

Université de Montréal

**Rôles et mécanismes moléculaires de l'apoptose  
cardiovasculaire en réponse à des antihypertenseurs**

Par

David Duguay

Département de Pharmacologie

Faculté de Médecine

Thèse présentée à la Faculté des études supérieures

En vue de l'obtention du grade de

Philosophiae Doctor (Ph.D.)

en Pharmacologie

Juin 2007

© David Duguay, 2007



Université de Montréal



**Direction des bibliothèques**

**AVIS**

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

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

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

**NOTICE**

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

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

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

Faculté des études supérieures

Cette thèse intitulée :

**Rôles et mécanismes moléculaires de l'apoptose  
cardiovasculaire en réponse à des antihypertenseurs**

par

David Duguay

a été évaluée par un jury composé des personnes suivantes :

Pierre Beaulieu

Président-rapporteur

Denis deBlois

Directeur de recherche

Guy Rousseau

Membre du jury

Pédro D'Orléans-Juste

Examineur externe

Pavel Hamet

Représentant du doyen de la FES

## Résumé

Certains antihypertenseurs, en plus d'abaisser la tension artérielle, peuvent corriger le remodelage cardiovasculaire pathologique. Chez le rat spontanément hypertendu, les inhibiteurs de l'enzyme de conversion de l'angiotensine (énalapril) et les antagonistes AT<sub>1</sub> (valsartan) génèrent, lors de la phase précoce de régression de l'hypertrophie, une vague de mort cellulaire par apoptose dans les cellules de muscle lisse (CML) aortiques et dans les fibroblastes cardiaques. Cependant, le type cellulaire cardiaque ciblé par les bloqueurs calciques (amlodipine), tout comme les mécanismes de l'apoptose transitoire déclenchée par ces trois traitements réduisant la tension artérielle par des voies distinctes, demeurent mal définis. L'objectif de cette thèse consistait donc à caractériser les voies moléculaires orchestrant l'apoptose initiée par des médicaments provenant de ces trois classes, tout en déterminant le rôle de cette apoptose dans la correction du remodelage hypertensif. Dans l'aorte, l'énalapril a augmenté transitoirement l'expression fonctionnelle du récepteur B<sub>1</sub> des kinines, en corrélation temporelle avec l'apparition de noyaux apoptotiques dans la média. Le blocage de ce récepteur inductible a complètement prévenu l'apoptose de CML initiée par l'énalapril, tandis qu'un antagoniste du récepteur B<sub>2</sub> constitutif n'a pas modulé cette réponse. L'apoptose vasculaire déclenchée par le valsartan (associée à l'activation des récepteurs AT<sub>2</sub> lors d'études antérieures) et par l'amlodipine (associée à la voie extrinsèque via caspase-8), a également été relayée par le récepteur B<sub>1</sub>. De plus, cette apoptose a contribué à la moitié de l'action anti-hypertrophique vasculaire, sans égard à l'antihypertenseur étudié. Dans le coeur, l'amlodipine a corrigé l'hyperplasie des non-cardiomyocytes par apoptose en ciblant spécifiquement les fibroblastes interstitiels lors de l'initiation de la régression de l'hypertrophie ventriculaire gauche, bien avant la réduction de la taille des cardiomyocytes. Finalement, le blocage des récepteurs des kinines n'a pas modulé l'apoptose cardiaque dans notre modèle. L'élucidation des voies moléculaires impliquées dans la réponse apoptotique, notamment le récepteur B<sub>1</sub> des kinines, ainsi que la reconnaissance du rôle de cette apoptose dans la correction de l'hypertrophie cardiovasculaire, offrent une meilleure compréhension des mécanismes sous-jacents aux effets bénéfiques des antihypertenseurs offrant généralement un meilleur pronostic concernant la morbidité et la mortalité cardiovasculaires.

Mots clés : Hypertension artérielle, Bloqueurs de canaux calciques, Inhibiteurs de l'enzyme de conversion de l'angiotensine, Antagonistes AT<sub>1</sub>, Récepteurs (B<sub>1</sub> et B<sub>2</sub>) des kinines, Hypertrophie vasculaire, Cellules de muscle lisse vasculaires, Hypertrophie ventriculaire gauche, Fibroblastes cardiaques, Rat spontanément hypertendu

## Abstract

Some antihypertensive drugs, independently of blood pressure lowering, can reduce pathological cardiovascular remodeling. In the spontaneously hypertensive rat, angiotensin converting enzyme inhibitors (enalapril) and AT<sub>1</sub> receptors antagonists (valsartan) stimulate, at the onset of hypertrophy regression, a wave of aortic smooth muscle cells (SMC) and cardiac fibroblasts deletion by apoptosis. However, the cardiac cell type targeted by calcium channel blockers (amlodipine), and the mechanisms of this transient cardiovascular apoptosis initiated by members of those three classes of antihypertensive drugs, which lower blood pressure by distinct mechanisms, remain incompletely defined. The aim of this thesis was to define the molecular pathways involved in the apoptosis initiated by different classes of antihypertensive drugs, along with the investigation of the role played by this apoptosis in regard of the reversal of the structural hypertensive remodeling. In the aorta, enalapril transiently increased functional kinin B<sub>1</sub> receptor expression in temporal correlation with the presence of apoptotic nuclei in the media. SMC apoptosis with enalapril was completely prevented by blocking this inducible receptor, while blocking the constitutive kinin B<sub>2</sub> receptor did not modulate apoptosis. Vascular apoptosis triggered by valsartan (previously associated to AT<sub>2</sub> receptor activation) and by amlodipine (associated to the extrinsic pathway via caspase-8) also involved kinin B<sub>1</sub> receptor. Furthermore, this apoptosis contributed to half of the vascular anti-hypertrophic action, without regards to the studied antihypertensive drug. In the heart, amlodipine reduced non-cardiomyocytes hyperplasia by selectively eliminating interstitial fibroblasts by apoptosis in temporal correlation with the onset of left ventricular hypertrophy regression and well before the reduction of cardiomyocytes size. Finally, kinin receptors blockers did not affect cardiac apoptosis in our model. The elucidation of the molecular pathways involved in the apoptotic response, notably the kinin B<sub>1</sub> receptor, as well as the recognition of the role played by apoptosis in the reversal of cardiovascular hypertrophy, give a better understanding of the mechanisms underlying the beneficial actions of antihypertensive drugs that usually give a better prognostic regarding cardiovascular morbidity and mortality.

Keywords : Hypertension, Calcium channel blockers, Angiotensin converting enzyme inhibitors, AT<sub>1</sub> antagonists, Kinin receptors (B<sub>1</sub> and B<sub>2</sub>), Vascular hypertrophy, Vascular

smooth muscle cells, Left ventricular hypertrophy, Cardiac fibroblasts, Spontaneously hypertensive rat.

# Table des matières

CHAPITRE 1 - Introduction .....	1
1.1 L'hypertension artérielle .....	2
1.1.1 Définition, prévalence et étiologie de l'hypertension artérielle .....	2
1.1.2 Mécanismes de contrôle de la tension artérielle.....	4
1.1.2.1 Hémodynamie de la tension artérielle .....	4
1.1.2.2 Systèmes nerveux central et autonome .....	5
1.1.2.3 Facteurs humoraux .....	5
1.1.3 Traitement de l'hypertension artérielle .....	11
1.1.3.1 Buts et approches thérapeutiques .....	11
1.1.3.2 Classes de médicaments antihypertenseurs.....	12
1.1.4 Modèles expérimentaux de l'hypertension artérielle .....	17
1.1.4.1 Le rat spontanément hypertendu .....	19
1.2 Actions cardiovasculaires de l'angiotensine II et des kinines.....	20
1.2.1 Implications physiopathologiques de l'angiotensine II.....	20
1.2.1.1 Système rénine-angiotensine tissulaire et production alternative d'angiotensine II.....	20
1.2.1.2 Récepteurs de l'angiotensine II et signalisation cellulaire .....	21
1.2.1.3 Réponses physiologiques relayées par l'angiotensine II et mécanismes moléculaires .....	24
1.2.1.4 Modulation du système rénine-angiotensine par des antihypertenseurs ciblant cette voie.....	30
1.2.2 Implications physiopathologiques des kinines.....	32
1.2.2.1 Les récepteurs des kinines.....	32
1.2.2.2 Autres aspects de la signalisation impliquant les kinines .....	35
1.2.2.3 Kinines et physiopathologie cardiovasculaire.....	37
1.2.2.4 Implication des kinines dans les effets pharmacologiques des inhibiteurs de l'enzyme de conversion de l'angiotensine et des antagonistes AT <sub>1</sub> .....	43
1.3 Le calcium et son implication dans l'hypertension artérielle.....	46
1.3.1 Dynamique et homéostasie du système calcique .....	46
1.3.1.1 Entrée du calcium dans la cellule.....	46
1.3.1.2 Mobilisation du calcium intracellulaire.....	48

1.3.1.3	Protéines tampons et effectrices du calcium .....	49
1.3.1.4	Retour du calcium vers son origine.....	49
1.3.1.5	Remodelage des systèmes de signalisation associés au calcium.....	50
1.3.2	Rôles du calcium dans la pathologie hypertensive.....	50
1.3.2.1	Calcium, prolifération et cycle cellulaire .....	50
1.3.2.2	Calcium et matrice extracellulaire.....	51
1.3.2.3	Calcium et mort cellulaire .....	51
1.3.2.4	Calcium, Contractilité cardiaque et structure cardiaque .....	54
1.3.2.5	Calcium, contractilité vasculaire et structure vasculaire.....	56
1.3.3	Effets pléiotropiques des bloqueurs de canaux calciques .....	59
1.3.3.1	Actions pléiotropiques de l'amlodipine .....	59
1.3.3.2	Mécanismes suggérés des effets pléiotropiques de l'amlodipine.....	61
1.4	Les dommages aux organes cibles de l'hypertension artérielle et leur modulation pharmacologique .....	62
1.4.1	Système vasculaire .....	62
1.4.1.1	Structure des artères .....	62
1.4.1.2	Pathophysiologie dans l'hypertension artérielle .....	63
1.4.1.3	Pharmacothérapie du remodelage vasculaire hypertensif.....	71
1.4.2	Remodelage cardiaque hypertensif .....	74
1.4.2.1	Architecture cellulaire cardiaque .....	74
1.4.2.2	Hypertrophie ventriculaire gauche .....	75
1.4.2.3	Fibrose cardiaque .....	81
1.4.2.4	Transition vers l'insuffisance cardiaque .....	83
1.4.2.5	Pharmacothérapie du remodelage cardiaque hypertensif.....	84
1.5	Apoptose : définitions et rôles dans l'hypertension artérielle.....	88
1.5.1	Description de l'apoptose et sa détection.....	88
1.5.1.1	Différentes formes de mort cellulaire.....	89
1.5.1.2	Critères morphologiques de détection.....	90
1.5.1.3	Critères biochimiques de détection .....	91
1.5.2	Voies de signalisation et cascades apoptotiques .....	92
1.5.2.1	La phase d'initiation.....	93
1.5.2.2	La phase d'exécution.....	98
1.5.2.3	La phase de dégradation.....	99

1.5.3 L'apoptose dans la pathologie hypertensive .....	101
1.5.3.1 Développement et traitement de pathologies par l'apoptose .....	101
1.5.3.2 Rôle de l'apoptose dans les maladies cardiovasculaires .....	101
1.5.3.3 L'apoptose et ses mécanismes moléculaires dans les dommages associés à l'hypertension artérielle.....	102
1.5.4 Rôle de la modulation de l'apoptose dans les effets bénéfiques des antihypertenseurs.....	106
1.5.4.1 Modulation de l'apoptose rénale par les antihypertenseurs .....	107
1.5.4.2 Modulation de l'apoptose cardiaque par les antihypertenseurs .....	108
1.5.4.3 Modulation de l'apoptose vasculaire par les antihypertenseurs.....	110
1.6 Considérations méthodologiques sur la mesure de l'apoptose <i>in vivo</i> .....	114
1.6.1 Généralités.....	114
1.6.2 Fragmentation internucléosomale de l'ADN .....	115
1.6.3 Protéines régulatrices de l'apoptose.....	116
1.6.4 Densité cellulaire et outils stéréologiques.....	116
1.7 Objectifs généraux.....	119
 CHAPITRE 2 – Méthodes et analyses .....	 120
2.1 Fragmentation internucléosomale de l'ADN .....	121
2.2 Nombre de cellules dans l'aorte .....	122
2.3 Nombre de cellules dans le ventricule gauche .....	123
 CHAPITRE 3 – Résultats.....	 125
3.1 Publication N°1 .....	126
Kinin B <sub>2</sub> Receptor Is Not Involved in Enalapril-induced Apoptosis and Regression of Hypertrophy in Spontaneously Hypertensive Rat Aorta: Possible Role of B <sub>1</sub> Receptor	126
3.1.1 Summary .....	128
3.1.2 Introduction .....	129
3.1.3 Methods.....	130
3.1.4 Results .....	135
3.1.5 Discussion .....	137
3.1.6 References .....	141
3.1.7 Figure legends, figures and table.....	146

3.2 Publication N°2 .....	155
Kinin B <sub>1</sub> Receptors Mediate Smooth Muscle Apoptosis During Regression of Aortic Hypertrophy in Enalapril-treated Hypertensive Rats .....	
3.2.1 Summary .....	157
3.2.2 Introduction .....	158
3.2.3 Methods.....	159
3.2.4 Results .....	163
3.2.5 Discussion .....	165
3.2.6 References .....	170
3.3.7 Figure legends, figures and table.....	177
3.3 Publication N°3 .....	186
Differential Regulation of Akt, Caspases and MAP Kinases Underlies Smooth Muscle Cell Apoptosis During Onset Aortic Remodeling in Hypertensive Rats Treated With Amlodipine.....	
3.3.1 Summary .....	188
3.3.2 Introduction .....	189
3.3.3 Methods.....	190
3.3.4 Results .....	193
3.3.5 Discussion .....	195
3.3.6 References .....	199
3.3.7 Figure legends, figures and tables .....	203
3.4 Publication N°4 .....	213
Fibroblast Apoptosis Precedes Cardiomyocytes Mass Reduction During Left Ventricular Remodeling in Hypertensive Rats Treated With Amlodipine .....	
3.4.1 Summary .....	215
3.4.2 Introduction .....	216
3.4.3 Methods.....	217
3.4.4 Results .....	219
3.4.5 Discussion .....	222
3.4.6 References .....	225
3.4.7 Figure legends, figures and tables .....	229
3.5 RÉSULTATS ADDITIONNELS.....	240
3.5.1 Objectifs .....	241

3.5.2 Hypothèse.....	241
3.5.3 Méthodologie .....	241
3.5.4 Résultats .....	243
3.5.4.1 Rôles du récepteur B <sub>1</sub> des kinines dans la réponse aux antihypertenseurs	243
3.5.4.2 Participation du céramide dans la réponse à l'énalapril.....	246
3.5.4.3 Autres résultats.....	248
 CHAPITRE 4 – Discussion générale .....	 254
4.1 Implications mécanistiques et théoriques de la nature transitoire de l'apoptose cardiovasculaire en réponse aux antihypertenseurs .....	255
4.1.1 Initiation de l'apoptose aortique.....	255
4.1.2 Points de convergence mécanistique.....	258
4.1.3 Terminaison de l'apoptose aortique .....	263
4.1.4 Population cellulaire aortique ciblée .....	264
4.1.5 Rôle de l'apoptose dans la régression de l'hypertrophie vasculaire .....	266
4.1.5.1 Autres mécanismes.....	267
4.1.6 Apoptose cardiaque .....	270
4.2 Limitations du modèle utilisé et des études présentées.....	273
4.3 Implications cliniques .....	276
4.4 Conclusion.....	281
 Références .....	 282

## Liste des tableaux

### Introduction, méthodes et discussion

Tableau 1. Classes d'agents antihypertenseurs .....	12
---	----

### Publication N°1

Table 1: Cardiac hypertrophy following SHR treatment with enalapril, Hoe 140 or a combination of both drugs for 4 weeks. ....	154
---	-----

