

Université de Montréal

**Les effets d'un traitement par l'hormone de croissance sur
l'expression ventriculaire des peptides natriurétiques et
des isoformes de myosine de chaînes lourdes chez le
hamster cardiomyopathique**

Par

Mukandila Mulumba

Faculté de pharmacie

Mémoire présenté à la faculté des études supérieures en vue de
l'obtention du grade de Maîtrise ès Sciences (M.Sc.)
en sciences pharmaceutiques
option pharmacologie

Août 2005

©, Mukandila Mulumba, 2005



QV

705

U58

2006

V. 007

AVIS

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

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

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

NOTICE

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

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

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

Université de Montréal
Faculté des études supérieures

Ce mémoire intitulé :

**Les effets d'un traitement par l'hormone de croissance sur
l'expression ventriculaire des peptides natriurétiques et
des isoformes de myosine de chaînes lourdes chez le
hamster cardiomyopathique**

présenté par :

Mukandila Mulumba

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Dr Daniel Lamontagne

président-rapporteur

Dr Sylvie Marleau

Directrice de recherche

Dr Huy Ong

Codirecteur de recherche

Dr Martin G. Sirois

Membre du jury

SOMMAIRE

La cardiomyopathie dilatée (CMD) est caractérisée par une dilatation du ventricule gauche sans augmentation compensatoire de l'épaisseur de la paroi ventriculaire. La dysfonction ventriculaire résultante progresse invariablement vers l'insuffisance cardiaque avec comme conséquence une détérioration de la fonction cardiaque. La cardiomyopathie idiopathique dilatée (CID), dont l'origine est inconnue, est associée à des modulations de l'expression des peptides natriurétiques (ANP et BNP) et des isoformes de myosines à chaînes lourdes (α - et β -MHC) au niveau ventriculaire. Le hamster cardiomyopathique (HCM), un modèle génétique de CMD, développe tous les symptômes observés dans la pathologie chez l'humain, avec une phase d'insuffisance cardiaque sévère débutant à 200 jours d'âge. Des études récentes ont montré des effets bénéfiques d'une thérapie avec l'hormone de croissance (HC) sur la performance cardiaque des patients et des modèles expérimentaux d'insuffisance cardiaque et de CMD. Dans le but d'évaluer les effets de l'HC sur l'expression génique des marqueurs de l'hypertrophie et de la contractilité cardiaque, les HCM femelles âgées de 200 jours ont reçu une dose quotidienne (1 mg/kg/jour) d'HC recombinante bovine (rbHC) pendant 40 jours. À 240 jours, la pression développée dans le ventricule gauche (LVP) des cœurs isolés des HCM traitées au véhicule (NaCl 0.9%) ainsi que sa dérivée première (LV dP/dt_{max}) ont diminué de 33% et 36% respectivement, par comparaison aux hamsters syriens dorés femelles contrôles (GSH). Les niveaux ventriculaires d'ARNm de l'ANP ($P < 0,01$) ainsi que les concentrations plasmatiques des peptides natriurétiques ($P < 0,001$) sont augmentés chez les HCM femelles non traitées en comparaison avec les GSH. À l'opposé, aucun changement n'a été observé dans l'expression du BNP, et des isoformes MHC α et β . Le traitement par la rbHC a induit une diminution de 60% de l'ANP et une augmentation de 50% du β -MHC, de la LVP (14%) et de la LV dP/dt_{max} (16%) par rapport aux HCM femelles traitées par le véhicule. Aucun

changement significatif dans les concentrations plasmatiques ainsi que dans les niveaux d'ARNm du BNP et de l' α -MHC ont été observés. Nos résultats suggèrent qu'un traitement de 40 jours par l'HC dans la phase terminale de la maladie chez les HCM femelles est associé avec un remodelage bénéfique et une amélioration modeste de la fonction du ventricule gauche.

Mots clés : ANP, BNP, cardiomyopathie dilatée, hamster UM-X7.1, insuffisance cardiaque, isoformes des chaînes lourdes de myosine, hormone de croissance.

SUMMARY

Dilated cardiomyopathy (DCM) is associated with left ventricular dilation accompanied by inadequate compensatory ventricular wall thickness. The resulting ventricular dysfunction progresses to heart failure which leads to an impaired cardiac function. Idiopathic dilated cardiomyopathy (IDCM), a DCM of unknown origin, is associated with changes in the expression of left ventricular natriuretic peptides (ANP and BNP) and myosin heavy chain isoforms (α - and β -MHC). The cardiomyopathic hamster (CMH), a genetic model of IDCM, develops all symptoms of the human IDCM, with a severe heart failure at 200-day-old. Recent studies have shown beneficial effects of growth hormone therapy in patients with DCM and in experimental models of heart failure and DCM. In order to assess the potentially beneficial effects of GH on ventricular gene expression of contractile and hypertrophic biomarkers in the terminal phase of the disease, 200-day-old female CMH were treated with recombinant bovine GH (rbGH) (1 mg/kg/day) during 40 days. At 240 days, isolated hearts from female CMH treated with vehicle had decreased left ventricular pressure (LVP) and its first derivative (LV dP/dt_{max}), by 33% and 36% respectively, compared to female GSH. Left ventricular mRNA of ANP and the circulating plasma levels of the natriuretic peptides were significantly increased ($P < 0,01$ and $P < 0,001$ respectively). In contrast, LV β -MHC mRNA levels in female CMH vehicle-treated were not modified by the disease. Forty days treatment with rbGH modestly increased LVP (14%), LV dP/dt_{max} (16%), and these effects were accompanied by an increase in left ventricular β -MHC mRNA (50%) and a reduction of ANP mRNA (60%). GH did not modulate natriuretic peptides plasma levels, neither BNP and α -MHC ventricular expression. These results suggest that a 40-day treatment with GH in terminally ill female CMH is associated with beneficial effects on ventricular remodelling, associated with modest favourable effect on ventricular function.

Key words: ANP, BNP, dilated cardiomyopathy, UM-X7.1 hamster, cardiac insufficiency, myosin heavy chain isoforms, growth hormone.

TABLE DES MATIÈRES

SOMMAIRE	iii
SUMMARY	v
TABLE DES MATIÈRES	vii
LISTE DES TABLEAUX	xi
LISTE DES FIGURES	xii
LISTE DES ABRÉVIATIONS.....	xiv
REMERCIEMENTS	xviii
DÉDICACE	xix
CITATION	xx
Chapitre 1 : INTRODUCTION	1
1.1. LA CARDIOMYOPATHIE	2
1.1.1. Classification.....	2
1.1.1.1. La cardiomyopathie dilatée	2
1.1.1.1.1. Facteurs familiaux et génétiques.....	3
1.1.1.1.2. Les infections virales ou cytotoxiques du myocarde	4
1.1.1.1.3. Facteurs immunologiques	4
1.1.1.1.4. Facteurs neuroendocriniens, énergétiques et contractiles.....	4
1.1.1.2. La cardiomyopathie hypertrophique	5
1.1.1.3. La cardiomyopathie restrictive	5
1.1.1.4. La cardiomyopathie arythmogène du ventricule droit	6
1.1.1.5. Cardiomyopathie ischémique	6
1.1.1.6. Insuffisance cardiaque et cardiomyopathie.....	7

1.1.2.	Pathophysiologie de la CID	7
1.2.	LES PEPTIDES NATRIURÉTIQUES	8
1.2.1.	Historique et classification	8
1.2.2.	Structure, biosynthèse et régulation	9
1.2.2.1.	<i>Le peptide natriurétique auriculaire ou de type A (ANP)</i>	10
1.2.2.2.	<i>Le peptide natriurétique de type B (BNP)</i>	12
1.2.2.3.	<i>Le peptide natriurétique de type C (CNP)</i>	13
1.2.3.	Récepteurs et voies de signalisation, actions biologiques	14
1.2.3.1.	Récepteurs et voies de signalisation	14
1.2.3.1.1.	Les récepteurs R1	14
1.2.3.1.2.	Les récepteurs R2.....	15
1.2.3.2.	Actions biologiques des peptides natriurétiques	16
1.2.3.2.1.	Actions sur le système rénal	16
1.2.3.2.2.	Actions sur le système nerveux central.....	17
1.2.3.2.3.	Actions sur le système cardiovasculaire	18
1.2.4.	Insuffisance cardiaque et peptides natriurétiques	19
1.3.	LES MYOSINES	21
1.3.1.	Classification et structure	21
1.3.2.	Mécanisme de contraction, régulation et expression des MHC	22
1.3.3.	Modulation de l'expression des MHC dans la cardiomyopathie	23
1.4.	L'HORMONE DE CROISSANCE	24
1.4.1.	Biosynthèse, sécrétion et régulation	24
1.4.2.	Métabolisme, récepteurs et actions biologiques	26
1.4.2.1.	<i>Les somatomédines ou IGFs</i>	28
1.4.3.	Approches thérapeutiques de la CID	28
1.4.3.1.	<i>Déficience en HC</i>	29
1.4.3.2.	<i>Acromégalie</i>	31
1.4.3.3.	<i>Traitement à l'HC et cardiomyopathie</i>	32

1.4.3.3.1. Modèles expérimentaux	32
1.4.3.4. <i>Traitement avec l'HC chez les patients atteints de CID</i>	36
1.5. DESCRIPTION DU MODÈLE EXPÉRIMENTAL	37
1.6. OBJECTIFS DE L'ÉTUDE.....	39
Chapitre 2: ARTICLE	41
ABSTRACT.....	43
INTRODUCTION	44
MATERIALS AND METHODS.....	46
Animals	46
<i>GH preparations</i>	47
Systolic function	47
Serum IGF-1 measurement.....	48
Serum ANP and BNP measurement.....	48
<i>LV expression of natriuretic peptides and MHC isoforms</i>	49
<i>Statistical analysis</i>	50
RESULTS	50
Survival rate in CMH and GSH	50
Effect of rbGH on body and heart weight and IGF-1 serum levels	51
Systolic function	51
Histologic evaluation.....	52
Circulating levels and ventricular expression of natriuretic peptides....	52
Ventricular expression of α and β -MHC	53
DISCUSSION	53
ACKNOWLEDGEMENTS	58
TABLES.....	59
REFERENCES	60
LEGEND TO FIGURES.....	68

FIGURES.....	69
---------------------	-----------

Chapitre 3: DISCUSSION GÉNÉRALE ET CONCLUSION

.....	73
--------------	-----------

3.1. Effets du traitement à l'HC sur la masse corporelle et cardiaque...	75
3.2. Effets du traitement à l'HC sur la fonction systolique du ventricule gauche	76
3.3. Effets du traitement à l'HC sur les taux plasmatiques des PNs.....	78
3.4. Effets du traitement à l'HC sur l'expression des ARNm ventriculaire des PNs.....	78
3.5. Effets du traitement à l'HC sur l'expression des ARNm ventriculaires de α- et β-MHC.....	79
3.6. Perspectives futures.....	81

RÉFÉRENCES	84
-------------------------	-----------

LISTE DES TABLEAUX

Chapitre 1

Tableau I: Études du traitement à l'HC chez des patients cardiomyopathiques de différentes étiologies 30

Tableau II: Études du traitement à l'HC et/ou à l'IGF-1 sur des modèles expérimentaux de défaillance cardiaque..... 33

Chapitre 2

Table 1. Cardiac characteristics and function in 240-day-old female hamsters following treatment with vehicle or rbGH (1 mg/kg/day) for 40 days..... 59

LISTE DES FIGURES

Chapitre 1

- Figure 1.1. Structure primaire des peptides natriurétiques de type-A, -B et -C9**
- Figure 1.2. Schéma de la transcription et de la traduction des peptides natriurétiques de type-A, -B et -C ainsi que la représentation des formes présentes dans la circulation sanguine..... 11**
- Figure 1.3. Représentation schématique des récepteurs des peptides natriurétiques RPNA, RPNB et RPNC 15**
- Figure 1.4. Effets physiologiques des peptides natriurétiques de type-A et -B 17**
- Figure 1.5. Le récepteur de l'HC 27**

Chapitre 2

- Figure 1. Cumulative mean body weight in female CMH aged 200 days when initiating treatment with vehicle (0.9% NaCl) (open symbol) or rbGH, 1 mg/kg/day subcutaneously (closed symbol)..... 69**
- Figure 2. ANP (A) and BNP (B) serum levels in control GSH (open bar) and control CMH (solid bar) or CMH treated with rbGH (hatched bar)..... 70**

Figure 3. ANP (A) and BNP (B) mRNA levels in the left ventricle of control GSH (open bar), vehicle-treated CMH (solid bar) or CMH treated with rbGH (hatched bar) 71

Figure 4. β -MHC (A) and α -MHC (B) mRNA levels in lthe left ventricle of control GSH (open bar), vehicle-treated (solide bar) or CMH treated with rbGH (hatched bar)..... 72

LISTE DES ABRÉVIATIONS

-/- :	souris invalidées par recombinaison homologue pour la substance concernée
a.a. :	acide aminé
AMPC :	adénosine monophosphate cyclique
ANF :	facteur natriurétique des oreillettes (atrial natriuretic factor)
ANG-II :	angiotensine II
ANP :	peptide natriurétique de type-A (atrial natriuretic peptide)
AR :	récepteur adrénergique
ARNm :	acide ribonucléique messenger
BNP :	peptide natriurétique de type-B (B-type natriuretic peptide)
Ca ²⁺ :	calcium
CDG :	complexe dystrophine glycoprotéique
CID :	cardiomyopathie idiopathique dilatée
CMD :	cardiomyopathie dilatée
CMH :	cardiomyopathic hamster
CNP :	peptide natriurétique de type-C
DAG :	diacylglycérol
DGC :	domaine guanylate cyclase
DHC :	déficiences en hormone de croissance
DHK :	domaine d'homologie kinase
DLE :	domaine de liaison extracellulaire
DTM :	domaine transmembranaire
DTT :	dithiothréitol
GAPDH :	glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase
GH :	Growth hormone
GHRH :	Growth hormone-releasing hormone

GHS :	growth hormone secretagogue (sécrétine de l'hormone de croissance)
GMPc :	guanosine monophosphate cyclique
GSH :	Golden syrian hamster
GSH-R1a :	récepteur des sécrétines de l'hormone de croissance de type 1a
HC :	hormone de croissance
HCM :	hamster cardiomyopathique
IC :	insuffisance cardiaque
IDCM :	idiopathic dilated cardiomyopathy
IECA :	inhibiteur de l'enzyme de conversion de l'angiotensine
IGF-1 :	insulin growth factor-1 (facteur de croissance de l'insuline de type 1)
IGF-1R :	récepteur de l'IGF-1
IGFBP :	protéine de liaison du facteur de croissance
IL-6 :	interleukine-6
IM :	infarctus du myocarde
IR :	immunoréactive
Jak :	Janus kinase
kDa :	Kilodalton
LACG :	ligature de l'artère coronarienne gauche
LV dP/dt_{max} :	left ventricular pressure first derivative
LV :	left ventricular
LVEDP :	left ventricular and-diastolic pressure
M :	molaire (mole/litre)
MAPK :	mitogen-activated protein kinase
MHC :	myosin heavy chain (chaînes lourdes de myosine)
MLP :	LIM protein
M-MLV :	Moloney murine leukemia virus

Na ⁺ :	sodium
NaCl :	chlorure de sodium
NaN ₃ :	azoture de sodium
NYHA :	New York Heart Association
PI3'K :	phosphatidylinositol 3' kinase
PKC :	protéine kinase C
PKGs :	protéine kinases GMPc-dépendantes
PNs :	peptides natriurétiques
preproANP :	préprohormone du peptide natriurétique de type-A
preproBNP :	préprohormone du peptide natriurétique de type-B
preproCNP :	préprohormone du peptide natriurétique de type-C
proANP :	prohormone du peptide natriurétique de type-A
proBNP :	prohormone du peptide natriurétique de type-B
proCNP :	prohormone du peptide natriurétique de type-C
RAAS :	système rénine-angiotensine-aldostérone
rbGH :	recombinant bovine growth hormone
rbHC :	hormone de croissance recombinante bovine
RHC :	récepteur de l'hormone de croissance
rhGH :	recombinant human growth hormone
rhHC :	hormone de croissance recombinante humaine
RPN :	récepteur des peptides natriurétiques
rrHC :	hormone de croissance recombinante de rat
Serca 2a :	calcium ATPase du réticulum sarcoplasmique
SH2 :	Src homology domain
SNC :	système nerveux central
STAT :	signal transducer and activator transcription (transducteur de signaux et activateur de transcription)
TNF- α :	tumor necrotic factor- α (facteur nécrosant des tumeurs α)

TTR-ANP : souris transgéniques surexprimant l'ANP

VG : ventricule gauche

WT : Wild type (type sauvage)

REMERCIEMENTS

*Je tiens tout d'abord à remercier **les membres de ma famille** pour tous les sacrifices consentis depuis que nous nous sommes séparés, pour leur support moral et pour leurs encouragements.*

*Je tiens aussi à remercier **ma seconde famille** qui a bien voulu m'accueillir et m'encourager durant toutes mes études universitaires.*

*Je tiens à remercier de façon particulière ma directrice de recherche, **Dr Sylvie Marleau**, pour sa disponibilité, ses précieux conseils et son expertise qu'elle bien a voulue me montrer.*

*Je remercie aussi mon co-directeur, **Dr Huy Ong**, pour son apport et ses conseils.*

*Merci aux membres des deux laboratoires : **Ève-Marie, Diala, Caroline, Étienne, Leila, Kim, Sanny, François et Petra** pour votre aide et votre amitié.*

*Merci de tout mon cœur, de toute ma force et de toute mon âme à **mon Seigneur, l'Éternel***

DÉDICACE

À mon père, Bernard

À ma mère, Clémentine

À mes frères, Fabrice (Fa), Glory et Christian

À mes sœurs, Sarah et Ester

À Me André Mbombo ainsi que toute sa famille

CITATION

***TOUT EST CLAIR POUR CELUI QUI EST INTELLIGENT,
ET TOUT EST DROIT POUR CEUX QUI ONT TROUVÉ LA SCIENCE.***

Proverbes 8: 9

Chapitre 1 : INTRODUCTION

1.1. LA CARDIOMYOPATHIE

1.1.1. Classification

La cardiomyopathie est une maladie du muscle cardiaque associée à une dysfonction cardiaque. La défaillance cardiaque qui en résulte dans la phase terminale représente un problème majeur dans la société nord-américaine. En effet le taux de mortalité associé est de près de 10 000 cas par an aux États-Unis (Jackson *et al.*, 2000). La cardiomyopathie touche les patients de tous âges avec une incidence de 36 cas pour 100 000 habitants (Jackson *et al.*, 2000). Elle se présente sous différentes formes dont les formes ischémiques et non ischémiques. Les formes ischémiques sont généralement la conséquence d'un dommage principalement dû à l'ischémie cardiaque tel qu'observé après un infarctus du myocarde (IM) (Komajda & Charron, 2002). Les formes non ischémiques, généralement associées avec un dysfonctionnement systolique ou diastolique, sont classées selon des critères morphologiques et fonctionnels en cardiomyopathies dilatées, hypertrophiques, restrictives et arythmiques du ventricule droit (Jackson *et al.*, 2000; Komajda & Charron, 2002)

1.1.1.1. *La cardiomyopathie dilatée*

La cardiomyopathie dilatée (CMD) est considérée comme la première cause de mortalité due aux cardiomyopathies non ischémiques et nécessite généralement une transplantation cardiaque. La CMD est caractérisée par une dilatation progressive du ventricule gauche (VG) qui engendre un dysfonctionnement dans le mécanisme de contraction. Son origine est inconnue dans près de 50% des cas, d'où la terminologie de cardiomyopathie idiopathique dilatée (CID). Les fibres musculaires du cœur malade sont tendues et étirées, ce qui pousse le cœur à compenser par une augmentation de

la masse des cardiomyocytes conduisant à une hypertrophie cardiaque (Hughes & McKenna, 2005). Cette hypertrophie, mal adaptée au fil du temps, contribue à un élargissement de la chambre ventriculaire et à un accroissement du stress mécanique des fibres musculaires de la paroi du ventricule (Hughes & McKenna, 2005). En effet, l'augmentation de la masse cardiaque n'est souvent pas accompagnée par l'épaississement de la paroi ventriculaire (Cabrera Cabrera, 1999), ce qui contribue grandement à l'élargissement de la cavité. Les tissus fibreux entre les cellules musculaires augmentent aussi considérablement, ce qui crée une fibrose cardiaque (Ferrans & Rodriguez, 1988). Des études menées dans le but de déterminer la pathogenèse de la CID se sont concentrées sur quatre facteurs potentiellement impliqués: les facteurs familiaux et génétiques, les infections virales et cytotoxiques du myocarde, les facteurs immunologiques et les facteurs métaboliques, énergétiques et contractiles.

1.1.1.1.1. Facteurs familiaux et génétiques

Le mode de transmission semble être de manière générale autosomique et dominant, mais il peut aussi être autosomique et récessif, lorsque la transmission est liée au chromosome X récessif ou à l'héritage mitochondrial (Burkett & Hershberger, 2005). Dans le cas de la CID liée au chromosome X, des mutations ont été observées au niveau du locus Xp21 du gène de la dystrophine (Aidonidis *et al.*, 1993; Burkett & Hershberger, 2005; Fatkin & Graham, 2002). Dans le cas de l'héritage génétique mitochondrial, nous observons une déficience en carnitine, un important co-facteur métabolique dans le transport des acides gras au niveau des membranes mitochondriales (Giles, 1988).

1.1.1.1.2. Les infections virales ou cytotoxiques du myocarde

La CID pourrait être due à une infection par le virus Coxsackie B, car des études ont montré que certains patients souffrant de CID ont un taux élevé d'anticorps contre ce virus (Dec & Fuster, 1994; Fatkin & Graham, 2002). Il y a une infiltration de cellules inflammatoires entre les myofibres et dans un stade avancé de l'infection, il y a nécrose résultant en une fibrose permanente (Quiroz *et al.*, 1988). Certains agents cytotoxiques, comme les anthracyclines ou les radiations ionisantes produisent des dommages cardiaques caractéristiques ayant comme conséquence un dysfonctionnement cardiaque. Isner *et al.* (1983) ont montré que 20 patients morts d'une défaillance cardiaque due à l'anthracycline ont présenté une masse cardiaque très élevée (entre 240 et 500 g), et que 11 de ces patients montraient une dilatation des deux ventricules, 4 une dilatation du VG et 5 une dilatation du ventricule droit (Isner *et al.*, 1983).

1.1.1.1.3. Facteurs immunologiques

Des anomalies dans le système immunitaire cellulaire et humoral ont été observées dans la CID. Il y a une activation des cellules T due à une interaction avec des antigènes étrangers ou encore avec des antigènes ALH (antigènes des leucocytes humains) altérés, produits au niveau des myocytes par les lymphocytes B. Il en résulte une activation des cellules T cytotoxiques de même qu'une production d'anticorps dirigés contre les cardiomyocytes (Giles, 1988).

1.1.1.1.4. Facteurs neuroendocriniens, énergétiques et contractiles

Ces facteurs, considérés comme des marqueurs de la CID, incluent des changements au niveau du système sympathique et de l'expression des

différents gènes fœtaux (Giles, 1988). D'une part, une diminution de l'expression des récepteurs bêta-adrénergiques (β -AR) et une augmentation des catécholamines circulantes sont observées (Giles, 1988). Il y a une sécrétion périphérique accrue de la norépinéphrine, ce qui conduit à une désensibilisation des récepteurs β -AR en conséquence de l'hyperstimulation (Dec & Fuster, 1994) et une réduction de leur densité (Eichhorn & Bristow, 1996). D'autre part, la CID est aussi associée à une augmentation de l'expression des peptides natriurétiques (PNs) et de l'isoforme β de la chaîne lourde de myosine (β -MHC), dont l'activité ATPase est plus lente dans la contraction (Small & Krieg, 2004).

1.1.1.2. La cardiomyopathie hypertrophique

La cardiomyopathie hypertrophique se caractérise par un épaississement des parois du cœur, principalement au niveau du septum, qui sépare le ventricule droit du gauche (Fatkin & Graham, 2002). L'hypertrophie asymétrique ou diffuse des cardiomyocytes au niveau des parois du VG (quelques fois du ventricule droit aussi) s'accompagne d'une réduction de la cavité. De façon générale, la masse cardiaque est augmentée. Ceci entraîne une diminution du débit cardiaque. Au niveau microscopique, il y a accroissement de la fibrose interstitielle, ainsi qu'un accroissement des cardiomyocytes dans des directions différentes au lieu d'être parallèles (Fatkin & Graham, 2002).

1.1.1.3. La cardiomyopathie restrictive

La cardiomyopathie restrictive, très rare, est caractérisée par une anomalie dans le volume diastolique. En effet, on observe un remplissage rapide de la cavité ventriculaire gauche au début de la diastole suivi d'un remplissage lent en fin de diastole, ce qui empêche le cœur de pomper adéquatement. Elle est souvent causée par des conditions pathologiques qui

favorisent une infiltration ou une fibrose au niveau du myocarde telles que l'hémochromatose (concentration élevée de fer dans le cœur) ou la sarcoïdose (maladie granulomateuse diffuse d'étiologie inconnue) (Hughes & McKenna, 2005).

1.1.1.4. La cardiomyopathie arythmogène du ventricule droit

La dysplasie ou cardiomyopathie arythmogène du ventricule droit se traduit par une dilatation de ce dernier, associée à des troubles du rythme ventriculaire (Corrado *et al.*, 1997; Fatkin & Graham, 2002). La maladie se caractérise par une perte de myocytes par nécrose et/ou par apoptose, avec des dépôts d'acides gras ou de tissus fibro-adipeux. Dans les formes sévères, il y a même remplacement partiel ou total du myocarde par le tissu adipeux ou fibro-adipeux de l'épicarde à l'endocarde (Hughes & McKenna, 2005).

1.1.1.5. Cardiomyopathie ischémique

La cardiomyopathie ischémique ou la maladie de l'artère coronarienne est l'une des principales causes de la dysfonction systolique des ventricules. Cette dernière résulte en l'incapacité des ventricules à produire un débit cardiaque suffisant pour la perfusion des tissus. La cardiomyopathie ischémique est souvent due à une sténose ou rétrécissement (suite à une occlusion) de l'artère coronarienne qui conduit à un infarctus du myocarde, avec comme conséquence une hypoxie irréversible et une mort cellulaire des cardiomyocytes. Durant la phase aiguë, il y a un remodelage tissulaire autour de la zone ischémique et une activation systémique du système nerveux sympathique suite à la diminution du débit cardiaque (Henry, 2003)

1.1.1.6. Insuffisance cardiaque et cardiomyopathie

L'insuffisance cardiaque (IC) due à une cardiomyopathie est généralement un processus irréversible et progressif (Eichhorn & Bristow, 1996). Elle se caractérise par des changements géométriques du cœur, un élargissement de la cavité du VG, une hypertrophie eccentricque et une contractilité inefficace. Les symptômes de maladie n'étant détectés qu'à un stade avancé, les traitements pharmacologiques usuels visent principalement l'amélioration de la performance systolique (Eichhorn & Bristow, 1996).

1.1.2. Pathophysiologie de la CID

L'analyse par nécropsie des cœurs des patients atteints de CID montre une dilatation, une hypertrophie et une fibrose interstitielle abondante (Giles, 1988). La principale observation est une diminution de la contractilité du muscle cardiaque, conséquence directe de la perte des myocytes, associée à une réduction de la capacité d'éjecter le sang (Hirota *et al.*, 1983).

Au niveau moléculaire, on observe des changements dans l'expression des facteurs et des gènes impliqués soit dans la régulation de l'homéostasie cardiovasculaire, soit dans la contraction (protéines sarcomériques et squelettiques principalement) cardiaque (Yung *et al.*, 2004). Les changements initiaux dans l'expression des gènes se font dans le but de maintenir de manière optimale la fonction cardiaque, mais ultimement, cela s'avère mal adapté étant donné qu'il y a déstabilisation des fibres musculaires due à la perte des cardiomyocytes et/ou un mauvais ancrage de ceux-ci sur la matrice extracellulaire (Small & Krieg, 2004; Yung *et al.*, 2004). Ces changements ont lieu après une réactivation des gènes actifs généralement à des stades embryonnaires (McGrath & De Bold, 2005). La perte des cardiomyocytes se fait principalement par deux mécanismes : la nécrose et l'apoptose.

Le processus de mort par nécrose se fait par des mécanismes cytotoxiques et a été observé dans des situations de dysfonctionnement chronique du myocarde (Eichhorn & Bristow, 1996), tandis que l'apoptose est une mort programmée de la cellule qui joue normalement un rôle dans le renouvellement et la maintenance d'un tissu en croissance. Dans la cardiomyopathie, l'apoptose intervient suite à une stimulation de la croissance des myocytes déjà différenciés (Eichhorn & Bristow, 1996). En effet, les myocytes adultes sont incapables de se diviser et donc d'assumer un renouvellement du tissu cardiaque (Eichhorn & Bristow, 1996). Il s'en suit une perte de cardiomyocytes sans renouvellement, ce qui contribue à l'amincissement de la paroi du VG.

