishigami T, Kihara M, Toya Y, Ishii M.** Activation of angiotensinogen gene in cardiac myocytes by angiotensin II and mechanical stretch. *Am J Physiol* 1998 Jul;275(1 Pt 2):R1-9

- Tang H, Guo DF, Porter JP, Wanaka Y, Inagami T.** Role of cytoplasmic tail of the type 1A angiotensin II receptor in agonist- and phorbol ester-induced desensitization. *Circ Res* 1998 Mar 23;82(5):523-531
- Tanimoto, K., F. Sugiyama, Y. Goto, J. Ishida, E. Takimoto, K. Yagami, A. Fukamizu, and K. Murakami** Angiotensinogen-deficient mice with hypotension. *J. Biol. Chem.* 1994, 269: 31334-31337
- Thienelt CD, Weinberg EO, Bartunek J, Lorell BH.** Load-induced growth responses in isolated adult rat hearts. Role of the AT1 receptor. *Circulation* 1997 Jun 17;95(12):2677-2683
- Tsutsumi Y, Matsubara H, Ohkubo N, Mori Y, Nozawa Y, Murasawa S, Kijima K, Maruyama K, Masaki H, Moriguchi Y, Shibasaki Y, Kamihata H, Inada M, Iwasaka T.** Angiotensin II type 2 receptor is upregulated in human heart with interstitial fibrosis, and cardiac fibroblasts are the major cell type for its expression. *Circ Res* 1998 Nov 16;83(10):1035-1046
- Uchida Y, Ninomiya H, Saotome M, Nomura A, Ohtsuka M, Yanagisawa M, Goto K, Masaki T, Hasegawa S.** Endothelin, a novel vasoconstrictor peptide, as potent bronchoconstrictor. *Eur J Pharmacol* 1988 Sep 13;154(2):227-8
- Ullian ME, Linas SL.** Role of receptor cycling in the regulation of angiotensin II surface receptor number and angiotensin II uptake in rat vascular smooth muscle cells. *J Clin Invest* 1989 Sep;84(3):840-846
- Urata H, Boehm KD, Philip A, Kinoshita A, Gabrovsek J, Bumpus FM, Husain A.** Cellular localization and regional distribution of an angiotensin II-forming chymase in the heart. *J Clin Invest* 1993 Apr;91(4):1269-81
- Urata H, Kinoshita A, Misono KS, Bumpus FM, Husain A.** Identification of a highly specific chymase as the major angiotensin II-forming enzyme in the human heart. *J Biol Chem* 1990 Dec 25;265(36):22348-57
- Valente M, Calabrese F, Thiene G, Angelini A, Basso C, Nava A, Rossi L.** In vivo evidence of apoptosis in arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy. *Am J Pathol* 1998 Feb;152(2):479-84

- van Kesteren CA, Danser AH, Derkx FH, Dekkers DH, Lamers JM, Saxena PR, Schalekamp MA.** Mannose 6-phosphate receptor-mediated internalization and activation of prorenin by cardiac cells. *Hypertension* 1997 Dec;30(6):1389-96
- Viswanathan M, Tsutsumi K, Correa FM, Saavedra JM.** Changes in expression of angiotensin receptor subtypes in the rat aorta during development. *Biochem Biophys Res Commun* 1991 Sep 30;179(3):1361-1367
- von Lutterotti N, Catanzaro DF, Sealey JE, Laragh JH.** Renin is not synthesized by cardiac and extrarenal vascular tissues. A review of experimental evidence. *Circulation* 1994 Jan;89(1):458-70
- Wagner J, Jan Danser AH, Derkx FH, de Jong TV, Paul M, Mullins JJ, Schalekamp MA, Ganten D.** Demonstration of renin mRNA, angiotensinogen mRNA, and angiotensin converting enzyme mRNA expression in the human eye: evidence for an intraocular renin-angiotensin system. *Br J Ophthalmol* 1996 Feb;80(2):159-63
- Walker P, Grouzmann E, Burnier M, Waeber B.** The role of neuropeptide Y in cardiovascular regulation. *Trends Pharmacol Sci* 1991 Mar;12(3):111-5
- Wang L, Ma W, Markovich R, Chen JW, Wang PH.** Regulation of cardiomyocyte apoptotic signaling by insulin-like growth factor I. *Circ Res* 1998 Sep 7;83(5):516-22
- Wei CM, Lerman A, Rodeheffer RJ, McGregor CG, Brandt RR, Wright S, Heublein DM, Kao PC, Edwards WD, Burnett JC Jr.** Endothelin in human congestive heart failure. *Circulation* 1994 Apr;89(4):1580-1586
- Weinberg EO, Schoen FJ, George D, Kagaya 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 Sep;90(3):1410-22
- Wilson JR, Douglas P, Hickey WF, Lanoce V, Ferraro N, Muhammad A, Reichek N.** Experimental congestive heart failure produced by rapid ventricular pacing in the dog: cardiac effects. *Circulation* 1987 Apr;75(4):857-67
- Xu Y, Hopfner RL, McNeill JR, Gopalakrishnan V.** Vasopressin accelerates protein synthesis in neonatal rat cardiomyocytes. *Mol Cell Biochem* 1999 May;195(1-2):183-90
- Yamada T, Akishita M, Pollman MJ, Gibbons GH, Dzau VJ, Horiuchi M. (a)** Angiotensin II type 2 receptor mediates vascular smooth muscle cell apoptosis and

antagonizes angiotensin II type 1 receptor action: an in vitro gene transfer study. *Life Sci* 1998;63(19):PL289-PL295