### Publication N°2

Table 1: Cardiac hypertrophy and DNA content following SHR treatment with enalapril, R-715 or a combination of both drugs for 21 days. ....	185
---	-----

### Publication N°3

Table 1. Systolic blood pressure measured by tail-cuff plethysmography during treatment with amlodipine.....	211
Table 2. Aortic DNA content, synthesis and fragmentation of SHR treated with amlodipine.....	212

### Publication N°4

Table 1. Body weight, left and right ventricular weight and left ventricular collagen content of SHR during amlodipine treatment and of age-matched controls and normotensive WKY rats.....	238
Table 2. Density of non-cardiomyocytes nuclei in three subregions of the left ventricle of SHR during amlodipine treatment and in vehicle-treated SHR and WKY rats.....	239

### Résultats additionnels

Tableau 1. Hypertrophie et contenu ventriculaire gauche en ADN suite au traitement de 21 jours à l'énalapril, au R-954 ou une combinaison des deux.....	246
Tableau 2. Hypertrophie et contenu rénal en ADN lors du traitement à l'énalapril. ....	251

## Liste des figures

### Introduction, méthodes et discussion

Figure 1. Voies de formation des peptides angiotensines et composantes nouvellement identifiées du système rénine-angiotensine.....	8
Figure 2. Kinines : voies de formation, de dégradation, et leurs récepteurs. ....	10
Figure 3. Résumé des principaux mécanismes de contrôle de la tension artérielle. ....	17
Figure 4. Les différents modes du remodelage vasculaire. ....	65
Figure 5. Représentation schématisée des myocytes et des non-myocytes dans le cœur. ...	75
Figure 6. Les deux voies classiques de l'apoptose.....	93
Figure 7. Effets des inhibiteurs du système rénine-angiotensine et des bloqueurs des canaux calciques sur l'apoptose dans le cœur hypertendu.....	109
Figure 8. Schéma présentant la technique du dissecteur tridimensionnel .....	123
Figure 9. Mécanismes généraux activés par les antihypertenseurs induisant l'apoptose de CML et renversant l'hypertrophie aortique chez le SHR.....	256

### Publication N°1

Figure 1. Systolic blood pressure regulation over the 4-week experimental period .....	148
Figure 2. Blockade of kinin B <sub>2</sub> receptors in anesthetized rat after 4 weeks.....	149
Figure 3. Enalapril induces aortic hypertrophy regression and SMC apoptosis even in the presence of a kinin B <sub>2</sub> receptor antagonist .....	150
Figure 4. Enalapril induces aortic DNA fragmentation even with the co-administration of Hoe 140.....	151
Figure 5. Enalapril treatment transiently increased aortic contraction elicited by a kinin B <sub>1</sub> receptor agonist .....	152
Figure 6. Increased expression of B <sub>1</sub> and B <sub>2</sub> receptors after enalapril treatment.....	153

### Publication N°2

Figure 1. Increased expression of kinin B <sub>1</sub> receptors in the aorta after enalapril treatment.....	179
Figure 2. Time course of enalapril effects in the aorta.....	180

Figure 3. Systolic blood pressure measured by tail-cuff plethysmography at days 0, 4, 14 and 18 of treatment.....	181
Figure 4. Evaluation of aortic hypertrophy and detection of apoptotic nuclei and cGMP at the time of active apoptosis.....	182
Figure 5. Cumulative effect of enalapril alone or in combination with kinin B <sub>1</sub> receptors antagonist on aortic SMC number and aortic hypertrophy .....	183
Figure 6. Expression ratio of the phosphorylated form over the total form of MAPKs at days 9-10 and day 21 of treatment .....	184

### Publication N°3

Figure 1. Line graphs showing (a) the reduced aortic cross-sectional area after 5 days of treatment with amlodipine and (b) the reduced aortic SMC number after 3 days of treatment with amlodipine.....	205
Figure 2. ISOL-positive nuclei present on aortic sections of rats sacrificed within one week of treatment with amlodipine.....	206
Figure 3. Bar graphs showing the aortic expression of cleaved caspases in response to amlodipine.....	207
Figure 4. Bar graphs showing (a) the reduced phosphorylation level of Akt from days 1 to 3 and (b) the trend toward an increased PTEN / phospho-PTEN expression ratio from days 1 to 6.....	208
Figure 5. Bar graphs showing (a) the reduced phosphorylation level of p38 at day 3 only and (b and c) the reduced phosphorylation level of ERK 1/2 from days 3 to 6 and of JNK from days 4 to 6 .....	209
Figure 6. Working hypothesis for amlodipine-induced aortic SMC apoptosis in SHR.....	210

### Publication N°4

Figure 1. Mean arterial blood pressure measured by plethysmography and heart rate of vehicle-treated and amlodipine-treated SHR during the 28 days of therapy .....	232
Figure 2. Left ventricle weight to body weight ratio, right ventricle weight to body weight ratio, left ventricular subepicardial and subendocardial cardiomyocytes cross-sectionnal area and left ventricular ANP level .....	233
Figure 3. Changes of apoptotic regulatory proteins expression after 0, 4, 7, 10, 14 and 28 days of treatment with amlodipine.....	234

Figure 4. Changes in the total number of non-cardiomyocytes nuclei, cardiomyocytes nuclei and DNA content in the left ventricle of SHR treated with amlodipine for 0, 4, 7, 10, 14 and 28 days.....	235
Figure 5. Quantification of <i>in situ</i> TUNEL labeling, number of capillaries per cardiomyocyte and number of ED-1 positive cells (macrophages and monocytes) per cross-section of the left ventricle of SHR during amlodipine treatment.....	236
Figure 6. Double immunofluorescence with TUNEL-AMCA labeling and lectin-TRITC binding in SHR left ventricle .....	237

### Résultats additionnels

Figure 1. Pression artérielle systolique suite à l'administration d'antihypertenseurs seuls ou en combinaison avec un antagoniste du RB <sub>1</sub> . .....	243
Figure 2. Aire de section aortique suite à l'administration d'antihypertenseurs seuls ou en combinaison avec un antagoniste du RB <sub>1</sub> . .....	245
Figure 3. Nombre de cellules dans l'aorte par unité de longueur suite à l'administration d'antihypertenseurs seuls ou en combinaison avec un antagoniste du RB <sub>1</sub> .....	245
Figure 4. Noyaux ISOL positifs dans l'aorte suite au traitement à l'énalapril, seul ou en combinaison avec la fumonisine B <sub>1</sub> . .....	247
Figure 5. Niveau de GMPc dans l'aorte suite au traitement à l'énalapril, seul ou en combinaison avec la fumonisine B <sub>1</sub> . .....	247
Figure 6. Niveau d'expression de p21 <sup>Cip1/Waf1</sup> et p27 <sup>Kip1</sup> suite au traitement à l'énalapril.	249
Figure 7. Niveau d'expression de Akt suite au traitement à l'énalapril.....	250
Figure 8. Sites de liaisons pour les récepteurs B <sub>1</sub> et B <sub>2</sub> des kinines chez le SHR suite au traitement à l'énalapril. ....	252
Figure 9. Quantification des sites de liaisons pour les récepteurs B <sub>1</sub> et B <sub>2</sub> des kinines chez le SHR suite au traitement à l'énalapril. ....	253

## Liste des sigles et abréviations

AA	Acide aminé
Ala (A)	Alanine
Arg (R)	Arginine
Asn (N)	Asparagine
Asp (D)	Aspartate
Cys (C)	Cystéine
Gln (Q)	Glutamine
Glu (E)	Glutamate
Gly (G)	Glycine
His (H)	Histidine
Iso (I)	Isoleucine
Leu (L)	Leucine
Lys (K)	Lysine
Met (M)	Méthionine
Phe (F)	Phénylalanine
Pro (P)	Proline
Ser (S)	Sérine
Thr (T)	Thréonine
Trp (W)	Tryptophane
Tyr (Y)	Tyrosine
Val (V)	Valine
Ac-SDKP	N-acétyl-Ser-Asp-Lys-Pro
ADMA	Dyméthylarginine asymétrique
ADN	Acide désoxyribonucléique
ADN-PK	Protéine kinase dépendante de l'ADN
AGT	Angiotensinogène
AIF	Facteur induisant l'apoptose
ALLHAT	<i>Antihypertensive and Lipid-Lowering Treatment to Prevent Heart Attack Trial</i>
AMCA	<i>7-Amino-4-Methylcoumarin-3-acetic Acid</i>
AmM	Aminopeptidase M
AMPc	Adénosine monophosphate cyclique

Ang	Angiotensine
ANOVA	Analyse de variance
ANP	Peptide natriurétique auriculaire
Apaf-1	<i>Apoptosis protease-activating factor</i>
ARC	Modulateur de l'apoptose possédant un CARD
ARNm	Acide ribonucléique messenger
ASCOT	<i>Anglo-Scandinavian Cardiac Outcomes Trial</i>
AT <sub>1</sub>	Récepteur de type 1 de l'Ang II
AT <sub>2</sub>	Récepteur de type 2 de l'Ang II
ATM	<i>Ataxia-Telangiectasia-Mutated</i>
ATP	Adénosine 5'-triphosphate
AVC	Accident vasculaire cérébral
BCC	Bloqueurs de canaux calciques
bFGF	Facteur de croissance basique des fibroblastes
BH	Domaine d'homologie à Bcl-2
BH4	Tétrahydrobioptérine
BK	Bradykinine
BNP	Peptide natriurétique de type B
c-	Carboxyl
Ca <sup>2+</sup>	Ion calcique
CAD / ICAD	Désoxyribonucléase activée par les caspases et son inhibiteur
CaM	Calmoduline
CaMKII	Kinase dépendante du Ca <sup>2+</sup> /CaM
CARD	Domaine de recrutement et d'activation de caspases
Ca <sub>v</sub>	Canal calcique voltage-dépendant
Cdc2	Cyclase dépendante de cyclines
CDK	Kinase dépendante des cyclines
cFLIP	Protéine inhibitrice de FLICE
CIRC	Relâche de calcium induite par le calcium
CKI	Inhibiteur de CDK
Cl <sup>-</sup>	Ion chlorure
CML	Cellule de muscle lisse
COX-2	Cyclooxygénase de type 2
CPN	Carboxypeptidase N

CREB	Protéine liant l'élément de réponse à l'AMPc
CSA	Aire de section de l'aorte
Csk1	Sous-unité de type 1 de la kinase de cyclines
CTGF	Facteur de croissance des tissus conjonctifs
DAG	Diacylglycérol
DBK	desArg <sup>9</sup> -BK
DD	Domaine de mort
DED	Domaine effecteur de mort
DFF	Facteur de fragmentation de l'ADN
DIABLO	<i>Direct IAP binding protein</i>
DISC	Complexe de signalisation induisant la mort
DKD	desArg <sup>10</sup> -KD (Lys-DBK)
DOCA	Déoxycorticostérone
DREAM	Modulateur de l'élément régulateur en aval
dUTP	2'-Désoxyuridine 5'-Triphosphate
ECA	Enzyme de conversion de l'angiotensine
EGF	Facteur de croissance des épidermes
eNOS	Forme endothéliale de la synthèse du NO
EPN	Endopeptidase neutre
ERK1/2	Kinases activées par des signaux extracellulaires 1 et 2
ET	Endothéline
FADD	Domaine de mort associé à Fas
FAK	Kinase d'adhésion focale
FasL	Fas ligand
FLICE	<i>FADD-like IL-1<math>\beta</math>-converting enzyme (Caspase-8)</i>
FMK	Fluorométhyl cétone
G	Protéine à activité GTPase
GMPc	Guanosine monophosphate cyclique
GTP	Guanosine 5'-triphosphate
H <sup>+</sup>	Ion hydrogène
HIPK3	<i>Homeodomain interacting protein kinase 3</i>
HOP	4-Hydroxyproline
HSP	Protéines de choc thermique
HVG	Hypertrophie ventriculaire gauche

IAP	protéines inhibitrices de l'apoptose
IC <sub>50</sub>	Concentration inhibant 50% de la réponse
ICAM-1	Molécule d'adhésion intracellulaire de type 1
iECA	Inhibiteur de l'ECA
IGF	Facteur de croissance semblable à l'insuline
IKK $\beta$	Kinase de I $\kappa$ B
IL	Interleukine
IP3, IP3R	Inositol 1,4,5-triphosphate et son récepteur
ISOL	In situ <i>oligonucleotide ligation</i>
IUR	Coupes isotropiques ni uniformément randomisées
I $\kappa$ B	Inhibiteur de NF $\kappa$ B
JAK	Janus kinases
JNK	Kinase au domaine N-terminal semblable à c-Jun
K <sup>+</sup>	Ion potassique
KBPM	Kininogène de bas poids moléculaire
KD	Kallidine (Lys-BK)
kD	kilo Dalton
KHPM	Kininogène de haut poids moléculaire
LDL	Lipoprotéines de faible densité
LIFE	<i>Losartan intervention for endpoint reduction in hypertension study</i>
L-NAME	N (G)-Nitro-L-Arginine Méthyl Ester
LPS	Lipopolysaccharide
MAPK	Protéines kinases activées par des mitogènes
MCP	Mort cellulaire programmée
MCP-1	<i>Monocyte chemoattractant protein-1</i>
MEF2	<i>Myocyte enhancer factor 2</i>
MEK	MAPK / ERK kinase
MEKK	Kinase de MEK
MKP-1	Phosphatase de type 1 des MAPK
MLC2	Chaîne légère régulatrice de la myosine
MLCK	Kinase de la chaîne légère régulatrice de la myosine
MLCP	Phosphatase de la chaîne légère régulatrice de la myosine
mm Hg	Millimètres de mercure
MMP	Métalloprotéinases matricielles

MOSES	<i>Morbidity and Mortality After Stroke, Eprosartan Compared With Nitrendipine for Secondary Prevention study</i>
mTOR	Cible de la rapamycine chez les mammifères
n-	Amino
Na <sup>+</sup>	Ion sodique
NADPH	Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate-oxydase
NFAT	Facteur nucléaire des cellules T activées
NK-κB	Facteur de transcription nucléaire kappa B
nNOS	Forme neuronale de la synthèse du NO
NO	Monoxyde d'azote
P	Phosphore
PAI-1	Inhibiteur de type 1 de l'activateur du plasminogène
PAK2	Kinase de type 2 activée par p21
PARP	Poly(ADP-ribose) polymérase
PDGF	Facteur de croissance dérivé des plaquettes
PGI2	Prostacycline
PHLPP	<i>PH domain leucine-rich repeat protein phosphatase</i>
PI3K	Phosphatidylinositol 3-kinase
PKA	Protéine kinase dépendante de l'AMPc
PKC	Protéine kinase dépendante du Ca <sup>2+</sup>
PKG	Protéine kinase dépendante du GMPc
PLA <sub>2</sub>	phospholipase A <sub>2</sub>
PLC	Phospholipase C
PLD	Phospholipase D
PMA	Phorbol 12-myristate 13-acétate
PP2A	Protéine phosphatase de type 2A
PS	Phosphatydilsérine
PTEN	<i>Phosphatase and tensin homolog (mutated in multiple advanced cancers 1)</i>
PTP	<i>permeability transition pore</i>
R+	Séréodésripteur d'un centre chiral (Rectus), dextrogyre (+)
RALES	<i>Randomized aldactone evaluation study</i>
RB <sub>1</sub>	Récepteur de type 1 des kinines
RB <sub>2</sub>	Récepteur de type 2 des kinines
RCPG	Récepteur couplé aux protéines G hétéro-trimériques

RE	Réticulum endoplasmique
RKBP	<i>Rat kallikrein-binding protein</i>
ROC	Canaux modulés par des récepteurs
ROS	Espèces réactives dérivées de l'oxygène
RS	Réticulum sarcoplasmique
RYR	Récepteur à la ryanodine
S.U.	Sous-unité
SCOPE	<i>Study on Cognition and Prognosis in the Elderly</i>
SEM	Erreur-type de la moyenne
SERCA	Pompe Ca <sup>2+</sup> -ATPase du RE/RS
SH	Domaine d'homologie à Src
SHP	Phosphatase à domaine SH2
SHR	Rat spontanément hypertendu
SHRSP	<i>Stroke-prone SHR</i>
SMAC	<i>Second mitochondria-derived activator of caspases</i>
SMemb	Forme embryonnaire de la chaîne lourde de myosine (non-musculaire)
SMOC	Canaux modulés par des seconds messagers
SNA	Système nerveux autonome
SNC	Système nerveux central
SOC	Canaux modulés par des réservoirs
SRA	Système rénine-angiotensine
STAT	Transducteurs du signal et activateurs de la transcription
tBID	BID tronqué
TDT	Désoxynucléotidyl transférase terminale
TGF- $\beta$	Facteur de croissance transformant de type $\beta$
TIMP	Inhibiteurs tissulaires des MMP
TNF- $\alpha$	Facteur nécrosant des tumeurs de type $\alpha$
TRAIL	<i>TNF-related apoptosis-inducing ligand</i>
TUNEL	<i>Tdt-mediated dUTP nick-end labeling</i>
UV	Ultraviolets
VCAM-1	Molécule d'adhésion vasculaire de type 1
VDAC	Canal anionique voltage-dépendant
WKY	Rat Wistar-Kyoto

*À Monette et Marcel*

## Remerciements

Je tiens à remercier mon directeur de recherche pour ces six belles années lors desquelles j'ai pu grandir et m'épanouir pleinement à ses côtés. Denis, je tiens à te remercier pour ton incroyable capacité à toujours identifier et souligner les aspects positifs, peu importe la situation rencontrée. Ton calme extérieur légendaire et ta patience envers les étudiants m'ont grandement facilité la vie dans le laboratoire. Ton esprit de synthèse dont tous les gens qui te côtoient profitent, ainsi que les nombreux conseils que tu m'as prodigués, m'ont permis de mûrir au niveau personnel et professionnel. N'eut été de toi, je serais fort différent aujourd'hui et pas nécessairement pour le mieux : mon entourage t'en remercie!