Dans le but d'améliorer la fonction du cœur, l'activation des systèmes neurohormonaux, entre autres les systèmes rénine-angiotensine-aldostérone (RAAS) et sympathique permettent de maintenir l'homéostasie cardiovasculaire (Saxena, 1992). L'angiotensine-II (ANG-II), dont les concentrations sont augmentées par l'activation du RAAS, stimule l'activité du système sympathique ainsi que la sécrétion de l'aldostérone. Cette dernière augmente le volume sanguin et contribue à l'augmentation du stress sur la paroi ventriculaire (Saxena, 1992). Les facteurs neurohormonaux vont aussi favoriser le développement de l'hypertrophie ventriculaire (Saxena, 1992).

1.2. LES PEPTIDES NATRIURÉTIQUES

1.2.1. Historique et classification

L'IC est associée à une augmentation de la concentration circulante des PNs. Si pendant plusieurs années le cœur a été considéré comme un organe contractile et dont la fonction est principalement d'assurer la circulation

sanguine, les travaux de de Bold et ses collaborateurs au début des années 80 ont révélé la fonction endocrine du coeur (de Bold *et al.*, 1981). La découverte des granules de sécrétion dans les oreillettes a permis d'identifier le peptide natriurétique de type A (ANP appelé aussi ANF ; atrial natriuretic factor) par de Bold, qui a montré que l'injection d'extraits auriculaires causait une réponse natriurétique chez le rat et que le nombre de granules dans l'oreillette fluctuait avec le volume intravasculaire (de Bold *et al.*, 1981).

Des études subséquentes ont permis d'identifier d'autres membres, les PNs de type B (BNP) et de type C (CNP), isolés initialement à partir du cerveau de porc (Sudoh *et al.*, 1990).

1.2.2. Structure, biosynthèse et régulation

Les PNs possèdent une structure primaire en forme de boucle due à la formation d'un pont disulfure dont le motif de 17 acides aminés (a.a.) CFGXXXDRISXXSGLGC est très conservé d'un peptide à l'autre (Suttner & Boldt, 2004; Suzuki *et al.*, 2001). Cette structure est nécessaire pour la reconnaissance des peptides par leurs récepteurs (figure 1.1.). Chez l'humain, les gènes de l'ANP et du BNP se situent sur le chromosome 1 à 8 kilobases l'un de l'autre tandis que le gène de CNP se trouve sur le chromosome 2 (Suzuki *et al.*, 2001).

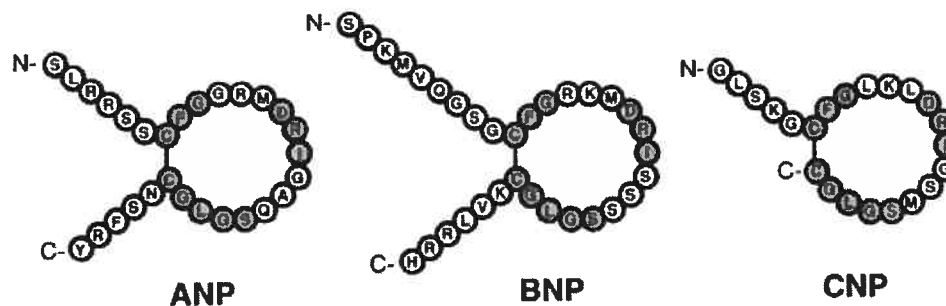


Figure 1.1. Structure primaire des peptides natriurétiques de type-A, -B et -C (Suzuki *et al.*, 2001)

L'ANP et BNP sont principalement exprimés dans les oreillettes et les ventricules, respectivement, et sont considérés comme des PN cardiaques. Le CNP est principalement exprimé dans le système nerveux, dans les cellules endothéliales et dans les monocytes (Suzuki *et al.*, 2001) mais aussi au niveau du cœur (Kalra *et al.*, 2003). Chaque peptide natriurétique est initialement produit sous forme de précurseur protéique (figure 1.2).

1.2.2.1. Le peptide natriurétique auriculaire ou de type A (ANP)

L'ANP est synthétisé sous forme d'une préprohormone de 152 a.a. qui est en suite clivée en prohormone de 126 a.a. (Figure 1.2.) principalement dans le réticulum endoplasmique des myocytes auriculaires (Suttner & Boldt, 2004; Vesely, 2001) et entreposé dans des vésicules de sécrétion (Vuolteenaho *et al.*, 1985). La stimulation de la sécrétion implique l'exocytose dans le fluide interstitiel où la prohormone est clivée par une protéase à sérine, la corine cardiaque (Vuolteenaho *et al.*, 1985). Ce clivage engendre deux fragments différents: l'ANP₁₋₉₈ et l'ANP₉₉₋₁₂₆ (Suttner & Boldt, 2004; Vesely, 2001). L'ANP₉₉₋₁₂₆ est biologiquement actif (Vesely, 2001). Au niveau rénal, le processus de clivage biochimique est différent avec un ajout de 4 a.a. au peptide, formant l'ANP₉₅₋₁₂₆ (McGrath & De Bold, 2005). Dans les conditions normales, l'ANP est principalement exprimé et synthétisé au niveau de l'oreillette (1% - 3% des ARNm totaux) (McGrath & de Bold, 2005; Suttner & Boldt, 2004). D'autres organes, tels que les poumons, les reins et l'hypothalamus expriment aussi l'ANP (McGrath & de Bold, 2005).

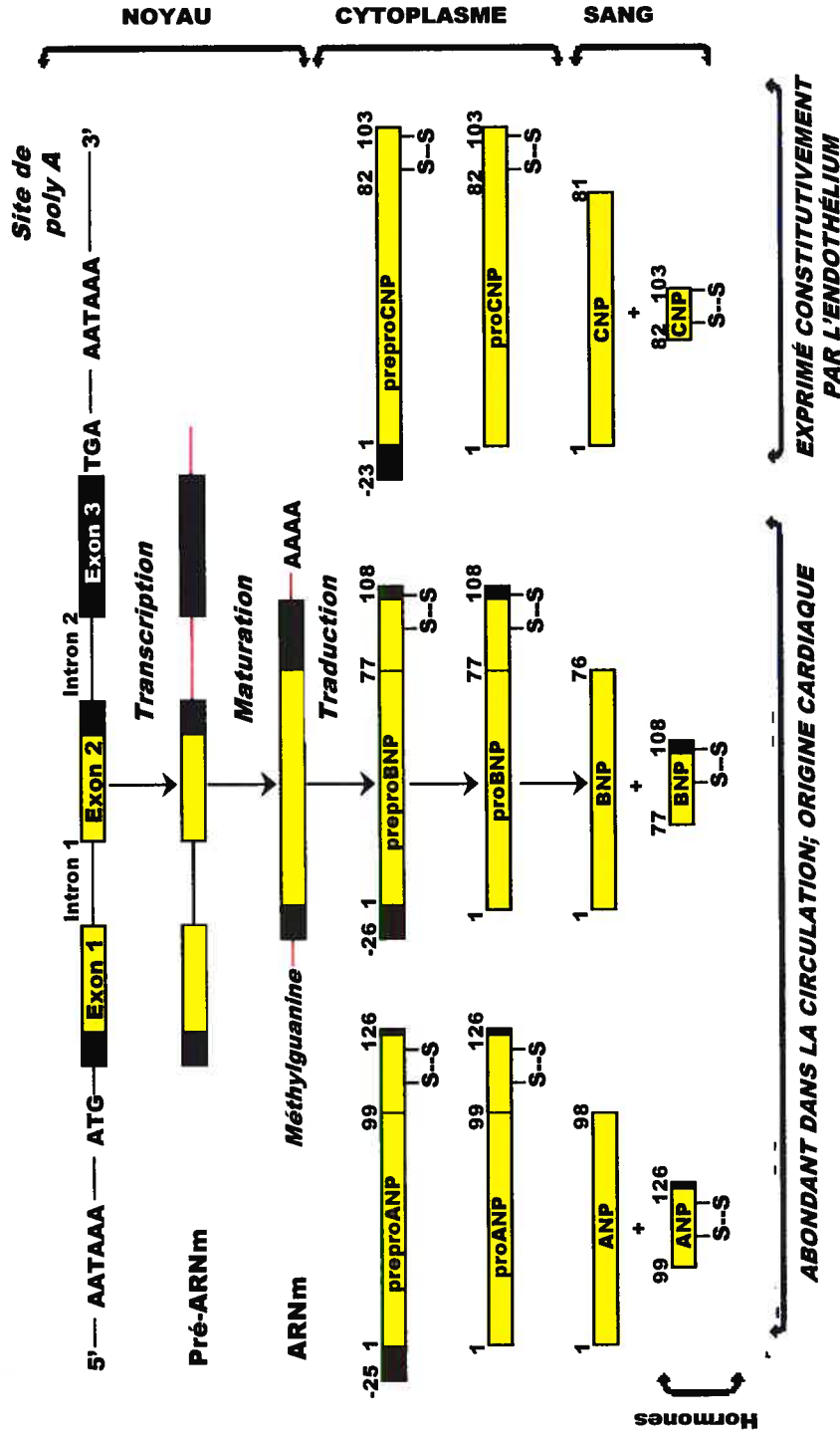


Figure 1.2. Schéma de la transcription et de la traduction des peptides natriurétiques de type-A, -B et -C ainsi que la représentation des formes présentes dans la circulation sanguine (Traduit et adapté McGrath & de Bold, 2005).

L'ANP est constamment sécrété par le cœur, mais le taux de sécrétion dans la circulation est influencé par plusieurs facteurs dont les facteurs mécaniques, qui jouent un rôle prédominant (de Bold *et al.*, 1996; Suttner & Boldt, 2004). En effet l'élargissement de la cavité de l'oreillette et l'augmentation du rythme cardiaque favorisent grandement la sécrétion de l'ANP (de Bold *et al.*, 1996; Edwards *et al.*, 1988). Les conditions pathophysiologiques telles que l'ischémie cardiaque et l'hypoxie conduisent à une augmentation des concentrations sanguines de l'ANP consécutive à l'augmentation de la synthèse et de la sécrétion (Brenner *et al.*, 1990; Tóth *et al.*, 1994; Vesely, 2001). Certains facteurs hormonaux sont aussi impliqués dans la régulation de la sécrétion de l'ANP (Luchner & Schunkert, 2004). Par exemple, la stimulation des récepteurs α -adrénergiques (α -AR) augmente la sécrétion de l'ANP tandis que la stimulation des récepteurs β -AR atténue sa sécrétion (Luchner & Schunkert, 2004; Ruskoaho, 1992). La vasopressine et l'ANG-II favorisent aussi la sécrétion de l'ANP *in vitro* et *in vivo* tandis que le monoxyde d'azote l'inhibe (de Bold *et al.*, 1996). L'endothéline-1, qui est un puissant vasoconstricteur synthétisé et sécrété par les cellules endothéliales inhibe à des faibles doses la sécrétion de l'ANP sur des cœurs isolés de rat, mais à des fortes doses, elle exerce une action de stimulation (Giles, 1988).

1.2.2.2. Le peptide natriurétique de type B (BNP)

Le BNP a été découvert dans le cerveau, mais c'est au niveau du cœur, particulièrement dans le ventricule que l'on retrouve les plus grandes concentrations (Lapointe, 2005). L'ARNm du BNP est traduit en une préprohormone de 134 a.a. (Figure 1.2) qui est ensuite clivée pour donner une molécule de 108 a.a. (proBNP). Cette dernière est aussi clivée pour donner 2 fragments; un fragment de 76 a.a. (BNP₁₋₇₆) et un autre de 32 a.a. (BNP₇₇₋₁₀₈). Le BNP₇₇₋₁₀₈ représente la forme biologiquement active (Lapointe, 2005; McGrath & de Bold, 2005). Comme l'ANP, le BNP est stocké dans des

granules mais non sous la forme d'une prohormone comme l'ANP, mais plutôt sous la forme clivée de BNP₇₇₋₁₀₈ (Luchner *et al.*, 1998; Pandey, 2005).

Le BNP est principalement exprimé durant l'embryogenèse dans le ventricule et l'oreillette gauche chez la souris entre 9.5 et 19.5 jours de gestation, même si l'expression continue faiblement après la naissance (Cameron & Ellmers, 2003). Toutefois, le pic de l'expression se situe au milieu de la gestation afin de donner une grande masse au cœur (Cameron & Ellmers, 2003; Lapointe, 2005). Près de 70% de l'expression cardiaque du BNP est ventriculaire dans les conditions normales et cela peut dépasser les 88% dans les conditions pathophysiologiques (Lapointe, 2005). L'endothéline-1 et l'hormone thyroïdienne favorisent l'expression ventriculaire du BNP (Lapointe, 2005).

1.2.2.3. Le peptide natriurétique de type C (CNP)

Le CNP possède la même structure que l'ANP mais sans la queue en C-terminal (figure 1.1) (Suzuki *et al.*, 2001). Produit sous forme de préprohormone 126 a.a., le CNP est d'abord mûré en un peptide de 103 a.a. (proCNP) et ensuite, il est clivé en 2 fragments; CNP₁₋₈₁ et CNP₈₂₋₁₀₃. Ce dernier est biologiquement actif (Lapointe, 2005). Les concentrations plasmatiques du CNP sont faibles et les sites de synthèse et de sécrétion sont le cerveau et les cellules endothéliales (Sudoh *et al.*, 1990; Wei *et al.*, 1993).

1.2.3. Récepteurs et voies de signalisation, actions biologiques

1.2.3.1. Récepteurs et voies de signalisation

Les PNs se lient à trois sous-types de récepteurs regroupés en récepteurs R1 (Figure 1.3) qui comprennent les RPN (récepteurs des peptides natriurétiques) de type A (RPNA) et de type B (RPNB) présentant un domaine catalytique couplé à une activité guanylate cyclase (GC) et en récepteurs R2 (RPNC) (Pandey, 2005).

1.2.3.1.1. Les récepteurs R1

La structure de RPNA et RPNB est divisée en quatre domaines distincts : le domaine de liaison extracellulaire (DLE), le domaine transmembranaire (DTM), le domaine d'homologie kinase (DHK) et le domaine guanylate cyclase (DGC) (figure 1.3). Le domaine DLE présente près de 44% d'homologie de séquence entre RPNA et RPNB et est responsable de la liaison avec le ligand. Il contient des sites consensus pour des résidus glycosylés à la partie N-terminale (McGrath & de Bold, 2005). Le domaine DHK, riche en glycine, est identique à 60% entre les 2 récepteurs, mais la fonction de ce domaine n'est pas encore connue outre sa liaison à l'ATP (McGrath & De Bold, 2005). La liaison du ligand sur le récepteur induit une dimérisation du récepteur et une déphosphorylation car le récepteur est phosphorylé dans sa forme basale. Ceci entraîne une augmentation de la formation du GMPc (guanosine monophosphate cyclique), qui induit des réponses cellulaires par l'activation de protéine kinases GMPc-dépendantes (PKGs) et des canaux ioniques GMPc-dépendants (Maack, 1992; Pandey, 2005; Suzuki *et al.*, 2001). Le RPNA lie avec plus d'affinité l'ANP et le BNP (ANP \geq BNP \gg CNP) tandis que le RPNB lie avec une forte affinité le CNP

(CNP \gg ANP \geq BNP) (Koller *et al.*, 1991; McGrath & De Bold, 2005; Pandey, 2005; Suzuki *et al.*, 2001).

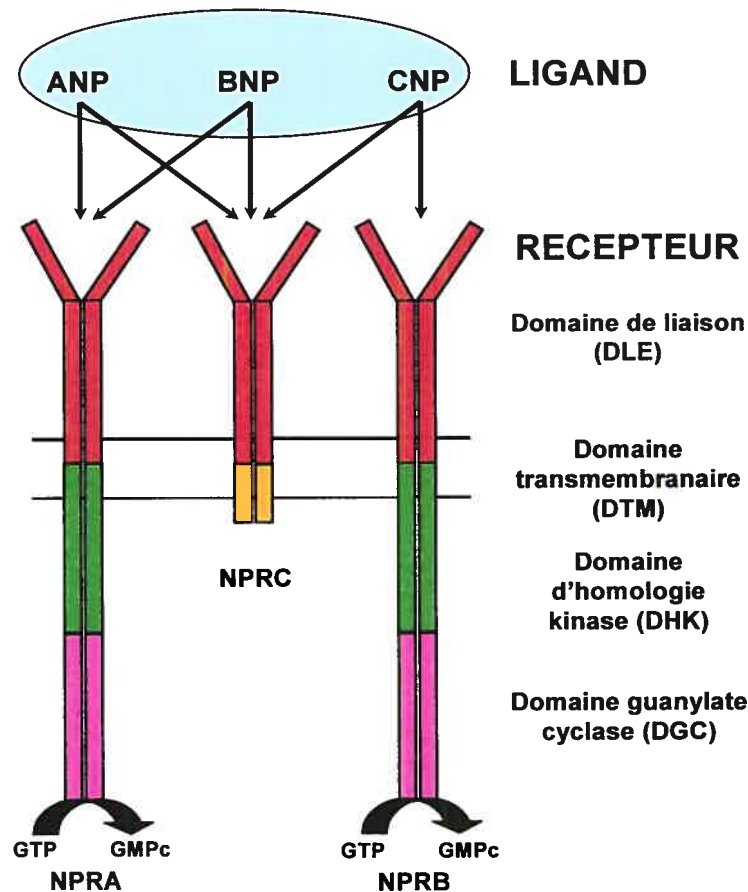


Figure 1.3. Représentation schématique des récepteurs des peptides natriurétiques RPNA, RPNB et RPNC (Traduit et adapté de Pandey, 2005).

1.2.3.1.2. Les récepteurs R2

Les RPNC possèdent un DTM unique qui lie les trois peptides avec une affinité décroissante pour l'ANP, le CNP et le BNP (Gianello *et al.*, 1990; Maack, 1992) et un court domaine intracellulaire dépourvu de domaines DHK et GC (figure 1.3) (Gianello *et al.*, 1990; Pandey, 2005; Witthaut, 2004). Ces récepteurs sont considérés comme des récepteurs de clairance puisque la liaison du ligand sur le récepteur induit l'internalisation du complexe suivie de

la dégradation des PNs et le recyclage des récepteurs (Maack, 1992; Pandey, 2005). La stimulation des RPNC provoquerait une inhibition des protéines G couplées à l'adénylate cyclase (Levin, 1993; Witthaut, 2004).

1.2.3.2. Actions biologiques des peptides natriurétiques

Pendant plusieurs années les PNs ont été considérés comme des régulateurs de l'homéostasie du volume sanguin (Nakao *et al.*, 1992), mais plusieurs actions sur les systèmes rénal, cardiovasculaire et nerveux central (SNC) sont maintenant bien documentées (Pandey, 2005; Witthaut, 2004) (figure 1.4). Ces peptides seraient aussi impliqués dans la lipolyse chez l'homme (Sengenès *et al.*, 2005).

1.2.3.2.1. Actions sur le système rénal

Au niveau rénal, l'ANP facilite l'excrétion du sodium et de l'eau (Brenner *et al.*, 1990). D'une part, l'ANP augmente la filtration glomérulaire par un effet vasoactif sur les artérioles rénales afférentes (vasodilatation) et efférentes (vasoconstriction), ce qui conduit à une augmentation de la pression dans les capillaires glomérulaires (Marin-Gre *et al.*, 1986; Suttner & Boldt, 2004). Tout comme l'ANP, le BNP exerce les mêmes effets diurétiques et natriurétiques (Woods, 2004). Les PNs jouent un rôle dans la régulation du RAAS en agissant comme un antagoniste du système (figure 1.4) (Woods, 2004). Les actions de l'ANP s'opposent à celles de l'ANG-II (Pandey, 2005; Paul *et al.*, 1988) en induisant une élévation du GMPc intracellulaire et une relaxation des cellules mésangiales et aussi en inhibant la réabsorption de l'eau et du sodium au niveau du tubule rénal distal (Kalra *et al.*, 2001). Contrairement aux deux autres peptides, le CNP ne semble pas avoir des effets sur le système rénal.

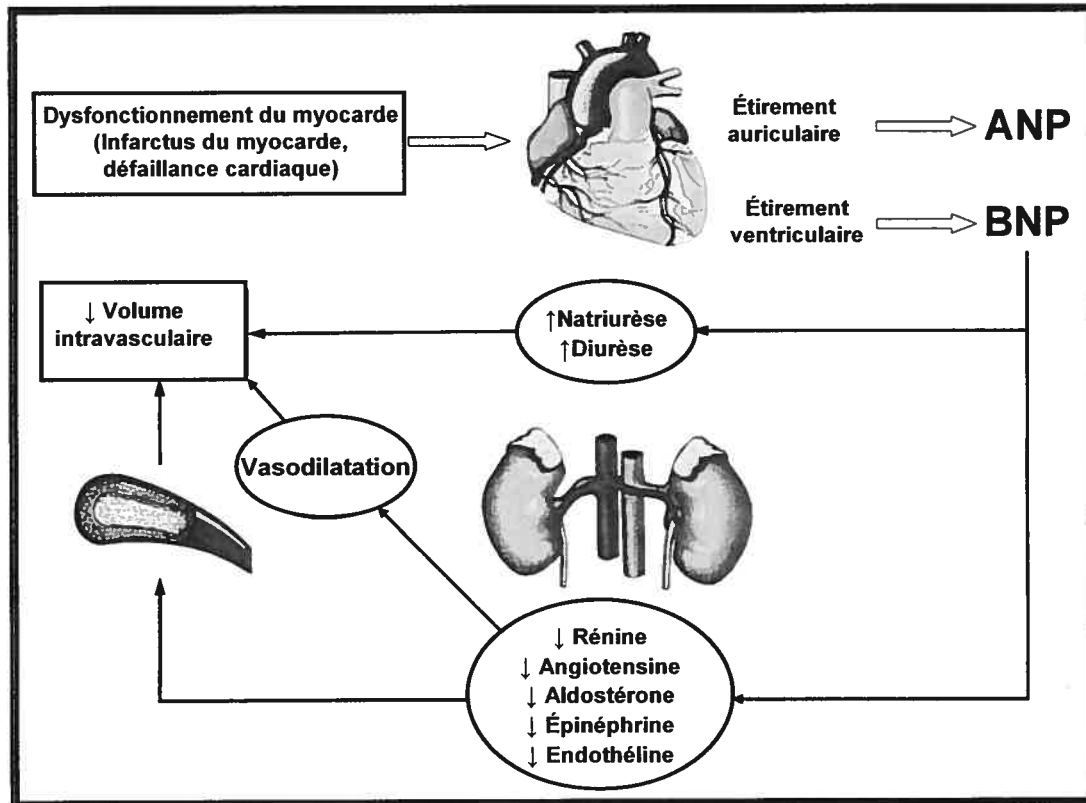


Figure 1.4. Effets physiologiques des peptides natriurétiques de type-A et -B (Traduit de Suttner & Boldt, 2004).

1.2.3.2.2. Actions sur le système nerveux central

Ne pouvant pas traverser la barrière hémato-encéphalique, les PNs sont produits localement (McGrath & de Bold, 2005). En effet, il a été démontré par des tests *in vitro* que l'endothéline-1, la vasopressine et la norépinéphrine stimulent la sécrétion de l'ANP (Levin *et al.*, 1998). L'ANP joue un rôle au niveau des barorécepteurs cardiovasculaires (Levin *et al.*, 1998) et sur la contraction cardiaque induite par la norépinéphrine (Woods, 2004).

1.2.3.2.3. Actions sur le système cardiovasculaire

L'ANP réduit la pression de l'artère pulmonaire et la résistance vasculaire systémique et contribue ainsi par ses effets natriurétiques et diurétiques à diminuer le volume sanguin ainsi que la pression sanguine (figure 1.4) (Saito *et al.*, 1987; Suzuki *et al.*, 2001). Chez les patients atteints d'IC, ces effets contribuent à diminuer la précharge (Sagnella, 2001; Saito *et al.*, 1987). L'injection intraveineuse de faibles doses d'urodilatine, peptide présent dans l'urine qui stimule les récepteurs de l'ANP (Kalra *et al.*, 2001), limite la taille de l'infarctus coronarien chez les porcs (Padilla *et al.*, 2001). L'administration à des rats anesthésiés de l'ANP (0.5 µg/kg/min) augmente la résistance au retour veineux, ce qui conduit à une réduction de la pression sanguine et du débit cardiaque (Chien *et al.*, 1987). Lorsque l'ANP est infusé à des faibles concentrations (<1 µg/kg/min) à des animaux conscients, il y a une baisse du débit cardiaque avec une augmentation de la résistance périphérique totale (Shen *et al.*, 1991; Woodyatt, 2004). À ces concentrations, les taux plasmatiques s'élèvent à moins de 100 fois les taux normaux. Lorsqu'il est administré à une dose unique et élevée (9 µg/kg) à des chiens conscients, les taux plasmatiques sont 100 fois plus élevés et il y a une diminution de la pression sanguine artérielle et de la résistance périphérique vasculaire, donc il y a vasodilatation (Ahluwalia *et al.*, 2004; Shen *et al.*, 1991). Des études sur les souris transgéniques surexprimant l'ANP (TTR-ANP) ou ANP^{-/-} ont montré les effets de l'ANP sur la pression sanguine, le débit cardiaque et la résistance périphérique (Melo *et al.*, 1999a; Melo *et al.*, 1999b). La pression sanguine est très élevée chez les souris ANP^{-/-} et faible chez les TTR-ANP comparée aux souris de type sauvage (WT) (Melo *et al.*, 1999b). La résistance périphérique est très élevée chez les souris ANP^{-/-} (Melo *et al.*, 1999a). Les auteurs ont conclu, après avoir étudié les effets d'un blocage du nerf ganglionnaire autonome, que les effets vasodilatateurs de l'ANP dépendent partiellement du blocage du tonus sympathique vasculaire. L'ANP antagonise les effets de l'ANG-II sur la pression sanguine en l'atténuant (Charles *et al.*,

1993) et inhibe la croissance des cellules endothéliales vasculaire (Itoh *et al.*, 1992; Morishita *et al.*, 1994) et l'hypertrophie des cellules vasculaires du muscle lisse induite par celle-ci (Itoh *et al.*, 1990).

Le BNP a des effets hémodynamiques bénéfiques telle que la réduction de la pression de remplissage des ventricules lorsqu'il est injecté chez des patients atteints d'IC (Sagnella, 2001). Le nésiritide, peptide natriurétique recombinant de type B, réduit sensiblement la pression des capillaires pulmonaires et la résistance vasculaire systémique (Sagnella, 2001).

Le CNP inhibe la vasoconstriction provoquée par l'ANG-I mais non celle provoquée par l'ANG-II (Kalra *et al.*, 2001). In vitro, il inhibe l'hypertrophie induite par l'endothéline-1 sur les cardiomyocytes via des mécanismes GMPc-dépendants (Tokudome *et al.*, 2004). Il atténue l'élargissement du ventricule droit causé par un IM chez le rat ainsi que le dépôt du collagène dans la région péri-infarctus (Soeki *et al.*, 2005). Il inhibe l'épaississement de l'intima des artères après des dommages (Furuya *et al.*, 1993; Shinomiya *et al.*, 1994)

1.2.4. Insuffisance cardiaque et peptides natriurétiques

Une caractéristique importante de la pathophysiologie de l'IC est l'augmentation caractéristique de la concentration circulante des PNs avec la progression de la pathologie (Muders *et al.*, 1997). En effet, les taux circulants (Talwar *et al.*, 2000) et l'expression cardiaque des PNs sont des bons indicateurs de la défaillance cardiaque (Falcao *et al.*, 2004; Maisel *et al.*, 2001; Omland *et al.*, 1996; Sabatine *et al.*, 2004) et de sa sévérité (Selvais *et al.*, 1998). Tel que mentionné au point 1.2.2.2, les PNs sont abondamment exprimés et synthétisés vers la fin du stade embryonnaire et dans les premiers jours après la naissance (Cameron & Ellmers, 2003). Leur expression décroît ensuite après les premiers mois et à l'âge adulte; leur re-expression cardiaque

est associée avec des conditions pathophysiologiques telles que l'hypertrophie (Ogawa *et al.*, 1996), l'ischémie (Padilla *et al.*, 2001; Sabatine *et al.*, 2004) et la CID (Fruhwald *et al.*, 1999; Hasegawa *et al.*, 1993).

Une étude des taux circulants des PNs chez des patients ayant eu un IM aigu (IMA) a montré que les taux plasmatiques du BNP fournissent des informations sur les pronostics de l'IMA et la fonction systolique tandis que l'ANP prédit de manière efficace la dysfonction du VG (Omland *et al.*, 1996). Muders *et al.* ont montré que l'ANP₉₉₋₁₂₆ plasmatique prédit efficacement et de manière indépendante de faibles fractions d'éjection (inférieures à 45%), et que l'ANP₁₋₉₈ est aussi un bon indicateur d'une dysfonction du VG. Le risque relatif lié à cette dernière augmente chez les patients ayant des taux élevés des PNs en général (Muders *et al.*, 1997). Plusieurs études ont montré l'importance de la quantification des taux plasmatiques de l'ANP₁₋₉₈ en plus de l'ANP₉₉₋₁₂₆ dans le diagnostic de la défaillance cardiaque (Hulsmann *et al.*, 2005; Stanton *et al.*, 2005). En effet, l'ANP₉₉₋₁₂₆ a une demi-vie très courte (1 à 5 minutes chez l'homme) comparativement à l'ANP₁₋₉₈ (50 à 60 minutes). Hülsmann *et al.* (2005) ont montré que le taux de mortalité est de 51% chez les patients avec une défaillance cardiaque présentant des taux élevés (> 7358 pmol/L) d'ANP₁₋₉₈ (Hulsmann *et al.*, 2005). Dans une autre étude, le taux d'hospitalisation était de 50% chez les patients souffrant de défaillance cardiaque chronique ayant une concentration élevée de l'ANP₁₋₉₈ (> 1200 pmol/L) (Andersson & Hall, 2000).