**Yamada T, Matsumori A, Wang WZ, Ohashi N, Shiota K, Sasayama S. (b)** Apoptosis in congestive heart failure induced by viral myocarditis in mice. *Heart Vessels* 1999;14(1):29-37

**Yamano Y, Ohyama K, Chaki S, Guo DF, Inagami T.** Identification of amino acid residues of rat angiotensin II receptor for ligand binding by site directed mutagenesis. *Biochem Biophys Res Commun* 1992 Sep 30;187(3):1426-1431

**Yamazaki T, Komuro I, Kudoh S, Zou Y, Shiojima I, Hiroi Y, Mizuno T, Maemura K, Kurihara H, Aikawa R, Takano H, Yazaki Y.** Endothelin-1 is involved in mechanical stress-induced cardiomyocyte hypertrophy. *J Biol Chem* 1996 Feb 9;271(6):3221-8

**Yanagisawa M, Kurihara H, Kimura S, Tomobe Y, Kobayashi M, Mitsui Y, Yazaki Y, Goto K, Masaki T.** A novel potent vasoconstrictor peptide produced by vascular endothelial cells. *Nature* 1988 Mar 31;332(6163):411-5

**Yanai K, Saito T, Kakinuma Y, Kon Y, Hirota K, Taniguchi-Yanai K, Nishijo N, Shigematsu Y, Horiguchi H, Kasuya Y, Sugiyama F, Yagami Ki, Murakami K, Fukamizu A.** Renin-dependent cardiovascular functions and renin-independent blood-brain barrier functions revealed by renin-deficient mice. *J Biol Chem* 2000 Jan 7;275(1):5-8

**Yaoita H, Ogawa K, Maehara K, Maruyama Y.** Attenuation of ischemia/reperfusion injury in rats by a caspase inhibitor. *Circulation* 1998 Jan 27;97(3):276-281

**Yorikane R, Sakai S, Miyauchi T, Sakurai T, Goto K.** Possible involvement of endothelin-1 in cardiac hypertrophy. *Arzneimittelforschung* 1994 Mar;44(3A):412-5

**Zhang J, Andrade ZA, Yu ZX, Andrade SG, Takeda K, Sadirgursky M, Ferrans VJ.** Apoptosis in a canine model of acute Chagasitic myocarditis. *J Mol Cell Cardiol* 1999 Mar;31(3):581-96

**Zhang X, Dostal DE, Reiss K, Cheng W, Kajstura J, Li P, Huang H, Sonnenblick EH, Meggs LG, Baker KM, et al.** Identification and activation of autocrine renin-angiotensin system in adult ventricular myocytes. *Am J Physiol* 1995 Nov;269(5 Pt 2):H1791-802

**Zhu LP, Yu XD, Ling S, Brown RA, Kuo TH.** Mitochondrial Ca(2+)homeostasis in the regulation of apoptotic and necrotic cell deaths. *Cell Calcium* 2000 Aug;28(2):107-117

## REMERCIEMENTS

Je désire témoigner ma profonde gratitude au Dr Mona Nemer, Directrice du laboratoire de développement et différenciation cardiaques de l'Institut de recherches cliniques de Montréal, pour m'avoir accueilli au sein de son équipe et pour son précieux soutien financier.

Je prie le Dr Jacques Drouin, Directeur du laboratoire de génétique moléculaire de l'Institut de recherches cliniques de Montréal, d'accepter ma sincère reconnaissance pour les commentaires et conseils judicieux qu'il m'a prodigués durant les réunions de laboratoire.

Toute ma reconnaissance au Dr Pierre Paradis pour son aide précieuse et sa collaboration fructueuse dans mes travaux de recherche.

Ma sincère gratitude au Dr Kevin McBride pour son amitié, sa disponibilité et son enthousiasme pour la recherche qu'il a su me communiquer tout au long de mon séjour au laboratoire.

Je suis reconnaissant à tous les membres des laboratoires des Drs Nemer et Drouin pour leur collaboration et pour m'avoir permis de bénéficier de leur expérience.

Toute ma gratitude va aux Drs Timothy Reudelhuber, Christian Deschepper, Gaétan Thibault et Ernesto Schiffrin du groupe multidisciplinaire de recherche en hypertension pour leurs commentaires et suggestions durant les réunions du groupe d'hypertension.

Ma sincère gratitude va aux membres du Jury, les Drs René Cardinal, Timothy Reudelhuber et Mona Nemer pour leur patience dans la lecture et l'appréciation de ce mémoire.

Mes remerciements les plus chaleureux à Lise Laroche pour sa jovialité et pour m'avoir aidé à mener à bien la rédaction de ce mémoire.

Enfin j'exprime ma reconnaissance à Christian Charbonneau et Hélène Liénard du service d'infographie pour leur aide durant mon séjour à L'Institut de recherches cliniques de Montréal.