Je remercie également tous les étudiants et membres du laboratoire que j'ai côtoyés pendant mon doctorat. Leur support réciproque, le partage d'idées novatrices et surtout ces nouvelles amitiés (moi qui croyait depuis toujours être un grand solitaire...) m'ont permis de m'épanouir et de mieux me connaître. Je tiens à exprimer ma gratitude particulière envers Diane Beaudry (pour son support à mes débuts), Stéphanie Pesant et Annik Migneault (pour leur bonne humeur contagieuse), Caroline Robillard (pour son dévouement envers les sucreries!), Sonia Deschesnes (pour m'avoir appris à mieux apprécier un plancher de ciment l'été!), Taben Hale, France Wagner, Julie-Émilie Huot-Marchand et Marielle Doyon. Et pour ceux et celles rencontrés plus récemment à l'Université de Montréal, j'espère que mon côté enfantin et moqueur aura permis d'alléger l'atmosphère parfois tendue de notre environnement. Si au contraire vous n'en pouviez plus, eh bien allez blâmer Julie-Émilie pour, comme elle-même le dit, avoir libéré un monstre!

Mes études doctorales ont été rendues beaucoup plus intéressantes par la généreuse aide financière des divers organismes m'ayant soutenu. Je remercie le GRSNA pour m'avoir encouragé en premier, le CRSNG pour m'avoir accordé une bourse avant que je fasse le saut au doctorat lors d'un passage direct, et enfin les IRSC pour m'avoir offert une généreuse bourse doctorale assortie d'une allocation de recherche fort intéressante. Sans ce

support, je n'aurais entre autres pas eu tant d'occasions de présenter mes travaux dans divers congrès nationaux et internationaux.

Je m'en voudrais de ne pas mentionner au passage une de mes sources principales d'énergie et de courage, soit la musique et tout particulièrement celle des artistes québécois indépendants dont la qualité et la quantité ne cesse de croître. Je ne citerai que le groupe Les chiens et son leader Éric Goulet dont l'intégrité et l'intensité m'ont permis de me ressourcer à maintes reprises depuis leurs débuts.

Un merci tout spécial à mes parents pour m'avoir inculqué le désir de réussir tout ce que j'entreprends. Grâce à vous papa et maman, j'ai acquis toute la confiance requise pour mener une carrière en recherche (bienvenue aux montagnes russes aussi grosses et narquoises qu'inattendues) et après plusieurs rappels, je sais maintenant et pour toujours que « pas capable » est mort et enterré! Votre générosité et votre altruisme m'ont aidé à me faire un nid et m'ont bercé de bonheur; je vous en remercie en vous dédiant cette thèse. Je vous serai toujours reconnaissant pour m'avoir forgé à votre image, c'est-à-dire solide (toujours prêt à affronter la tempête pour mieux se relever), intègre, au caractère parfois bouillant (sûrement le côté belge!), etc.

Je tiens finalement à remercier ma copine Émilie. Rencontrée au tout début de cette grande aventure, elle m'a supporté à travers les multiples expériences vécues. Son précieux soutien a grandement facilité mes études de doctorat et je la remercie tout particulièrement de m'avoir supporté lors de la dernière grande épreuve qu'a été la rédaction de cette thèse. Un bras sur une de mes épaules et sa tête sur l'autre, elle a su, tel un antagoniste irréversible, empêcher le stress et la pression de s'y déposer! Et avec l'arrivée imminente de notre premier petit ange, nous pourrons nous protéger l'un et l'autre afin d'éloigner ces fardeaux à tout jamais. Merci de tout coeur!

# **CHAPITRE 1 - Introduction**

## 1.1 L'hypertension artérielle

### 1.1.1 Définition, prévalence et étiologie de l'hypertension artérielle

Les maladies cardiovasculaires représentent la plus importante cause de décès dans les pays industrialisés et l'hypertension artérielle demeure le facteur de risque cardiovasculaire le plus fréquent, quoique modifiable. L'hypertension artérielle a été identifiée en tant que facteur de risque principal de mortalité (toutes causes confondues, plus de 7 millions de décès par an) et classée troisième en tant que facteur de morbidité ajustée pour la durée de vie (He & Whelton, 1997; Kearney *et al.*, 2005), malgré les avancées spectaculaires dans la compréhension de sa pathophysiologie.

En effet, dans les années 1930-40, l'hypertension artérielle était perçue comme essentielle pour forcer le passage du sang à travers les vaisseaux sclérosés afin de maintenir la perfusion des organes vitaux. Bref, il ne fallait pas atténuer ce mécanisme compensatoire et cette vision précipita la mort du Président Roosevelt victime d'une hémorragie cérébrale (tension artérielle supérieure à 300/190 mm Hg et systolique supérieure à 200 mm Hg pendant près d'un an avant sa mort) (Messerli, 1995). L'étude Framingham a changé la donne en montrant que chaque augmentation de 10 mm Hg à partir de 100/60 mm Hg correspondait à une réduction de la survie suite à un événement cardiovasculaire néfaste (Gifford, Jr., 1980). En 2002, une méta-analyse regroupant plus d'un million d'adultes a popularisé la règle du 20/10 : chaque hausse de tension artérielle de 20/10 mm Hg à partir de 115/75 mm Hg double le risque de mortalité cardiovasculaire (Lewington *et al.*, 2002). Cette même étude a confirmé que même une mince atténuation de la tension systolique réduit le risque de mortalité d'une maladie cardiaque ischémique et le risque d'accident vasculaire cérébral (AVC). En plus d'affecter le cœur et le cerveau, une tension artérielle chroniquement élevée entraîne d'autres perturbations dans la microcirculation conduisant à la rétinopathie et à des néphropathies (insuffisance rénale).

Présentement, l'hypertension artérielle se répartit en cinq stades : normal (120 à 129/80 à 84 mm Hg), normal/élevé (130 à 139/85 à 89), stade 1 (140 à 159/90 à 99), stade 2

(160 à 179/100 à 109) et stade 3 (supérieur à 180/110). Le niveau de risque associé à chaque stade varie selon la présence de facteurs de risque additionnels, d'atteinte des organes cibles ou de diabète. Au Canada, 21% de la population présente une tension artérielle supérieure ou égale à 140/90 mm Hg et seulement 13% de ces patients hypertendus sont traités et contrôlés adéquatement (Joffres *et al.*, 2001). L'analyse des données existantes provenant du monde entier révèle qu'en 2000, 26% de la population adulte mondiale était hypertendue et que ce pourcentage grimpera possiblement à 29% en 2025 (Kearney *et al.*, 2005).

L'hypertension essentielle, ne se développant pas en réponse à une pathologie sous-jacente telle qu'une insuffisance rénale, un phéochromocytome ou un hyperaldostérionisme par opposition à l'hypertension secondaire, compte pour plus de 90% de tous les cas d'hypertension artérielle. Elle est le résultat direct d'altérations des mécanismes normaux de contrôle de la tension artérielle, causées par l'interaction entre de multiples facteurs génétiques et environnementaux. Les facteurs prédisposant au développement de l'hypertension artérielle incluent entre autres une histoire familiale d'hypertension (composante de susceptibilité génétique), l'obésité, la résistance à l'insuline, le stress, le tabagisme et la consommation élevée d'alcool. Les analyses récentes confirment aussi la stratification de la prévalence de l'hypertension selon le sexe (plus élevée chez les hommes avant 55 ans et plus élevée chez les femmes parmi les personnes âgées), l'âge (plus élevée en vieillissant), la race (ex : plus élevée dans la population noire) et le niveau de développement économique du pays (plus élevée dans les pays développés) (Kearney *et al.*, 2005).

Outre la brève description ci-dessus de l'hypertension essentielle, la mise en contexte de cette thèse abordera 1) les mécanismes de contrôle de la pression sanguine et le traitement de l'hypertension artérielle, 2) le fonctionnement et les rôles des systèmes rénine-angiotensine et kallikréine-kinines, 3) le calcium et son implication dans l'hypertension artérielle, 4) les atteintes des organes cibles dans l'hypertension artérielle et leur modulation pharmacologique et 5) le rôle de l'apoptose dans le développement et le traitement de la pathologie hypertensive.

### **1.1.2 Mécanismes de contrôle de la tension artérielle**

L'interaction entre les facteurs génétiques et environnementaux cités plus haut produit de nombreux phénotypes intermédiaires présentant un dérèglement, par exemple, de l'activité du système nerveux sympathique, du système rénine-angiotensine-aldostérone et de facteurs endothéliaux, qui à leur tour influencent l'excrétion de sodium, la réactivité vasculaire, la contractilité cardiaque, etc. Ces paramètres modifient la résistance périphérique totale et le débit cardiaque, soit les déterminants fondamentaux de la pression sanguine (Oparil *et al.*, 2003).

#### **1.1.2.1 Hémodynamie de la tension artérielle**

Les résistances vasculaires périphériques représentent les résistances que les vaisseaux sanguins systémiques opposent à l'écoulement du sang. Elles se déterminent principalement par le calibre des petites artères et des artérioles. En effet, de faibles modifications du diamètre de ces vaisseaux influencent grandement les résistances puisque celles-ci sont inversement proportionnelles à la puissance quatrième du rayon vasculaire. Dans l'hypertension artérielle, l'état contractile du muscle lisse et le remodelage des petits vaisseaux autour d'une lumière réduite contribuent à accroître les résistances périphériques.

Le débit cardiaque, soit la quantité de sang propulsée par le coeur par unité de temps, est fonction de la fréquence (rythme) cardiaque et du volume d'éjection systolique. Cette fonction de pompage du ventricule gauche dépend donc de plusieurs facteurs incluant la pré-charge (ou volume ventriculaire gauche à la fin de la diastole, influencé directement par le volume sanguin), l'état contractile du muscle ventriculaire et la post-charge.

D'autres facteurs, tels que le caractère du flot (turbulent ou laminaire), la compliance des gros troncs (leur élasticité/rigidité) et la viscosité du sang complexifient cette vision simplifiée de la tension systolique et diastolique.

### 1.1.2.2 Systèmes nerveux central et autonome

La modulation nerveuse de la tension artérielle débute au niveau du système nerveux central (SNC). En contrôlant l'activité du système nerveux autonome (SNA) et le relâchement d'hormones, le SNC permet une adaptation rapide de la tension artérielle et de la fréquence cardiaque afin de maintenir l'homéostasie cardiovasculaire.

Le contrôle du SNA s'effectue à l'aide des réflexes des barorécepteurs et des chémorécepteurs qui stimulent ou inhibent la décharge sympathique et/ou parasympathique. Au niveau des barorécepteurs, lorsqu'une baisse de pression survient, ils émettent plus lentement leurs influx nerveux, entraînant une réduction de la stimulation parasympathique cardiaque et une augmentation de la stimulation sympathique associée à la relâche d'adrénaline et de noradrénaline. À l'inverse, une augmentation soudaine de pression détectée par les barorécepteurs tend à augmenter la stimulation parasympathique et diminuer la stimulation sympathique de façon à réduire la fréquence cardiaque, la force de contraction du cœur ainsi que la résistance périphérique. Au niveau de chémorécepteurs, lorsqu'ils détectent une variation de la concentration sanguine en O<sub>2</sub>, CO<sub>2</sub> et ions H<sup>+</sup>, une modification de la réponse sympathique s'ensuit. Une activité accrue du système nerveux sympathique contribue au développement et au maintien de l'hypertension artérielle en agissant sur le cœur, le réseau vasculaire périphérique et les reins de façon à accroître le débit cardiaque, la résistance vasculaire et la rétention de fluides (de Champlain, 1977). Les mécanismes expliquant l'activité sympathique accrue dans l'hypertension artérielle sont complexes et incluent le réajustement des barorécepteurs à une pression plus élevée, le réajustement central des baroréflexes supprimant l'inhibition sympathique normalement observée après une stimulation nerveuse des barorécepteurs (Chapleau *et al.*, 1988) ainsi que des chémoréflexes exagérés.

### 1.1.2.3 Facteurs humoraux

Parmi les facteurs neuro-humoraux dont la relâche est stimulée par le SNC, certains participent au contrôle de la tension artérielle. Ainsi, l'adrénaline et la noradrénaline accélèrent la fréquence cardiaque, augmentent la force de contraction du cœur et provoquent une vasoconstriction des artérioles de la peau et de l'abdomen, ce qui augmente

les résistances périphériques. D'autre part, des hormones circulantes et des substances vasoactives locales participent à la modulation de la pression artérielle s'échelonnant sur une plus longue période. Par exemple, l'hormone antidiurétique (vasopressine), produite par l'hypothalamus, favorise la vasoconstriction ainsi que l'augmentation du volume circulant via la rétention d'eau, contribuant à l'élévation de la tension artérielle. L'endothéline (ET-1), quant à elle, constitue un puissant vasoconstricteur produit localement dans la paroi vasculaire par les cellules endothéliales (Yanagisawa *et al.*, 1988) dont l'induction du gène survient en réponse à l'angiotensine II (Ang II), à l'ischémie ou autre stress mécanique dans la paroi vasculaire. À l'opposé, le peptide natriurétique auriculaire (ANP) produit et libéré par les myocytes auriculaires, abaisse la tension artérielle en situation d'hypervolémie en favorisant entre autres la sécrétion et l'excrétion rénale de sodium.

Un déséquilibre de certains facteurs humoraux, particulièrement au niveau du système rénine-angiotensine, joue un rôle déterminant dans le développement de l'hypertension artérielle. Une description détaillée de certaines composantes de ce système ainsi que la définition de leurs implications et mécanismes par rapport au sujet de cette thèse complèteront à la section 1.2.1 la définition sommaire du système rénine-angiotensine suivante.