Dans la CID, il y a une augmentation de l'expression des PNs au niveau du VG et le contenu en peptides dans les granules de sécrétion est en corrélation inverse avec la fraction d'éjection (Hasegawa *et al.*, 1993). Des deux peptides, c'est l'ANP qui a une meilleure corrélation. Une autre étude a montré une corrélation entre le degré de sévérité du dysfonctionnement cardiaque dans la CID et le niveau d'expression de l'ANP et du BNP (Fruhwald *et al.*, 1999). Les taux plasmatiques du BNP chez les patients CID

ont une meilleure corrélation avec le diamètre du VG en fin de diastole (Demachi *et al.*, 2004). Les taux plasmatiques du BNP sont une meilleure indication de l'hypertrophie cardiaque (Omland *et al.*, 1996; Selvais *et al.*, 1998).

1.3. LES MYOSINES

Comme le muscle squelettique, le muscle cardiaque se contracte et se relaxe par la force des différentes protéines qui constituent ses fibres; notamment les myosines (Sugiura & Yamashita, 1998).

1.3.1. Classification et structure

Les myosines sont divisées en sept classes distinctes en se basant sur les propriétés du domaine moteur (Weiss & Leinwand, 1996). La classe II est constituée de deux têtes de myosine qui forment le filament et qui comportent deux sous-unités à chaînes lourdes (les myosines à chaînes lourdes, MHC de 200 kDa chacune) et quatre sous-unités à chaînes légères (17-23 kDa) formant des paires non-identiques (Sugiura & Yamashita, 1998; Weiss & Leinwand, 1996). Hoh *et al.* (1978) ont identifié au niveau cardiaque trois isoformes distincts: V1, V2 et V3 (Hoh *et al.*, 1978). Les homodimères de V1 et V3 forment respectivement les isoformes α et β . L'isoforme α possède une forte activité ATPase et une vélocité de contraction rapide tandis que l'isoforme β a une faible activité ATPase et une faible vélocité de contraction (Pope *et al.*, 1980; Weiss & Leinwand, 1996). La sous-unité MHC est formée de deux domaines fonctionnels: le domaine globulaire (tête) amino-terminal qui contient la fonction motrice et le domaine carboxy-terminal en forme de filament d'hélices alpha (Weiss & Leinwand, 1996).

1.3.2. Mécanisme de contraction, régulation et expression des MHC

Le cycle d'interaction entre les têtes de myosines et les filaments d'actine constitue la base de la contraction musculaire. En général, en absence de nucléotides, la liaison des têtes de myosine à l'actine est forte. Après la liaison d'une molécule d'ATP, il y a une dissociation rapide des têtes de myosine et de l'actine entraînant l'hydrolyse de l'ATP, ce qui permet le glissement des têtes de myosine sur les filaments d'actine (Pope *et al.*, 1980). La présence d'actine accélère la vitesse d'hydrolyse de l'ATP (Weiss & Leinwand, 1996). Au cours de la diastole, la tropomyosine, une protéine régulatrice, couvre le site de liaison sur l'actine empêchant ainsi l'interaction entre les têtes de myosine et l'actine. Au cours de la systole, il y a une entrée des ions calciques et sodiques dans la cellule, ce qui entraîne une libération du Ca^{2+} stocké dans le réticulum sarcoplasmique. Le Ca^{2+} se lie alors à la tropomyosine et induit un changement de conformation qui libère le site de liaison sur l'actine. Ceci va permettre aux têtes de myosine de se lier à l'actine, d'hydrolyser l'ATP et de glisser sur les filaments d'actine et conduire ainsi à un raccourcissement du muscle cardiaque. Pour la relaxation, il y a diminution de la concentration intracellulaire en Ca^{2+} par la pompe à Ca^{2+} ATPase (Dillmann, 2005).

Plusieurs facteurs régulent l'expression, la quantité et la distribution des α - et β -MHC (Weiss & Leinwand, 1996). La quantité des α - et β -MHC peut être modifiée par l'hormone thyroïdienne (Lompré *et al.*, 1984). Dans le ventricule, l'expression de α -MHC est induite par l'hormone thyroïdienne tandis que l'expression du β -MHC y est réprimée (Lompré *et al.*, 1984; Weiss & Leinwand, 1996). Les gènes sont aussi régulés différemment durant le développement (Weiss & Leinwand, 1996). L' α -MHC est l'isoforme majoritairement exprimé dans les ventricules et les oreillettes chez les

mammifères inférieurs tandis que le β -MHC est l'isoforme abondant au cours du développement du fœtus dans les ventricules (Lompré *et al.*, 1984; Robbins *et al.*, 1990). Les transcrits de α - et β -MHC apparaissent aux environs du huitième jour du développement, ce qui correspond à la formation de la chambre ventriculaire et au dixième jour chez les rongeurs (Weiss & Leinwand, 1996). L'expression du β -MHC commence à être restreinte après la naissance tandis que l'expression de l' α -MHC augmente et devient la forme prépondérante chez l'adulte (Weiss & Leinwand, 1996). D'autres facteurs tels qu'un stress hypertrophique (Mercadier *et al.*, 1981), l'exercice ou une privation en énergie (Sugiura & Yamashita, 1998) modulent l'expression des isoformes de MHC.

1.3.3. Modulation de l'expression des MHC dans la cardiomyopathie

La CID montre une corrélation entre l'augmentation de la masse du myocarde et la diminution de la vitesse de raccourcissement des fibres cardiaques. Cette dernière est en association étroite avec l'activité ATPase des myosines tel que mentionné précédemment (Scheuer & Bahn, 1979). La découverte qu'une mutation des isoformes de MHC était à l'origine de l'hypertrophie dans la cardiomyopathie hypertrophique ou dilatée familiale a ouvert la voie à des études plus poussées dans le but de comprendre leur rôle dans la pathologie (Burkett & Hershberger, 2005; Villard *et al.*, 2005). Des mutations de l'arginine en glutamate en position 403 du α -MHC (Lowey, 2002) et de la sérine en proline en position 532 au niveau du β -MHC (Kamisago *et al.*, 2004) ont été observées, conduisant à une réduction considérable de l'activité ATPase et de la vélocité et à l'hypertrophie cardiaque. D'autres études ont montré une association entre la perte de l'activité ATPase et de la vélocité et la réduction de l'expression des ARNm de l' α -MHC au niveau du VG et à une augmentation de celle du β -MHC chez

l'humain (Lowes *et al.*, 1997). Il y a cependant une controverse à savoir si la diminution de l'expression en ARNm du β -MHC se traduit par une réduction de l'expression protéique. Reiser *et al.* (2001) ont montré une diminution de la quantité de l' α -MHC dans VG chez les patients avec une défaillance cardiaque comparativement aux patients non défailants (Reiser *et al.*, 2001) tandis que les études faites avant par Coumans *et al.* (1997) sur des patients atteints de CID n'ont pas pu montrer cet effet (Coumans *et al.*, 1997). Une autre étude clinique menée par Abraham et ses collaborateurs (2002), a montré une association entre l'amélioration de la fonction cardiaque dans la CID, l'augmentation de l'expression de l' α -MHC et la réduction du β -MHC (Abraham *et al.*, 2002). Des études sur plusieurs modèles expérimentaux d'hypertrophie cardiaque chez le rat ont montré que l'induction d'une hypertrophie provoque des changements de l'expression des isoformes de MHC, principalement une augmentation de l'expression du β -MHC (Lompré *et al.*, 1979; Mercadier *et al.*, 1981). À l'opposé, lorsque les rats hypertrophiques sont traités avec la thyroxine (T4), il y a une régulation négative de l'expression du β -MHC et une induction de l' α -MHC (Izumo *et al.*, 1987). Récemment, James *et al.* (2005) ont montré que l'induction de la cardiomyopathie chez des lapins transgéniques exprimant l' α -MHC a des effets moins délétères que chez les lapins non-transgéniques (James *et al.*, 2005).

1.4. L'HORMONE DE CROISSANCE

1.4.1. Biosynthèse, sécrétion et régulation

L'hormone de croissance (HC) humaine isolée en 1956 des cellules somatotropes de la glande pituitaire antérieure, a été utilisée en thérapie pour la première fois en 1958 (Raben, 1958). Le gène de l'HC et ses transcrits d'ARNm sont formés de 5 exons séparés de 4 introns. L'HC est synthétisée

dans les cellules somatotropes en réponse à la stimulation des récepteurs à sept passages transmembranaires de la GHRH (growth hormone-releasing hormone), activant la transcription par la voie de l'AMPc (Strobl & Thomas, 1994). L'HC humaine, qui est une hormone peptidique de 21.5 kDa de 191 a.a., provient de la maturation d'une prohormone de 28 kDa. Strobl et Thomas (1994) ont examiné le mode de sécrétion de l'HC et ont montré un mélange de plusieurs formes de poids moléculaire différents, dû à des modifications post-transcriptionnelles (Strobl & Thomas, 1994). Les cellules de l'adénohypophyse contiennent entre 5 et 10 mg de l'HC emmagasinée dans les cellules somatotropes (Volterrani *et al.*, 2000). Ces cellules représentent près de 35 à 45% de la glande et sont principalement localisées au niveau de la partie latérale de la glande pituitaire. La synthèse et la libération peuvent être inhibées par la somatostatine et aussi par une rétroaction négative de l'HC elle-même ou par la somatomédine ou *l'insulin growth factor-1* (IGF-1), un médiateur des effets de l'HC (Volterrani *et al.*, 2000). Plusieurs voies neurohormonales régulent la sécrétion de l'HC, entre autres, la stimulation centrale cholinergique qui provoque la libération de l'hormone et réduit la sécrétion de la somatostatine (Casanueva *et al.*, 1983; Delitala *et al.*, 1983). À l'opposé, les agonistes β -adrénergiques augmentent la somatostatine et inhibent la sécrétion de l'HC (Kelijman & Frohman, 1989).

Une autre voie neuroendocrine régule la sécrétion de l'HC par l'action des sécrétines de l'HC (GHS) via l'activation d'un récepteur à 7 passages transmembranaires couplé aux protéines G (GHS-R1a) (McKee *et al.*, 1997). Ce dernier est principalement exprimé au niveau de l'hypothalamus et de l'hypophyse, mais aussi au niveau cardiaque, pulmonaire, dans les ovaires et le muscle squelettique (Muccioli *et al.*, 2000; Papotti *et al.*, 2000). Les GHS stimulent la sécrétion de l'HC de façon reproductible et dose-dépendante (Bisi *et al.*, 1999; Ghigo *et al.*, 1999). Cette stimulation requiert l'activité du GHRH hypothalamique étant donné que l'effet des GHS est réprimé par la perfusion de la somatostatine (Pandya *et al.*, 1998). Le ligand endogène du GHS-R1a est

la ghréline, un peptide de 28 a.a. principalement exprimée au niveau des cellules entéro-endocrines de l'estomac, mais aussi au niveau des reins, l'hypophyse, des cellules α pancréatiques et du cœur (Date *et al.*, 2002; Kojima *et al.*, 1999). La ghréline stimule la sécrétion de l'HC en activant ses récepteurs GHS-R1a hypothalamiques et hypophysaires en synergie avec la GHRH (Takaya *et al.*, 2000).

1.4.2. Métabolisme, récepteurs et actions biologiques

Une fois sécrétée, l'HC entre dans la circulation sanguine et possède une demi-vie d'environ 20 à 25 minutes. Les taux plasmatiques de l'HC pendant une période de 24 heures varient entre 2 et 4 $\mu\text{g/L}$ chez un adulte et entre 5 et 8 $\mu\text{g/L}$ chez un enfant (homme et femme confondus) (Volterrani *et al.*, 2000).

Le récepteur de l'HC (RHC), fait partie des récepteurs à cytokine de classe I qui subissent une dimérisation induite par la liaison du ligand. Ces récepteurs comprennent dans leur partie extracellulaire un motif WSXWS qui joue un rôle important dans l'interaction du récepteur avec le ligand (Figure 1.5). Dans la partie cytoplasmique, le récepteur comprend deux motifs, le premier (boîte 1), à proximité de la membrane plasmique est riche en proline et est impliqué dans la liaison avec les Jak (Janus kinases) essentiellement Jak2 (Argetsinger & Carter-Su, 1996). Le deuxième motif (boîte 2) comporte une série d'a.a. hydrophobes suivis de 2 a.a. chargés positivement. Ces deux motifs sont impliqués dans la transduction du signal après la liaison du ligand sur le récepteur (Carter-Su *et al.*, 1996). Le mécanisme de liaison de l'HC est séquentiel en vue de la dimérisation du récepteur. L'HC se lie d'abord à un premier récepteur, ce qui permet ensuite d'exposer des sites de liaison pour le deuxième récepteur (Wood *et al.*, 1997). Après la dimérisation des récepteurs, il y a recrutement et juxtaposition de 2 Jak2 liées chacune à la partie cytoplasmique du récepteur et auto-phosphorylation sur les résidus de

tyrosine. Ces tyrosines phosphorylées forment des sites de liaison de haute affinité pour des protéines de signalisation ayant un domaine SH2 (Src homology domain 2) (Argetsinger & Carter-Su, 1996). Parmi les voies de signalisation activées, nous retrouvons la voie de Jak-STAT (Janus kinase-Signal Transducer and Activator Transcription) et de MAPK (mitogen-activated protein kinase) via les protéines SHC, la voie de PI3'K (phosphatidylinositol 3' kinase) via les substrats aux récepteurs à l'insuline 1 et 2 et la voie de PKC via les phospholipases qui mènent à la formation du diacylgérol (DAG) et de l'inositol trisphosphate (Volterrani *et al.*, 2000; Waters *et al.*, 1999).

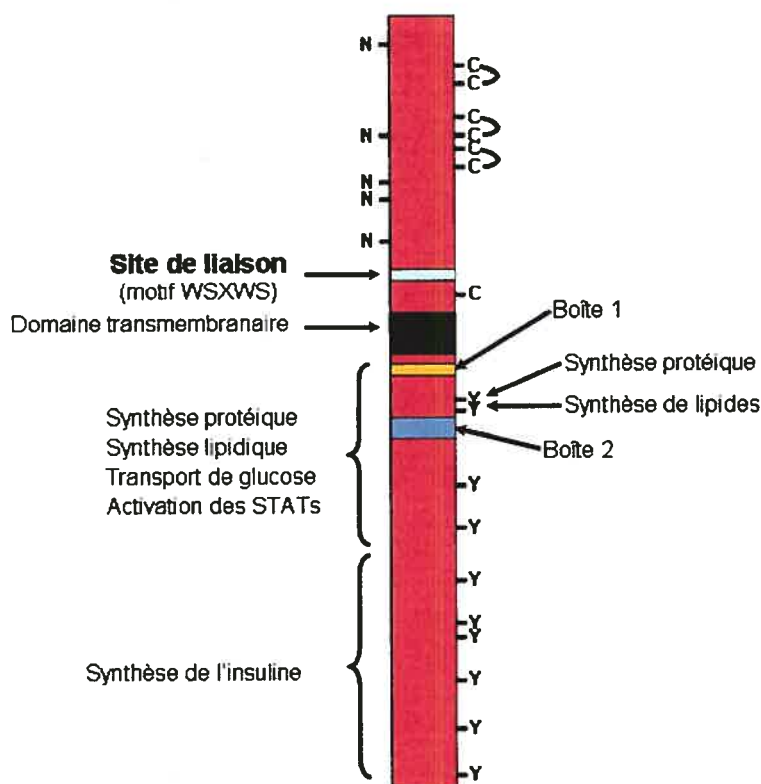


Figure 1.5: Le récepteur de l'HC (Traduit et adapté de Carter-Su *et al.*, 1996)

L'HC favorise la production de glucose, de l'insuline, la lipolyse et l'anabolisme des protéines, directement ou indirectement par les IGFs, aussi appelés somatomédines (Broglia *et al.*, 1999). L'HC induit la différenciation cellulaire et peut aussi moduler l'expression de certains facteurs de croissance ainsi que leurs récepteurs (Colao *et al.*, 2004b).

1.4.2.1. Les somatomédines ou IGFs

Les principales somatomédines sont les IGF-1 et IGF-2, deux peptides de 70 a.a. Ils sont sécrétés et libérés en réponse à la stimulation du récepteur de l'HC et exercent leurs effets en se liant sur des récepteurs spécifiques. Le récepteur de IGF-1, l'IGF-1R, est une protéine hétérodimérique qui a une structure similaire au récepteur de l'insuline dans ses sous-unités α et β . L'IGF-1R possède au niveau du domaine intracellulaire de sa sous-unité β une activité tyrosine kinase. L'activation des récepteurs conduit au recrutement de protéines de signalisation avec un domaine SH2 qui à leur tour vont activer les voies de MAPK et de PI-3K conduisant ainsi à la transcription des gènes (Colao *et al.*, 2004b). Les IGFs sont synthétisés dans le foie et le rein et circulent dans le plasma sous forme liée à des protéines identifiées comme *insulin growth-factor binding protein* (IGFBP-1, 2, 3) (Delafontaine, 1995; Volterrani *et al.*, 2000). Dans le sérum, l'IGF-1 est lié à l'IGFBP-3 et à une sous-unité ALS (acid-labile subunit) et forme un complexe de 150 kDa (Colao *et al.*, 2004b). Les éléments du complexe sont synthétisés dans le foie suite à la stimulation par l'HC.

1.4.3. Approches thérapeutiques de la CID

La CID est l'une des principales causes de transplantation cardiaque dans le monde occidental en partie dû au fait que le diagnostic précoce de la maladie n'est pas fréquent (Mohan *et al.*, 2002). Néanmoins, des traitements médicaux orientés vers l'utilisation de β -bloqueurs, de vasodilatateurs et d'inhibiteurs de l'enzyme de conversion de l'angiotensine (IECA) permettent de ralentir la progression de la maladie. Les IECA, tel que le captopril, sont capables de réduire le remodelage cardiaque en agissant sur la pré- et la post-charge. Il y a aussi l'utilisation des diurétiques qui permettent de réduire l'excès du fluide corporel extravasculaire et d'améliorer ainsi le débit cardiaque. Cependant, les succès thérapeutiques sont limités et les symptômes

d'IC apparaissent en dépit d'un régime thérapeutique optimal, d'où la recherche de thérapies alternatives dont le traitement avec l'HC (Tableau I).

1.4.3.1. Déficience en HC

Le rôle de l'HC/IGF-1 dans la régulation de la fonction cardiovasculaire a été mis en évidence lors des études cliniques et épidémiologiques où l'on rapportait un risque élevé de mortalité et de morbidité chez les patients souffrant d'une déficience en HC (DHC) découlant principalement de la défaillance cardiaque (Tableau I) (Colao *et al.*, 2004c). On observait chez ces patients de faibles concentrations plasmatiques d'IGF-1 et un rythme cardiaque anormalement faible. Amato *et al.* (1993) ont examiné la composition, la structure et la fonction cardiaque des patients DHC adultes avant et après un traitement avec de faibles doses d'HC (Amato *et al.*, 1993). Chez les patients DHC dont la maladie a évolué depuis l'enfance, une réduction de l'épaisseur (Merola *et al.*, 1993), du diamètre intérieur et de la masse du VG (Longobardi *et al.*, 1998; Merola *et al.*, 1993) a été rapportée. En effet, le développement de la DHC à partir de l'enfance est souvent associé avec une incidence élevée du dysfonctionnement ventriculaire tant systolique que diastolique à l'âge adulte en conséquence de la réduction de l'épaisseur de la paroi du myocarde (Longobardi *et al.*, 1998). Une étude récente a montré une corrélation entre la sévérité de la dysfonction cardiaque et la sévérité de la DHC (Colao *et al.*, 2004a).

Plusieurs études attestent que les complications cardiaques chez les patients DHC sont liées à une déficience en HC et en IGF-1 (Colao *et al.*, 2002a) et qu'une amélioration de la fonction cardiaque chez ces patients est observée suite à une thérapie de remplacement avec l'HC (Amato *et al.*, 1993; Colao *et al.*, 2001; Colao *et al.*, 2002a). Amato *et al.* (1993) ont rapporté une augmentation de près de 26% de l'index de la masse du

Tableau I: Études du traitement à l'HC chez des patients cardiomyopathiques de différentes étiologies

Premier auteur, date	Étiologie	Étude et nombre de patients	Traitement	Dose, durée	Principales observations
(Fazio et al., 1996)	CMD	Non randomisée ou non contrôlée 7 patients	rhHC	0,15 U (0,05 mg) à 0,2 U (0,07 mg)/kg/semaine x 3 mois	Réduction de la taille du VG, amélioration des statuts cliniques et hémodynamiques.
(Osterziel et al., 1998)	CMD	Randomisée, contrôlée par l'effet placebo, 50 patients	rhHC	De 0,5 U (0,17 mg)/jour à 2 U (0,67 mg)/jour x 12 semaines	Augmentation de la masse VG mais aucun effet clinique bénéfique
(Perrot et al., 2001)	CMD	Randomisée, contrôlée par placebo, 50 patients	rhHC	De 0,5 U (0,17 mg)/jour jusqu'à 2 U (0,67 mg)/jour x 12 semaines	Augmentation de la FEVG (si l'élévation de l'IGF-1 > 80 pg/ml) Diminution de l'expression des cytokines pro-inflammatoires et amélioration de la performance du VG
(Adamopoulos et al., 2002)	CMD	Randomisée, 12 patients	rhHC	4 U (1,33 mg) x 12 semaines	Amélioration dans la tolérance à l'exercice
(O'Driscoll et al., 1997)	Ischémique, DC sévère	Étude de cas 2 patients	rhHC	14 U (4,7 mg)/jour x 7 jours 10 U (3,3 mg) x 6 semaines	Amélioration du statut clinique et réduction du remodelage du VG
(Genth-Zotz et al., 1999)	Ischémique, DC moyenne	Non randomisée et non contrôlée par l'effet placebo	rhHC	2 U (0,67 mg)/jour x 3 mois	Amélioration de la tolérance à l'exercice; détérioration si la DC est sévère
(Spallarossa et al., 1999)	Ischémique, DC de classe II ou III selon NYHA ^a	Contrôlée par l'effet placebo, 20 patients	rhHC	0,006 U (2 µg)-0,002 (0,7 µg)/kg x 6 mois	Aucun effet bénéfique
(van Thiel et al., 2004)	Ischémique, FEVG < 40%	Randomisée, contrôlée par l'effet placebo 22 patients	rhHC	0,5 U (0,17 mg) jusqu'à 2 U (0,67 mg)/jour x 26 semaines	Aucun effet bénéfique
(Smit et al., 2001)	Ischémique, FEVG < 40%	Randomisée, contrôlée par l'effet placebo 22 patients	rhHC	0,5 U (0,2 mg) jusqu'à 2 U (0,77 mg)/jour x 26 semaines	Aucun effet bénéfique
(Isgaard et al., 1998)	Mixte, DC de classe II ou III selon NYHA	Randomisée, contrôlée par l'effet placebo 22 patients	rhHC	0,1 U (0,033 mg) jusqu'à 0,25 U (0,83 mg)/kg (4 U (1,33 mg)/jour maximum) x 3 mois	Aucun effet bénéfique
(Napoli et al., 2002)	Mixte, DC de classe II ou III selon NYHA	Randomisée, contrôlée par l'effet placebo 16 patients	rhHC	4 U (1,33 mg) x 3 mois	Normalisation de la dysfonction de l'endothélium

Abréviations: NYHA – New York Heart Association; rhHC – HC recombinante humaine; DC – Défaillance cardiaque; FEVG – Fraction d'éjection du VG; CMD – Cardiomyopathie dilatée; U = unités, *1 mg rhGH IRP 88/624 = 3 U (Growth Hormone Research Society, 1997) (traduit et adapté de Marleau et al., 2005)

VG et de 12% de la fraction d'éjection au repos du VG. Ces effets bénéfiques disparaissent après un arrêt de 6 mois de traitement avec l'HC (Amato *et al.*, 1993). La thérapie de remplacement à l'HC induit une augmentation de l'index de la masse et une amélioration de la fonction du VG, ainsi qu'une diminution de la pression diastolique sanguine (Colao *et al.*, 2002a; Cuocolo *et al.*, 1996).

1.4.3.2. Acromégalie

L'acromégalie est une condition clinique caractérisée par une sécrétion excessive et chronique de l'HC (Saccà *et al.*, 1994). L'analyse des causes de mortalité de l'acromégalie indique que près de 60% des patients meurent à la suite de complications cardiaques, 25% de problèmes respiratoires et 15% de tumeurs malignes (Colao *et al.*, 2004b). La cardiomyopathie associée à l'acromégalie se développe en trois stades. Le premier stade, généralement observé chez des patients jeunes, est caractérisé par un index de cinétique (vélocité) du VG très élevé avec une augmentation de la contractilité et du rendement cardiaque (Colao *et al.*, 2002b; Colao *et al.*, 2004b). Le stade intermédiaire se caractérise par une hypertrophie cardiaque concentrique ou eccentric, un remplissage diastolique anormal et une performance cardiaque réduite (Colao *et al.*, 2004b). Le troisième stade est caractérisé par une performance systolique et diastolique diminuée (Colao *et al.*, 2004b). À ce stade, la maladie peut conduire à une IC congestive (Saccà *et al.*, 1994).

Une concentration en HC inférieure à 5 µg/L, associée avec une normalisation des taux de l'IGF-1, réduit les risques de mortalité cardiovasculaire (Holdaway *et al.*, 2004) et améliore la morphologie et la performance cardiaque (Colao *et al.*, 2004b). Les analogues de la somatostatine permettent de normaliser les niveaux plasmatiques de l'HC et de l'IGF-1 et d'améliorer la morphologie et la fonction cardiaque (Tokgozoglul *et al.*, 1994). En effet, Colao *et al.* (2002) ont montré qu'en traitant des patients

avec l'octréotide-LAR (slow release form of octreotide) à des doses comprises entre 20 et 40 mg, par voie intra-musculaire tous les 28 jours pendant six mois, il était possible de réduire les taux de l'HC et d'IGF-1 en plus d'améliorer la performance et la morphologie cardiaques (Colao *et al.*, 2002b).

1.4.3.3. Traitement à l'HC et cardiomyopathie

Le rôle de l'HC dans la régulation de la fonction cardiaque, tel que mis en évidence dans la DHC et de l'acromégalie, a augmenté l'intérêt de l'utilisation pour l'HC comme un traitement alternatif dans l'IC chez les patients atteints de CID (Fazio *et al.*, 1996). Plusieurs études sur des modèles expérimentaux ont été menées dans le but d'explorer les effets de l'HC et/ou de l'IGF-1 sur la fonction cardiaque.

1.4.3.3.1. Modèles expérimentaux

Les investigations initiales concernant les effets de l'HC ont été faites sur des modèles d'IC induite par un IM causé par la ligature de l'artère coronarienne gauche (LACG) (Tableau II). Castagnino *et al.* (1990) ont rapporté qu'un traitement de 3 jours avec l'HC recombinante humaine (rhHC) administrée à une dose de 0,17 mg/kg/jour directement après la ligature coronarienne des rats a des effets positifs sur le remodelage cardiaque en maintenant le réseau de collagène intact (Castagnino *et al.*, 1990). Cependant, les travaux de Bollano *et al.* (2001) n'ont montré aucune différence dans la formation d'anévrisme après un traitement de 9 jours à l'HC à des doses 10 fois plus élevées (Bollano *et al.*, 2001). Des études additionnelles (Tableau II) ont montré des effets bénéfiques d'un traitement immédiat à l'HC sur l'hypertrophie et la fonction cardiaque après une LACG chez le rat. Cittadini *et al.* (1997) ont rapporté une réduction de l'hypertrophie dans la zone non-infarctée du myocarde, de la dilatation du VG et de la résistance vasculaire après un traitement à l'HC de 3 semaines à une dose de 3 mg/kg/jour

Tableau II: Études du traitement à l'HC et/ou à l'IGF-1 sur des modèles expérimentaux de défaillance cardiaque

<i>Premier auteur, date</i>	<i>Espèces</i>	<i>Modèle</i>	<i>Traitement</i>	<i>Dose, durée, début du traitement</i>	<i>Principales observations</i>
			Traitement précoce à l'HC		
<i>(Castagnino et al., 1990)</i>	Rats SD	LACG	rhHC	0,5 U (0,17 mg)* /kg/jour x 3 jours, jour de LACG	Réduction des cas d'anévrisme post-infarctus
<i>(Bollano et al., 2001)</i>	Rats SD	LACG	rhHC	2 mg/kg/jour x 9 jours, 3 jours après opération	Aucun changement des cas d'anévrisme
<i>(Cittadini et al., 1997)</i>	Rats SD	LACG	rhHC	3 mg/kg/jour (2 injections) x 3 semaines, 1 jour après opération	Augmentation de la surface des cardiomyocytes
<i>(Grimm et al., 1998)</i>	Rats Wistar	LACG	rhHC	2 U (0,67 mg) /kg/jour x 4 semaines, après LACG	Amélioration de la fonction cardiaque et réduction du remodelage
<i>(Omerovic et al., 2000)</i>	Rats SD	LACG	rhHC	3 mg/kg/jour x 3 semaines, 3 jours post-infarctus	Amélioration du statut énergétique du myocarde et réduction du remodelage
<i>(Shen et al., 1996)</i>	Rats SD (femelles)	LACG (infarctus > 45% du VG)	rrHC	3,2 mg/kg/jour x 4 semaines, après LACG	Aucun effet bénéfique
			Traitement précoce à l'IGF-1 et/ou à l'HC		
<i>(Duerr et al., 1995)</i>	Rats SD (femelles)	LACG	rhIGF-1	3 mg/kg/jour x 14 jours, 2 jours post-LACG	Hypertrophie ventriculaire
<i>(Jin et al., 2002)</i>	Rats SD	LACG	rhHC et rhIGF-1	2 mg/kg/jour chaque x 14 jours, 20 min post-infarctus	Réduction de la taille de l'infarctus et amélioration de la survie
			Traitement tardif à l'HC et/ou à l'IGF-1		
<i>(Yang et al., 1995)</i>	Rats SD	LACG	rhHC	2 mg/kg/jour x 15 jours, 4 semaines post-infarctus	Amélioration de la fonction cardiaque et réduction de la résistance vasculaire
<i>(Tivesten et al., 2001)</i>	Rats SD	LACG	rhHC rhIGF-1	1,1 mg/kg/jour x 4 semaines ou, 3 mg/kg/jour, 4 semaines post-infarctus	Amélioration de la fonction systolique et réduction de la résistance vasculaire
<i>(Tajima et al., 1999)</i>	Rats SD mâles	LACG	rhHC	3,5 mg/kg/jour x 14 jours, 6 semaines post-infarctus	Amélioration de la contractilité

Abréviations: SD – Sprague Dawley; rhHC – HC recombinante bovine; rhHC – HC recombinante humaine; rrHC – HC recombinante de rat; rhIGF-1 – IGF-1 recombinante humaine; U = unités, 1 mg rhGH IRP 88/624 = 3 U (Growth Hormone Research Society, 1997) (traduit et adapté de Marleau et al., 2005)

(Cittadini *et al.*, 1997). Cependant un traitement avec la rhHC (3 mg/kg/jour pendant 3 semaines) débuté 3 jours après la LACG, atténue le remodelage du VG sans induction de l'hypertrophie de celui-ci chez les rats avec une région infarctée plus large du myocarde (Omerovic *et al.*, 2000).

Des effets bénéfiques d'un traitement combiné IGF-1 et HC débuté immédiatement après l'infarctus ont été rapportés (Tableau II). En effet, Jin *et al.* (2002) ont observé une réduction de 18% de la taille de la zone infarctée accompagnée d'un accroissement du taux de survie de 36% chez des rats dont le traitement de 2 semaines à la rhHC (1 mg/kg/jour) a débuté 20 minutes après l'opération (Jin *et al.*, 2002). Cependant, aucun effet bénéfique n'a été rapporté après un traitement précoce à l'HC recombinante de rat (rrHC) à une dose de 3,2 mg/kg/jour pendant 3 semaines (Shen *et al.*, 1996) ainsi qu'après un traitement à l'IGF-1 recombinante humaine (rhIGF-1) à 3 mg/kg/jour pendant 2 semaines sur des rats ayant subi une LACG (Duerr *et al.*, 1996).

Les effets d'un traitement tardif à l'HC (débuté 4 à 6 semaines après la LACG) ont été rapportés (Tableau II). Tivesten *et al.* (2001) ont observé des effets bénéfiques d'un traitement sur la fonction systolique et la résistance périphérique après un traitement de 2 semaines avec la rhHC (1,1 mg/kg/jour) et/ou la rhIGF-1 (3,0 mg/kg/jour), débutant 4 semaines post-infarctus (Tivesten *et al.*, 2001). Les effets bénéfiques sur la contractilité du VG post-infarctus du myocarde ont été confirmés par des tests *in vitro* sur des cellules isolées de rats traités 4 semaines après LACG avec la rhHC à 3.5 mg/kg/jour pendant 2 semaines (Tajima *et al.*, 1999). Plus récemment, une étude a proposé une autre approche pour palier aux inconvénients de l'administration systémique de l'HC par une injection intramyocardique d'un adénovirus codant pour l'HC humaine 6 semaines après la ligature coronarienne. La production locale de l'HC a permis de préserver la

fonction du VG tout en provoquant une hypertrophie de celui-ci (Jayasankar *et al.*, 2004).

Plusieurs autres études ont utilisé d'autres modèles expérimentaux, tel est le cas de l'étude réalisée dans notre laboratoire avec un modèle génétique de CMD (caractéristiques du modèle détaillées au point 1.5), le hamster cardiomyopathique (HCM) de la lignée UM-X7.1 (Marleau *et al.*, 2002). Ce modèle présente des anomalies héréditaires tant au niveau du muscle cardiaque que du muscle squelettique dues à la mutation du gène codant pour une protéine d'ancrage, le δ -sarcoglycan du complexe de la dystrophine (Sakamoto *et al.*, 1997). Ce modèle mime les différentes étapes de la pathologie humaine, s'échelonnant sur une période d'environ une année et se terminant par une mortalité due à l'IC (Chemla *et al.*, 1991). Dans cette étude, le traitement à l'HC recombinante bovine (rbHC) (1,0 mg/kg/jour) a été débuté soit à 30 jours d'âge, soit à 160 jours d'âge pour se poursuivre jusqu'au sacrifice à 240 jours. L'utilisation de la rbHC a permis de prévenir la formation d'anticorps anti-HC au-delà de 210 jours de traitement. Comparés aux HCM contrôles, le traitement prolongé à l'HC n'a pas permis d'améliorer la fonction du VG. En fait, un traitement prolongé de 210 jours à l'HC a été associé à un effet délétère, avec une réduction de la contractilité de 64%, une hypertrophie, une dilatation, une fibrose extensive et une augmentation de la mortalité (Marleau *et al.*, 2002). Une étude sur une souche de hamsters dérivée de la lignée de UM-X7.1 a montré qu'un traitement avec la rhHC pendant 21 jours n'avait aucun effet bénéfique sur la fonction cardiaque lorsque débuté à dix mois d'âge, comparativement à un traitement débuté à quatre mois d'âge, pour lequel une augmentation de la contractilité a été observée (Ryoke *et al.*, 1999).

1.4.3.4. Traitement avec l'HC chez les patients atteints de CID

Fazio *et al.* (1996) ont été les premiers à réaliser une étude clinique sur les effets de l'HC pour le traitement de CID (Tableau I). En administrant sur une base quotidienne de la rhHC (0,05 mg/kg par semaine sur 3 mois) à un nombre restreint de patients souffrant de CID, ils ont observé une augmentation de l'épaisseur de la paroi du VG et une diminution de la dilatation, permettant de réduire le stress sur la paroi en fin de la systole et d'améliorer le débit cardiaque (Fazio *et al.*, 1996). Avec un groupe plus large de patients souffrants de CMD, Osterziel *et al.* (1998) dans une étude randomisée à double insu et contrôlée pour l'effet placebo, n'ont pu observer des effets bénéfiques après une administration de la rhHC à une dose de 0,67 mg/jour pendant trois mois en dépit d'une augmentation de la masse du VG (Osterziel *et al.*, 1998). De même, Isgaard *et al.* (1998) ont rapporté que le traitement à la rhHC à une dose de 0,033 mg/kg/semaine pour une semaine suivi par un traitement de 0,83 mg/kg/semaine pendant 3 mois chez des patients en défaillance cardiaque d'origine mixte (ischémique et non ischémique) n'améliorait pas la fonction cardiaque (Isgaard *et al.*, 1998).

Une étude à double insu randomisée et contrôlée pour l'effet placebo a été effectuée par Perrot *et al.* (2001) dans le but d'évaluer les effets de l'HC sur la masse du VG, le stress sur la paroi pendant la phase systolique et la fraction d'éjection du VG (Perrot *et al.*, 2001). Les patients ont été divisés et placés aléatoirement afin de recevoir soit 0,67 mg de rhHC par jour, soit le placebo, pendant 12 semaines. Le traitement a provoqué une augmentation de la masse du VG chez les patients traités à l'HC comparé au placebo sans changement du stress sur la paroi. Ils ont aussi observé une relation entre les concentrations de l'IGF-1 dans le sérum chez les patients traités à l'HC et au placebo, et les changements dans la masse du VG.

Une autre étude réalisé sur des patients atteints de CID par Adamopoulos et ses collaborateurs a été faite dans le but d'évaluer les effets de l'HC sur la balance entre les cytokines pro- et anti-inflammatoires et de voir si la réponse immune module la fonction du VG (Adamopoulos *et al.*, 2003). Trois mois de traitement avec 1.33 mg/jour de rhHC a permis d'augmenter le rapport de cytokines anti-inflammatoires (IL-10) sur les cytokines pro inflammatoires (TNF- α et IL-6). Ils ont aussi observé une amélioration de la contractilité, une augmentation de l'épaisseur et une réduction du stress de la paroi ventriculaire gauche. Dans une étude plus récente, ils ont observé que le même traitement pendant la même période, diminue les concentrations circulantes des médiateurs solubles de l'apoptose et que cet effet anti-apoptotique est associé à une meilleure tolérance à l'exercice chez les patients souffrants de défaillance cardiaque congestive et de CID (Parissis *et al.*, 2005).

1.5. DESCRIPTION DU MODÈLE EXPÉRIMENTAL

Le hamster syrien de la lignée de UM-X7.1 dérive de la lignée de Bio14.6 (elle-même dérivée de la lignée polymyopathique initiale Bio1.50). La lignée UM-X7.1 a été développée par le Dr. Gaëtan Jasmin du département de pathologie de l'Université de Montréal. Cette souche possède une mutation du gène du δ -sarcoglycan (Sakamoto *et al.*, 1997) conduisant à la fois à la perte des autres sous-unités sarcoglycanes et du β -dystroglycan (Ikeda *et al.*, 2000). Le complexe transmembranaire dystrophine-glycoprotéine (CDG) sert de lien entre le cytosquelette et la matrice extracellulaire, connectant ainsi l'actine intracellulaire, la dystrophine, les sarcoglycans transmembranaires et les

dystroglycanes avec la lamine- $\alpha 2$ extracellulaire. Le complexe sarcoglycan sert comme stabilisateur moléculaire du CDG et une distribution anormale de la dystrophine peut contribuer à la perte observée de l'intégrité du sarcolemme, laquelle est associée avec une progression précoce de la dysfonction cardiaque chez les HCM (Ikeda *et al.*, 2000). Le hamster UM-X7.1 se développe normalement jusqu'à l'âge de 30-40 jours lorsque commence la nécrose du myocarde, pour atteindre un plateau autour de 60-75 jours. La phase nécrotique est suivie par un remodelage cardiaque caractérisé par un accroissement de dépôts de collagène de type III qui vont surpasser la quantité de collagène de type I (Dixon *et al.*, 1997) tel qu'observé chez l'humain (Weber, 1989). L'hypertrophie cardiaque se développe entre 90 et 120 jours et est considérée comme le stade de pré-défaillance. Cette phase est par la suite accompagnée par une réduction de l'activité ATPase du sarcolemme ainsi que par une réduction de l'entrée du calcium par le réticulum sarcoplasmique en raison d'une réduction de l'activité de SR- Ca^{2+} ATPase dépendant et d'une réduction de l'expression du phosphobolamban, conduisant à une accumulation de Ca^{2+} (Tada & Toyofuku, 1996). Il y a aussi une phase de réparation qui chevauche la phase hypertrophique, conduisant à la phase finale de la dilatation de la chambre et à une réduction de la performance cardiaque (Lazar, 2001). La défaillance cardiaque qui progresse à partir de 120 jours d'âge, est divisée en trois phases, la phase précoce (120 à 160 jours), la phase modérée (160 à 200 jours) et la phase sévère (200 à 240 jours). Chez les HCM avec une défaillance cardiaque sévère, la concentration cardiaque en Ca^{2+} est diminuée et l'amplitude diastolique est élevée comparées à un cœur normal. La dilatation du VG apparaît souvent après 160 jours (Jasmin & Proschek, 1982). Chez les personnes souffrant de la CID, les désordres dans l'homéostasie du calcium sont aussi liés à des changements d'activité ou d'expression de la SR Ca^{2+} -ATPase, du phospholamban et de l'échangeur $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ conduisant à l'accumulation intracellulaire du Ca^{2+} et à une augmentation de la sensibilité au Ca^{2+} , changements qui réduisent la vitesse de la

relaxation (Wolska *et al.*, 1996). De plus, l'activation d'un nombre de protéines kinases diminue, conséquence de la réduction d'AMPc intracellulaire inhibant la phosphorylation de la troponine I et C dans les myofilaments (Stein *et al.*, 1996), donc réduisant la relaxation myocardique. En plus de la perturbation de l'homéostasie du Ca^{2+} dans le myocarde, le dysfonctionnement de la voie β -adrénergique/adénylyl cyclase est amplifiée par une augmentation du turnover de la norépinéphrine, un découplage des récepteurs β 1-adrénergiques de la protéine Gs (St-Onge *et al.*, 1994), et dans la phase terminale de la maladie, par une réduction (ou une régulation négative) de l'expression des récepteurs β -adrénergiques (Kayiga *et al.*, 1991) tel que chez l'humain (Matsui *et al.*, 1995).

1.6. OBJECTIFS DE L'ÉTUDE

Comme nous l'avons déjà mentionné, la CID se manifeste par une dilatation du VG sans augmentation compensatoire de la paroi ventriculaire, ce qui conduit à la détérioration de la fonction cardiaque, notamment une détérioration de la contractilité ventriculaire. Ceci favorise donc le développement de l'IC. À ce jour, seule la transplantation cardiaque permet de sauver les patients atteints de la CID mais cela n'est pas sans difficultés vue la disponibilité des organes, d'où l'intérêt de développer des traitements alternatifs.

L'intérêt de l'HC dans le traitement de l'insuffisance cardiaque en général et de la cardiomyopathie en particulier, provient des observations faites chez des patients déficients en HC pour lesquelles l'HC avait des effets bénéfiques sur la fonction cardiaque. Certaines études expérimentales suggèrent un effet bénéfique sur des modèles de CMD et de cardiomyopathie ischémique.

Des études antérieures réalisées dans notre laboratoire ont montré qu'un traitement prolongé par la rbHC chez des HCM de la lignée de UM-X7.1 n'a pas pu prévenir la progression de la maladie chez les HCM traités pendant 80 (soit à partir de 160 jours) ou 210 jours (soit à partir de 30 jours) (Marleau *et al.*, 2002). Ces hamsters développent la CID à partir de 30 jours jusqu'à manifester une défaillance cardiaque à 160 jours. Une détérioration de la fonction cardiaque a été observée après un traitement de 210 jours. De plus, il a été observé que chez les femelles, le taux de mortalité était très élevé et que le traitement prolongé à la rhHC était délétère.

Dans le but de compléter cette étude, le travail de maîtrise porte sur les effets d'un traitement à la rbHC pendant une courte période de traitement (40 jours) sur le niveau d'expression ventriculaire des PNs et des isoformes α et β des chaînes lourdes de myosine chez les HCM femelles. Le traitement, débuté à 200 jours d'âge qui correspond à la phase de défaillance cardiaque sévère, a aussi pour but d'observer les effets d'un court traitement à la rbHC sur la fonction cardiaque.

Chapitre 2: ARTICLE

**En préparation en vue d'être soumis à la revue *European Journal of
Endocrinology***

**Recombinant bovine growth hormone treatment initiated in terminally ill
UM-X7.1 female cardiomyopathic hamsters is associated with favorable
cardiac remodeling and function**

Mukandila MULUMBA¹, Catia CÉMÉUS¹, Louis DUMONT², Patrick du
SOUICH², Huy ONG^{1,2} and Sylvie MARLEAU¹

¹Faculty of Pharmacy, ²Department of Pharmacology, Faculty of Medicine,
Université de Montréal

Short title: Late GH treatment is associated with favorable cardiac remodeling
to whom correspondence should be addressed:

Dr. Sylvie Marleau

Faculty of Pharmacy

Université de Montréal

P.O.Box 6128, Station Centre-Ville

Montréal, Québec

Canada, H3C 3J7

FAX: 514-343-2102

Email: XXXXXXXXXX

ABSTRACT

Background: In recent years, assessment of the potential benefits of growth hormone (GH) therapy in terminally ill patients suffering from idiopathic dilated cardiomyopathy (IDCM) yielded conflicting results. Experimental studies revealed that chronic treatment with recombinant bovine GH (rbGH) reduced cardiac performance and survival in UM-X.7 cardiomyopathic hamsters (CMH), a model of human IDCM. The present study addresses the effect of short-term (40 days) administration of rbGH on cardiac remodeling and function in female CMH, initiating the treatment in the terminal phase of the disease.

Objective: To assess the potentially beneficial effect of rbGH treatment on ventricular fetal genes expression and myocardial contractility in 240-day-old female CMH.

Design: rbGH (1 mg/kg subcutaneously for 40 days) was administered in 200-day-old female CMH. Age- and sex-matched Golden Syrian hamsters (GSH) were used as controls.

Results: Left ventricular (LV) pressure and its first derivative (LV dp/dt_{max}) were reduced by 33 and 36% in isolated hearts of vehicle-treated female CMH compared with GSH controls, respectively. In contrast, these systolic parameters in rbGH-treated CMH were not significantly different from those of control GSH. These changes were associated with beneficial ventricular remodeling, as shown by a 60% reduction in LV ANP expression and a 50% increase in the low ATPase activity beta-myosin heavy chain (β -MHC) isoform following rbGH treatment.

Conclusions: Our results suggest that short-term treatment with GH in terminally ill CMH is associated with a modest, potentially favorable effect on ventricular remodeling and function.

[238 words]

INTRODUCTION

Salutary effects of growth hormone (GH) replacement therapy on the impaired cardiac performance displayed by patients with GH deficiency (GHD) have been reported (Cuocolo *et al.*, 1996; Tritos & Mantzoros, 1998). In addition, isolated case reports showed that acute and/or short-term GH administration significantly improved systemic hemodynamics and myocardial function in patients with chronic heart failure of either ischemic or idiopathic origin (Cuneo *et al.*, 1989; Frustaci *et al.*, 1992; O'Driscoll *et al.*, 1997). Fazio *et al.* (1996) observed a beneficial effect of a short-term (3 months) treatment with recombinant human GH (rhGH), as shown by an increase in left ventricular (LV) mass and cardiac output (CO), and a reduced norepinephrine secretion and aldosterone plasma levels in seven patients with idiopathic dilated cardiomyopathy (IDCM) (Fazio *et al.*, 1996). The overall improvement of the cardiac status in these patients was associated with improved exercise capacity and myocardial energetics. However, subsequent studies by other investigators, using different dosing regimens and/or duration of GH treatment, gave conflicting results regarding the effects of GH on LV mass and function in patients with IDCM or ischemic cardiac failure (van Thiel *et al.*, 2004; Adamopoulos *et al.*, 2003; Smit *et al.*, 2001).

A well-documented experimental model of human IDCM is the UM-X7.1 Syrian cardiomyopathic hamsters (CMH), which features a slow progression of the disease towards heart failure and other traits of the human disease (Jasmin & Proschek, 1982; Jasmin & Eu, 1979). A chronic (210 days) administration of GH at a dose of 1 mg/kg, initiated from an early stage of the disease in CMH was detrimental, as shown by a depressed myocardial contractility and a reduced survival rate, particularly in female hamsters (Marleau *et al.*, 2002). In contrast,

when initiating GH treatment in 160-day-old CMH, an age at which most hamsters presented with ventricular dilatation and/or mild cardiac failure, a modest increase in LV contractility was observed at 240-day-old (Marleau *et al.*, 2002). Ryoke *et al.* (1999) (Ryoke *et al.*, 1999) reported that a short-term (3 weeks) administration of rhGH at a dose of 2 mg/kg twice daily in 4- and 10-month old CHF 147, a UM-X7.1 derivative strain of CMH, had favorable effects on myocardial function and hemodynamics in 4-month old CMH. However, the modest beneficial effects of this high dose regimen of GH in 10-month old CMH were questioned, in view of the elevation of the LV end-diastolic pressure in these older animals.

Along with chronic cardiac deterioration, changes in the pattern of expression of genes belonging to the embryogenic gene program have been observed in cardiomyopathic hearts (Hongo *et al.*, 2000). Hongo *et al.* (Hongo *et al.*, 2000) showed that a short-term (2 weeks) treatment with GH in cardiomyopathic mice presenting LV dilation and dysfunction secondary to the disruption of the muscle LIM protein (MLP), was associated with an improved cardiac performance, and with a down-regulated expression of natriuretic peptides in the left ventricle.

In the present study, we took advantage of the use of recombinant bovine GH (rbGH), which shares a high sequence homology with the hamster GH, to study the effect of GH administration during a 40-day period, avoiding problems related to the development of anti-GH antibodies which occurs following continuous administration of rhGH for periods exceeding 3 weeks (Groesbeck & Parlow, 1987). Our main objective was to assess the effect of short-term (40 days) administration of GH on cardiac performance and ventricular remodeling in terminally-ill (200-day-old) female CMH. The latter, under our breeding conditions,

appear to develop a uniformly more severe symptomatology than males. Female CMH were administered a fixed dose of 1 mg rbGH/kg daily from day 200 after birth until death at day 240. LV gene expression of ANP and BNP, as well as expression of the myocardial energetic biomarkers, α - and β -myosin heavy chain isoforms (MHC) were assessed. The present study demonstrates that 40-day rbGH treatment elicits beneficial ventricular remodeling as shown by a reduced LV expression of ANP and an up-regulation of the low ATPase activity β -MHC, in addition to modestly improving cardiac performance in terminally ill female CMH.

MATERIALS AND METHODS

Animals

The experiments were conducted in female CMH of the UM-X7.1 subline (L. Dumont, Dept. of Pharmacology, Faculty of Medicine, Université de Montréal) and sex and age-matched Golden Syrian hamsters (GSH) (Charles River, St-Constant, Québec). The animals were housed in cages (less than 5 per cage) and fed with a standard chow diet and water *ad libitum*. Thirty-nine female CMH were randomly assigned to either the vehicle (n = 20) or rbGH (n = 19) groups. Daily subcutaneous injections of GH or 0.9% NaCl (vehicle) were initiated in 200-day-old hamsters until sacrifice (240-day-old). The animal study protocol was reviewed and approved by the institutional Animal Ethics Committee of the Université de Montréal and conducted in accordance with the Canadian Council on Animal Care guidelines for use of experimental animals.

GH preparations

rbGH was kindly provided by Monsanto, St-Louis, Missouri. Stock solutions of rbGH (10 mg/ml) were prepared by adding sterile water to the lyophilized rbGH. One-milliliter aliquots were frozen at -80°C . One aliquot was diluted 1/10 with 0.9% NaCl and kept for a maximum of 7 days at 4°C , and used for daily injections, administered between 08:00 h and 11:00 h. Long-term activity of rbGH preparations in hamsters has been assessed by monitoring serum IGF-1 levels at sacrifice and weight gain throughout the study period. As reported previously, rbGH shares a high sequence homology with the hamster GH sequence (86%), thereby avoiding the appearance of anti-bovine GH antibodies during long-term GH therapy (Marleau *et al.*, 2002).

Systolic function

A minimum of 5 (GSH) and 7 (CMH) hearts were used to assess systolic function according to the Langendorff's method. At 240 days, hamsters were anesthetized with chloral hydrate (30 mg/100 g i.p.) 30 minutes after the morning dose of rbGH (or vehicle) followed by 1,000 IU of heparin intraperitoneally. One ml of blood was taken from the jugular vein and the heart superfused with cold saline while the aorta was isolated and the heart rapidly dissected out. The hearts were retrogradely perfused with oxygenated modified Krebs-Ringer buffer (Ca^{2+} , 1.25 mM) at 37°C at a pressure of 140 cm of H_2O . A latex balloon (#5 or 6, Hugo-Sachs Elektronik, Germany) was introduced into the left ventricle through the left atrium and connected to a pressure transducer. The hearts were permitted to beat freely during a 15-min stabilization period. LV systolic and diastolic pressures were obtained with the ventricular balloon filled with 0.9% NaCl to obtain a diastolic

pressure of 5 mm Hg. LV pressure was computed as systolic minus diastolic pressure. After a 15 min equilibration period, the LV pressure, its first derivative, $LV + dP/dt_{max}$, and heart rate were recorded with a Grass recorder (Model 7400, Astro-Med Inc. West Warwick, RI). Once the isovolumetric pressures were recorded, the hearts were arrested in diastole by infusing a solution of potassium chloride (20 mM). The isolated heart model allows assessment of intrinsic ventricular performance without systemic influences (Cittadini *et al.*, 1997b; Doring, 1990).

Serum IGF-1 measurement

Serum was obtained from the blood and frozen at -20°C until assayed for measurement of IGF-1 levels. Serum concentrations of IGF-1 were determined by RIA on hydrochloric acid-ethanol extracts using radiolabelled human IGF-1 (Nichols Institute Diagnostic, San Juan Capistrano, CA). The assay was performed according to manufacturer's instructions.

Serum ANP and BNP measurement

Serum immunoreactive (IR) ANP was assayed as described previously (Hogg, 1992). Hamster BNP was synthesized by Biochem ImmunoSystems Inc. (Laval, Québec, Canada). IR-hamster BNP was quantified by a direct RIA assay using rabbit anti-rat BNP antibody generated in house by coupling hamster BNP to BSA using glutaraldehyde as a crosslinking agent as described previously (Marleau *et al.*, 1991). Briefly, 100 μl aliquot was incubated overnight at 4°C with 100 μl buffer (0.019 M NaH_2PO_4 , 0.081 M Na_2HPO_4 , 0.05 M NaCl , 0.1 % BSA, 0.1 % Triton X-100, 0.02% NaN_3 , pH 7.4) or standards and 100 μl of anti-BNP (1/75 000). [^{125}I]BNP (15 000 cpm) was added after 24 h and incubated

overnight. BNP standards from hamster were incubated in the presence of 100 μ l BNP-free hamster serum. Separation of free and bound fractions was achieved by the addition of 1 ml of 12% PEG 8000 and goat anti-rabbit γ globulins (1/125). Radioactivity in the pellet was determined in a gamma counter. The typical standard curve analyzed by non-linear regression, was characterized by a slope factor of 1.16 ± 0.07 , an ED_{50} of 41.6 ± 0.9 pg/tube, a maximal binding of [125 I]BNP of 23.3% and a minimal detectable dose of 3.4 pg/tube. Intra- and inter-assay coefficients of variation were 9% (at a concentration of 24.5 pg/tube) and 12%, respectively.

LV expression of natriuretic peptides and MHC isoforms

Total LV RNA was extracted with Trizol LS reagent (Invitrogen) according to the manufacturer's instructions. Total RNA (1 μ g) was reverse transcribed with 20 U M-MLV Reverse Transcriptase (Invitrogen) and random primers (250 ng/ μ l) at 37°C for 2 hours in a total volume of 20 μ l containing 50 mM Tris-HCl pH 8.3, 75 mM KCl, 3 mM MgCl₂, 10 mM DTT and 0.5 mM dNTP. Samples were divided in 2 μ L aliquots and stored at -20°C until PCR. After sample denaturation at 95°C for 5 minutes, PCR amplification was performed in a volume of 50 μ l with 2 μ l of reverse transcription reaction and 0.4 μ M of each specific primer using 2.5 U of Taq DNA polymerase (Invitrogen). Cycling conditions for ANP were 23 cycles at 94°C for 1.5 min; 60°C for 1 min and 72°C for 2 min; for BNP, 33 cycles at 94°C for 1 min; 65°C for 1 min and 72°C for 3 min; for α -MHC, 21 cycles at 94°C for 1.5 min; 60°C for 1.5 min and 72°C for 3 min; and for β -MHC, 29 cycles at 94°C for 1 min; 53°C for 1 min and 72°C for 1.5 min. PCR products were separated on 1.5% agarose gel, and the relative signal intensity was measured with an image analyzer (Alpha Imager, Alpha Innotec, San Leandro, CA). All values were normalized against GAPDH.

The primer sequences and the expected product size were as follows: hamster ANP, sense primer : 5'-CTG ATG GAT TTC AAG AAC CTG CTG GAC TCC-3', antisense primer : 5'-CTG TTA TCT TCG GTA CCG GAA GCT GTT ACA TCC-3' (359 bp); hamster BNP, sense primer : 5'-CCA CCA CAG CAG CCT GGC CCA TCA ATT CTG-3', antisense primer : 5'-GAA TGA GCC GAT TCT GTC -3' (367 bp); hamster α -MHC, sense primer : 5'-GGA GGA GTG AGC GGC GCA TCA AGG-3', antisense primer : 5'-CTG CGG GCA GCA TCA TTC TTC ATC G-3' (302 bp); hamster β -MHC, sense (5'-CCT ATC CAA GGC CAA CTC AG-3'), anti-sense (5'-CCA GTT GCT TTC GGA TCT TC-3'); and murine GAPDH, (Clonotech, Palo Alto, CA).