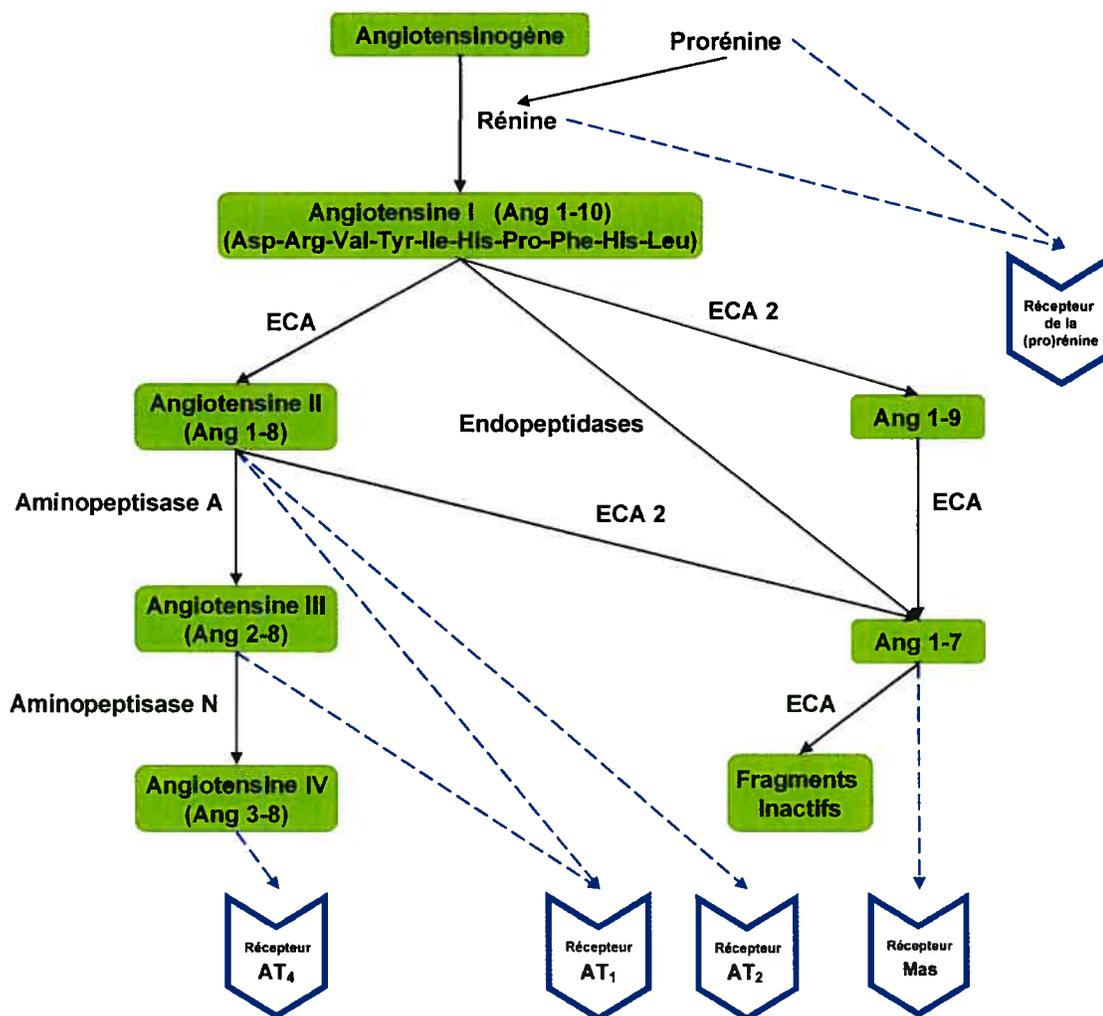
#### *1.1.2.3.1 Système rénine-angiotensine-aldostérone*

Le système rénine-angiotensine (SRA) consiste en une cascade hormonale culminant avec la production du principal effecteur de ce système, l'Ang II, qui déclenche des réponses multiples. Cet octapeptide est impliqué à la fois dans le remodelage structural du système cardiovasculaire, en raison de ses diverses actions sur la croissance cellulaire, et dans la hausse de la tension artérielle, de par ses effets vasoconstricteurs directs, son effet stimulateur sur la relâche de catécholamines augmentant le tonus sympathique ainsi que sa stimulation de la relâche d'aldostérone par les surrénales favorisant la rétention hydrosodée. De plus, des réponses pro-inflammatoires et pro-coagulantes sont attribuées à l'Ang II. Par ailleurs, le rôle de l'aldostérone dans l'insuffisance cardiaque a pu être clairement mis en évidence lors de l'étude RALES (Pitt *et al.*, 1999).

Le SRA se distribue entre le sang circulant (SRA classique endocrinien) et l'espace péricellulaire de l'interstitium cellulaire (SRA tissulaire). La cascade biochimique classique débute par la biosynthèse d'une glycoprotéine enzymatique, la rénine, dans les cellules juxtaglomérulaires rénales, à partir de la préprorénine. La relâche de rénine par exocytose dans le plasma lui permet de rencontrer son substrat, soit l'angiotensinogène (AGT) synthétisé majoritairement par le foie et seul précurseur connu des peptides de la famille de l'angiotensine. La rénine clive donc l'AGT en Ang I. Une autre glycoprotéine, l'enzyme de conversion de l'angiotensine (ECA), hydrolyse l'Ang I inactive en Ang II biologiquement active. Cette ECA existe sous deux formes somatiques, soit soluble ou fixée à la membrane plasmique de diverses cellules, dont celles tapissant les vaisseaux sanguins. Une forme germinale de l'ECA existe, mais ne sera pas présentée plus en détails dans cette thèse. La grande majorité des actions attribuées à l'Ang II sont relayées par son récepteur de type 1 (AT<sub>1</sub>), un récepteur à sept passages transmembranaires couplé aux protéines G hétéro-trimériques (RCPG). Les effets de l'Ang II relayés par son récepteur de type 2 (AT<sub>2</sub>), principalement impliqué dans l'embryogénèse et ré-exprimé dans des tissus en remodelage, tendent parfois à s'opposer aux effets produits via le récepteur AT<sub>1</sub>, mais de façon inefficace étant donné son expression restreinte chez l'adulte. Contrairement à la rénine et à l'AGT qui ont de longues demi-vies plasmatiques leur permettant de voyager, l'Ang II n'agit que localement en raison de sa dégradation en quelques secondes par des angiotensinases. La dégradation de l'Ang II produit des fragments inactifs et d'autres actifs, dont l'Ang III, l'Ang IV (fragment 3-8) et l'Ang (1-7).

Ce système a récemment été complexifié par de nombreuses découvertes (Carey & Siragy, 2003). Brièvement, un récepteur spécifique pour la prorénine/rénine a été cloné, suggérant une action de la rénine indépendante de son activité protéolytique sur l'AGT (Nguyen *et al.*, 2002). Un homologue de l'ECA, l'ECA2, qui transforme entre autres l'Ang II en Ang (1-7) a été cloné (Donoghue *et al.*, 2000; Turner *et al.*, 2002), mais le rôle physiologique précis de cette enzyme demeure à l'étude, tout comme la réelle portée de l'action de l'Ang (1-7) sur son récepteur Mas (Santos *et al.*, 2003). De plus, l'identification d'une cascade signalétique reposant sur la phosphorylation de la queue C-terminale intracellulaire de l'ECA suite à la liaison d'un inhibiteur de l'ECA remet en question les

mécanismes d'actions des effets bénéfiques des inhibiteurs de l'ECA (Fleming, 2006). La figure 1 résume le SRA tel qu'il est présentement connu.



**Figure 1. Voies de formation des peptides angiotensines et composantes nouvellement identifiées du système rénine-angiotensine.**

Les lignes pointillées indiquent la liaison à un récepteur. Les principales enzymes sont indiquées et les actions relayées par la stimulation des récepteurs de l'angiotensine sont décrites à la section 1.2.1. D'autres facteurs modulant le SRA sont introduits dans le texte, notamment en ce qui concerne les voies alternatives de formation de l'angiotensine II.

#### 1.1.2.3.2 Lien SRA et système kallibréines – kinines

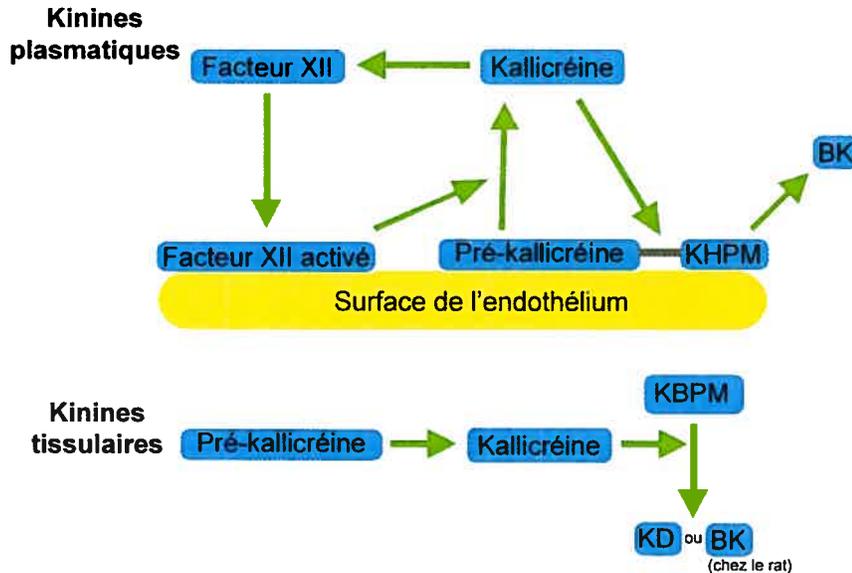
Le SRA se connecte au système des kinines au niveau de l'ECA. En effet, cette enzyme, identique à la kininase II, dégrade la bradykinine (BK), un puissant vasodilatateur, en son métabolite inactif BK (1-7). Le système peptidergique complexe kallibréine-kinine

comprend les enzymes de synthèse (kalllicréines, aussi appelées kininogénases), leurs substrats (kininogènes), les peptides vasoactifs (kinines) et les enzymes de dégradations (kininases) (Bhoola *et al.*, 1992). La voie sanguine de formation des kinines débute par l'activation du facteur XII de la cascade de coagulation, lorsque le sang fait contact avec des surfaces chargées négativement. Le facteur XII activé convertit la pré-kalllicréine plasmatique, associée au kininogène de haut poids moléculaire (KHPM), en kalllicréine active qui permet la libération de la BK à partir du KHPM. Au niveau tissulaire, la kalllicréine activée par des enzymes protéolytiques libère la kallidine (KD, possédant une lysine supplémentaire au début de sa chaîne peptidique et ainsi également nommée Lys-BK) à partir du kininogène de bas poids moléculaire (KBPM), sauf chez le rat où la BK est encore une fois produite. Les multiples voies de dégradation des kinines par les kininases (des amino-, carboxy- et endopeptidases), font en sorte que la demi-vie de la BK dans le plasma n'atteint pas 30 secondes et elles mènent à la production de plusieurs métabolites. Ainsi, des métabolites inactifs sont générés par les deux types de kininases II, soit l'ECA et l'endopeptidase neutre (NEP) 24.11. Par contre, la kininase I, correspondant à la carboxypeptidase N (CPN) du plasma et à la carboxypeptidase M cellulaire, enlève l'arginine en position C-terminale pour générer les peptides vasoactifs desArg<sup>9</sup>-BK (DBK) et desArg<sup>10</sup>-KD (DKD, aussi appelée Lys-DBK). De plus, l'aminopeptidase M (AmM) enlève la lysine en position N-terminale pour transformer KD et DKD en BK et DBK, respectivement. Les kinines ainsi produites agissent soit sur leur récepteur constitutif de type 2 (RB<sub>2</sub>, agonistes : BK et KD), soit sur leur récepteur inductible de type 1 (RB<sub>1</sub>, agonistes : DBK et DKD) pour influencer l'homéostasie cardiovasculaire, l'inflammation et la nociception. La figure 2 présente une vue d'ensemble du système des kinines.

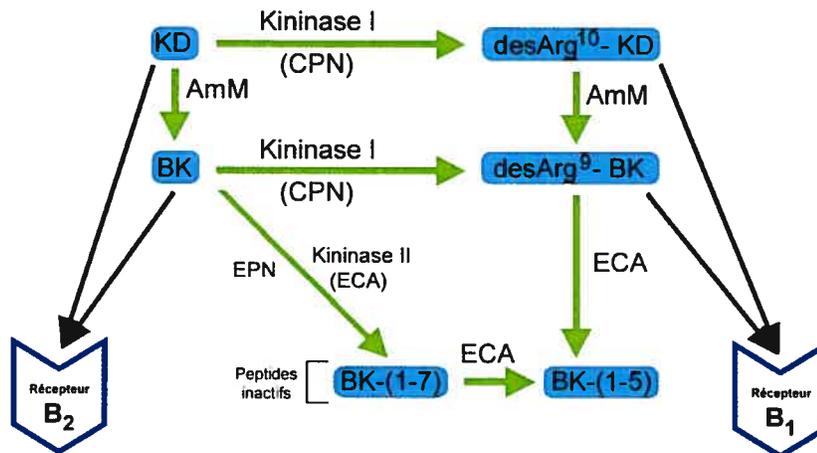
## A) Composition

	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Bradykinine (BK)	Arg	Pro	Pro	Gly	Phe	Ser	Pro	Phe	Arg - OH
Kallidine (KD)	Lys	Arg	Pro	Pro	Gly	Phe	Ser	Pro	Phe - Arg - OH
desArg <sup>9</sup> - BK	Arg	Pro	Pro	Gly	Phe	Ser	Pro	Phe	- OH
desArg <sup>10</sup> - KD	Lys	Arg	Pro	Pro	Gly	Phe	Ser	Pro	Phe - OH

## B) Formation des kinines



## C) Dégradation des kinines



**Figure 2. Kinines : voies de formation, de dégradation, et leurs récepteurs.**

(A) Structure des kinines chez les mammifères, à l'exception des T-kinines présentes seulement chez le rat. (B) Voies de formation des kinines. (C) Dégradation et récepteurs des kinines. Adaptée de Gabra *et al.*, 2003.

### 1.1.3 Traitement de l'hypertension artérielle

#### 1.1.3.1 Buts et approches thérapeutiques

En clinique, la décision de traiter l'hypertension artérielle se prend suite à la mesure de la tension artérielle systolique et diastolique du patient. L'évaluation de l'efficacité du médicament chez le patient et les décisions concernant le dosage et l'ajout d'un deuxième médicament pour accentuer le contrôle de l'hypertension se basent sur des cibles tensionnelles. Ainsi, au Canada, l'hypertension artérielle devient contrôlée lorsque la tension descend sous 140/90 mm Hg. Toutefois, le but recherché lors du traitement d'un patient hypertendu demeure plutôt la réduction de la morbidité et de la mortalité reliées à sa pression sanguine élevée. Ceci sous-entend donc l'évaluation des risques de l'individu, en tenant compte non seulement des valeurs de pression systolique et diastolique, mais aussi des autres risques cardiovasculaires et la présence de dommages des organes cibles. Toutefois, l'efficacité de divers antihypertenseurs à préserver la perfusion tissulaire des organes essentiels, de façon à diminuer les complications cardiovasculaires intimement reliées à l'hypertension artérielle, varie et ce même en présence d'une baisse de pression similaire. Ce point sera traité plus en profondeur dans la section portant sur la pharmacologie des atteintes des organes cibles (1.4).

La complexité de la pathologie hypertensive, allant des multiples facteurs environnementaux et génétiques favorisant son développement aux nombreux mécanismes de contrôle de la pression artérielle pouvant être ciblés, a propulsé la recherche et le développement dans ce domaine. Étant donné que les patients ne répondent pas tous de la même façon aux médicaments antihypertenseurs ni à leurs effets secondaires, le clinicien dispose d'un arsenal très varié pour traiter les patients hypertendus. Nous nous concentrerons ici sur le traitement de l'hypertension essentielle systolo-diastolique. En premier lieu, des modifications apportées au style de vie, telles qu'une restriction sodée, la perte de poids, l'activité physique et les changements nutritionnels, permettent d'obtenir des baisses de pression non négligeables, allant jusqu'à environ 10/5 mm Hg (Miller, Jr. *et al.*, 1999). Des traitements pharmacologiques de première ligne sont ensuite adoptés et s'ils ne parviennent pas à réduire suffisamment la tension artérielle, des combinaisons de médicaments de diverses classes sont essayées.