Statistical analysis

Data are expressed as mean \pm SEM. Comparisons between groups were performed using a one-way analysis of variance (ANOVA) followed by pair-wise multiple comparisons using the Student-Newman-Keuls method. Growth curves were analyzed using repeated-measures ANOVA followed by the Dunnett's post-test. Differences were considered significant at $p < 0.05$.

RESULTS

Survival rate in CMH and GSH

In the vehicle-treated CMH group, one hamster died before initiating treatment and two additional hamsters died (unknown cause) before the end of the experimental period, at 221- and 231-day-old, respectively. In the GH-treated

group, two hamsters died (unknown cause) before initiating treatment (< 200-day-old), one at 221-day-old and one at 235-day-old, probably secondary to heart failure. In addition, one CMH in the GH-treated group died following anesthesia.

Effect of rbGH on body and heart weight and IGF-1 serum levels

240-day-old female CMH-treated with 0.9% NaCl had reduced body weight compared with their GSH controls (Table 1). Compared to the body weight of vehicle-treated CMH, the cumulative mean body weight (up to 235 days old) of CMH treated daily with rbGH for 40 days showed a significant increase (Fig. 1).

Heart weight increased in proportion with body weight in both GSH and CMH following GH treatment inasmuch as the heart to body weight ratios were not significantly different (Table 1).

Basal serum IGF-1 concentrations were higher in vehicle-treated GSH than in vehicle-treated CMH by ~2-fold, 865 ± 57 ng/ml and 456 ± 29 ng/ml ($P < 0.001$), respectively. GH treatment did not further elevate IGF-1 serum concentrations in female CMH (500 ± 22 ng/ml), as reported previously (Marleau *et al.*, 2002). No anti-bovine GH antibodies were detected in GSH or CMH sera following GH treatment (data not shown).

Systolic function

Isolated heart preparations from 240-day-old untreated CMH had depressed cardiac contractility, as shown by a 36% ($P < 0.05$) decrease in LV dP/dt_{max} (Table 1). A similar tendency was observed for LVP. In addition, vehicle-treated CMH had a lower heart rate (24%, $P < 0.05$) compared with GSH controls. Treatment with

rbGH, initiated in 200 day-old CMH for a period of 40 days, elevated these systolic parameters towards control GSH values (Table 1).

Histologic evaluation

Myocardial fibrosis in 240-day-old untreated CMH was extensive, accounting for ~35% of total surface area, as reported previously (Marleau *et al.*, 2002). The extent of fibrosis was not significantly modulated following a 40-day treatment period with rbGH in terminally-ill female CMH (data not shown).

Circulating levels and ventricular expression of natriuretic peptides

As illustrated in Fig. 2A, ANP levels in serum were elevated by 8.5-fold in vehicle-treated CMH female compared with vehicle-treated GSH female (431 ± 34 pg/ml and 51 ± 8 pg/ml respectively, $P < 0.001$). BNP circulating levels were also increased by 8.7-fold, from 102 ± 15 pg/ml to 891 ± 85 pg/ml ($P < 0.001$) in vehicle-treated GSH and CMH, respectively (Fig 2B). rbGH administration in 200-day-old CMH for 40 days did not significantly modulate the circulating levels of natriuretic peptides. Along with elevated serum levels, ANP mRNA levels in the left ventricle were significantly increased by ~3-fold in vehicle-treated CMH compared with control GSH (Fig. 3A). In contrast, ventricular BNP expression in control CMH did not differ significantly from vehicle-treated GSH. rbGH treatment induced a striking reduction in LV ANP mRNA levels compared to vehicle-treated CMH (Fig.3A). In contrast, BNP mRNA levels (Fig. 3B) were not modulated by rbGH treatment.

Ventricular expression of α and β -MHC

Ventricular expression of β -MHC was not significantly increased in hearts from untreated CMH compared with GSH (Fig 4A). However, LV β -MHC mRNA levels were increased by ~50% in CMH treated with rbGH for 40 days compared to vehicle-treated CMH. Expression of α -MHC in the left ventricle was not modulated by the disease state, nor by rbGH treatment (Fig. 4B).

DISCUSSION

Dilated cardiomyopathy is a primary degenerative myocardial disorder associated with an altered LV geometry characterized by ventricular dilatation that is unaccompanied by compensatory wall thickening, followed by systolic (and/or diastolic) dysfunction of the ventricles (Mohan *et al.*, 2002). Disease progression is associated with an increase in wall stress and deterioration of myocardial energetics, leading to hemodynamic sequelae and left or biventricular failure. Most cases are of idiopathic origin, although some have been associated with selected gene defects, including δ -sarcoglycan and dystrophin (Michels *et al.*, 2003). Mutation in δ -sarcoglycan, leading to a disruption of the dystrophin-associated glycoprotein complex, has been associated with both cardiac and skeletal muscle abnormalities in both humans and UM-X7.1 CMH, a subline of the original BIO 14.6 strain of the Bio-Research Institute (Cambridge, MA) established at the Université de Montréal (Jasmin & Eu, 1979; Jasmin & Proschek, 1982; Michels *et al.*, 2003; Sakamoto *et al.*, 1997; Straub *et al.*, 1998). For over 30 years, the CMH genetic model has been widely used and shown to feature traits of the human disease, including similar hemodynamic profiles, diffuse fibrosis that is substantially greater in the epicardium than the endocardium, leading to early myolysis and calcification, cardiac hypertrophy,

ventricular dilatation and ultimately resulting in death through cardiac failure (Gertz, 1972; Cabrera, 1999; Jasmin & Eu, 1979; Jasmin & Proschek, 1982). This model provides unique possibilities of studying the effect of pharmacological treatments on disease progression.

As of yet, the prognosis of patients with IDCM is poor and this disease remains the major indication for heart transplantation in USA (Mohan *et al.*, 2002). Benefits of GH therapy have been exemplified initially in patients with GH deficiency, for which GH substitution resulted in an increase of ventricular wall mass, an improvement of cardiac function and a reduction of vascular resistance (Jorgensen *et al.*, 1989; ter Maaten *et al.*, 1999). However, the effect of GH treatment in patients with chronic heart failure of different etiologies, including IDCM, led to conflicting results (Isgaard *et al.*, 1998; Fazio *et al.*, 1996; Osterziel *et al.*, 1998; Smit *et al.*, 2001).

Beneficial effects of short-term (2 – 4 weeks) GH administration have been reported in several experimental heart failure settings in rats, with enhanced myocardial contractility, reduced left ventricular end-diastolic pressure (LVEDP) and peripheral resistance (Jin *et al.*, 1995; Yang *et al.*, 1995; Cittadini *et al.*, 1997a; Hongo *et al.*, 1998) as well as reduced cardiac gene expression associated with pathological remodelling (Jin *et al.*, 2002). Beneficial effects have also been found after a combined IGF-1 and GH treatment in experimental heart failure (Duerr *et al.*, 1996). Advantages of GH therapy in non-ischemic experimental models of heart failure are less apparent. For instance, Shen *et al.* (Shen *et al.*, 1998) did not observe an improvement in LV function or systemic vascular dynamics following 4 weeks treatment with porcine GH in dogs, in spite of a significant rise in body weight and IGF-1 levels. In contrast, administration of rhGH at a dose of 8 mg/kg twice daily for 2 weeks in a genetic murine model of dilated cardiomyopathy, led to an improved cardiac performance associated with

a reduction in LV mRNA expression of natriuretic peptides (Hongo *et al.*, 2000). In CMH ~300-day old presenting systolic and diastolic dysfunction, the modest beneficial effects GH administration (2 mg/kg twice a day x 21 days) contrasted with the favourable effects observed in CMH ~ 120 d old CMH treated with the same regimen (Ryoke *et al.*, 1999).

In contrast to the limitations of previous studies using recombinant GH of human source in rodents, the lack of anti-GH antibodies formation using the bovine source allowed study the effect of daily injections of GH for extended periods (Marleau *et al.*, 2002). In the present study, rbGH was administered daily at a fixed dose of 1 mg/kg/d, starting in the terminal (cardiac failure) stage of the disease until sacrifice at 240 days of age. This dose of GH is relatively modest compared to that used in experimental heart failure models (2-4 mg/kg/d) and was selected on the basis of previous dose-response studies as well as for its tropic effect throughout the experimental period (Fig. 1). This dose of rbGH did not increase the mortality rate and improved ventricular function in 240 days old female CMH (data not shown). In contrast, hearts from female hamsters treated with vehicle showed markedly depressed myocardial contractility, as both LV developed pressure and LV +dP/dtmax were reduced by ~50% compared with GSH. In addition, female CMH had a reduced heart rate compared with GSH. Altogether, these observations may be a consequence of the autonomic imbalance associated with decreased β -adrenergic receptor-mediated responses in this model (Kaura *et al.*, 1996). In agreement with our results, GH treatment (2 mg/kg x 21 d) in UM-X7.1 (~ 140-day old) improved LV systolic function, but did not prevent structural damage of myocytes, possibly as a consequence of reduced myocardial loss of sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} by GH (Ueyama *et al.*, 1998).

In addition, we investigated the effects of a short-term (40 days) administration of GH in 200-day-old CMH on the expression of selected genes of the embryonic cardiac gene program known to be induced during the myocardial hypertrophic response, including genes for fetal contractile proteins (α - and β -MHC) and of the natriuretic peptides, ANP and BNP (Chien *et al.*, 1991; Gidh-Jain *et al.*, 1998; Cameron & Ellmers, 2003). Induction of natriuretic peptides genes in the heart, along with elevated plasma levels, have been ascribed a diagnostic value of clinical severity in patients with heart failure (Suzuki *et al.*, 2001; Kitaoka *et al.*, 2001; McDonagh *et al.*, 2001; Hirata *et al.*, 2001), including those with IDCM (Fruhwald *et al.*, 1999). In 32 week-old CMH of the BIO 14.6 strain, both ANP and BNP plasma levels were elevated several fold, with BNP surpassing ANP levels by \sim 3-fold. In agreement, we found that BNP serum levels were elevated by \sim 2-fold compared to ANP levels in female UM-X7.1 CMH (Fig.2). ANP concentrations in serum were strikingly elevated by 8-fold in CMH compared with GSH (Fig.2). In a similar manner, circulating BNP levels was increased by 9-fold compared to GSH. These results are in agreement with the results of Carnio *et al.* (Cárnio *et al.*, 1997). Neither ANP nor BNP serum levels were significantly modulated by GH administration. A possible explanation for these observations could be that the hemodynamic status of these animals prevented peptide disposition.

LV ANP mRNA levels were found to be elevated in female CMH in agreement with an increased mRNA expression associated with disease progression (Thibault *et al.*, 1989). In contrast to ANP, BNP expression in the left ventricle was not significantly elevated CMH (Fig. 3). This could be related to the differential regulation of ANP and BNP ventricular expression in heart failure for which compensated heart failure is associated with increased LV ANP mRNA whereas BNP mRNA levels are unchanged (Langenickel *et al.*, 2000). In contrast, BNP mRNA levels are largely induced in overt heart failure while ANP mRNA

levels do not exceed those observed in compensated heart failure. In the present study, GH treatment induced a striking reduction in the LV expression of ANP. A similar tendency was observed following short-term GH treatment in 4- and 10-month old CMH (Ryoke *et al.*, 1999), as well as in the MLP-deficient cardiomyopathic mouse (Hongo *et al.*, 2000) and in rats after acute myocardial infarction (Jin *et al.*, 2002). The reduction in LV ANP fetal gene expression may be a consequence of improved cardiac performance and attenuation of LV remodelling, as suggested by others (Jin *et al.*, 2002).

Nevertheless, both experimental and clinical studies clearly point out the importance of timing and duration of GH treatment to assess its effect on myocardial function. In rodents, including healthy young hamsters, the α -MHC (V1 fast ATPase isoform) predominates in both right and left ventricles, with a shift towards the V3 slow ATPase isoform (β -MHC) with increasing age (Minieri *et al.*, 1999). Progressive deterioration of cardiac performance in CMH has also been associated with an accelerated down-regulation of α -MHC and a concomitant up-regulation of the more energetically favorable β -MHC fetal isoform in ventricular tissue (Minieri *et al.*, 1999). Our results show a significant increase in the LV expression of β -MHC in GH-treated female CMH (fig. 4). In accordance with these results, chronic high levels of GH have been associated with myosin phenoconversion towards the low ATPase isoform, thereby inducing a unique pattern associated with an increased economy of isometric force development in CMH (Ueyama *et al.*, 1998).

Overall, our results show that a short-term treatment of female CMH with rbGH, initiated in the terminal phase of the disease, is associated with an improved cardiac performance and favorable ventricular remodelling. These results suggest that selected patients awaiting cardiac transplantation may benefit from GH

administration at an optimal dose and duration of treatment, requiring continuous individual assessment.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by Pharmacia-Upjohn and the Heart and Stroke Foundation of Quebec.

Recombinant bovine GH was kindly supplied by Monsanto Company (St-Louis, MO). The authors are grateful to Mrs Lucie Héroux for excellent technical assistance.

Table 1. Cardiac characteristics and function in 240-day-old female hamsters following treatment with vehicle or rbGH (1 mg/kg per day) for 40 days

	GSH	CMH	CMH
	0.9% NaCl	0.9% NaCl	rbGH
Body weight (BW) (g)	181 ± 5	139 ± 5 ^b	162 ± 8 ^c
Heart weight (HW) (g)	0.83 ± 0.04	0.90 ± 0.05	0.94 ± 0.12
HW/BW (mg/g)	4.61 ± 0.19	6.39 ± 0.42 ^d	6.58 ± 0.15
LV dP/dt _{max} (mm Hg)	807 ± 54	518 ± 66 ^e	599 ± 49
LVP (mm Hg)	43 ± 4	29 ± 4	33 ± 2
Heart rate (bpm)	185 ± 9	140 ± 9 ^e	152 ± 13

^aBody weight at sacrifice; ^bP < 0.001, ^dP < 0.01, ^eP < 0.05 (control CMH compared to control GSH); ^cP < 0.001 (rbGH-treated CMH compared to control CMH)

REFERENCES

ADAMOPOULOS S., PARISSIS J.T., PARASKEVAIDIS I., KARATZAS D., LIVANIS E., GEORGIADIS M., KARAVOLIAS G., MITROPOULOS D., DEGIANNIS D. & KREMASTINOS D.T. (2003) Effects of growth hormone on circulating cytokine network, and left ventricular contractile performance and geometry in patients with idiopathic dilated cardiomyopathy. *Eur.Heart J.* **24**, 2186-2196.

CABRERA J.R. (1999) Idiopathic dilated cardiomyopathy. Elastic parallel element dysfunction as a physiological hypothesis for ventricular failure. *Medical Hypotheses* **53**, 260-262.

CAMERON V.A. & ELLMERS L.J. (2003) Minireview: Natriuretic peptides during development of the fetal heart and circulation. *Endocrinology* **144**, 2191-2194.

CÁRNIO E.C., JANKOWSKI M., MUKADDAM-DAHER S., GORSKA I., ANTUNES-RODRIGUES J. & GUTKOWSKA J. (1997) Elevated levels of natriuretic peptides in lungs of hamsters with genetic cardiomyopathy. *Regul.Peptides* **70**, 67-73.

CHIEN K.R., KNOWLTON K.U., ZHU H. & CHIEN S. (1991) Regulation of cardiac gene expression during myocardial growth and hypertrophy: molecular studies of an adaptive physiologic response. *FASEB J.* **5**, 3037-3046.

CITTADINI A., GROSSMAN J.D., NAPOLI R., KATZ S.E., STRÖMER H., SMITH R.J., CLARK R., MORGAN J.P. & DOUGLAS P.S. (1997a) Growth hormone attenuates early left ventricular remodeling and improves cardiac

function in rats with large myocardial infarction. *J.Am.Coll.Cardiol.* **29**, 1109-1116.

CITTADINI A., STROMER H., VATNER D.E., GROSSMAN J.D., KATZ S.E., CLARK R., MORGAN J.P. & DOUGLAS P.S. (1997b) Consequences of growth hormone deficiency on cardiac structure, function, and beta-adrenergic pathway: studies in mutant dwarf rats. *Endocrinology* **138**, 5161-5169.

CUNEO R.C., WILMSHURST P., LOWY C., MCGAULEY G. & SONKSEN P.H. (1989) Cardiac failure responding to growth hormone. *Lancet* **1**, 838-839.

CUOCOLO A., NICOLAI E., COLAO A., LONGOBARDI S., CARDEI S., FAZIO S., MEROLA B., LOMBARDI G., SACCÀ L. & SALVATORE M. (1996) Improved left ventricular function after growth hormone replacement in patients with hypopituitarism: assessment with radionuclide angiography. *Eur.J.Nucl.Med.* **23**, 390-394.

DORING H.J. (1990) The isolated perfused heart according to Langendorff: technique - function - application. *Physiol.Bohemoslov* **39**, 481-504.

DUERR R.L., MCKIRNAN M.D., GIM R.D., CLARK R.G., CHIEN K.R. & ROSS J., Jr. (1996) Cardiovascular effects of insulin-like growth factor-1 and growth hormone in chronic left ventricular failure in the rat. *Circulation* **93**, 2188-2196.

FAZIO S., SABATINI D., CAPALDO B., VIGORITO C., GIORDANO A., GUIDA R., PARDO F., BIONDI B. & SACCÀ L. (1996) A preliminary study of growth hormone in the treatment of dilated cardiomyopathy. *N.Engl.J.Med.* **334**, 809-814.

FRUHWALD F.M., FAHRLEITNER A., WATZINGER N., FRUHWALD S., DOBNIG H., SCHUMACHER M., MAIER R., ZWEIKER R. & KLEIN W.W.

(1999) Natriuretic peptides in patients with diastolic dysfunction due to idiopathic dilated cardiomyopathy. *Eur.Heart.J.* **20**, 1415-1423.

FRUSTACI A., PERRONE G.A., GENTILONI N. & RUSSO M.A. (1992) Reversible dilated cardiomyopathy due to growth hormone deficiency. *Am.J.Clin.Pathol.* **97**, 503-511.

GERTZ E.W. (1972) Cardiomyopathic Syrian hamster: a possible model of human disease. *Prog.Exp.Tumor Res.* **16**, 242-260.

GIDH-JAIN M., HUANG B., JAIN P., GICK G. & EL-SHERIF N. (1998) Alterations in cardiac gene expression during ventricular remodeling following experimental myocardial infarction. *J.Mol.Cell Cardiol.* **30**, 627-637.

GROESBECK M.D. & PARLOW A.F. (1987) Highly improved precision of the hypophysectomized female rat body weight gain bioassay for growth hormone by increased frequency of injections, avoidance of antibody formation, and other simple modifications. *Endocrinology* **120**, 2582-2590.

HIRATA Y., MATSUMOTO A., AOYAGI T., YAMAOKI K., KOMURO I., SUZUKI T., ASHIDA T., SUGIYAMA T., HADA Y., KUWAJIMA I., NISHINAGA M., AKIOKA H., NAKAJIMA O., NAGAI R. & YAZAKI Y. (2001) Measurement of plasma brain natriuretic peptide level as a guide for cardiac overload. *Cardiovasc.Res.* **51**, 585-591.

HOGG N. (1992) Leukocyte integrin activation. *C.R.Acad.Sci.Paris* **314 (série III)**, 39-43.

HONGO M., RYOKE T., SCHOENFELD J., HUNTER J., DALTON N., CLARK R., LOWE D., CHIEN K. & ROSS J., Jr. (2000) Effects of growth hormone on cardiac dysfunction and gene expression in genetic murine dilated cardiomyopathy. *Basic Res.Cardiol.* **95**, 431-441.

HONGO M., SENTIANIN E.M., TANAKA N., MAO L., WON W., MCKIRNAN M.D., CARK R.G., CHIEN K.R. & ROSS J., Jr. (1998) Angiotensin II blockade followed by growth hormone as adjunctive therapy after experimental myocardial infarction. *J.Cardiac Failure* **4**, 213-224.

ISGAARD J., BERGH C.-H., CAIDAHN K., LOMSKY M., HJALMARSON Å. & BENGTSSON B.-Å. (1998) A placebo-controlled study of growth hormone in patients with congestive heart failure. *Eur.Heart J.* **19**, 1704-1711.

JASMIN G. & EU H.Y. (1979) Cardiomyopathy of hamster dystrophy. *Ann.NY Acad.Sci.* **317**, 46-58.

JASMIN G. & PROSCHEK L. (1982) Hereditary polymyopathy and cardiomyopathy in the syrian hamster. I. Progression of heart and skeletal muscle lesions in the UM-X7.1 line. *Muscle & Nerve* **5**, 20-25.

JIN H., YANG R., GILLET N., CLARK R.G., KO A. & PAONI N.F. (1995) Beneficial effects of growth hormone and insulin-like growth factor-1 in experimental heart failure in rats treated with chronic ACE inhibition. *J.Cardiovasc.Pharmacol.* **26**, 420-425.

JIN H., YANG R., LU H., OGASAWARA A.K., LI W., RYAN A., PEALE F. & PAONI N.F. (2002) Effects of early treatment with growth hormone on infarct size, survival, and cardiac gene expression after acute myocardial infarction. *Growth Horm.IGF Res.* **12**, 208-215.

JORGENSEN J.O., PEDERSEN S.A., THUESEN L., JORGENSEN J., INGEMANN-HANSEN T., SKAKKEBAEK N.E. & CHRISTIANSEN J.S. (1989) Beneficial effects of growth hormone treatment in GH-deficient adults. *Lancet* **1**, 1221-1225.

KAURA D., TAKEDA N., SETHI R., WANG X., NAGANO M. & DHALLA N.S. (1996) Beta-adrenoceptor mediated signal transduction in congestive heart failure in cardiomyopathic (UM-X7.1) hamsters. *Mol.Cell.Biochem.* **157**, 191-196.

KITAOKA H., HITOMI N., YABE T., FURUNO T. & DOI Y.L. (2001) Cardiovascular events and plasma atrial natriuretic peptide level in patients with hypertrophic cardiomyopathy. *Am.J.Cardiol.* **87**, 1318-1320.

LANGENICKEL T., PAGEL I., HÖHNEL K., DIETZ R. & WILLENBROCK R. (2000) Differential regulation of cardiac ANP and BNP mRNA in different stages of experimental heart failure. *Am.J.Physiol.Heart Circ.Physiol.* **278**, H1500-H1506

MARLEAU S., LAPOINTE N., MASSICOTE J., CÉMÉUS C., JASMIN G., DUMONT L., SIROIS M.G., ROULEAU J.L., DU SOUICH P. & ONG H. (2002) Effect of chronic treatment with bovine recombinant growth hormone on cardiac dysfunction and lesion progression in UM-X7.1 cardiomyopathic hamsters. *Endocrinology* **143**, 4846-4855.

MARLEAU S., NGUYEN T.-T., DU SOUICH P., BELLEMARE M., DE LÉAN A. & ONG H. (1991) Role of the endopeptidase 24.11 in the disposition and metabolism of endogenous atrial natriuretic factor in the rabbit. *Drug Metab.Disp.* **19**, 194-199.

MCDONAGH T.A., CUNNINGHAM A.D., MORRISON C.E., MCMURRAY J.J.V., FORD I., MORTON J.J. & DARGIE H.J. (2001) Left ventricular dysfunction, natriuretic peptides, and mortality in an urban population. *Heart* **86**, 21-26.

MICHELS V.V., DRISCOLL D.J., MILLER F.A., OLSON T.M., ATKINSON E.J., OLSWOLD C.L. & SCHAID D.J. (2003) Progression of familial and non-familial dilated cardiomyopathy: long term follow-up. *Heart* **89**, 757-761.

MINIERI M., FIACCAVENTO R., CAROSELLA L., PERUZZI G. & DI NARDO P. (1999) The cardiomyopathic hamster as model of early myocardial aging. *Mol.Cell.Biochem.* **198**, 1-6.

MOHAN S.B., PARKER M., WEHBI M. & DOUGLASS P. (2002) Idiopathic dilated cardiomyopathy: a common but mystifying cause of heart failure. *Cleveland Clin.J.Med.* **69**, 481-487.

O'DRISCOLL J.G., GREEN D.J., IRELAND M., KERR D. & LARBALESTIER R.I. (1997) Treatment of end-stage cardiac failure with growth hormone. *Lancet* **349**, 1068

OSTERZIEL K.J., STROHM O., SCHULER J., FRIEDRICH M., HÄNLEIN D., WILLENBROCK R., ANKER S.D., POOLE-WILSON P.A., RANKE M.B. & DIETZ R. (1998) Randomised, double-blind, placebo-controlled trial of human recombinant growth hormone in patients with chronic heart failure due to dilated cardiomyopathy. *Lancet* **351**, 1233-1237.

RYOKE T., GU Y., MAO L., HONGO M., CLARK R.G., PETERSON K.L. & ROSS J., Jr. (1999) Progressive cardiac dysfunction and fibrosis in the cardiomyopathic hamster and effects of growth hormone and angiotensin-converting enzyme inhibition. *Circulation* **100**, 1734-1743.

SAKAMOTO A., ONO K., ABE M., JASMIN G., EKI T., MURAKAMI Y., MASAKI T., TOYO-OKA T. & HANAOKA F. (1997) Both hypertrophic and dilated cardiomyopathies are caused by mutation of the same gene, δ - sarcoglycan, in hamster: an animal model of disrupted dystrophin-associated glycoprotein complex. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* **94**, 13873-13878.

SHEN Y.-T., WOLTMANN R.F., APPLEBY S., PRAHALADA S., KRAUSE S.M., KIVILIGN S.D., JOHNSON R.G., SIEGL P.K. & LYNCH J.J. (1998) Lack of beneficial effects of growth hormone treatment in conscious dogs during development of heart failure. *Am.J.Physiol.Heart Circ.Physiol.* **274**, H456-H466

SMIT J.W.A., JANSSEN Y.J.H., LAMB H.J., VAN DER WALL E.E., STOKKEL M.P.M., VIERGEVER E., BIERMASZ N.R., BAX J.J., VLIEGEN H.W., DE ROOS A., ROMIJN J.A. & ROELFSEMA F. (2001) Six months of recombinant human GH therapy in patients with ischemic cardiac failure does not influence left ventricular function and mass. *J.Clin.Endocrinol.Metab.* **86**, 4638-4643.

STRAUB V., DUCLOS F., VENZKE D.P., LEE J.C., CUTSHALL S., LEVEILLE C.J. & CAMPBELL K.P. (1998) Molecular pathogenesis of muscle degeneration in the delta-sarcoglycan-deficient hamster. *Am.J.Pathol.* **153**, 1623-1630.

SUZUKI T., YAMAZAKI T. & YAZAKI Y. (2001) The role of the natriuretic peptides in the cardiovascular system. *Cardiovasc.Res.* **51**, 489-494.

TER MAATEN J.C., DE BOER H., KAMP O., STUURMAN L. & VAN DER VEEN A.E. (1999) Long-term effects of growth hormone (GH) replacement in men with childhood-onset GH deficiency. *J.Clin.Endocrinol.Metab.* **84**, 2373-2380.

THIBAUT G., NEMER M., DROUIN J., LAVIGNE J.P., DING J., CHARBONNEAU C., GARCIA R., GENEST J., JASMIN G., SOLE M. & CANTIN M. (1989) Ventricles as a major site of atrial natriuretic factor synthesis and release in cardiomyopathic hamsters with heart failure. *Circ.Res.* **65**, 71-82.

TRITOS N.A. & MANTZOROS C.S. (1998) Recombinant human growth hormone: old and novel uses. *Am.J.Med.* **105**, 44-57.

UEYAMA T., OHKUSA T., YANO M. & MATSUZAKI M. (1998) Growth hormone preserves cardiac sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} release channels (ryanodine receptors) and enhances cardiac function in cardiomyopathic hamsters. *Cardiovasc.Res.* **40**, 64-73.

VAN THIEL S.W., SMIT J.W., DE ROOS A., BAX J.J., VAN DER WALL E.E., BIERMASZ N.R., VIERGEVER E., VLIEGEN H.W., ROMIJN J.A., ROELFSEMA F. & LAMB H.J. (2004) Six-months of recombinant human GH therapy in patients with ischemic cardiac failure. *Int.J.Cardiovasc.Imaging* **20**, 53-60.

YANG R., BUNTING S., GILLETT N., CLARK R.G. & JIN H. (1995) Effects of growth hormone in rats with postinfarction left ventricular dysfunction. *Cardiovasc.Drug Ther.* **9**, 125-131.

LEGEND TO FIGURES

Figure 1. Cumulative mean body weight in female CMH aged 200 days when initiating treatment with vehicle (0.9% NaCl) (open symbol) or rbGH, 1 mg/kg/day subcutaneously (closed symbol). Data represent the mean value of $n = 5-6$ hamsters per group. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ (rbGH compared to 0.9% NaCl).

Figure 2. ANP (A) and BNP (B) serum levels in control GSH (open bar) and control CMH (solid bar) or CMH treated with rbGH (hatched bar). All hamsters were 200-day-old when initiating treatment. Data represent the mean value of $n = 3-9$ hamsters (surviving at 240 days) in each group. *** $P < 0.001$ (CMH compared to control GSH).