### 1.1.3.2 Classes de médicaments antihypertenseurs

Étant donné que la pression artérielle représente le produit de la résistance vasculaire périphérique et du débit cardiaque, elle peut être réduite par des médicaments agissant sur ces composantes. De plus, la réduction d'une même composante peut s'obtenir en visant différentes cibles. Le tableau 1 présente un bref survol des principales classes d'antihypertenseurs.

<b>Classes</b>	<b>Exemples</b>
<u>Sympatholytiques</u>	
à action centrale	$\alpha$ -Méthyldopa, clonidine
antagonistes $\alpha_1$ -adrénergiques	Prazosine, doxazosine
antagonistes $\beta$ -adrénergiques	Propranolol, aténolol
<u>Diurétiques</u>	
thiazidiques	Chlortalidone, hydrochlorothiazide
de l'anse de Henle	Furosémide
d'épargne potassique	Amiloride
<u>Vasodilatateurs directs</u>	
	Hydralazine, minoxidil
<u>Inhibiteurs du SRAA</u>	
antagonistes de l'aldostérone	Spirolactone
inhibiteurs de l'ECA	Captopril, énalapril
antagonistes AT <sub>1</sub>	Losartan, valsartan
<u>Bloqueurs de canaux calciques</u>	
dihydropyridines	Nifédipine, amlodipine
phénylalkylamines	Vérapamil
benzothiazépines	Diltiazem

**Tableau 1. Classes d'agents antihypertenseurs**

SRAA : Système rénine-angiotensine-aldostérone. ECA : enzyme de conversion de l'angiotensine II. AT<sub>1</sub> : Récepteur de type 1 de l'angiotensine II.

#### 1.1.3.2.1 Agents sympatholytiques

Les antihypertenseurs à action centrale inhibent la relâche de signaux adrénérgiques dirigés vers le système nerveux sympathique périphérique (Langer *et al.*, 1980) de façon à réduire la résistance périphérique et parfois le débit cardiaque. Ils sont rarement utilisés en raison de leur action agoniste sur les récepteurs  $\alpha_2$ -adrénérgiques inhibiteurs dans les centres responsables de l'éveil et de la vigilance. Les antagonistes  $\alpha_1$ -adrénérgiques abaissent la résistance artériolaire et la capacitance veineuse (Cubeddu, 1988), mais sont contre-indiqués en monothérapie depuis l'étude ALLHAT (risque accru d'insuffisance cardiaque) (ALLHAT Officers and Coordinators for the ALLHAT Collaborative Research Group, 2002). Les antagonistes  $\beta$ -adrénérgiques incluent des antagonistes purs, sans activité sympathomimétique, et réduisent la tension artérielle principalement en atténuant la contractilité myocardique et le débit cardiaque. Ils entraînent aussi une baisse de la sécrétion de rénine se traduisant par de plus faibles niveaux d'Ang II.

#### 1.1.3.2.2 Diurétiques

Les diurétiques favorisent l'excrétion de sodium ( $\text{Na}^+$ ) et ainsi de l'eau en agissant sur les tubules rénaux, de façon à produire une réduction volumique abaissant la résistance périphérique. Les thiazidiques, les plus fréquemment employés, bloquent le symporteur  $\text{Na}^+\text{Cl}^-$  dans le tubule collecteur distal, tandis que les diurétiques de l'anse, moins utilisés dans le traitement de l'hypertension artérielle en raison de leur puissance remarquable à excréter le  $\text{Na}^+$ , bloquent le symporteur  $\text{Na}^+\text{K}^+\text{2Cl}^-$ . Les diurétiques d'épargne potassique, principalement administrés en combinaison avec un autre diurétique, inhibent le canal  $\text{Na}^+$  épithélial du tubule collecteur.

#### 1.1.3.2.3 Vasodilatateurs directs

Les vasodilatateurs directs relaxent les cellules de muscle lisse (CML) de nombreux lits vasculaires (sauf dans les vaisseaux de capacitance et dans les veines) par un mécanisme incompris, ce qui entraîne une dilatation des vaisseaux de résistance

(coronariens, cérébraux et rénaux) et permet la réduction de la tension artérielle. Cependant, une forte réponse compensatoire (puissante activation du système nerveux sympathique) augmente la contractilité cardiaque, la rénine plasmatique et la rétention de fluides, contrant en partie l'effet antihypertenseur (Azuma *et al.*, 1987).

#### 1.1.3.2.4 Inhibiteurs du système rénine-angiotensine-aldostérone

Les antagonistes de l'aldostérone inhibent de façon compétitive la liaison de l'aldostérone au récepteur des minéralocorticoïdes et réduisent ainsi la rétention sodée de même que l'induction de l'expression de nombreux gènes causés par la liaison de l'aldostérone à son récepteur. Les inhibiteurs de l'enzyme de conversion de l'angiotensine (iECA) réduisent la tension artérielle par une réduction de la résistance périphérique. Cet effet est relié à la réduction des niveaux circulants de l'Ang II vasoconstrictrice. Le captopril représente le premier agent de cette classe à avoir été développé et fait partie de la famille des iECA contenant un groupement sulfhydrique (Cushman *et al.*, 1977). Les deux autres familles d'iECA comprennent ceux possédant un groupement dicarboxylique (énalapril) ou un phosphore (fosinopril). La majorité des iECA se présentent sous la forme de pro-médicaments 100 à 1000 fois moins puissants que le métabolite actif, mais possédant une bien meilleure disponibilité orale (ex : énalapril → énalaprilat). Les iECA interfèrent avec les boucles de rétro-inhibition de la rénine. Ils augmentent ainsi la relâche de rénine et la production d'Ang I, alors convertie par des voies alternatives en peptides telle que l'Ang (1-7) pouvant participer aux effets pharmacologiques des iECA. Ces antihypertenseurs bloquent également la dégradation des kinines en peptides inactifs ainsi que la dégradation de nombreux autres peptides, tels le Ac-SDKP (N-Acétyle-Ser-Asp-Lys-Pro). Les liens entre ces différents systèmes seront discutés en détail dans d'autres sections. Brièvement, les kinines sont impliquées dans l'effet hypotenseur aigu des iECA et dans leurs effets secondaires majeurs (toux et angio-oedème). De plus, des voies alternatives de formation de l'Ang II empêchent ces médicaments de bloquer complètement les effets de l'Ang II. Les antagonistes du récepteur AT<sub>1</sub> de l'Ang II, développés en partie en raison des effets secondaires des iECA et pour bloquer plus efficacement les effets de l'Ang II, incluent maintenant des antagonistes non peptidiques. Ces agents réduisent la tension artérielle en bloquant les effets de l'Ang II sur son récepteur AT<sub>1</sub>, incluant les réponses

vasoconstrictrices sur le muscle lisse, la stimulation du système nerveux sympathique périphérique, les effets sur le SNC (ex : stimulation de la soif), la sécrétion d'aldostérone, la croissance cellulaire et la rétro-inhibition de la relâche de rénine. Cette dernière action des antagonistes AT<sub>1</sub> favorise la production d'Ang II qui peut alors sur-stimuler son récepteur AT<sub>2</sub> produisant des effets s'opposant généralement à ceux relayés par le récepteur AT<sub>1</sub>.

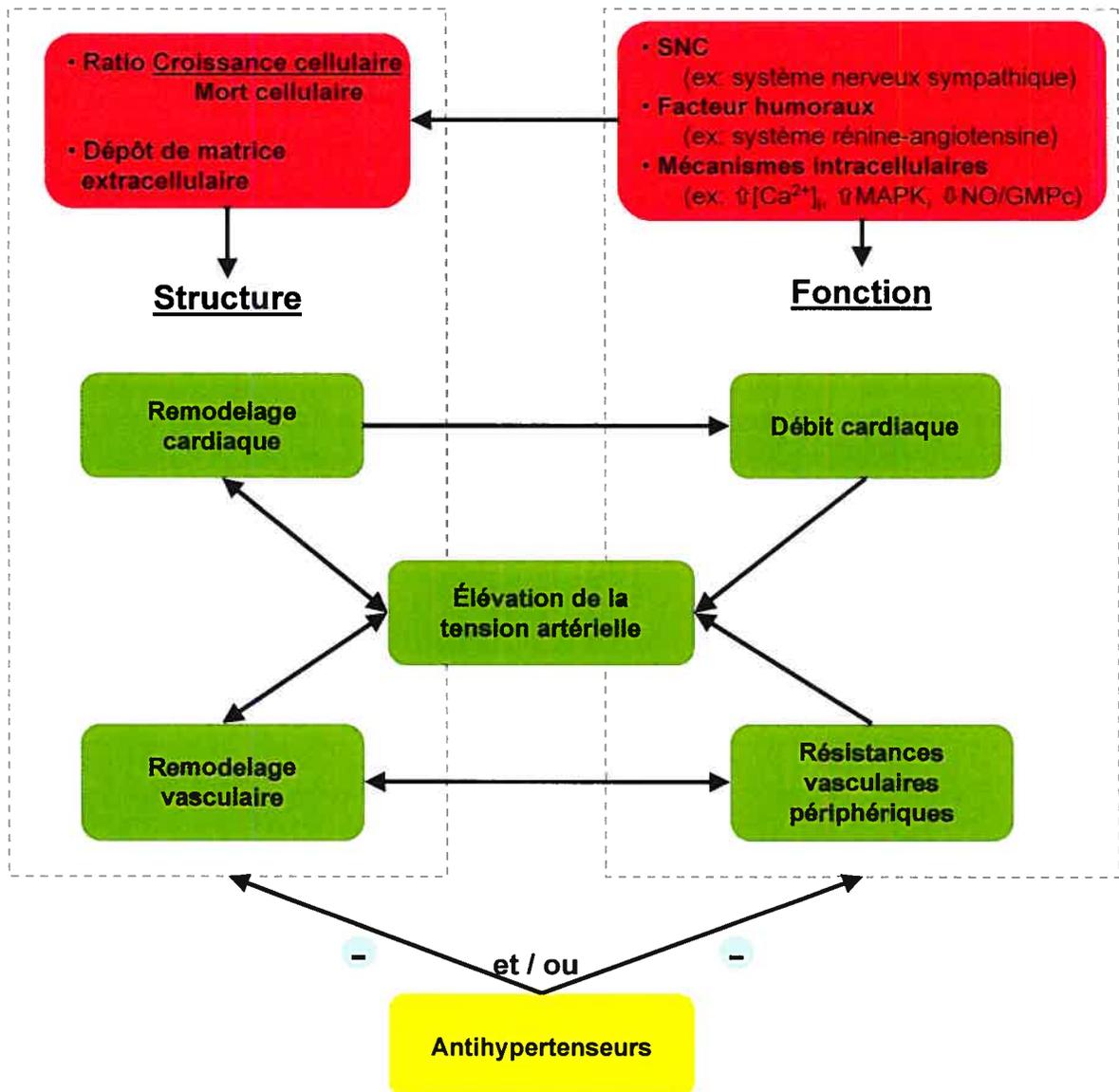
En résumé, les antagonistes AT<sub>1</sub> diffèrent des iECA à plusieurs niveaux. 1) Les antagonistes AT<sub>1</sub> réduisent l'activation des récepteurs AT<sub>1</sub> plus efficacement que les iECA, 2) les antagonistes AT<sub>1</sub> activent indirectement le récepteur AT<sub>2</sub>, 3) les iECA augmentent plus les niveaux d'Ang (1-7) que les antagonistes AT<sub>1</sub> et 4) les iECA augmentent les niveaux circulants d'un certain nombre de substrats de l'ECA, telles que les kinines, bien que la stimulation des récepteurs AT<sub>2</sub> puisse aussi augmenter les kinines en stimulant leur production (Tsutsumi *et al.*, 1999).

#### 1.1.3.2.5 Antagonistes calciques

Les bloqueurs de canaux calciques (BCC) atténuent l'hypertension artérielle en réduisant la résistance vasculaire périphérique et, selon leur sous-classe (voir Tableau 1), affectent aussi la contractilité et le débit cardiaque (effet général inotrope négatif) (Lehmann *et al.*, 1983). Ils se lient à la sous-unité  $\alpha_1$  du canal calcique voltage-dépendant de type L (Ca<sub>v</sub>1) et déplacent l'état d'inactivation du canal à un potentiel membranaire plus négatif. Étant donné que la contraction des CML dépend de la concentration intracellulaire de calcium libre, l'inhibition du mouvement transmembranaire de calcium diminue la quantité de cet ion qui atteint les sites intracellulaires et relaxe donc les muscles lisses artériolaires. La grande vasodilatation périphérique observée avec les dihydropyridines s'accompagne d'une réponse baro-réflexe augmentant le tonus sympathique et donc la décharge de catécholamines générant une tachycardie et un effet inotrope positif masquant la réduction de contractilité myocardique. La courte durée d'action des dihydropyridines de la première génération, tel que la nifédipine, produit des rebonds constants dans l'état de contractilité du muscle lisse et fait en sorte que l'activation sympathique réflexe se produit régulièrement. Les dihydropyridines plus récentes, comme l'amlodipine, possèdent une longue durée d'action et sont donc plus sécuritaires à cet égard (Opie *et al.*, 2000).

Parmi ces classes de médicaments, les diurétiques,  $\beta$ -bloqueurs, BCC, iECA et antagonistes AT<sub>1</sub> représentent celles prescrites en première ligne. Lors de combinaisons de médicaments, un diurétique ou un BCC reçoit l'ajout d'un iECA, d'un antagonistes AT<sub>1</sub> ou d'un  $\beta$ -bloqueur.

En plus de ces agents, d'autres classes de médicaments poursuivent leur développement. Ainsi, les antagonistes mixtes des récepteurs de l'endothéline (ET-A et ET-B), tel que le bosentan, s'utilisent dans le traitement de l'hypertension pulmonaire alors que ceux sélectifs pour le récepteur ET-A, tel que le darusentan, pourraient s'avérer utiles chez des patients dont l'hypertension artérielle demeure non contrôlée même en présence de trois médicaments ou plus (Gradman & Alfayoumi, 2006). De plus, les inhibiteurs de vasopeptidases offrent théoriquement des effets supérieurs aux iECA (en empêchant la dégradation entre autres des peptides natriurétiques via la ENP. De façon similaire, une meilleure inhibition de la production d'Ang II pourrait s'obtenir avec un inhibiteur de rénine, dont le prototype non peptidique aliskiren fonctionne bien dans un modèle expérimental (Wood *et al.*, 2005), et est rendu en études cliniques de phase III chez l'humain. Par ailleurs, l'inhibition de la phosphodiesterase de type 5 par le sildénafil semble réduire efficacement la tension artérielle chez les patients hypertendus (Oliver *et al.*, 2006). La figure 3 résume les mécanismes de régulation de la tension artérielle, décrits à la section 1.1.2. Cette figure présente aussi la relation entre les modifications fonctionnelles (débit cardiaque et résistances périphériques, décrites à la section 1.1.3) et les modifications structurales (remodelage cardiovasculaire, section 1.4), ainsi que les effets possibles d'un traitement avec un antihypertenseur.



**Figure 3. Résumé des principaux mécanismes de contrôle de la tension artérielle.**

Les sites et modes d'action des diverses classes d'antihypertenseurs sont décrits à la section 1.1.3.2.  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ , niveau de calcium intracellulaire; GMPc, guanosine monophosphate cyclique; MAPK, protéines kinases activées par des mitogènes; NO, monoxyde d'azote; SNC, système nerveux central.

### 1.1.4 Modèles expérimentaux de l'hypertension artérielle

L'étude de la pathophysiologie de l'hypertension artérielle est facilitée par l'existence de nombreux modèles animaux (Lerman *et al.*, 2005). Ces derniers ont permis l'identification de nombreux facteurs associés au contrôle de la tension artérielle ainsi que la caractérisation des dommages secondaires à l'hypertension. De même, les altérations de

la fonction et de la géométrie ventriculaire ainsi que les effets préventifs des iECA ont tout d'abord été documentées chez le rat spontanément hypertendu (SHR) avant de trouver des corrélations cliniques chez l'humain. Ces modèles d'hypertension artérielle servent donc également au développement et à l'évaluation des agents antihypertenseurs.

Le modèle animal idéal devrait présenter une anatomie, une physiologie cardiovasculaire et des traits hémodynamiques similaires à ceux de l'humain, tout en développant les caractéristiques et les complications associées à la pathologie humaine. Toutefois, aucune espèce ne peut remplir toutes ces conditions. Le choix du modèle devient donc dicté par le design expérimental et d'autres contraintes. L'hypertension secondaire peut être étudiée chez les animaux en créant des modèles d'hypertension rénovasculaire (2-reins 1-pince, coarctation aortique, etc.) ou causée par des altérations métaboliques (ex : rat DOCA (déoxycorticostérone)-sel) (Lerman *et al.*, 2005). D'autres modèles endocriniens se construisent par exemple en infusant des composantes du SRA (ex : Ang II), alors que des modèles basés sur la diète, telle que la diète riche en fructose, sont plus délicats. En effet, l'hypertension artérielle chez le rat recevant une diète riche en fructose ne se détecte que lorsque la pression est mesurée par pléthysmographie (D'Angelo *et al.*, 2005). L'absence de hausse de pression détectée par télémétrie dans ce modèle suggère plutôt que le fructose augmente la réponse au stress lors de la lecture par pléthysmographie (D'Angelo *et al.*, 2005). Les modèles dictés par le génotype permettent quant à eux l'étude de formes Mendéliennes d'hypertension humaine ou encore la fonction d'un gène précis dans la pathophysiologie de l'hypertension.

Comme mentionné précédemment, la forme la plus fréquente d'hypertension humaine est l'hypertension essentielle et des modèles expérimentaux développés à partir du phénotype y ressemblent avantageusement. Cette approche expérimentale prend avantage des variations naturelles à l'intérieur de lignées d'animaux co-sanguins. Les individus présentant les plus hautes lectures de pression sont accouplés sélectivement et lorsque le phénotype se fixe, l'accouplement frère-sœur se poursuit pendant une vingtaine de générations afin d'obtenir une homogénéité génétique. Ce type de modèle est entre autres exemplifié par le SHR, le rat Dahl sensible au sel et les lignées de rats hypertendus Lyon, New Zealand et Milan SHR (Lerman *et al.*, 2005).

#### 1.1.4.1 Le rat spontanément hypertendu

Les études initiales décrivant une induction d'apoptose lors de la régression de l'hypertrophie cardiovasculaire ayant été réalisées chez le SHR (deBlois *et al.*, 1997; Tea *et al.*, 1999), les expériences présentées dans cette thèse entourant l'étude des mécanismes de cette réponse apoptotique ont également été effectuées sur ce modèle. Le SHR a été développé en 1963 par Okamoto et Aoki à partir de rats Wistar-Kyoto (WKY), par l'accouplement d'un mâle modérément hypertendu et d'une femelle très hypertendue (Okamoto & AOKI, 1963). La distribution de mâles géniteurs à la communauté internationale a contribué à l'essor du SHR en tant que modèle animal d'hypertension artérielle le plus étudié. Les SHR développent spontanément une hypertension artérielle, sans exception, entre 7 et 15 semaines d'âge, alors que la pression systolique atteint un plateau d'environ 200 mm Hg. Les mécanismes entourant la hausse initiale de pression sanguine ne sont pas encore bien compris, mais semblent impliquer une altération dans la modulation centrale de la pression. Ainsi, l'augmentation initiale de la résistance vasculaire périphérique dépendrait principalement de mécanismes neurogéniques. La pression s'élève graduellement dès un très jeune âge (Gray, 1984) et cette légère hypertension, associée à la prolifération / croissance des CML, contribue aux changements vasculaires observés dès la 3<sup>e</sup> semaine et participant au maintien de l'hypertension artérielle. Cependant, il a été suggéré que l'hypertrophie artérielle existe dès le stade fœtal chez le SHR (Eccleston-Joyner & Gray, 1988). L'hypertrophie ventriculaire gauche se développe progressivement sans hausse de la masse du ventricule droit jusqu'à 24 mois d'âge et apparaîtrait en réponse à la hausse de pression (Pfeffer & Pfeffer, 1983), bien que le contraire ait également été suggéré (Yamori *et al.*, 1979). Ces conclusions opposées rappellent que le débat entourant l'ordre d'apparition de l'élévation de la pression et des changements structuraux existe depuis fort longtemps.

En bref, le SHR représente un modèle animal possédant de nombreuses similarités avec l'hypertension essentielle humaine, incluant un développement progressif à partir d'un jeune âge, ce qui en fait un modèle de choix malgré toutes les complexités lui étant rattachées et le niveau de contrôle restreint comparativement aux études *in vitro*. Le SHR

présente les changements structuraux et les atteintes des organes cibles associés à l'hypertension artérielle. Les mécanismes du développement de ces dommages et les effets des traitements pharmacologiques sont bien documentés et seront revus en détail à la section 1.4.

## 1.2 Actions cardiovasculaires de l'angiotensine II et des kinines

### 1.2.1 Implications physiopathologiques de l'angiotensine II

La biocascade impliquée dans la formation de l'Ang II ayant été décrite à la section 1.1.2.3.1 et schématisée sur la figure 1, la présente section traitera de la signalisation cellulaire enclenchée lors de la stimulation des récepteurs de l'Ang II ainsi que des mécanismes moléculaires responsables des effets physiologiques de ce peptide profondément mis à contribution dans la pathophysiologie de l'hypertension artérielle.

#### 1.2.1.1 Système rénine-angiotensine tissulaire et production alternative d'angiotensine II

Le SRA classique constitue un système endocrinien jouant un rôle majeur dans le développement et l'entretien de l'hypertension artérielle en contrôlant le volume sanguin, le tonus vasculaire et la contractilité cardiaque. L'Ang II peut également être synthétisée localement, déclenchant des actions plutôt autocrines, paracrines (Paul *et al.*, 2006) et possiblement intracrines (Re, 2003). Le SRA tissulaire participe à la pathophysiologie des complications de l'hypertension artérielle, incluant l'athérosclérose, l'hypertrophie cardiovasculaire et l'insuffisance rénale, ce qui pourrait expliquer les effets bénéfiques des iECA et des antagonistes AT<sub>1</sub> observés dans divers modèles arborant une activité normale ou même réduite de la rénine plasmatique. Un tel système sous-entend que les composantes du SRA sont présentes dans les organes produisant localement de l'Ang II (Paul *et al.*, 2006). Par exemple, l'angiotensinogène, bien que provenant majoritairement du foie, a pu être décelé au niveau de la paroi artérielle et du cœur, tout comme la rénine (quoique controversé), sécrétée principalement par le rein.

Au niveau du tissu cardiaque, la production de l'Ang II par la voie classique de l'ECA semble minoritaire, particulièrement chez l'homme (Urata *et al.*, 1990). En effet, de nombreuses voies alternatives dont la contribution varie selon l'espèce et l'organe (Akasu *et al.*, 1998) existent, incluant l'activation de protéases locales telles que la chymase, la

tonine, la trypsine, la cathepsine G, etc. Chez la souris, bien que la chymase participe à la production d'Ang II tissulaire, elle contribue pour moins de 2% de toute l'Ang II produite (Wei *et al.*, 2002). Chez l'homme, la chymase semble jouer un rôle déterminant alors que chez le rat, sa contribution apparaît beaucoup moins importante (Akasu *et al.*, 1998; de Lannoy *et al.*, 2001).

### 1.2.1.2 Récepteurs de l'angiotensine II et signalisation cellulaire

Les récepteurs de l'Ang II incluent deux types principaux, soit AT<sub>1</sub> et AT<sub>2</sub>, présentant une affinité égale pour ce peptide malgré une homologie de seulement 30%, mais dont la distribution et les voies de signalisation recrutées suite à leur stimulation permettent de relayer des effets physiologiques différents, voire opposés (de Gasparo *et al.*, 2000). Ils présentent une structure à sept domaines transmembranaires et font partie de la grande famille des RCPG. Le récepteur AT<sub>4</sub>, liant préférentiellement l'Ang IV et qui pourrait répondre à d'autres peptides (Moeller *et al.*, 1997), ainsi que le récepteur Mas liant l'Ang 1-7 (Jackson *et al.*, 1988; Kostenis *et al.*, 2005), présentent une pharmacologie partiellement caractérisée et ne seront donc pas présentés plus en détail.

#### 1.2.1.2.1 Récepteur AT<sub>1</sub>

Le récepteur AT<sub>1</sub> de l'Ang II a été cloné en 1991 (Sasaki *et al.*, 1991; Murphy *et al.*, 1991). Il est exprimé principalement au niveau vasculaire (fortement dans la média, mais peu dans l'adventice), cardiaque (cardiomyocytes et fibroblastes), rénal, surrénal, hépatique et nerveux. Il existe deux sous-types de récepteurs AT<sub>1</sub> chez les rongeurs, soit AT<sub>1A</sub> et AT<sub>1B</sub> (auparavant AT<sub>3</sub>) partageant une homologie de 94% et des propriétés pharmacologiques similaires, mais une distribution tissulaire différente. L'action de l'Ang II sur ses récepteurs AT<sub>1</sub> peut être bloquée avec des antagonistes spécifiques et de nature non peptidique permettant leur administration *in vivo*. Ces antagonistes, tels le valsartan et le losartan, réduisent efficacement la tension artérielle et préviennent et/ou régressent certains effets de l'Ang II dissociés de son effet presseur. La liaison de l'Ang II aux récepteurs AT<sub>1</sub> entraîne une internalisation rapide de ceux-ci, permettant une désensibilisation du système (Thomas *et al.*, 1996).

Le récepteur AT<sub>1</sub> peut s'associer à diverses protéines hétérotrimériques, soit principalement à G<sub>αq/11</sub>, mais également à G<sub>αi</sub>, G<sub>α11/13</sub> et G<sub>αs</sub>, ce qui complexifie le tableau des effecteurs recrutés par l'Ang II via le récepteur AT<sub>1</sub>. Couplée à la protéine G<sub>αq</sub>, la stimulation du récepteur AT<sub>1</sub> déclenche le recrutement de la phospholipase C (PLC) permettant d'hydrolyser le phosphatidyl inositol, menant à la fois à la production d'inositol 1,4,5-triphosphate (IP3) impliquée dans la hausse de calcium intracellulaire, et de diacylglycérol (DAG), activant la protéine kinase C (PKC). Le récepteur AT<sub>1</sub> active également la phospholipase D (PLD), agissant sur la phosphatidylcholine accroissant la libération de DAG, et la phospholipase A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>), libérant l'acide arachidonique menant à la production d'eicosanoïdes vasodilatateurs ou vasoconstricteurs. Par ailleurs, le récepteur AT<sub>1</sub> accroît l'influx calcique à travers les canaux de type L. La stimulation du récepteur AT<sub>1</sub> active de plus des protéines à activité tyrosine kinase relayant l'activation de la voie des MAPK (protéines kinases activées par des mitogènes) et la transcription génique amorcée en réponse à l'Ang II. Les voies tyrosines kinases majeures initiées par la stimulation du récepteur AT<sub>1</sub> incluent l'activation de c-Src, de FAK (kinase d'adhésion focale), des membres de la voie JAK (Janus kinases) / STAT (transducteurs du signal et activateurs de la transcription) ainsi que la transactivation de récepteurs de facteurs de croissance (EGF, IGF, PDGF, etc.) possédant une activité tyrosine kinase. Plus récemment, des voies de signalisation indépendantes des protéines G, plutôt reliées à l'activation de protéines de la famille des arrestines, ont été décrites et participent entre autres à l'activation de MAPK (Lefkowitz & Shenoy, 2005).

L'activation du récepteur AT<sub>1</sub> est responsable des effets classiques attribués à l'Ang II visant à moduler le volume sanguin circulant et le tonus vasculaire : sécrétion de vasopressine, sécrétion d'aldostérone, stimulation sympathique, stimulation de la soif et vasoconstriction via la hausse de calcium. Plus récemment, la stimulation AT<sub>1</sub> a été associée au remodelage structural du système cardiovasculaire par plusieurs mécanismes incluant des signaux de prolifération / hypertrophie, de migration et de survie cellulaire (décrits à la section 1.2.1.3.1), des processus inflammatoires via la relâche de cytokines (TNF-α, IL-6, etc.), l'activation du facteur de transcription nucléaire NK-κB et l'activation de monocytes/macrophages, des processus thrombotiques via entre autres PAI-1 (inhibiteur

de type 1 de l'activateur du plasminogène) de même que le développement de la fibrose via le CTGF (facteur de croissance des tissus conjonctifs) et le TGF- $\beta$  (facteur de croissance transformant de type  $\beta$ ) (Touyz, 2003b).

#### 1.2.1.2.2 Récepteur AT<sub>2</sub>

Le récepteur AT<sub>2</sub> a été cloné en 1994 chez l'humain (Koike *et al.*, 1994) et par la suite chez le rat (Koike *et al.*, 1995). Il est exprimé fortement lors du développement foetal et son niveau décline rapidement par la suite. Chez l'adulte, on le retrouve dans la médulla des surrénales et à de plus faibles niveaux dans le réseau vasculaire (endothélium et/ou muscle lisse), le cœur, les reins, le cerveau et les tissus reproducteurs. Son expression est augmentée dans diverses pathologies impliquant la ré-expression de gènes foetaux, telle que l'hypertrophie ventriculaire pathologique (Lopez *et al.*, 1994). Des antagonistes spécifiques aux récepteurs AT<sub>2</sub>, tel que le PD123319, permettent d'étudier le rôle de ce récepteur dans la réponse à l'Ang II. À l'inverse des récepteurs AT<sub>1</sub>, les récepteurs AT<sub>2</sub> ne sont pas internalisés suite à la liaison de l'agoniste (Hein *et al.*, 1997). Le récepteur AT<sub>2</sub> peut de plus former un hétérodimère avec le récepteur AT<sub>1</sub> résultant en un blocage de la signalisation et des fonctions de ce dernier (Abd Alla *et al.*, 2001a).

Bien qu'étant un RCPG tout comme le récepteur AT<sub>1</sub>, les mécanismes enclenchés suite à la stimulation du récepteur AT<sub>2</sub> présentent des caractéristiques plutôt atypiques de cette famille, initiant à la fois des voies dépendantes [via G <sub>$\alpha$ 12</sub> et G <sub>$\alpha$ 13</sub> (Hansen *et al.*, 2000)] et indépendantes des protéines G (Berry *et al.*, 2001). Les cascades majeures activées par la stimulation du récepteur AT<sub>2</sub> impliquent premièrement des phosphatases à tyrosine et à sérine/thréonine (Nouet & Nahmias, 2000) permettant de déphosphoryler des protéines et généralement de les désactiver, tel que démontré initialement pour la guanylate cyclase particulière (Bottari *et al.*, 1992), deuxièmement la relâche de monoxyde d'azote (NO) (Siragy & Carey, 1997) stimulant la production de guanine monophosphate cyclique (GMPc) (Gohlke *et al.*, 1998) et troisièmement la relâche d'acide arachidonique suite à la stimulation de la PLA<sub>2</sub>. La stimulation du récepteur AT<sub>2</sub> est également couplée à l'ouverture de canaux K<sup>+</sup> et à l'inhibition du courant calcique de type T, contribuant à

l'hyperpolarisation membranaire et atténuant les effets de la stimulation du récepteur AT<sub>1</sub> sur le contrôle de la réponse vasomotrice et de la tension artérielle.

Bien que complexe, la stimulation du récepteur AT<sub>2</sub> s'oppose généralement aux actions résultant de la stimulation du récepteur AT<sub>1</sub>, ce qui implique des effets vasodilatateurs, natriurétiques, anti-prolifératifs et pro-apoptotiques (Henrion *et al.*, 2001; Carey, 2005). Toutefois, ces actions, tout comme les plus récentes descriptions d'un effet sur la soif et l'activité motrice, demeurent partiellement caractérisées et donc fortement controversées (Reudelhuber, 2005). Ce point de vue du contrebalancement des effets relayés par le récepteur AT<sub>1</sub> est supporté par des études sur les souris pour lesquelles le récepteur AT<sub>2</sub> a été invalidé et qui présentent une tension artérielle élevée (Hein *et al.*, 1995), une réponse vasoconstrictrice amplifiée (Akishita *et al.*, 1999) ainsi qu'une augmentation du remodelage vasculaire coronarien et de la fibrose cardiaque périvasculaire en réponse à une surcharge pressive (Akishita *et al.*, 2000). En revanche, la stimulation du récepteur AT<sub>2</sub> pourrait également relayer certains effets néfastes de l'Ang II, dont certaines actions paradoxalement hypertrophiques (Senbonmatsu *et al.*, 2000; D'Amore *et al.*, 2005), fibrosantes (Senbonmatsu *et al.*, 2000), pro-inflammatoires (activation de NF- $\kappa$ B) et anti-angiogéniques en condition hypoxique (Silvestre *et al.*, 2002).