Figure 3. ANP (A) and BNP (B) mRNA levels in the left ventricle of control GSH (open bar), vehicle-treated CMH (solid bar) or CMH treated with rbGH (hatched bar). All hamsters were 200-day-old when initiating treatment. Data represent the mean value of $n = 3-8$ hearts from hamsters (surviving at 240 day) in each group. ** $P < 0.01$ (CMH compared to control GSH). # $P < 0.05$ (rbGH-treated CMH compared to control CMH).

Figure 4. β -MHC (A) and α -MHC (B) mRNA levels in the left ventricle of control GSH (open bar), vehicle-treated CMH (solid bar) or CMH treated with rbGH (hatched bar). All hamsters were 200-day-old when initiating treatment. Data represent the mean value of $n = 3-8$ hearts from hamsters (surviving at 240 days) in each group. * $P < 0.05$ (CMH compared to control GSH). # $P < 0.05$ (rbGH-treated CMH compared to control CMH).

Figure 1

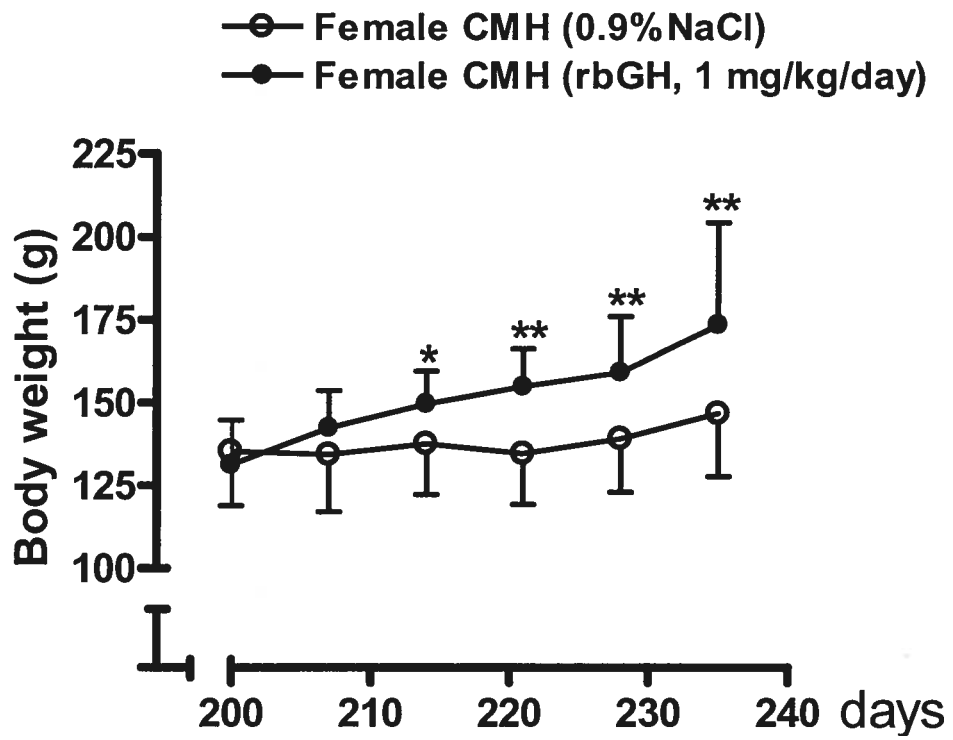


Figure 2

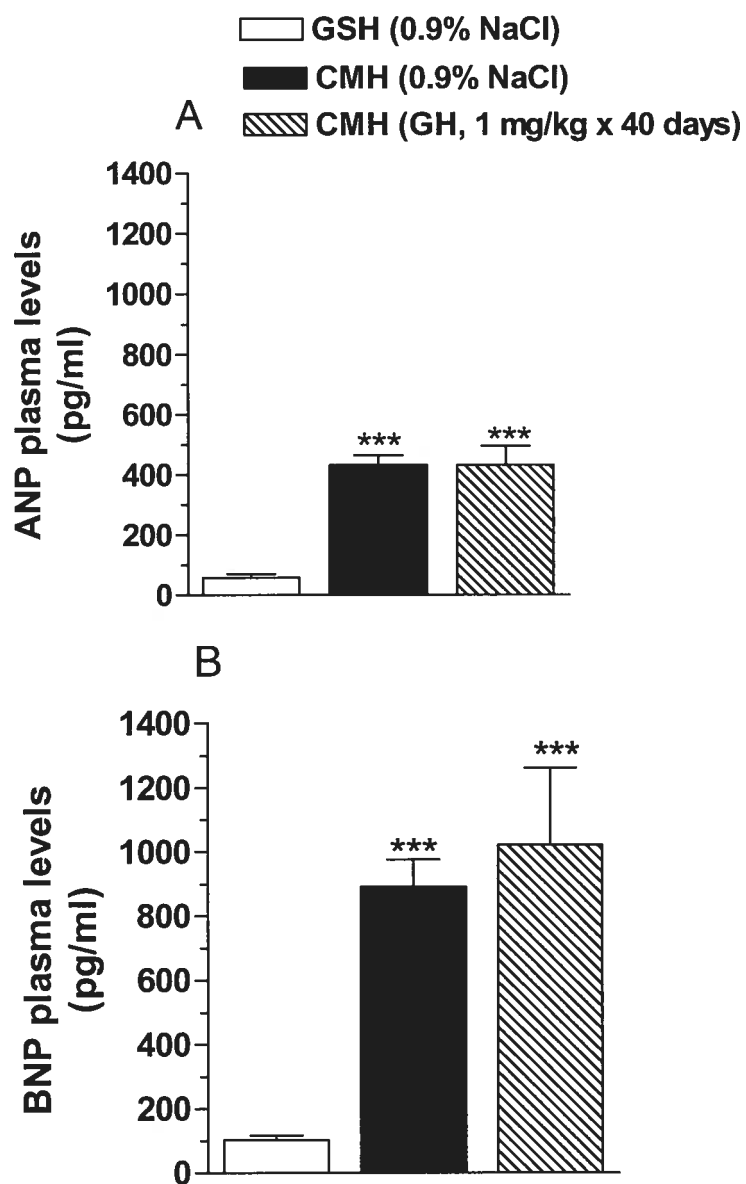


Figure 3

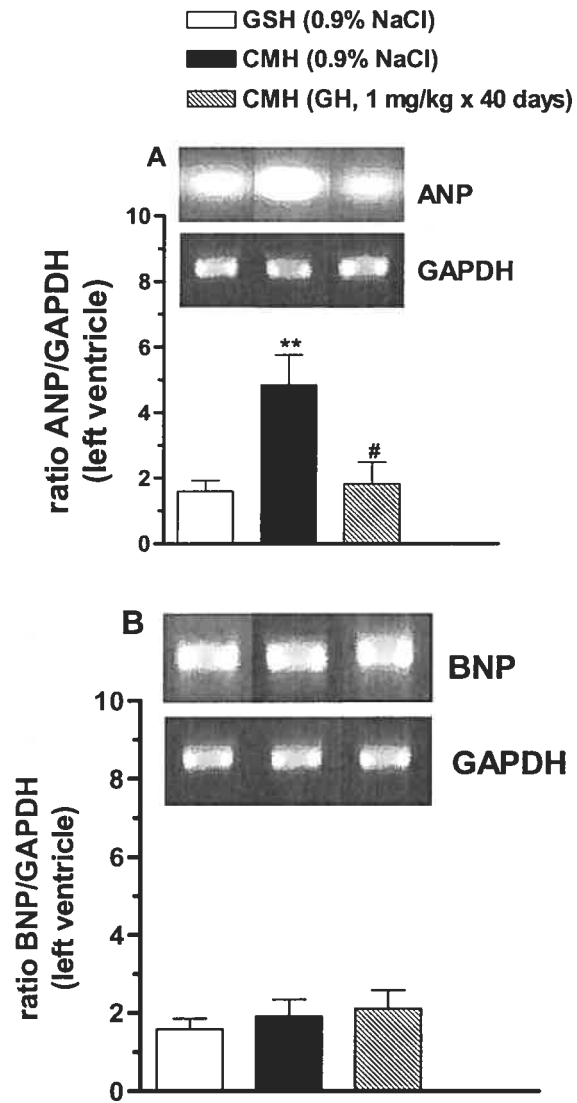
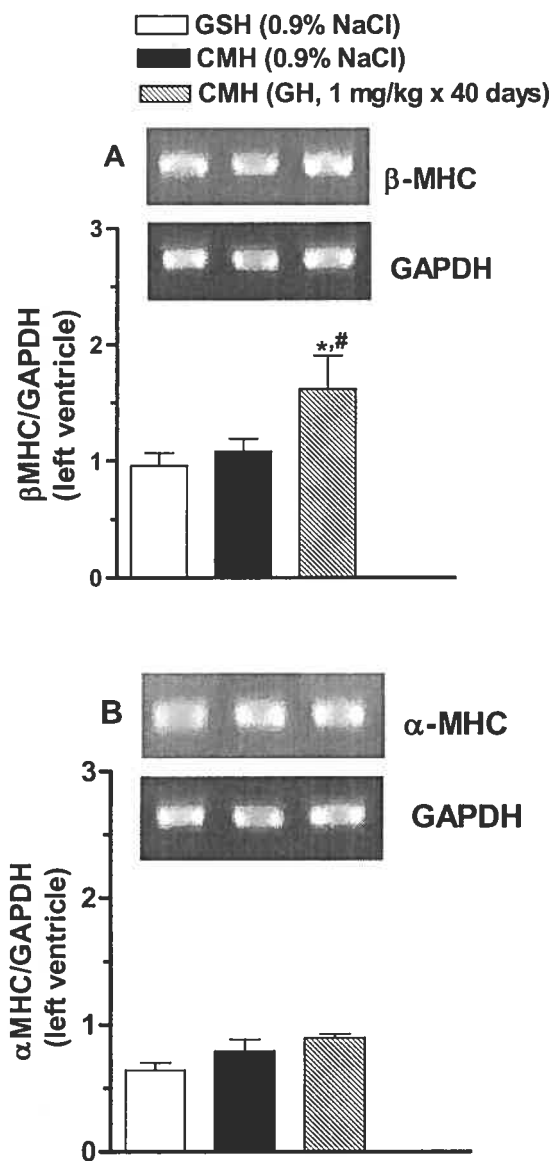


Figure 4



Chapitre 3: DISCUSSION GÉNÉRALE ET CONCLUSION

La CMD est caractérisée par une dilatation du ventricule gauche sans augmentation compensatoire de l'épaisseur de la paroi ventriculaire qui aboutit à un dysfonctionnement de la fonction ventriculaire systolique et/ou diastolique (Mohan *et al.*, 2002). La maladie progresse invariablement vers l'IC avec comme conséquence une détérioration progressive de la fonction cardiaque, des séquelles hémodynamiques et la mort. La CID, dont l'origine est inconnue, est associée avec des gènes défectueux dont le δ -sarcoglycan et la dystrophine (Michels *et al.*, 2003). Les HCM de la lignée UM-X7.1 présentent une mutation du gène codant pour le δ -sarcoglycan du complexe glycoprotéique associé à la dystrophine conduisant à des anomalies du muscle cardiaque et squelettique, à des désordres hémodynamiques, à une hypertrophie cardiaque et à une dilatation ventriculaire tels que observés chez l'homme (Jasmin & Eu, 1979; Jasmin & Proschek, 1982). Chez les HCM, les premiers symptômes de la pathologie sont observés à 30 jours d'âge avec une nécrose myocardique et une progression vers des phases de remodelage (à 60 jours), d'hypertrophie cardiaque (à 90 jours) et de défaillance (à 120 jours). Cette dernière devient sévère à 200 jours (Ikeda *et al.*, 2000; Tada & Toyofuku, 1996).

De nombreuses études expérimentales documentant les effets de l'HC sur la fonction cardiaque défaillante (Tableau II) ont utilisé l'HC recombinante humaine. Les études ont été limitées dans la durée du traitement, dû à l'apparition d'anticorps anti-HC humains après 3-4 semaines de traitement (Ueyama *et al.*, 1998b). Au contraire, l'utilisation de la rbHC permet d'éviter la formation d'anticorps anti-HC durant la période de traitement (Marleau *et al.*, 2002) car elle présente une forte homologie de séquence (86%) avec l'HC du hamster (Groesbeck & Parlow, 1987). C'est ainsi que nous avons mis à profit l'utilisation de la rbHC pour l'étude de traitements prolongés (ici 40 jours) chez le hamster. Des études antérieures de notre groupe ont montré l'absence de la production d'anticorps après une période d'administration allant jusqu'à 210 jours (Marleau

et al., 2002). L'étude faite dans notre laboratoire a montré un effet délétère, réduisant la survie chez les femelles traitées à l'HC (1 mg/kg/jour) pendant 210 jours tandis que chez les mâles, le traitement n'a pu arrêter la progression de la maladie malgré l'absence de mortalité due au traitement (Marleau *et al.*, 2002). Dans la présente étude, le taux de survie est de 89%, après 40 jours de traitement à la rbHC, ce qui confirme l'importance de la durée de traitement dans les effets potentiellement bénéfiques et délétères d'une administration prolongée d'HC.

Tel qu'observé précédemment, le taux sérique d'IGF-1 chez les HCM femelles est beaucoup plus élevé que chez les mâles (2 à 3 fois). Tandis que ces derniers répondent à l'HC par une augmentation des concentrations sériques d'IGF-1 (Marleau *et al.*, 2002), les concentrations déjà élevées chez les femelles n'augmentent pas de façon significative, en dépit d'une augmentation des masses corporelle et cardiaque. La réponse à l'HC semble différer en fonction du sexe, tel que suggéré par Span *et al.* (Span *et al.*, 2000). Néanmoins, les effets cardiaques directs de l'HC, à défaut de ceux via l'IGF-1, ont été observés dans nos études.

3.1. Effets du traitement à l'HC sur la masse corporelle et cardiaque

Les HCM femelles traitées par le véhicule et âgées de 240 jours sont caractérisées par une diminution d'environ 23% de la masse corporelle et une augmentation de 8% de la masse cardiaque comparativement aux GSH du même âge. Le traitement par l'HC à une dose de 1 mg/kg/jour pendant une période de 40 jours a induit une augmentation significative de la masse corporelle et une augmentation non significative de la masse cardiaque par comparaison aux HCM traitées par le véhicule (Table 1). Le rapport des masses cardiaque et corporelle,

au moment du sacrifice, est significativement ($P < 0,01$) plus élevé chez les HCM par rapport au GSH, suggérant une hypertrophie cardiaque chez les hamsters malades. Un traitement de 40 jours par la rhHC en phase terminale de la maladie n'a pas modifié ce rapport. Ces résultats sont en accord avec ceux de Ueyama *et al.* (1998) qui ont observé une augmentation de la masse cardiaque de 8% et une diminution de la masse corporelle de 30% des HCM UM-X7.1 (mâles et femelles) âgés de 23 semaines (Ueyama *et al.*, 1998b). Cependant, avec une dose de 2 mg/kg/jour de rhHC pendant 3 semaines à partir de 20 semaines, ils ont observé une diminution de l'hypertrophie. Dans l'étude réalisée dans notre laboratoire sur des HCM mâles, il a été montré que ni le traitement à long terme (210 jours) ni le traitement à court terme (80 jours) par l'HC ne modifiait le rapport des masses cardiaque et corporelle (Marleau *et al.*, 2002). La raison pour laquelle des résultats divergents ont été observés n'est pas claire, mais pourrait être liée au fait que la présente étude porte sur des femelles et non sur des mâles qui de façon générale sont atteints moins sévèrement par la maladie à âge égal. Par ailleurs, les HCM dans l'étude de Ueyama étaient beaucoup plus jeunes (20 semaines) au début du traitement que ceux de notre étude (environ 28 semaines). À 20 semaines d'âge, c'est le stade où l'hypertrophie commence à se manifester et est donc susceptible d'être réversible tandis qu'à 28 semaines, c'est la phase de défaillance cardiaque sévère (voir point 1.5). De plus, 20 semaines d'âge correspondent à la phase où débute la fibrose qui devient extensive au-delà de 27 semaines (Dixon *et al.*, 1997; Ryoke *et al.*, 1999).

3.2. Effets du traitement à l'HC sur la fonction systolique du ventricule gauche

La pression développée dans le VG (LVP) des cœurs isolés et la première dérivée (dp/dt_{max}) sont inférieures d'environ 50% et 36%, respectivement chez les

HCM femelles traitées par le véhicule comparativement aux GSH. Ceci est accompagné par une diminution du rythme cardiaque d'environ 20% ($P < 0.05$). Ceci est en accord avec les résultats de Ueyama *et al.* (1998) où la dP/dt_{max} est diminuée de près de 67% chez des HCM UM-X7.1 âgés de 23 semaines sans grande diminution du rythme cardiaque (Ueyama *et al.*, 1998b). L'administration de l'HC chez les HCM femelles a augmenté de façon modeste (16%) l'indice de contractilité, sans toutefois atteindre le seuil de signification statistique. Des tendances à une augmentation de la LVP et du rythme cardiaque ont été aussi notées post-traitement (tableau 1). Ceci est en accord avec les observations précédentes chez les HCM mâles traités pendant 80 jours à partir de 160 jours où le traitement par l'HC tend à améliorer la LVP et la dP/dt_{max} (Marleau *et al.*, 2002). De même, dans l'étude de Ryoke *et al.* (1999), l'administration de la rhHC (2 mg/kg/jour) pendant 3 semaines à des HCM CHF 147 (une lignée dérivée de UM-X7.1) âgés de 4 et 10 semaines a permis une amélioration de l'indice de contractilité et une augmentation du rythme cardiaque (Ryoke *et al.*, 1999). Durant la phase de défaillance cardiaque chez les HCM, il y a une diminution de l'activité ATPase du sarcolemme ainsi qu'une réduction de l'entrée du calcium par le réticulum sarcoplasmique en raison d'une réduction de l'activité de SR- Ca^{2+} ATPase dépendante (Tada & Toyofuku, 1996), et lorsque la défaillance cardiaque devient sévère, la concentration de Ca^{2+} est diminuée ainsi que la densité de récepteurs à la ryanodine qui sont impliqués dans la relâche du Ca^{2+} du réticulum sarcoplasmique (Ueyama *et al.*, 1998a). Dans l'étude de Ueyama *et al.* (1998), il a été montré que l'amélioration de l'indice de contractilité (53%) des HCM traités à la rhHC était associée à une augmentation de la densité des récepteurs ryanodine au niveau du VG (Ueyama *et al.*, 1998b). Ainsi, il est possible de spéculer que l'amélioration modeste de l'indice de contractilité chez nos femelles plus âgées est liée à un effet de l'HC sur la densité de récepteurs à la ryanodine, tel qu'observé chez les hamsters de la même lignée dans l'étude Ueyama *et al.* (Ueyama *et al.*, 1998b).

3.3. Effets du traitement à l'HC sur les taux plasmatiques des PNs

L'IC et la CMD sont associées à des modulations des concentrations sériques des PNs, notamment l'ANP et le BNP (de Boer *et al.*, 2001; Mair, 2002; Sagnella, 1998). Les taux plasmatiques trouvés chez les HCM femelles comparés à ceux des GSH femelles sont 8 fois et 9 fois plus élevés pour l'ANP et le BNP, respectivement. Ces observations sont en accord avec les résultats de Carnio *et al.* (1997) observés chez les HCM UM-X7.1 âgés des 230 jours (Carnio *et al.*, 1997) et avec ceux observés chez d'autres lignées de HCM (Masutomo *et al.*, 1999). Cependant, le traitement par la rbHC n'a induit aucun changement dans les taux plasmatiques de l'ANP et du BNP. En accord avec nos résultats, une étude avec des souris transgéniques qui surexpriment l'HC, a montré que les taux plasmatiques de l'ANP sont aussi élevés chez les souris transgéniques âgées de 7 semaines que chez celles âgées de 27 semaines comparativement aux souris de type sauvage (Dirsch *et al.*, 1998). Ceci pourrait être dû à la régulation de la sécrétion des PNs, car en effet, chez les HCM de 230 jours, les concentrations en PNs dans les ventricules sont 10 à 20 fois plus élevés à celles des GSH tandis que les taux plasmatiques sont 5 à 10 fois plus élevés chez les HCM versus les GSH (Carnio *et al.*, 1997).

3.4. Effets du traitement à l'HC sur l'expression des ARNm ventriculaire des PNs

L'expression des ARNm ventriculaires de l'ANP est élevée chez les femelles HCM, ceci en accord avec les niveaux des ARNm de l'ANP lors de la progression de la maladie (Masutomo *et al.*, 1999; Minieri *et al.*, 1999; Thibault

et al., 1989). Contrairement à l'ANP, les niveaux d'ARNm du BNP n'augmentent pas de manière significative. Ceci pourrait être dû soit à la phase de la défaillance cardiaque (Langenickel *et al.*, 2000) et/ou à la régulation de la transcription (Roy & Flynn, 1990). En effet, dans différents stades où la défaillance cardiaque est compensée, l'expression ventriculaire de l'ANP augmente (Langenickel *et al.*, 2000; Minieri *et al.*, 1999) tandis que celle du BNP ne change pas (Langenickel *et al.*, 2000). Lors de la transcription des gènes, l'ARNm du BNP est flanqué d'un motif riche en adénine-uracile (AU) à l'extrémité 3'-UTR qui le rend instable par rapport à l'ARNm de l'ANP qui n'en possède pas (Roy & Flynn, 1990). Dans notre étude, le traitement par la rbHC dans la phase tardive de la maladie a induit une diminution significative de l'expression ventriculaire de l'ANP sans changer l'expression du BNP. Une diminution de l'expression ventriculaire de l'ANP a été aussi observée par Ryoke *et al.* (Ryoke *et al.*, 1999). Cette réduction pourrait être due à l'amélioration de la performance cardiaque et à l'atténuation du remodelage cardiaque (Jin *et al.*, 2002).

3.5. Effets du traitement à l'HC sur l'expression des ARNm ventriculaires de α - et β -MHC

Nos résultats ne montrent aucun changement dans l'expression génique de l' α - et du β -MHC au niveau du VG chez les femelles HCM non traitées à 240 jours par comparaison au GSH femelles. Plusieurs études sur des modèles expérimentaux d'infarctus du myocarde (Jin *et al.*, 2002) et de surcharge ventriculaire (Imamura *et al.*, 1990; Izumo *et al.*, 1987) ont montré une induction de l'expression génique du β -MHC ventriculaire et une diminution de l'expression de l' α -MHC. Cependant, dans toutes ces études, l'âge des animaux se situe entre 4 et 10 semaines. Il a été démontré que la composition en différentes isoformes cardiaques de MHC varie en fonction de l'âge dans le VG

(Lompré *et al.*, 1981). Ainsi chez le hamster normal (GSH), la composition protéique en α -MHC est de 87% et de 13% en β -MHC à 20 jours d'âge et la proportion en α -MHC diminue au profit de l'isoforme β , à des taux de 64% et 36% en α - et β -MHC respectivement, chez les HCM du même âge (Di Nardo *et al.*, 1997; Minieri *et al.*, 1999). À 270 jours, la composition est de 49% et 52% en α - et β -MHC, respectivement chez les GSH et 4 et 96% en α - et β -MHC, respectivement chez les HCM. En fait chez le hamster, le phénotype cardiaque ne varie presque plus après 120 jours d'âge (Di Nardo *et al.*, 1997; Minieri *et al.*, 1999). Abraham *et al.* ont montré que les modifications phénotypiques des isoformes de MHC dans la CID chez l'homme sont aussi observées (Abraham *et al.*, 2002).

Le traitement par la rbHC n'a pas induit de changement significatif dans l'expression génique de l' α -MHC ventriculaire mais augmente de manière significative l'expression génique du β -MHC ventriculaire. En accord avec ces résultats, le traitement avec des fortes doses d'HC est associé avec une conversion du phénotype des myosines vers l'isoforme β chez les HCM (Ueyama *et al.*, 1998b). De plus, Florini *et al.* ont montré que l'HC induit une augmentation de l'expression de β -MHC chez des rats normaux âgés (Florini & Ewton, 1989; Florini & Ewton, 1992).

En conclusion, nos résultats montrent qu'un traitement de 40 jours à l'HC des HCM femelles en phase terminale de la maladie est associé à une amélioration de la performance cardiaque et de la survie, à une augmentation de l'expression génique de β -MHC au niveau du VG et à une diminution de l'expression ventriculaire de l'ANP. Ces résultats suggèrent que le traitement de 40 jours en par la rbHC est potentiellement bénéfique chez les HCM femelles en phase terminale.

3.6. Perspectives futures

Récemment, il a été proposé que l'utilisation des sécrétines de l'HC (GHS) pourrait être bénéfique dans le traitement de l'insuffisance cardiaque et de la CMD. Les GHS sont un groupe hétérogène de molécules synthétiques incluant de petits peptides synthétiques dérivés de l'encéphaline connus sous l'appellation de GHRPs (growth hormone releasing peptides). Les GHRPs et les dérivés non peptidiques stimulent la sécrétion de l'HC ainsi que celle de la prolactine et de l'ACTH chez les mammifères (Bowers *et al.*, 1984). Au delà de leur activité somatotrope, les GHRPs ciblent directement le système cardiovasculaire indépendamment de la stimulation par le récepteur GHS-R1a. Au niveau cardiaque, un traitement prolongé à l'hexaréline, un membre de la famille des GHRPs, a une activité protectrice contre les dommages tissulaires observés après une ischémie et la reperfusion tissulaire, notamment au niveau du myocarde, chez les rats déficients en HC et chez les rats âgés. L'hexaréline améliore aussi les performances cardiaques après un infarctus du myocarde chez les rats (De Gennaro Colonna *et al.*, 1997; Locatelli *et al.*, 1999). Ces effets protecteurs sont indépendants de l'activité somatotrope. Il a aussi été rapporté que l'hexaréline pouvait améliorer la fonction cardiaque en augmentant le débit cardiaque et en diminuant la résistance périphérique chez les rats (Tivesten *et al.*, 2000).

En utilisant le HCM comme modèle expérimental, il serait intéressant de pouvoir documenter les effets des GHRPs et en particulier l'hexaréline sur la fonction cardiaque, l'expression des PNs et des MHCs au niveau cardiaque ainsi que sur l'expression du Serca 2a. Cette pompe est impliquée dans le phénomène de contraction. Le Ca^{2+} entreposé dans le réticulum sarcoplasmique est libéré dans le cytosol afin d'activer la contraction et est ensuite récupéré par le réticulum sarcoplasmique afin d'initier la relaxation. C'est à ce niveau qu'est

impliqué le Serca 2a (Tada & Toyofuku, 1996). L'implication du Serca 2a dans la CMD a été démontré (Hongo *et al.*, 2000).

Une des facettes des effets de l'hexaréline sur le système cardiovasculaire est sa capacité de réduire la mort cellulaire. En effet, la mort cellulaire par apoptose du myocarde a été rapportée dans diverses situations pathologiques de la cardiomyopathie (MacLellan & Schneider, 1977; MacLellan & Schneider, 1997; Twu *et al.*, 2002). In vitro, l'hexaréline réduit l'apoptose induite par l'ANG-II sur les cellules H9c2 en inhibant probablement l'activité de la caspase 3 et l'expression des protéines pro-apoptotiques. De plus, l'hexaréline inhiberait l'apoptose en se liant au récepteur GHS-R1a activant la voie de PI3K/Akt chez ces cellules (Pang *et al.*, 2004). Cette voie est impliquée dans la régulation de l'apoptose (Kuwahara *et al.*, 2000; Matsui *et al.*, 2001).

Les effets de l'hexaréline à observer seraient principalement sur l'expression des protéines anti- et pro-apoptotiques et sur le pourcentage de l'apoptose des cardiomyocytes après une étude immunohistochimique qui colore les noyaux apoptotiques par la technique dite de TUNEL (*TdT-mediated deoxyuridine triphosphate nick end-labelling*). Cette technique exploite les propriétés des enzymes telles que la ADN polymérase I ou la transférase terminale (TdT) catalyse l'addition de désoxynucléotides marqués à la biotine ou digoxigénine à l'extrémité 3'-hydroxyl (OH) d'un double brin d'ADN (Hughes, 2003). Ces extrémités se forment après une cassure du brin par activité endonucléase ou par fragmentation de la chromatine dans le processus de l'apoptose (Mercié & Belloc, 2001).

Dans cette étude, les hamsters seront divisés en trois groupes; le premier composé de GHS traités au véhicule, le deuxième composé des HCM traités au véhicule et le troisième composé de HCM traité à l'hexaréline. Deux différentes

périodes de traitement d'une durée de 30 jours seront initiées, un traitement débutant à 30 jours d'âge (phase nécrotique) et un autre débutant à 160 jours d'âge (pendant la phase de défaillance cardiaque) (Ikeda *et al.*, 2000; Tada & Toyofuku, 1996). Afin d'observer les effets de l'hexaréline sur l'apoptose cardiaque et de déterminer si ses effets anti-apoptotiques sont indépendants de l'activation de l'axe HC/IGF-1, la dose de 100 µg/kg sera administrée (Bisi *et al.*, 1999; Ghigo *et al.*, 1999). Les analyses immunohistochimiques et de l'expression tant protéique que génique seront faites sur des tissus du VG après sacrifice. L'analyse de l'expression protéique portera sur la modulation des protéines anti-apoptotiques (Bcl-2, Bcl-Xl) et des protéines pro-apoptotiques (Bad et Bax) (Kawahara *et al.*, 2000; Matsui *et al.*, 2001) induite le traitement à l'hexaréline.