### **1.2.1.3 Réponses physiologiques relayées par l'angiotensine II et mécanismes moléculaires**

À travers les sections précédentes, les impacts hémodynamiques bien connus de l'Ang II, de même que l'état de vasoconstriction que ce peptide produit [masquant la réponse vasodilatatrice orchestrée par le récepteur AT<sub>2</sub> (Li & Widdop, 2004)], ont été mis en évidence. Les actions de l'Ang II ayant un impact sur la structure cardiovasculaire seront maintenant détaillées de façon à mieux évaluer l'étendue des effets produits par les inhibiteurs du SRA.

### 1.2.1.3.1 Croissance et survie cellulaire

La réponse proliférative à l'Ang II requiert divers effecteurs convergeant vers l'activation de kinases de la famille des MAPK. Celles-ci relayent les signaux vers le noyau où l'activation de facteurs de transcription permet d'augmenter l'expression de gènes impliqués dans la croissance cellulaire caractéristique du remodelage cardiovasculaire hypertensif. Les MAPKs, une famille de protéines kinases à sérine/thréonine, se regroupent en 6 sous-familles, ERK1/2 (kinases activées par des signaux extracellulaires 1 et 2), JNK (kinase au domaine N-terminal semblable à c-Jun) et p38<sup>MAPK</sup> formant les trois principales et étant activées différemment par l'Ang II (Kusuhara *et al.*, 1998; Kim & Iwao, 1999a). Les autres sous-familles de MAPK incluent ERK6 (p38-like MAPK) et ERK3, 4 et 5. L'activation de ERK1/2 survient généralement en réponse à des facteurs de croissance et de différenciation via l'activation d'une MAPK kinase (MEK) elle-même contrôlée par une MEK kinase telle que Raf-1 (Kyriakis *et al.*, 1992), alors que JNK et p38<sup>MAPK</sup> répondent plutôt à des cytokines inflammatoires et au stress cellulaire via d'autres voies de signalisation suivant un principe similaire. Bien que ses rôles et son état *in vivo* dans le réseau vasculaire demeurent obscurs, p38<sup>MAPK</sup> participerait à la production de stress oxydant via l'activation de la NADPH oxydase et pourrait de plus agir en tant que modulateur négatif de ERK1/2, tandis que JNK agirait plutôt en tant que facilitateur de l'apoptose et inhibiteur de la croissance (Lin, 2003). L'activation de ERK1/2 peut de plus contrecarrer l'apoptose induite par de nombreux récepteurs de mort (Tran *et al.*, 2001a). Les actions des MAPKs sont contrebalancées par l'activité de phosphatases, notamment MKP-1 (phosphatase de type 1 des MAPK), dont la réponse est atténuée chez le SHR, favorisant de surcroît la croissance cellulaire.

*In vitro*, l'Ang II stimule la synthèse protéique et l'hypertrophie via son récepteur AT<sub>1</sub> et conduit à l'induction rapide des proto-oncogènes *c-fos*, *c-myc* et *c-jun*; ces effets peuvent être grandement atténués tant dans les CML que les cardiomyocytes par l'inhibition de la phosphorylation de ERK (Servant *et al.*, 1996). Au niveau des cardiomyocytes, une telle réponse hypertrophiante implique en partie la génération d'ET-1, tandis que dans les CML, de nombreux facteurs de croissance (Itoh *et al.*, 1993) sont produits suite à la stimulation du récepteur AT<sub>1</sub>, incluant entre autres le bFGF (facteur de croissance basique des fibroblastes), le PDGF et le TGF-β. Ces effets prolifératifs et

hypertrophiques de l'Ang II mettent en jeu la transactivation de récepteurs de facteurs de croissance possédant une activité tyrosine kinase, tel que démontré pour le récepteur de l'EGF et du PDGF (Linseman *et al.*, 1995; Eguchi *et al.*, 1998). Suite aux évidences initiales suggérant un lien entre l'élévation des niveaux plasmatiques d'Ang II et la croissance hypertrophique des CML (Owens & Schwartz, 1983), il a été établi que la perfusion d'Ang II produit une telle réponse dans l'aorte et les coronaires. D'ailleurs, ERK1/2 et JNK se trouvent continuellement activées dans l'aorte du SHR et semblent participer à la hausse de la masse du vaisseau (Kim *et al.*, 1997). L'Ang II participe également activement au remodelage cardiaque hypertensif en favorisant la prolifération des fibroblastes et l'hypertrophie des cardiomyocytes selon des voies intracellulaires similaires impliquant généralement le récepteur AT<sub>1</sub>. Ces actions de l'Ang II impliquent d'ailleurs la synthèse et relâche d'ET-1 (Scott-Burden *et al.*, 1991), un puissant vasoconstricteur participant également à la croissance / hypertrophie des CML. De plus, des études récentes ont révélé le rôle majeur *in vivo* de la transactivation du récepteur de l'EGF et celui du PDGF respectivement dans le développement de l'hypertrophie cardiaque (Zhai *et al.*, 2006) et par la suite dans le déclin de la fonction cardiaque (Schellings *et al.*, 2006). Les facteurs de croissance décrits ci-dessus stimulent donc la phosphorylation de résidus tyrosines activant ERK1/2, qui à son tour favorise l'expression de cyclines afin d'induire la croissance cellulaire. Les cyclines, ainsi que les protéines qu'elles activent, les CDK (kinases dépendante des cyclines), contrôlent le passage à travers le cycle cellulaire et participent aux dommages structuraux dans les maladies cardiovasculaires (Boehm & Nabel, 2003). Brièvement, le couple cycline D / CDK4 contrôle principalement la phase G<sub>1</sub>, les cyclines A et E avec CDK2 contrôlent la phase S et les cyclines A et B avec CDK1 contrôlent la phase mitotique. Les inhibiteurs de CDKs (CKI), à l'inverse des cyclines, favorisent plutôt l'arrêt de la croissance et incluent entre autres les protéines p16<sup>INK4a</sup>, p21<sup>Cip1/Waf1</sup>, p27<sup>Kip1</sup> et p57<sup>Kip2</sup>. Ainsi, une baisse de ces CKI joue un rôle clé chez les CML dans la progression du cycle cellulaire en réponse aux agents mitogéniques ainsi que dans la réponse hypertrophique, alors que plusieurs agents limitant la prolifération cellulaire modulent plutôt à la hausse ces protéines, notamment p21 et p27.

Plusieurs autres mécanismes mis en jeu lors de la stimulation du récepteur AT<sub>1</sub> assurent la réponse de croissance et de survie cellulaire, à commencer par les espèces

réactives dérivées de l'oxygène (ROS) dérivées du stress oxydant et principalement composées de l'anion superoxyde instable (Touyz, 2003a). Les sources principales de superoxyde incluent la NADPH oxydase, la xanthine oxydase, la lipoxigénase et la eNOS (lorsque découplée). Au niveau vasculaire, la NADPH oxydase, activée principalement par l'Ang II via le récepteur AT<sub>1</sub>, constitue la source principale de superoxyde. Ces radicaux libres de l'oxygène influencent la signalisation cellulaire (activation de MAPKs et tyrosine kinases et phosphatases), l'expression génique (activation de facteurs de transcription) et entraînent ainsi la prolifération, l'hypertrophie et le remodelage dans certains lits vasculaires. Outre ces effets favorisant la croissance, les ROS amplifient la dysfonction endothéliale en réduisant la biodisponibilité du NO et présentent des actions pro-inflammatoires et pro-fibrotiques en amplifiant les effets de l'Ang II sur les cellules cardiovasculaires, les leucocytes et les monocytes. La voie de Akt, un effecteur situé en aval de la phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) activée entre autres par l'Ang II via le récepteur AT<sub>1</sub> (Saward & Zahradka, 1997), participe également à la croissance et à la survie cellulaire (Hixon *et al.*, 2000a). L'expression de Akt, tout comme celle de Csk1 (sous-unité de type 1 de la kinase de cyclines, un effecteur en aval d'Akt) est modulée à la hausse dans l'aorte de SHR en raison de l'activation du récepteur AT<sub>1</sub>. À travers Csk1 qui force la relâche de la cycline B de Cdc2 (cyclase dépendante de cyclines) et ainsi sa dégradation empêchant la progression vers la mitose, Akt favorise la polypléidie (Hixon *et al.*, 2000b). Akt favorise la synthèse protéique en activant p70 S6 kinase (Giasson & Meloche, 1995) et protège les CML de l'apoptose, favorise leur survie par de multiples voies, incluant la modulation de l'expression de la protéine anti-apoptotique Bcl-2 et l'inhibition de caspases.

À l'opposé, la stimulation du récepteur AT<sub>2</sub> atténue les cascades intracellulaires menant à l'activation de protéines clés de la prolifération, dont les MAPKs. Cela se répercute entre autres dans les CML et les fibroblastes par une réduction de la prolifération cellulaire associée à une inhibition de ERK1/2, un effet pouvant être relayé par l'activation d'une des phosphatases en aval du récepteur AT<sub>2</sub>, dont MKP-1, PP2A (protéine phosphatase de type 2A), SHP-1 (phosphatase à domaine SH2) ou SHP-2 (Elbaz *et al.*, 2000; Nouet & Nahmias, 2000). Ainsi, le récepteur AT<sub>2</sub> supprime la croissance hyperplasique des cellules vasculaires (cellules endothéliales et CML) et des fibroblastes.

En accord avec les études *in vitro*, la stimulation du récepteur AT<sub>2</sub> non opposée par le récepteur AT<sub>1</sub> réduit la synthèse d'ADN dans les vaisseaux du SHR (Sabri *et al.*, 1997). De plus, le récepteur AT<sub>2</sub> réduit l'expression de *c-fos* en réponse à l'Ang II, mettant un frein à la croissance hypertrophique. Par contre, au niveau des cardiomyocytes, bien que le récepteur AT<sub>2</sub> semble supprimer la réponse hypertrophique (Booz & Baker, 1996), les études produites sur des souris pour lesquelles le récepteur AT<sub>2</sub> a été invalidé tendent à ne démontrer aucun effet du récepteur AT<sub>2</sub> à ce niveau (Akishita *et al.*, 2000) ou encore une participation directe au processus hypertrophique (Senbonmatsu *et al.*, 2000).

#### 1.2.1.3.2 Mort cellulaire

De multiples études concernant la modulation de la mort cellulaire par apoptose (type de mort cellulaire décrit en détails à la section 1.5) en réponse à l'Ang II, tant via les récepteurs AT<sub>1</sub> que AT<sub>2</sub>, ont été publiées. L'analyse de l'ensemble de ces résultats suggère que l'Ang II influence le processus apoptotique de façon spécifique au type cellulaire et au type de récepteur stimulé (deBlois *et al.*, 2001).

L'activation du récepteur AT<sub>1</sub> protège les CML et les fibroblastes lors d'un stimulus apoptotique telle qu'une privation de sérum ou une hausse importante de NO suite à l'ajout d'un donneur de NO. Les mécanismes en jeu semblent impliquer un déséquilibre en faveur des signaux de survie, telle que l'activation de ERK1/2 et de Akt. À l'inverse, la stimulation du récepteur AT<sub>1</sub> au niveau des cellules endothéliales et des cardiomyocytes (Kajstura *et al.*, 1997) peut activer l'apoptose et ainsi, dans une population cellulaire peu encline à se diviser (cardiomyocytes), se traduire par une perte nette de cellules (Kajstura *et al.*, 1997). De plus, il a été démontré que *in vivo*, les antagonistes AT<sub>1</sub> permettent de prévenir l'apoptose de cardiomyocytes en atténuant l'expression de protéines pro-apoptotiques (Fortuno *et al.*, 2003), tout en éliminant des fibroblastes par un processus ne pouvant être prévenu par l'ajout d'un antagoniste AT<sub>2</sub> et qui serait plutôt relié à la réduction des signaux de survie initiés par le récepteur AT<sub>1</sub> (Der Sarkissian *et al.*, 2003).

L'activation des récepteurs AT<sub>2</sub> dans les CML, les cellules endothéliales, les fibroblastes et les cardiomyocytes en culture (Horiuchi *et al.*, 1999) peut se traduire par le déclenchement du processus apoptotique. Cela est relié à l'activation des phosphatases décrites plus haut et à l'inactivation subséquente de la protéine anti-apoptotique Bcl-2 (Horiuchi *et al.*, 1997) ou de celles favorisant la survie, comme Akt (Cui *et al.*, 2002) et ERK1/2, créant un environnement permissif à l'apoptose. *In vivo*, nous avons rapporté que l'apoptose de CML chez le SHR traité avec un antagoniste AT<sub>1</sub> peut être prévenue par la co-administration du PD123319, un antagoniste AT<sub>2</sub> (Tea *et al.*, 2000). Le récepteur AT<sub>2</sub> serait ainsi pro-apoptotique dans les CML, bien que *in vivo* ce rôle demeure passablement controversé. La mort cellulaire relayée par le récepteur AT<sub>2</sub> implique, du moins dans la lignée de cellules PC12W (phéochromocytome de rat), la production du céramide (Lehtonen *et al.*, 1999; Gallinat *et al.*, 1999). Ce sphingolipide peut être formé soit par la voie catabolique impliquant sa relâche suite à l'hydrolyse de la sphingomyéline membranaire par la sphingomyélinase, soit par la voie anabolique caractérisée par la synthèse *de novo* sous l'action de la céramide synthase et possiblement activée en aval du récepteur AT<sub>2</sub> (Lehtonen *et al.*, 1999), tel que suggéré par l'inhibition de cette enzyme avec la fumonisine B<sub>1</sub>. Le céramide constitue un second messenger qui relaie des actions vasodilatatrices (Johns *et al.*, 1997) et anti-prolifératives / pro-apoptotiques (Hannun & Linardic, 1993), entre autres de par son activation de la phosphatase PP2A (Dobrowsky *et al.*, 1993) et de son interaction (inhibition) avec des isoformes de PKC (Jones & Murray, 1995). De plus, il a récemment été suggéré que la sphingosine-1-phosphate, formée à partir du céramide, contribue à l'activation de eNOS et ainsi aux effets vasodilatateurs entre autres de la bradykinine (Roviezzo *et al.*, 2006). *In vivo*, l'administration d'analogues du céramide réduit la formation de la néointima carotidienne suite à une blessure endothéliale avec un ballonnet (Charles *et al.*, 2000) et précipite l'emphysème en éliminant des cellules pulmonaires par apoptose (Petrache *et al.*, 2005). Ces effets antiprolifératifs et/ou apoptotiques du céramide impliqueraient une modulation de l'activité des MAPKs, plus précisément une activation de JNK et de p38<sup>MAPK</sup> en présence d'une inhibition de ERK1/2. Bref, l'apoptose est un processus sensible aux ratios d'activités entre les différentes MAPKs.