RÉFÉRENCES

ABRAHAM W.T., GILBERT E.M., LOWES B.D., MINOBE W.A., LARRABEE P., RODEN R.L., DUTCHER D., SEDERBERG J., LINDENFELD J.A., WOLFEL E.E., SHAKAR S.F., FERGUSON D., VOLKMAN K., LINSEMAN J.V., QUAIFFE R.A., ROBERTSON A.D. & BRITSOW M.R. (2002) Coordinate changes in myosin heavy chain isoform gene expression are selectively associated with alterations in dilated cardiomyopathy phenotype. *Mol.Med.* **8**, 750-760.

ADAMOPOULOS S., PARISSIS J.T., GEORGIADIS M., KARATZAS D., PARASKEVAIDIS J., KROUPIS C., KARAVOLIAS G., KONIAVITOU K. & KREMASTINOS D.Th. (2002) Growth hormone administration reduces circulating proinflammatory cytokines and soluble Fas/soluble Fas ligand system in patients with chronic heart failure secondary to idiopathic dilated cardiomyopathy. *Am.Heart J.* **144**, 359-364.

ADAMOPOULOS S., PARISSIS J.T., PARASKEVAIDIS I., KARATZAS D., LIVANIS E., GEORGIADIS M., KARAVOLIAS G., MITROPOULOS D., DEGIANNIS D. & KREMASTINOS D.T. (2003) Effects of growth hormone on circulating cytokine network, and left ventricular contractile performance and geometry in patients with idiopathic dilated cardiomyopathy. *Eur.Heart J.* **24**, 2186-2196.

AHLUWALIA A., MACALLISTER R.J. & HOBBS A.J. (2004) Vascular actions of natriuretic peptides. Cyclic GMP-dependent and -independent mechanisms. *Basic Res.Cardiol.* **99**, 83-89.

AIDONIDIS I., METZ J., GERSTHEIMER F., KÜBLER W. & BRACHMANN J. (1993) Significance of cardiac innervation on spontaneous ventricular arrhythmias elicited by left stellate ganglion stimulation in dogs 4 days after myocardial infarction: comparison of two experimental models. *Basic Res.Cardiol.* **88**, 155-166.

AMATO G., CARELLA C., FAZIO S., LA MONTAGNA G., CITTADINI A., SABATINI D., MARCIANO-MONE C., SACCÀ L. & BELLASTELLA A. (1993) Body composition, bone metabolism, and heart structure and function in growth hormone (GH)-deficient adults before and after GH replacement therapy at low doses. *J.Clin.Endocrinol.Metab.* **77**, 1671-1676.

ANDERSSON B. & HALL C. (2000) N-terminal proatrial natriuretic peptide and prognosis in patients with heart failure and preserved systolic function. *J.Cardiac Failure* **6**, 208-213.

ARGETSINGER L.S. & CARTER-SU C. (1996) Mechanism of signaling by growth hormone receptor. *Physiol.Rev.* **76**, 1089-1107.

BISI G., PODIO V., VALETTO M.R., BROGLIO F., BERTUCCIO G., AIMARETTI G., PELOSI E., DEL RIO G., MUCCIOLI G., ONG H., DEGHENGI R. & GHIGO E. (1999) Cardiac effects of hexarelin in hypopituitary adults. *Eur.J.Pharmacol.* **381**, 31-38.

BOLLANO E., BERGH C.-H., KJELLSTRÖM C., OMEROVIC E., KUJACIC V., CAIDAHN K., BENGTSSON B.-Å., WAAGSTEIN F. & ISGAARD J. (2001) Growth hormone alone or combined with metoprolol preserves cardiac function after myocardial infarction in rats. *Eur.J.Heart Failure* **3**, 651-660.

BOWERS C.Y., MOMANY F.A., REYNOLDS G.A. & HONG A. (1984) On the in vitro and in vivo activity of a new synthetic hexapeptide that acts on the pituitary to specifically release growth hormone. *Endocrinology* **114**, 1537-1545.

BRENNER B.M., BALLERMANN B.J., GUNNING M.E. & ZEIDEL M.L. (1990) Diverse biological actions of atrial natriuretic peptide. *Physiol.Rev.* **70**, 665-699.

BROGLIO F., FUBINI A., MORELLO M., ARVAT E., AIMARETTI G., GIANOTTI L., BOGHEN M.F., DEGHENGI R., MANGIARDI L. & GHIGO E. (1999) Activity of GH/IGF-1 axis in patients with dilated cardiomyopathy. *Clin.Endocrinol.* **50**, 417-430.

BURKETT E.L. & HERSHBERGER R.E. (2005) Clinical and genetical issues in familial dilated cardiomyopathy. *J.Am.Coll.Cardiol.* **45**, 969-981.

CABRERA CABRERA J.R. (1999) Idiopathic dilated cardiomyopathy. Elastic parallel element dysfunction as a physiological hypothesis for ventricular failure. *Medical Hypotheses* **53**, 260-262.

CAMERON V.A. & ELLMERS L.J. (2003) Minireview: natriuretic peptides during development of the fetal heart and circulation. *Endocrinology* **144**, 2191-2194.

CARNIO E.C., JANKOWSKI M., MUKADDAM-DAHER S., GORSKA I., ANTUNES-RODRIGUES J. & GUTKOWSKA J. (1997) Elevated levels of natriuretic peptides in lungs of hamsters with genetic cardiomyopathy. *Regul.Peptides* **70**, 67-73.

CARTER-SU C., SCHWARTZ J. & SMIT L.S. (1996) Molecular mechanism of growth hormone action. *Annu.Rev.Physiol.* **58**, 187-207.

CASANUEVA F.F., BETTI R., CELLA S.G., MULLER E.E. & MANTEGAZZA P. (1983) Effect of agonists and antagonists of cholinergic neurotransmission on growth hormone release in the dog. *Acta Endocrinologica* **103**, 15-20.

CASTAGNINO H.E., MILEI J., TORANZOS F.A., WEISS V. & BEIGELMAN R. (1990) Bivalent effects of human growth hormone in experimental myocardial

infarcts. Protective when administered alone and aggravating when combined with beta blockers. *Jpn.Heart J.* **31**, 845-855.

CHARLES C.J., ESPINER E.A. & RICHARDS A.M. (1993) Cardiovascular actions of ANF: contributions of renal, neurohumoral, and hemodynamic factors in sheep. *Am.J.Physiol.* **264**, R533-R538

CHEMLA D., SCALBERT E., DESCHÉ P. & LECARPENTIER Y. (1991) La cardiomyopathie du hamster Syrien. Aspects physiopathologiques et thérapeutiques. *Arch.Mal.Coeur* **84**, 85-87.

CHIEN Y.W., FROHLICH E.D. & TRIPPODO N.C. (1987) Atrial natriuretic peptide increases resistance to venous return in rats. *Am J.Physiol.* **252**, H894-H899

CITTADINI A., GROSSMAN J.D., NAPOLI R., KATZ S.E., STRÖMER H., SMITH R.J., CLARK R., MORGAN J.P. & DOUGLAS P.S. (1997) Growth hormone attenuates early left ventricular remodeling and improves cardiac function in rats with large myocardial infarction. *J.Am.Coll.Cardiol.* **29**, 1109-1116.

COLAO A., DI SOMMA C., CUOCOLO A., FILIPEPELLA M., ROTA F., ACAMPA W., SAVASTANO S., SALVATORE M. & LOMBARDI G. (2004a) The severity of growth hormone deficiency correlates with the severity of cardiac impairment in 100 adult patients with hypopituitarism: an observational, case-control study. *J.Clin.Endocrinol.Metab.* **89**, 5998-6004.

COLAO A., DI SOMMA C., PIVONELLO R., CUOCOLO A., SPINELLI L., BONADUCE D., SALVATORE M. & LOMBARDI G. (2002a) The cardiovascular risk of adult GH deficiency (GHD) improved after GH replacement and worsened in untreated GHD: A 12-month prospective study. *J.Clin.Endocrinol.Metab.* **87**, 1088-1093.

COLAO A., DI SOMMA C., SPINELLI L., TEDESCO N., PIVONELLO R., BONADUCE D., SALVATORE M. & LOMBARDI G. (2001) Improved cardiovascular risk factors and cardiac performance after 12 months of growth hormone (GH) replacement in young adult patients with GH deficiency. *J.Clin.Endocrinol.Metab.* **86**, 1874-1881.

COLAO A., FERONE D., MARZULLO P. & LOMBARDI G. (2004b) Systemic complications of acromegaly: Epidemiology, pathogenesis, and management. *Endoc.Rev.* **25**, 102-152.

COLAO A., SPINELLI L., CUOCOLO A., SPIEZIA S., PIVONELLO R., DI SOMMA C., BONADUCE D., SALVATORE M. & LOMBARDI G. (2002b) Cardiovascular consequences of early-onset growth hormone excess. *J.Clin.Endocrinol.Metab.* **87**, 3097-3104.

COLAO A., VITALE G., PIVONELLO R., CICCARELLI A., DI SOMMA C. & LOMBARDI G. (2004c) The heart: an end-organ of GH action. *Eur.J.Endocrinol.* **151**, S93-S101

CORRADO D., BASSO C., THIENE G., MCKENNA W.J., DAVIES M.J., FONTALIRAN F., NAVA A., SILVESTRI F., BLOMSTROM-LUNDOVIST C., WLODARSKA E., FONTAINE G. & CAMERINI F. (1997) Spectrum of clinicopathologic manifestations of arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy/dysplasia: A multicenter study. *J.Am.Coll.Cardiol.* **30**, 1512-1520.

COUMANS J.V.F., YEOH T., SEETO R.K., KEOGH A., BRENNAM K., GUNNING P., HARDEMAN E. & DOS REMEDIOS C.G. (1997) Variations in the relative mRNA levels of actins and myosin heavy chains do not produce corresponding differences in their proteins in the adult human heart. *J.Mol.Cell Cardiol.* **29**, 895-905.

CUOCOLO A., NICOLAI E., COLAO A., LONGOBARDI S., CARDEI S., FAZIO S., MEROLA B., LOMBARDI G., SACCÀ L. & SALVATORE M. (1996) Improved left ventricular function after growth hormone replacement in patients with hypopituitarism: assessment with radionuclide angiography. *Eur.J.Nucl.Med.* **23**, 390-394.

DATE Y., NAKAZATO M., HASHIGUCHI S., DEZAKI K., MONDAL M.S., HOSODA H., KOJIMA M., KANGAWA K., ARIMA T., MATSUO H., YADA T. & MATSUKURA S. (2002) Ghrelin is present in pancreatic α -cells of humans and rats and stimulates insulin secretion. *Diabetes* **51**, 124-129.

DE BOER R.A., HENNING R.H., SUURMEIJER A.J.H., PINTO Y.M., OLTHOF E., KIRKELS J.H., VAN GILST W.H., CRIJNS H.J.G.M. & VAN VELDHUISEN D.J. (2001) Early expression of natriuretic peptides and SERCA in mild heart failure. Association with severity of the disease. *Int.J.Cardiol.* **78**, 5-12.

DE BOLD A.J., BORENSTEIN H.B., VERESS A.T. & SONNENBERA H. (1981) A rapid and potent natriuretic response to intravenous injection of atrial myocardial extract in rats. *Life Sciences* **28**, 89-94.

DE BOLD A.J., BRUNEAU B.G. & KUROSKI-DE BOLD M.L. (1996) Mechanical and neuroendocrine regulation of the endocrine heart. *Cardiovasc.Res.* **31**, 7-18.

DE GENNARO COLONNA V., ROSSONI G., BERNAREGGI M., MULLER E.E. & BERTI F. (1997) Cardiac ischemia and impairment of vascular endothelium function in hearts from growth hormone-deficient rats: protection by hexarelin. *Eur.J.Pharmacol.* **334**, 201-207.

DEC G.W. & FUSTER V. (1994) Idiopathic dilated cardiomyopathy. *N.Engl.J.Med.* **331**, 1564-1575.

DELAFONTAINE P. (1995) Insulin-like growth factor I and its binding proteins in the cardiovascular system. *Cardiovasc.Res.* **30**, 825-834.

DELITALA G., MAIOLI M., PACIFICO A., BRIANDA S., PALERMO M. & MANNELLI M. (1983) Cholinergic receptor control mechanisms for L-dopa, apomorphine, and clonidine-induced growth hormone secretion in man. *J.Clin.Endocrinol.Metab.* **57**, 1145-1149.

DEMACHI J., KAGAYA Y., WATANABE J., SAKUMA M., IKEDA J., KAKUTA Y., MOTOYOSHI I., KOHNOSU T., SAKUMA H., SHIMAZAKI S., SAKAI H., KIMPARA T., TAKAHASHI T., OMURA K., OKADA M., SAITO H. & SHIRATO K. (2004) Characteristics of the increase in plasma natriuretic peptide level in left ventricular systolic dysfunction, associated with muscular dystrophy in comparison with idiopathic dilated cardiomyopathy. *Neuromuscul.Disord.* **14**, 732-739.

DI NARDO P., FIACCAVENTO R., NATALI A., MINIERI M., SAMPAOLESI M., FUSCO A., JANMOT C., CUDA G., CARBONE A., ROGLIANI P. & PERUZZI G. (1997) Embryonic gene expression in nonoverloaded ventricles of hereditary hypertrophic cardiomyopathic hamsters. *Lab.Invest.* **77**, 489-502.

DILLMANN W.H. (2005) Hormonal influences on cardiac myosin ATPase activity and myosin isoenzyme distribution. *Mol.Cell.Endocrinol.* **34**, 169-181.

DIRSCH V.M., WOLF E., WANKE R., SCHULZ R., HERMANNNS W. & VOLLMAR A.M. (1998) Effect of chronic GH overproduction on cardiac ANP expression and circulating ANP levels. *Mol.Cell.Endocrinol.* **144**, 109-118.

DIXON I.M.C., JU H., REID N.L., SCAMMELL-LA FLEUR T., WERNER J.P. & JASMIN G. (1997) Cardiac collagen remodeling in the cardiomyopathic Syrian hamster and the effect of losartan. *J.Mol.Cell Cardiol.* **29**, 1837-1850.

DUERR R.L., HUANG S., MIRALIAKBAR H.R., CLARK R., CHIEN K.R. & ROSS J., Jr. (1995) Insulin-like growth factor-1 enhances ventricular hypertrophy and function during the onset of experimental cardiac failure. *J.Clin.Invest.* **95**, 619-627.

DUERR R.L., MCKIRNAN M.D., GIM R.D., CLARK R.G., CHIEN K.R. & ROSS J., Jr. (1996) Cardiovascular effects of insulin-like growth factor-1 and growth hormone in chronic left ventricular failure in the rat. *Circulation* **93**, 2188-2196.

EDWARDS B.S., ZIMMERMAN R.S., SCHWAB T.R., HEUBLEIN D.M. & BURNETT J.C.Jr. (1988) Atrial stretch, not pressure, is the principal determinant controlling the acute release of atrial natriuretic factor. *Circ.Res.* **62**, 191-195.

EICHHORN E.J. & BRISTOW M.R. (1996) Medical therapy can improve the biological properties of the chronically failing heart. A new aera in the treatment of heart failure. *Circulation* **94**, 2285-2296.

FALCAO L.M., PINTO F., RAVARA L. & VAN ZWIETEN P.A. (2004) BNP and ANP as diagnostic and predictive markers in heart failure with left ventricular systolic dysfunction. *J.Renin Angiotensin Aldosterone Syst.* **5**, 121-129.

FATKIN D. & GRAHAM R.M. (2002) Molecular mechanisms of inherited cardiomyopathies. *Physiol.Rev.* **82**, 945-980.

FAZIO S., SABATINI D., CAPALDO B., VIGORITO C., GIORDANO A., GUIDA R., PARDO F., BIONDI B. & SACCÀ L. (1996) Preliminary study of growth hormone in the treatment of dilated cardiomyopathy. *N.Engl.J.Med.* **334**, 809-814.

FERRANS V.J. & RODRIGUEZ E.R. (1988) The pathology of cardiomyopathies. In *Cardiomyopathy*. Giles, T.D. and Sander, G.E. Eds. Eds T.D. Giles & G.E. Sander. PSG Publishing company, Inc. pp. 15-54.

FLORINI J.R. & EWTON D.Z. (1989) Skeletal muscle fiber types and myosin ATPase activity do not change with age or growth hormone administration. *J. Gerontol.* **44**, B110-B117

FLORINI J.R. & EWTON D.Z. (1992) Induction of gene expression in muscle by the IGFs. *Growth Regul.* **2**, 23-29.

FRUHWALD F.M., FAHRLEITNER A., WATZINGER N., FRUHWALD S., DOBNIG H., SCHUMACHER M., MAIER R., ZWEIKER R. & KLEIN W.W. (1999) Natriuretic peptides in patients with diastolic dysfunction due to idiopathic dilated cardiomyopathy. *Eur. Heart. J.* **20**, 1415-1423.

FURUYA M., AISAKA K., MIYAZAKI T., HONBOU N., KAWASHIMA K., OHNO T., TANAKA S., MINAMINO N., KANGAWA K. & MATSUO H. (1993) C-type natriuretic peptide inhibits intimal thickening after vascular injury. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **193**, 248-253.

GENTH-ZOTZ S., ZOTZ R., GEIL S., VOIGTLANDER T., MEYER J. & DARIUS H. (1999) Recombinant growth hormone therapy in patients with ischemic cardiomyopathy : effects on hemodynamics, left ventricular function, and cardiopulmonary exercise capacity. *Circulation* **99**, 18-21.

GHIGO E., ARVAT E., BROGLIO F., GIORDANO R., GIANOTTI L., MUCCIOLI G., PAPOTTI M., GRAZIANI A., BISI G., DEGHENGI R. & CAMANNI F. (1999) Endocrine and non-endocrine activities of growth hormone secretagogues in humans. *Horm. Res.* **51(suppl.3)**, 9-15.

GIANELLO P., BESSE T., GUSTIN T., CHATZOPOULOS C., LAVENNE-PARDONGE E., KETELSLEGGERS J.M., LAMBOTTE L., SQUIFFLET J.-P. & ALEXANDRE G.P.J. (1990) Atrial natriuretic factor, arachidonic acid metabolites and acute renal ischemia: experimental protocol in the rat. *Eur.Surg.Res.* **22**, 57-62.

GILES T.D. (1988) Idiopathic dilated cardiomyopathy. In *Cardiomyopathy*. Giles T D and Sander G E (Eds.) Ed. Eds T.D.Giles & G.E.Sander. PSG Publishing company, Inc. pp. 121-133.

GRIMM D., CAMERON D., GRIESE D.P., RIEGGER G.A.J. & KROMER E.P. (1998) Differential effects of growth hormone on cardiomyocyte and extracellular matrix protein remodeling following experimental myocardial infarction. *Cardiovasc.Res.* **40**, 297-306.

GROESBECK M.D. & PARLOW A.F. (1987) Highly improved precision of the hypophysectomized female rat body weight gain bioassay for growth hormone by increased frequency of injections, avoidance of antibody formation, and other simple modifications. *Endocrinology* **120**, 2582-2590.

HASEGAWA K., FUJIWARA H., DOYAMA K., MUKOYAMA M., NAKAO K., FUJIWARA T., IMURA H. & KAWAI C. (1993) Ventricular expression of atrial and brain natriuretic peptides in dilated cardiomyopathy. An immunohistochemical study of the endomyocardial biopsy specimens using specific monoclonal antibodies. *Am.J.Pathol.* **142**, 107-116.

HENRY L.B. (2003) Left ventricular systolic dysfunction and ischemic cardiomyopathy. *Crit.Care Nurs.Q.* **26**, 16-21.

HIROTA Y., KOHRIYAMA T., HAYASHI T., KAKU K., NISHIMURA M., SAITO T., NAKAYAMA Y., SUWA M., KINO M. & KAWAMURA K. (1983) Idiopathic restrictive cardiomyopathy: Differences of left ventricular relaxation

and diastolic wave forms from constrictive pericarditis. *Am.J.Cardiol.* **52**, 421-423.

HOH J.F.Y., MCGRATH P.A. & HALE H.T. (1978) Electrophoretic analysis of multiple forms of rat cardiac myosin. Effect of hypophysectomy and thyroxine replacement. *J.Mol.Cell Cardiol.* **10**, 1053-1076.

HOLDAWAY I.M., RAJASOORYA R. & GAMBLE G.D. (2004) Factors influencing mortality in acromegaly. *J.Clin.Endocrinol.Metab.* **89**, 667-674.

HONGO M., RYOKE T., SCHOENFELD J., HUNTER J., DALTON N., CLARK R., LOWE D., CHIEN K. & ROSS J., Jr. (2000) Effects of growth hormone on cardiac dysfunction and gene expression in genetic murine dilated cardiomyopathy. *Basic Res.Cardiol.* **95**, 431-441.

HUGHES S.E. (2003) Detection of apoptosis using in situ markers for DNA strand breaks in the failing human heart. Fact or epiphenomenon? *J.Pathol.* **201**, 186

HUGHES S.E. & MCKENNA W.J. (2005) New insights into the pathology of inherited cardiomyopathy. *Heart* **91**, 257-264.

HULSMANN M., BERGER R., MORTL D., GORE O., MEYER B. & PACHER R. (2005) Incidence of normal values of natriuretic peptides in patients with chronic heart failure and impact on survival: A direct comparison of N-terminal atrial natriuretic peptide, N-terminal brain natriuretic peptide and brain natriuretic peptide. *Eur.J.Heart Failure* **7**, 552-556.

IKEDA Y., MARTONE M., GU Y., HOSHIJIMA M., THOR A., OH S.S., PETERSON K.L. & ROSS J., Jr. (2000) Altered membrane proteins and permeability correlate with cardiac dysfunction in cardiomyopathic hamsters. *Am.J.Physiol.* **278**, H1362-H1370

IMAMURA S., MATSUOKA R., HIRATSUKA E., KIMURA M., NISHIKAWA T. & TAKAO A. (1990) Local response to cardiac overload on myosin heavy chain gene expression and isozyme transition. *Circ.Res.* **66**, 1067-1073.

ISGAARD J., BERGH C.-H., CAIDAHN K., LOMSKY M., HJALMARSON Å. & BENGTSSON B.-Å. (1998) A placebo-controlled study of growth hormone in patients with congestive heart failure. *Eur.Heart J.* **19**, 1704-1711.

ISNER J.M., FERRANS V.J., COHEN S.R., WITKIND B.G., VIRMANI R., GOTTDIENER J.S., ROBERT BECK J. & ROBERTS W.C. (1983) Clinical and morphological cardiac findings after anthracycline chemotherapy. Analysis of 64 patients studied at necropsy. *Am.J.Cardiol.* **51**, 1167-1174.

ITOH H., PRATT R.E. & DZAU V.J. (1990) Atrial natriuretic polypeptide inhibits hypertrophy of vascular smooth muscle cells. *J.Clin.Invest.* **86**, 1690-1697.

ITOH H., PRATT R.E., OHNO M. & DZAU V.J. (1992) Atrial natriuretic polypeptide as a novel antigrowth factor of endothelial cells. *Hypertension* **19**, 758-761.

IZUMO S., LOMPRÉ A.-M., MATSUOKA R., KOREN G., SCHWARTZ K., NADAL-GINARD B. & MAHDAVI V. (1987) Myosin heavy chain messenger RNA and protein isoform transition during cardiac hypertrophy. Interaction between hemodynamic and thyroid hormone-induced signals. *J.Clin.Invest.* **79**, 970-977.

JACKSON G., GIBBS C.R., DAVIES M.K. & LIP G.Y.H. (2000) ABC of heart failure. *Basic Med.J.* **320**, 167-170.

JAMES J., MARTIN L., KRENZ M., QUATMAN C., JONES F., KLEVISKY R., GULICK J. & ROBBINS J. (2005) Forced expression of α -myosin heavy chain in the rabbit ventricle results in cardioprotection under cardiomyopathic conditions. *Circulation* **111**, 2339-2346.

JASMIN G. & EU H.Y. (1979) Cardiomyopathy of hamster dystrophy. *Ann.NY Acad.Sci.* **317**, 46-58.

JASMIN G. & PROSCHEK L. (1982) Hereditary polymyopathy and cardiomyopathy in the syrian hamster. I. Progression of heart and skeletal muscle lesions in the UM-X7.1 line. *Muscle & Nerve* **5**, 20-25.

JAYASANKAR V., BISH L.T., PIROLI T.J., BERRY M.F., BURDICK J. & WOO Y.J. (2004) Local myocardial overexpression of growth hormone attenuates postinfarction remodeling and preserves cardiac function. *Ann.Thorac.Surg.* **77**, 2122-2129.

JIN H., YANG R., LU H., OGASAWARA A.K., LI W., RYAN A., PEALE F. & PAONI N.F. (2002) Effects of early treatment with growth hormone on infarct size, survival, and cardiac gene expression after acute myocardial infarction. *Growth Horm.IGF Res.* **12**, 208-215.

KALRA P.R., ANKER S.D. & COATS A.J. (2001) Water and sodium regulation in chronic heart failure: the role of natriuretic peptides and vasopressin. *Cardiovasc.Res.* **51**, 495-509.

KALRA P.R., CLAGUE J.R., BOLGER A.P., ANKER S.D., POOLE-WILSON P.A., STRUTHERS A.D. & COATS A.J. (2003) Myocardial production of C-type natriuretic peptide in chronic heart failure. *Circulation* **107**, 571-573.

KAMISAGO M., SHARMA S.D., DEPALMA S.R., SOLOMON S., SHARMA P., MCDONOUGH B., SMOOT L., MULLEN M.P., WOOLF P.K., WIGLE

E.D., SEIDMAN J.G. & SEIDMAN C.E. (2004) Mutations in sarcomere protein genes as a cause of dilated cardiomyopathy. *N.Engl.J.Med.* **343**, 1688-1696.

KAYIGA T., HORI M., IWAKURA K., IWAI K., WATANABE Y., UCHIDA S., YOSHIDA H., KITABATAKE A., INOUE M. & KAMADA T. (1991) Role of increased α 1-adrenergic activity in cardiomyopathic Syrian hamster. *Am J.Physiol.* **260**, H80-H88

KELIJMAN M. & FROHMAN L.A. (1989) Beta-adrenergic modulation of growth hormone (GH) autofeedback on sleep-associated and pharmacologically induced GH secretion. *J.Clin.Endocrinol.Metab.* **69**, 1187-1194.

KOJIMA M., HOSODA H., DATE Y., NAKAZATO M., MATSUO H. & KANGAWA K. (1999) Ghrelin is a growth-hormone-releasing acylated peptide from stomach. *Nature* **402**, 656-660.

KOLLER K.J., LOWE D.G., BENNETT G.L., MINAMINO N., KANGAWA K., MATSUO H. & GOEDDEL D.V. (1991) Selective activation of the B natriuretic peptide receptor by C-type natriuretic peptide (CNP). *Science* **252**, 120-123.

KOMAJDA M. & CHARRON P. (2002) Idiopathic cardiomyopathies. *Révue du Praticien* **52**, 1664-1670.

KUWAHARA K., SAITO Y., KISHIMOTO I., MIYAMOTO Y., HARADA M., OGAWA E., HAMANAKA I., KAJIYAMA N., TAKAHASHI N., IZUMI T., KAWAKAMI R. & NAKAO K. (2000) Cardiotrophin-1 phosphorylates Akt and BAD, and prolongs cell survival via a PI3K-dependent pathway in cardiac myocytes. *J.Mol.Cell Cardiol.* **32**, 1385-1394.

LANGENICKEL T., PAGEL I., HOHNEL K., D.R. & WILLENBROCK R. (2000) Differential regulation of cardiac ANP and BNP mRNA in different stages

of experimental heart failure. *Am.J.Physiol.Heart Circ.Physiol.* **278**, H1500-H1506

LAPOINTE M.C. (2005) Molecular regulation of the brain natriuretic peptide gene. *Peptides* **26**, 944-956.

LAZAR M.A. (2001) Progress in cardiovascular biology: PPAR for the course. *Nature Med.* **7**, 23-24.

LEVIN E.R. (1993) Natriuretic peptide C-receptor: more than a clearance receptor. *Am.J.Physiol.* **264**, E483-E489

LEVIN E.R., GARDNER D.G. & SAMSON W.K. (1998) Natriuretic peptides. *N.Engl.J.Med.* **339**, 321-328.

LOCATELLI V., ROSSONI G., SCHWEIGER F., TORSELLO A., DE GENNARO C.V., BERNAREGGI M., DEGHENGI R., MULLER E.E. & BERTI F. (1999) Growth hormone-independent cardioprotective effects of hexarelin in the rat. *Endocrinology* **140**, 4024-4031.

LOMPRÉ A.-M., MERCADIER J.-J., WISNEWSKY C., BOUVERT C., PANTALONI C., D'ALIBIS A. & SCHWARTZ K. (1981) Species- and age-dependent changes in relative amounts of cardiac myosin Isoenzyme in mammals. *Dev.Biol.* **84**, 286-290.

LOMPRÉ A.-M., NADAL-GINARD B. & MAHDAVI V. (1984) Expression of the cardiac ventricular alpha- and beta-myosin heavy chain genes is developmentally and hormonally regulated. *J.Biol.Chem.* **259**, 6437-6446.

LOMPRÉ A.-M., SCHWARTZ K., D'ALIBIS A., LACOMBE G., VAN THIEM N. & SWYNGHEDAUW B. (1979) Myosin isoenzyme redistribution in chronic heart overload. *Nature* **282**, 105-107.

LONGOBARDI S., CUOCOLO A., MEROLA B., DI RELLA F., COLAO A., NICOLAI E., CARDEI S., SALVATORE M. & LOMBARDI G. (1998) Left ventricular function in young adults with childhood and adulthood onset growth hormone deficiency. *Clin.Endocrinol.* **48**, 137-143.

LOWES B.D., MINOBE W., ABRAHAM W.T., RIZEQ M.N., BOHLMeyer T.J., QUAlFE R.A., RODEN R.L., DUTCHER D.L., ROBERTSON A.D., VOELKEL N.F., BADESCH D.B., GROVES B.M. & GILBERT E.M. (1997) Changes in expression in the intact human heart. Downregulation of alpha-myosin heavy chain in hypertrophied, failing ventricular myocardium. *J.Clin.Invest.* **100**, 2315-2324.

LOWEY S. (2002) Functional consequences of mutations in the myosin heavy chain at sites implicated in familial hypertrophic cardiomyopathy. *Trends Cardiovasc.Med.* **12**, 348-354.

LUCHNER A. & SCHUNKERT H. (2004) Interactions between the sympathetic nervous system and the cardiac natriuretic peptide system. *Cardiovasc.Res.* **63**, 443-449.

LUCHNER A., STEVENS T.L., BORGESON D.D., REDFIELD M., WEI C.M., PORTER J.G. & BURNETT J.C., Jr. (1998) Differential atrial and ventricular expression of myocardial BNP during evolution of heart failure. *Am.J.Physiol.* **274**, H1684-H1689

MAACK T. (1992) Receptors of atrial natriuretic factor. *Annu.Rev.Physiol.* **54**, 11-27.

MACLELLAN W.R. & SCHNEIDER M.D. (1977) Programmed cell death in cardiovascular biology and disease. *Circ.Res.* **81**, 137-144.

MACLELLAN W.R. & SCHNEIDER M.D. (1997) Death by design: Programmed cell death in cardiovascular biology and disease. *Circ.Res.* **81**, 137-144.

MAIR J. (2002) Role of cardiac natriuretic peptide testing in heart failure. *Clin.Chem.* **48**, 977-978.

MAISEL A.S., KOON J., KRISHNASWAMY P., KAZENEGRA R., CLOPTON P., GARDETTO N., MORRISEY R., GARDIA A., CHIU A. & DE MARIA A. (2001) Utility of B-natriuretic peptide as a rapid, point-of-care test for screening patients undergoing echocardiography to determine left ventricular dysfunction. *Am.Heart J.* **141**, 367-374.

MARIN-GRE M., FLEMING J.T. & STEINHAUSEN M. (1986) Atrial natriuretic peptide causes pre-glomerular vasodilatation and post-glomerular vasoconstriction in rat kidney. *Nature* **324**, 473-476.

MARLEAU S., LAPOINTE N., MASSICOTE J., CÉMÉUS C., JASMIN G., DUMONT L., SIROIS M.G., ROULEAU J.L., DU SOUICH P. & ONG H. (2002) Effect of chronic treatment with bovine recombinant growth hormone on cardiac dysfunction and lesion progression in UM-X7.1 cardiomyopathic hamsters. *Endocrinology* **143**, 4846-4855.

MARLEAU S., MULUMBA M., LAMONTAGNE D. & ONG H. (2005) Cardiac and peripheral actions of growth hormone and its releasing peptides: relevance for the treatment of cardiomyopathies. *Cardiol.Rev.* **(in press)**,

MASUTOMO K., MAKINO N., SUGANO M., MIYAMOTO S., HATA T., TOMOJI H. & YANAGA T. (1999) Extracellular Matrix Regulation in the Development of Syrian Cardiomyopathic Bio 14.6 and Bio 53.28 Hamsters. *J.Mol.Cell Cardiol.* 1607-1615.

MATSUI S., FU M.L., SHIMIZU M., FUKUOKA T., TERAOKA K., TAKEKOSHI N., MURAKAMI E. & HJALMARSON A. (1995) Dilated cardiomyopathy defines serum autoantibodies against G-protein-coupled cardiovascular receptors. *Autoimmunity* **21**, 85-88.

MATSUI T., TAO J., DEL MONTE F., LEE K.-H., LI L., PICARD M., FORCE T.L., FRANKE T.F., HAJJAR R.J. & ROSENZWEIG A. (2001) Akt, activation preserves cardiac function and prevents injury after transient cardiac ischemia in vivo. *Circulation* **104**, 335

MCGRATH M.F. & DE BOLD A.J. (2005) Determinants of natriuretic peptide gene expression. *Peptides* **26**, 933-943.

MCKEE K.K., PALYHA O.C., FEIGNER S.D., HRENIUK D.L., TAN C.P., PHILLIPS M.S., SMITH R.G., VAN DER PLOEG L.H. & HOWARD A.D. (1997) Molecular analysis of rat pituitary and hypothalamic growth hormone secretagogue receptors. *Mol.Endocrinol.* **11**, 415-423.

MELO L.G., VERESS A.T., ACKERMANN U., PANG S.C., FLYNN T.G. & SONNENBERG H. (1999a) Chronic hypertension in ANP knockout mice: contribution of peripheral resistance. *Regul.Peptides* **79**, 109-115.

MELO L.G., VERESS A.T., ACKERMANN U., STEINHELPER M.E., PANG S.C., TSE Y. & SONNENBERG H. (1999b) Chronic regulation of arterial blood pressure in ANP transgenic and knockout mice: role of cardiovascular sympathetic tone. *Cardiovasc.Res.* **43**, 437-444.

MERCADIER J.-J., LOMPRÉ A.-M., WISNEWSKY C., SAMUEL J.-L., BERCOVICI J., SWYNGHEDAUW B. & SCHWARTZ K. (1981) Myosis isoenzymic changes in several models of rat cardiac hypertrophy. *Circ.Res.* **49**, 525-532.

MERCIÉ P. & BELLOC F. (2001) Mécanismes physiopathologiques et méthodes d'analyse de l'apoptose cellulaire. *Rev Méd Interne* **22**, 90-96.

MEROLA B., CITTADINI A., COLAO A., LONGOBARDI S., FAZIO S., SABATINI D., SACCÀ L. & LOMBARDI G. (1993) Cardiac structural and functional abnormalities in adult patients with growth hormone deficiency. *J.Clin.Endocrinol.Metab.* **77**, 1658-1661.

MICHELS V.V., DRISCOLL D.J., MILLER F.A., OLSON T.M., ATKINSON E.J., OLSWOLD C.L. & SCHAID D.J. (2003) Progression of familial and non-familial dilated cardiomyopathy: long term follow up. *Heart* **89**, 757-761.

MINIERI M., FIACCAVENTO R., CAROSELLA L., PERUZZI G. & DI NARDO P. (1999) The cardiomyopathic hamster as model of early myocardial aging. *Mol.Cell.Biochem.* **198**, 1-6.

MOHAN S.B., PARKER M., WEHBI M. & DOUGLASS P. (2002) Idiopathic dilated cardiomyopathy: a common but mystifying cause of heart failure. *Cleveland Clin.J.Med.* **69**, 481-487.

MORISHITA R., GIBBONS G.H., PRATT R.E., TOMITA N., KANEDA Y. & OGIHARA T. (1994) Autocrine and paracrine effects of atrial natriuretic peptide gene transfer on vascular smooth muscle and endothelial cellular growth. *J.Clin.Invest.* **94**, 824-829.

MUCCIOLI G., BROGLIO F., VALETTO M.R., GHÈ C., CATAPANO F., GRAZIANI A., PAPOTTI M., BISI G., DEGHENGI R. & GHIGO E. (2000) Growth hormone-releasing peptides and the cardiovascular system. *Ann.Endocrinol.* **61**, 27-31.

MUDERS F., KROMER E.P., GRIESE D.P., PFEIFER M., HENSE H.-W., RIEGGER G.A.J. & ELSNER D. (1997) Evaluation of plasma natriuretic peptides as markers for left ventricular dysfunction. *Am.Heart J.* **134**, 442-449.

NAKAO K., OGAWA Y., SUGA S.-I. & IMURA H. (1992) Molecular biology and biochemistry of the natriuretic peptide system. I: Natriuretic peptides. *J.Hypertens.* **10**, 907-912.

NAPOLI R., GUARDASOLE V., MATARAZZO M., PALMIERI E.A., OLIVIERO U., FAZIO S. & SACCÀ L. (2002) Growth hormone corrects vascular dysfunction in patients with chronic heart failure. *J.Am.Coll.Cardiol.* **39**, 90-95.

O'DRISCOLL J.G., GREEN D.J., IRELAND M., KERR D. & LARBALESTIER R.I. (1997) Treatment of end stage cardiac failure with growth hormone. *Lancet* **349**, 1068

OGAWA T., LINZ W., STEVENSON M., BRUNEAU B.G., KUROSKI-DE BOLD M.L., CHEN J.H., EID H., SCHOLKENS B.A. & DE BOLD A.J. (1996) Evidence for load-dependent and load-independent determinants of cardiac natriuretic peptide production. *Circulation* **93**, 2059-2067.

OMEROVIC E., BOLLANO E., MOBINI R., KUJACIC V., MADHU B., SOUSSI B., FU M., HJALMARSON A., WAAGSTEIN F. & ISGAARD J. (2000) Growth hormone improves bioenergetics and decreases catecholamines in postinfarct rat hearts. *Endocrinology* **141**, 4592-4599.

OMLAND T., AAKVAAG A., BONARJEE V.V.S., CAIDAH K., LIE T.R., NILSEN D.W.T., SUNDSFJORD J.A. & DICKSTEIN K. (1996) Plasma brain natriuretic peptide as an indicator of left ventricular systolic function and long-term survival after acute myocardial infarction: comparison with plasma atrial

natriuretic peptide and N-terminal proatrial natriuretic peptide. *Circulation* **93**, 1963-1969.

OSTERZIEL K.J., STROHM O., SCHULER J., FRIEDRICH M., HÄNLEIN D., WILLENBROCK R., ANKER S.D., POOLE-WILSON P.A., RANKE M.B. & DIETZ R. (1998) Randomised, double-blind, placebo-controlled trial of human recombinant growth hormone in patients with chronic heart failure due to dilated cardiomyopathy. *Lancet* **351**, 1233-1237.

PADILLA F., GRACIA-DORADO D., AGULLO L., BARRABES J.A., INSERTE J., ESCOLONA N., MEYER M., MARIBET M., PINA P. & SOLER-SOLER J. (2001) Intravenous administration of the natriuretic peptide urodilatin at low doses during coronary reperfusion limits size in anesthetized pigs. *Cardiovasc.Res.* **51**, 592-600.

PANDEY K.N. (2005) Biology of natriuretic peptides and their receptors. *Peptides* **26**, 901-932.

PANDYA N., DEMOTT-FRIBERG R., BOWERS C.Y., BARKAN A.L. & JAFFE C.A. (1998) Growth hormone (GH)-releasing peptide-6 requires endogenous hypothalamic GH-releasing hormone for maximal GH stimulation. *J.Clin.Endocrinol.Metab.* **86**, 1186-1189.

PANG J.-J., XU R.-K., XU X.-B., CAO J.-M., NI C., ZHU W.-L., ASOTRA K., CHEN M.-C. & CHEN C. (2004) Hexarelin protects rat cardiomyocytes from angiotensin II-induced apoptosis in vitro. *Am J.Physiol.Heart Circ.Physiol.* **286**, H1063-H1069

PAPOTTI M., GHÈ C., CASSONI P., CATAPANO F., DEGHENGI R., GHIGO E. & MUCCIOLI G. (2000) Growth hormone secretagogue binding sites in peripheral human tissues. *J.Clin.Endocrinol.Metab.* **85**, 3803-3807.

PARISSIS J.T., ADAMOPOULOS S., KARATZAS D., PARASKEVAIDIS J., LIVANIS E. & KREMASTINOS D. (2005) Growth hormone-induced reduction of soluble apoptosis mediators is associated with reverse cardiac remodelling and improvement of exercise capacity in patients with idiopathic dilated cardiomyopathy. *Eur.J.Cardiovasc.Prev.Rehabil* **12**, 164-168.

PAUL R.V., FERGUSON T. & NAVAR L.G. (1988) ANF secretion and renal responses to volume expansion with equilibrated blood. *Am.J.Physiol.* **255**, F936-F943

PERROT A., RANKE M.B., DIETZ R. & OSTERZIEL K.J. (2001) Growth hormone treatment in dilated cardiomyopathy. *J.Card.Surg.* **16**, 127-131.

POPE B., HOH J.F.Y. & WEEDS A. (1980) The ATPase activities of rats cardiac myosin isoenzymes. *FEBS Lett.* **118**, 205-208.

QUIROZ A.C., SANDER G.E. & GILES T.D. (1988) Infectious cardiomyopathy. In *Cardiomyopathy*. Giles T D and Sander G E (Eds.) Ed. Eds T.D.Giles & G.E.Sander. PSG Publishing company, Inc. pp. 213-254.

RABEN M.S. (1958) Treatment of a pituitary dwarf with human growth hormone. *J.Clin.Endocrinol.Metab.* **18**, 901-903.

REISER P.J., PORTMAN M.A., NING X.-H. & MORAVEC C.S. (2001) Human cardiac myosin heavy chain isoforms in fetal and failing adult atria and ventricles. *Am J.Physiol.Heart Circ.Physiol.* **280**, H1814-H1820

ROBBINS J., GULICK J., SANCHEZ A., PHILIP H. & DOETSCHMAN T. (1990) Mouse embryonic stem cells express the cardiac myosin heavy chain genes during development in vitro. *J.Biol.Chem.* **265**, 11905-11909.

ROY R.N. & FLYNN T.G. (1990) Organization of the gene for iso-rANP, a rat B-type natriuretic peptide. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* **171**, 416-423.

RUSKOAHO H. (1992) Atrial natriuretic peptide: synthesis, release, and metabolism. *Pharmacol.Rev.* **44**, 479-602.

RYOKE T., GU Y., MAO L., HONGO M., CLARK R.G., PETERSON K.L. & ROSS J., Jr. (1999) Progressive cardiac dysfunction and fibrosis in the cardiomyopathic hamster and effects of growth hormone and angiotensin-converting enzyme inhibition. *Circulation* **100**, 1734-1743.

SABATINE M.S., MORROW D.A., DE LEMOS J.A., OMLAND T., DESAI M.Y., TANASIJEVIC M., HALL C., MCCABE C.H. & BRAUNWALD E. (2004) Acute change in circulating natriuretic peptide levels in relation to myocardial ischemia. *J.Am.Coll.Cardiol.* **44**, 1988-1995.

SACCÀ L., CITTADINI A. & FAZIO S. (1994) Growth hormone and the heart. *Endoc.Rev.* **15**, 555-573.

SAGNELLA G.A. (1998) Measurement and significance of circulating natriuretic peptides in cardiovascular disease. *Clin.Sci.* **95**, 519-529.

SAGNELLA G.A. (2001) Atrial natriuretic peptide mimetics and vasopeptidase inhibitors. *Cardiovasc.Res.* **51**, 416-428.

SAITO Y., NAKAO K., NISHIMURA K., SUGAWARA A., OKUMURA K., OBATA K., SONODA R., BAN T., YASUE H. & IMURA H. (1987) Clinical application of atrial natriuretic polypeptide in patients with congestive heart failure: beneficial effects on left ventricular function. *Circulation* **76**, 115-124.

SAKAMOTO A., ONO K., ABE M., JASMIN G., EKI T., MURAKAMI Y., MASAKI T., TOYO-OKA T. & HANAOKA F. (1997) Both hypertrophic and dilated cardiomyopathies are caused by mutation of the same gene, δ - sarcoglycan, in hamster: an animal model of disrupted dystrophin-associated glycoprotein complex. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* **94**, 13873-13878.

SAXENA P.R. (1992) Interaction between the renin angiotensin aldosterone and sympathetic nervous system. *J.Cardiovasc.Pharmacol.* **19**, S80-S88

SCHEUER J. & BAHN A.K. (1979) Cardiac contractile proteins. Adenosine triphosphate activity and physiological function. *Circ.Res.* **45**, 1-12.

SELVAIS P.L., DONCKIER J.E., ROBERT A., LALOUX O., VAN LINDEN F., AHN S., KETELSLEGERS J.M. & ROUSSEAU M.F. (1998) Cardiac natriuretic peptides for diagnosis and risk stratification in heart failure: influences of left ventricular dysfunction and coronary artery disease on cardiac hormonal activation. *Eur.J.Clin.Invest.* **28**, 636-642.

SENGENES C., MARO C., GALITZKY J., BERLAN M. & LAFONTAN M. (2005) Les peptides natriurétiques. Une nouvelle voie de la régulation de la lipolyse chez l'homme. *Médecine/sciences* **21**, 61-65.

SHEN Y.T., GRAHAM R.M. & VATNER S.F. (1991) Effects of atrial natriuretic factor on blood flow distribution and vascular resistance in conscious dogs. *Am.J.Physiol.Heart Circ.Physiol.* **260**, H1893-H1902

SHEN Y.T., WIEDMANN R.T., LYNCH J.J., GROSSMAN W. & JOHNSON R.G. (1996) GH replacement fails to improve ventricular function in hypophysectomized rats with myocardial infarction. *Am.J.Physiol.* **271**, H1721-H1727

SHINOMIYA M., TASHIRO J., SAITO Y., YOSHIDA S., FURUYA M., OKA N., TANAKA S., KANGAWA K. & MATSUO H. (1994) C-type natriuretic peptide inhibits intimal thickening of rabbit carotid artery after balloon catheter injury. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* **205**, 1051-1056.

SMALL E.M. & KRIEG P.A. (2004) Molecular regulation of cardiac chamber-specific gene expression. *Trends Cardiovasc.Med.* **14**, 13-18.

SMIT J.W.A., JANSSEN Y.J.H., LAMB H.J., VAN DER WALL E.E., STOKKEL M.P.M., VIERGEVER E., BIERMASZ N.R., BAX J.J., VLIEGEN H.W., DE ROOS A., ROMIJN J.A. & ROELFSEMA F. (2001) Six months of recombinant human GH therapy in patients with ischemic cardiac failure does not influence left ventricular function and mass. *J.Clin.Endocrinol.Metab.* **86**, 4638-4643.

SOEKI T., KISHIMOTO I., OKUMURA H., TOKUDOME T., HORIO T., MORI K. & KANGAWA K. (2005) C-type natriuretic peptide, a novel antifibrotic and antihypertrophic agent, prevents cardiac remodeling after myocardial infarction. *J.Am.Coll.Cardiol.* **45**, 608-616.

SPALLAROSSA P., ROSSETTIN P., MINUTO F., CARUSO D., CORDERA R., BATTISTINI M., BARRECA A., MASPERONE M.A. & BRUNELLI C. (1999) Evaluation of growth hormone administration in patients with chronic heart failure secondary to coronary artery disease. *Am.J.Cardiol.* **84**, 430-433.

SPAN J.P.T., PIETERS G.F.F.M., SWEEP C.G.J., HERMUS A.R.M.M. & SMALS A.G.H. (2000) Gender difference in insulin-like growth factor I response to growth hormone (GH) treatment in GH-deficient adults: role of sex hormone replacement. *J.Clin.Endocrinol.Metab.* **85**, 1121-1125.

ST-ONGE S., CHIDIAC P., BRAKIER-GINGRAS L. & BOUVIER M. (1994) β -adrenergic receptor desensitization in the early stage of hereditary cardiomyopathy in hamsters. *Can.J.Physiol.Pharmacol.* **72**, 875-883.

STANTON E., HANSEN M., WIJEYSUNDERA H.C., KUPCHAK P., HALL C. & ROULEAU J.L. (2005) A direct comparison of the natriuretic peptides and their relationship to survival in chronic heart failure of a presumed non-ischaemic origin. *Eur.J.Heart Failure* **7**, 557-565.

STEIN B., BARTEL S., KIRCHHEFER U., KOKOTT S., KRAUSE E.G., NEUMAN J., SCHMITZ W. & SCHOLZ H. (1996) Relation between contractile function and regulatory cardiac proteins in hypertrophied hearts. *Am.J.Physiol.* **270**, H2021-H2028

STROBL J.S. & THOMAS M.J. (1994) Human growth hormone. *Pharmacol.Rev.* **46**, 1-34.

SUDOH T., MINAMINO N., KANGAWA K. & MATSUO H. (1990) C-type natriuretic peptide (CNP): a new member of natriuretic peptide family identified in porcine brain. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* **168**, 863-870.

SUGIURA S. & YAMASHITA H. (1998) Functional characterization of cardiac myosin isoforms. *Japan.Journal of Physiol.* **48**, 173-179.

SUTTNER S.W. & BOLDT J. (2004) Natriuretic peptide system: physiology and clinical utility. *Curr.Opin.Crit.Care* **10**, 336-341.

SUZUKI T., YAMAZAKI T. & YAZAKI Y. (2001) The role of the natriuretic peptides in the cardiovascular system. *Cardiovasc.Res.* **51**, 489-494.

TADA M. & TOYOFUKU T. (1996) SR Ca(2+)-ATPase/phospholamban in cardiomyocyte function. *J.Cardiac Failure* **2(Suppl 4)**, S77-S85

TAJIMA M., WEINBERG E.O., BARTUNEK J., JIN H., YANG R., PAONI N.F. & LORELL B.H. (1999) Treatment with growth hormone enhances contractile reserve and intracellular calcium transients in myocytes from rats with postinfarction heart failure. *Circulation* **99**, 127-134.

TAKAYA K., ARIYASU H., KANAMOTO N., IWAKURA H., YOSHIMURA A., HARADA M., MORI K., KOMATSU Y., USUI T., SHIMATSU A., OGAWA Y., HOSODA K., AKAMIZU T., KOJIMA M., KANGAWA K. &

NAKAO K. (2000) Ghrelin strongly stimulates growth hormone release in humans. *J.Clin.Endocrinol.Metab.* **85**, 4908-4911.

TALWAR S., DOWNIE P.F., NG L.L. & SQUIRE I.B. (2000) Towards a blood test for heart failure: the potential use of circulating natriuretic peptides. *Br.J.Clin.Pharmacol.* **50**, 15-20.

THIBAUT G., NEMER M., DROUIN J., LAVIGNE J.P., DING J., CHARBONNEAU C., GARCIA R., GENEST J., JASMIN G., SOLE M. & CANTIN M. (1989) Ventricles as a major site of atrial natriuretic factor synthesis and release in cardiomyopathic hamsters with heart failure. *Circ.Res.* **65**, 71-82.

TIVESTEN Å., BOLLANO E., CAIDAH K., KUJACIC V., SUN X.Y., HEDNER T., HJALMARSON Å., BENGTSSON B.-Å. & ISGAARD J. (2000) The growth hormone secretagogue Hexarelin improves cardiac function in rats after experimental myocardial infarction. *Endocrinology* **141**, 60-66.

TIVESTEN Å., CAIDAH K., KUJACIC V., SUN X.Y., HERNER T., BENGTSSON B.-Å. & ISGAARD J. (2001) Similar cardiovascular effects of growth hormone and insulin-like growth hormone factor-I in rats after experimental myocardial infarction. *Growth Horm.IGF Res.* **11**, 187-195.

TOKGOZOGLU S.L., ERBAS T., AYTEMIR K., AKALIN S., KES S. & ORAM E. (1994) Effects of octreotide on left ventricular mass acromegaly. *Am.J.Cardiol.* **74**, 1072-1074.

TOKUDOME T., HORIO T., SOEKI T., KISHIMOTO I., SUGA S., YOSHIHARA F., KAWANO Y., KOHNO M. & KANGAWA K. (2004) Inhibitory effect of C-type natriuretic peptide (CNP) on cultured cardiac myocyte hypertrophy: interference between CNP and endothelin-1 signaling pathways. *Endocrinology* **145**, 2131-2140.

TÓTH M., VUORINEN K.H., VUOLTEENAHO O., HASSINEN I.E., UUSIMAA P.A., LEPPÄLUOTO J. & RUSKOAHO H. (1994) Hypoxia stimulates release of ANP and BNP from perfused rat ventricular myocardium. *Am.J.Physiol.* **266**, H1572-H1580

TWU C., LIU N.Q., POPIK W., BUKRINSKY M., SAYRE J., ROBERTS J., RANIA S., BRAMHANDAM V., ROOS K.P., MACLELLAN W.R. & FIALA M. (2002) Cardiomyocytes undergo apoptosis in human immunodeficiency virus cardiomyopathy through mitochondrion- and death receptor-controlled pathways. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* **99**, 14386-14391.

UEYAMA T., OHKUSA T., HISAMATSU Y., NAKAMURA Y., YAMAMOTO T., YANO M. & MATSUZAKI M. (1998a) Alteration in cardiac SR Ca²⁺ release channels during development of heart failure in cardiomyopathic hamsters. *Am.J.Physiol.Heart Circ.Physiol.* **43**, H1-H7

UEYAMA T., OHKUSA T., YANO M. & MATSUZAKI M. (1998b) Growth hormone preserves cardiac sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ release channels (ryanodine receptors) and enhances cardiac function in cardiomyopathic hamsters. *Cardiovasc.Res.* **40**, 64-73.

VAN THIEL S.W., SMIT J.W., DE ROOS A., BAX J.J., VAN DER WALL E.E., BIERMASZ N.R., VIERGEVER E., VLIEGEN H.W., ROMIJN J.A., ROELFSEMA F. & LAMB H.J. (2004) Six-months of recombinant human GH therapy in patients with ischemic cardiac failure. *Int.J.Cardiovasc.Imaging* **20**, 53-60.

VESELY D.L. (2001) Atrial natriuretic peptides in pathophysiological diseases. *Cardiovasc.Res.* **51**, 647-658.

VILLARD E., DUBOSCQ-BIDOT L., CHARRON P., BENAICHE A., CONRAADS V., SYLVIUS N. & KOMAJDA M. (2005) Mutation screening in

dilated cardiomyopathy: prominent role of the beta myosin heavy chain gene. *Eur.Heart J.* **26**, 794-803.

VOLTERRANI M., MANELLI F., CICOIRA M., LORUSSO R. & GIUSTINA A. (2000) Role of growth hormone in chronic heart failure. Therapeutic Implications. *Drugs* **60**, 711-719.

VUOLTEENAHO O., ARJAMAA O., JARVINEN M. & RINNE A. (1985) Atrial natriuretic factor. Immunohistochemical localization in the specific atrial granules of the rat heart. *Acta Histochem.* **77**, 199-203.

WATERS M.J., SHANG C.A., BEHNCKEN S.N., TAM S.P., LI H., SHEN B. & LOBIE P.E. (1999) Growth hormone as a cytokine. *Clin.Exp.Pharmacol.Physiol.* **26**, 760-764.

WEBER K.T. (1989) Cardiac interstitium in health and disease: the fibrillar collagen network. *J.Am.Coll.Cardiol.* **13**, 1637-1652.

WEI C.M., AARHUS L.L., MILLER V.M. & BURNETT J.C.Jr. (1993) Action of C-type natriuretic peptide in isolated canine arteries and veins. *Am.J.Physiol.* **264**, H71-H73

WEISS A. & LEINWAND L.A. (1996) The mammalian myosin heavy chain gene family. *Annu.Rev.Cell Dev.Biol* **12**, 417-439.

WITTHAUT R. (2004) Science review: Natriuretic peptides in critical illness. *Critical care* **8**, 342-349.

WOLSKA B.M., STOJANOVIC M.O., LUO W., KRANIAS E.G. & SOLARO R.J. (1996) Effect of ablation of phospholamban on dynamics of cardiac myocyte contraction and intracellular Ca^{2+} . *Am.J.Physiol.* **271**, C391-C397

WOOD T.J.J., HALDOSEN L.-A., SLIVA D., UNSTRÖM M. & NORSTEDT G. (1997) Stimulation of kinase cascades by growth hormone: a paradigm for cytokine signaling. *Progress Nucl. Acid Res. Mol. Biol.* **67**, 73-94.

WOODS R.L. (2004) Cardioprotective functions of atrial natriuretic peptide and B-type natriuretic peptide: a brief review. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* **31**, 791-794.

WOODYATT N.J. (2004) Cardioprotective functions of atrial natriuretic peptide and B-type natriuretic peptide: a brief review. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* **31**, 791-794.

YANG R., BUNTING S., GILLET N., CLARK R. & JIN H. (1995) Growth hormone improves cardiac performance in experimental heart failure. *Circulation* **92**, 262-267.

YUNG C.K., HALPERIN V.L., TOMASELLI G.F. & WINSLOW R.L. (2004) Gene expression profiles in end-stage human idiopathic cardiomyopathy: altered expression of apoptotic and cytoskeletal genes. *Genomics* **83**, 281-297.