### 1.2.1.3.3 Matrice extracellulaire et migration cellulaire

Dans les CMLs, la stimulation du récepteur AT<sub>1</sub> accroît la production de protéines favorisant l'expansion de la matrice extracellulaire, tels que le TGF- $\beta$  et le CTGF, ainsi que des composantes mêmes de la matrice, telles que la fibronectine et collagène de type I, ce qui se traduit *in vivo* par une fibrose vasculaire et des changements des propriétés élastiques des vaisseaux. Dans le cœur, la production accrue d'Ang II favorise le dépôt de collagène en favorisant sa synthèse tout en réduisant sa dégradation par les métalloprotéinases matricielles (MMP), contribuant à la fibrose cardiaque (Weber, 1997). L'Ang II augmente l'expression d'intégrines, des récepteurs de molécules d'adhésion à la fois impliqués dans le contrôle de la migration et de la prolifération cellulaire (Brassard *et al.*, 2006). Des molécules d'adhésion telles que ICAM-1 (molécule d'adhésion intracellulaire de type 1), VCAM-1 (molécule d'adhésion vasculaire de type 1) et MCP-1 (*monocyte chemoattractant protein-1*) participent d'ailleurs à la réponse affectant la matrice extracellulaire et l'infiltration de cellules inflammatoires lors de l'infusion d'Ang II et des inhibiteurs du SRA réduisent l'expression de ces molécules d'adhésion chez des patients hypertendus (Jilma *et al.*, 2002).

### 1.2.1.4 Modulation du système rénine-angiotensine par des antihypertenseurs ciblant cette voie

L'administration d'inhibiteurs du SRA couramment employés en clinique (antagonistes AT<sub>1</sub> et iECA) semble procurer des effets cardiovasculaires protecteurs au-delà de la réduction efficace de la tension artérielle. Ces agents modulent le niveau plasmatique et tissulaire d'Ang II, l'activation des récepteurs de cet octapeptide ainsi que les niveaux de rénine. En effet, la rénine augmente en réponse aux antagonistes AT<sub>1</sub>, car l'activité de la boucle de rétro-inhibition en aval du récepteur AT<sub>1</sub> est réduite. Les antagonistes AT<sub>1</sub>, en plus d'inhiber les réponses vasoconstrictrices et pressives de l'Ang II, s'opposent à tous ses effets trophiques. Ainsi, le renversement de l'hypertrophie / hyperplasie cardiaque semble s'obtenir via une réduction de la production de facteurs de croissance et/ou de survie normalement situés en aval des récepteurs AT<sub>1</sub>. De surcroît, le niveau circulant d'Ang II grimpe suite au blocage des récepteurs AT<sub>1</sub>, ce qui suractive sélectivement les récepteurs AT<sub>2</sub> pouvant ainsi relayer certains des effets bénéfiques des

antagonistes AT<sub>1</sub>, notamment en ce qui a trait au remodelage vasculaire (Tea *et al.*, 2000), possiblement en raison d'une augmentation de la production de bradykinine telle que proposée à la section suivante.

Quant aux iECA, en dépit des voies alternatives de formation de l'Ang II, leur principal effet sur le SRA (et le mécanisme responsable de la normalisation de la tension artérielle) demeure la réduction du niveau circulant d'Ang II. Ainsi, autant les récepteurs AT<sub>1</sub> que AT<sub>2</sub> présentent une baisse de leur activation en présence d'un iECA. Par ailleurs, une cascade de signalisations intracellulaires initiée par la liaison d'un iECA sur l'ECA situé sur la membrane cytoplasmique des cellules endothéliales a récemment été identifiée (Fleming, 2006). En effet, les iECA, qui pourraient imiter la fonction d'un agoniste présentement inconnu, activent JNK et induisent ainsi des modifications de l'expression génique [ex : induction de COX-2 (Kohlstedt *et al.*, 2005)] via *c-jun* suite à leur liaison à l'ECA. En plus d'altérer la production d'Ang II, l'administration d'un iECA prévient la dégradation des kinines et de nombreux autres facteurs, incluant le peptide Ac-SDKP (Rousseau *et al.*, 1995), l'Ang 1-7, la substance P, la cholécystokinine, l'hémopressine, la protéine  $\beta$ -amyloïde (Hemming & Selkoe, 2005), etc. En particulier, chez les patients hypertendus recevant un iECA, le niveau plasmatique du peptide Ac-SDKP, un inhibiteur naturel de la prolifération des cellules souches, augmente significativement (Azizi *et al.*, 1996). Il a récemment été suggéré que ce peptide participe aux effets bénéfiques des iECA, notamment en ce qui a trait à la prolifération cellulaire et au dépôt de collagène (Peng *et al.*, 2005). Pour la même raison que celle invoquée avec les antagonistes AT<sub>1</sub>, les niveaux de rénine augmentent en présence d'un iECA.

En résumé, les patients hypertendus sous médication avec un iECA, de même que ceux recevant un antagoniste AT<sub>1</sub> (Campbell *et al.*, 2005), présentent des niveaux circulants de bradykinine augmentés qui semblent participer aux effets bénéfiques de ces antihypertenseurs, tels que décrits à la prochaine section.

## 1.2.2 Implications physiopathologiques des kinines

La base du système kallikréines-kinines ayant déjà été présentée à la figure 2, la présente section décrira les voies de signalisation initiées par les récepteurs des kinines, l'implication des kinines en physiopathologie cardiovasculaire et leurs divers rôles dans les effets pharmacologiques des iECA.

### 1.2.2.1 Les récepteurs des kinines

Les effets cellulaires des kinines sont relayés par des récepteurs hautement spécifiques classifiés tout d'abord lors d'études pharmacologiques datant de la fin des années 1970 et par la suite caractérisés grâce à la biologie moléculaire. Ils présentent une structure à sept passages transmembranaires typique des RCPG. Le RB<sub>2</sub>, exprimé de façon constitutive alors que le RB<sub>1</sub> est normalement absent dans les tissus sains, contribue en majeure partie aux effets principaux des kinines chez un sujet normal.

#### 1.2.2.1.1 Le récepteur B<sub>2</sub>

Le RB<sub>2</sub> des kinines a été cloné à partir du rat en 1991 (McEachern *et al.*, 1991). Dans le réseau vasculaire, une distribution différentielle du RB<sub>2</sub> s'observe. Au niveau des grosses artères, des capillaires, des veinules et des grosses veines, le RB<sub>2</sub> abonde sur l'endothélium. À l'opposé, sur les petites artéioles déterminant la tension artérielle, le RB<sub>2</sub> se trouve plutôt dans les CML de la média (Figuroa *et al.*, 2001). Dans le cœur, le RB<sub>2</sub> se trouve sur les cardiomyocytes (aussi sur les fibroblastes mais avec une affinité pour la BK cent fois plus faible) (Minshall *et al.*, 1995). Chez l'adulte, le RB<sub>2</sub> est présent sur l'endocarde des oreillettes et des ventricules, mais non dans le myocarde, contrairement au nouveau-né (Figuroa *et al.*, 2001). L'ordre d'affinité des kinines pour le RB<sub>2</sub> humain est le suivant : Lys-BK ≥ BK >> [des-Arg<sup>9</sup>]BK, Lys-[des-Arg<sup>9</sup>]. Il existe de nombreux antagonistes du RB<sub>2</sub>. Le plus fréquemment employé est le Hoe 140 (DArg[Hyp<sup>3</sup>,Thi<sup>5</sup>,DTic<sup>7</sup>,Oic<sup>8</sup>]BK, icatibant), qui présente une forte affinité et une longue durée d'action, tant *in vitro* que *in vivo*, en raison des deux résidus d'acides aminés artificiels (Bao *et al.*, 1991). Le Hoe 140 présente une forte sélectivité pour le RB<sub>2</sub>, bien qu'une très faible affinité pour le RB<sub>1</sub> puisse être détectée.

Le RB<sub>2</sub> est principalement couplé à G<sub>αq</sub>, et active donc ainsi la PLCβ qui conduit à la production d'IP<sub>3</sub> et de DAG, permettant respectivement la hausse de calcium intracellulaire et l'activation de PKC. La hausse de calcium permet d'activer eNOS, et la BK demeure un des plus puissants inducteurs de la relâche de NO par l'endothélium. Le NO diffuse alors vers le muscle lisse sous-jacent à l'endothélium où il augmente la production de GMPc par une guanylate cyclase soluble. L'activation de PKCε par le RB<sub>2</sub> favorise le recrutement des MAPKs ERK1/2 par la BK (Velarde *et al.*, 1999). Le RB<sub>2</sub> active aussi la PLA<sub>2</sub> qui permet la relâche d'acide arachidonique et donc la production de prostaglandines, incluant la prostacycline (PGI<sub>2</sub>) vasodilatatrice. Le RB<sub>2</sub> interagit également avec d'autres protéines G, incluant G<sub>αi</sub>, G<sub>αs</sub> et G<sub>α12/13</sub> (Leeb-Lundberg *et al.*, 2005). Un mode atypique de signalisation déclenché par l'activation du RB<sub>2</sub> se présente sous la forme d'interactions directes avec des protéines intracellulaires, telles que SHP-2, eNOS, nNos, PLCγ1 (dans les cellules quiescentes et non les cellules prolifératives) (Golser *et al.*, 2000; Duchene *et al.*, 2002; Duchene *et al.*, 2005). Le RB<sub>2</sub> présente un recyclage rapide suite à sa désensibilisation (internalisation) stimulée par un agoniste (Faussner *et al.*, 1998).

#### 1.2.2.1.2 Le récepteur B<sub>1</sub>

Le RB<sub>1</sub> des kinines a été cloné en 1994 (Menke *et al.*, 1994) et il possède une très faible homologie avec le RB<sub>2</sub> (36%). Le RB<sub>1</sub> présente généralement une expression très limitée dans les tissus normaux, sains, mais peut être induit en réponse à un stimulus pathophysiologique (deBlois *et al.*, 1991; Marceau *et al.*, 1998), tel que démontré pour la première fois par Regoli *et al.* (Regoli *et al.*, 1977) lors de l'apparition d'une réponse contractile à la [des-Arg<sup>9</sup>]BK sur l'aorte de lapin isolée dépendante du temps et de la synthèse protéique *de novo*. Néanmoins, l'expression du RB<sub>1</sub> a été démontrée sur une variété de vaisseaux sanguins (artères et veines, cellules endothéliales et CML) de plusieurs espèces incluant l'humain, sur le tissu cardiaque et dans le système nerveux central. L'induction de l'expression du RB<sub>1</sub> survient habituellement en réponse à l'inflammation, une blessure ou des cytokines (IL-1β, TNF-α, etc.) (Marceau *et al.*, 1998). Le lipopolysaccharide (LPS) bactérien induit aussi l'expression du RB<sub>1</sub>. Les mécanismes en

aval de ces stimuli demeurent imprécis, mais semblent impliquer l'activation de MAPKs (entre autres  $p38^{\text{MAPK}}$ ) (Larrivee *et al.*, 1998) et du facteur de transcription NF- $\kappa$ B (Ni *et al.*, 1998). La stimulation du RB<sub>2</sub> par la BK semble pouvoir moduler à la hausse le RB<sub>1</sub> de façon autocrine (Phagoo *et al.*, 1999), mais cela ne constitue clairement pas l'unique mécanisme d'induction, car les souris pour lesquelles le RB<sub>2</sub> a été invalidé montrent une induction compensatoire du RB<sub>1</sub>.

L'induction de l'expression du RB<sub>1</sub> par les iECA demeure un sujet fort controversé. Des études pharmacologiques réalisées au tournant des années 1990 ont à la fois suggéré (Nwator & Whalley, 1989) et réfuté (deBlois *et al.*, 1991) qu'un bref traitement (18 ou 20 heures) puisse moduler à la hausse le RB<sub>1</sub> dans le système vasculaire du lapin. Plus récemment, la deuxième option a été reprise (Marceau *et al.*, 1999). Par contre, chez le rat normotendu, le ramipril induit l'expression du RB<sub>1</sub> dans le rein, le cœur et les grosses artères (Marin-Castano *et al.*, 2002). Dans la moelle épinière du SHR, la thérapie avec un iECA augmente l'expression du RB<sub>1</sub> dans la lamina I après 4 semaines et cette expression revient au niveau basal, pratiquement indétectable, après 8 et 16 semaines de traitement (Ongali *et al.*, 2003). Enfin, chez le cochon d'Inde, une augmentation du nombre de sites de liaison pour un agoniste B<sub>1</sub> dans un homogénat membranaire de trachée et de larynx s'observe dès le premier jour de traitement à l'énalapril et est maintenue pendant toute l'étude (30 jours) (Hirata *et al.*, 2003), alors que dans le pharynx et l'endothélium vasculaire lingual de porc, l'ARNm du RB<sub>1</sub> augmente après 7 jours de traitement à l'énalapril (Moreau *et al.*, 2005). Bref, l'induction du RB<sub>1</sub> par les iECA semble dépendre de l'espèce, du tissu, de l'âge et/ou de la durée du traitement, suggérant aussi que l'induction pourrait être transitoire. L'hypertension artérielle sévère (SHRSP) favorise l'expression du RB<sub>1</sub> rénal (Hagiwara *et al.*, 2004). Chez le SHR, une expression fonctionnelle accrue du RB<sub>1</sub> se présente dans l'hypothalamus (Qadri *et al.*, 2002) et la moelle épinière (Ongali *et al.*, 2003) lorsque l'hypertension est développée. Cette expression redescend dans la moelle épinière après 8 semaines d'âge. Une telle expression du RB<sub>1</sub> s'observe au niveau cardiaque chez le rat hypertendu 2-reins 1-pince (Fernandes *et al.*, 2006), mais n'est par contre pas détectée dans le système cardiovasculaire des rats hypertendus (mREN2)27 (Lagneux *et al.*, 2000). Suite à un infarctus du myocarde chez le rat, l'application d'un antagoniste AT<sub>1</sub>

induit une forte augmentation de l'expression du RB<sub>1</sub> persistante même trois semaines plus tard (Tschöpe *et al.*, 2004).

La BK et la KD dont le résidu arginine en C-terminal a été retiré par la kininase I activent le RB<sub>1</sub>. Ainsi, l'ordre d'affinité des agonistes pour le RB<sub>1</sub> humain se lit ainsi: Lys-[des-Arg<sup>9</sup>] > [des-Arg<sup>9</sup>]BK = Lys-BK > BK. Chez les rongeurs, la [des-Arg<sup>9</sup>]BK présente une affinité comparable ou supérieure à Lys-[des-Arg<sup>9</sup>]. Plusieurs antagonistes sélectifs au RB<sub>1</sub> existent, incluant le [Leu<sup>8</sup>][des-Arg<sup>9</sup>]BK, le R-715 (AcLys [D-β-Nal<sup>7</sup>,Ile<sup>8</sup>][des-Arg<sup>9</sup>]BK) et le R-954

(AcOrn[Oic<sup>2</sup>,(αMe)Phe<sup>5</sup>,DβNal<sup>7</sup>,Ile<sup>8</sup>][desArg<sup>9</sup>]BK) (Neugebauer *et al.*, 2002).

Les voies de signalisation mises en place suite à la stimulation du RB<sub>1</sub> ressemblent à celles activées par le RB<sub>2</sub> et impliquent donc la relâche d'IP<sub>3</sub> et de DAG par la PLC, favorisant la hausse de calcium intracellulaire et l'activation de PKC, ainsi que la relâche d'acide arachidonique par la PLA<sub>2</sub> conduisant à la synthèse de prostaglandines (McLean *et al.*, 2000). Par contre, contrairement au RB<sub>2</sub>, le RB<sub>1</sub> ne se désensibilise pas, même lors d'une stimulation chronique par un agoniste (Zhou *et al.*, 2000), ce qui pourrait expliquer les effets plus soutenus quant à l'hydrolyse du phosphatidyl inositol et à la hausse de calcium.

### 1.2.2.2 Autres aspects de la signalisation impliquant les kinines

#### 1.2.2.2.1 Récepteur GPR100

Bien que les souris pour lesquelles le RB<sub>2</sub> a été invalidé ne répondent plus à la BK, il a été suggéré récemment qu'un RCPG orphelin, le GPR100, soit un récepteur de haute affinité pour la BK (Boels & Schaller, 2003) en plus de lier la relaxin-3. Toutefois, l'analyse d'une plus récente étude (Meini *et al.*, 2004) soulève plusieurs interrogations quant à la définition de la BK en tant que ligand endogène du récepteur GPR100 et un groupe différent a rapporté que la BK n'active pas ce récepteur (Chen *et al.*, 2005). De plus, chez le rat, le gène codant pour GPR100 ne présente pas de cadre de lecture ouvert et

apparaît donc plutôt comme un pseudogène (Chen *et al.*, 2005), ce qui explique l'absence d'études sur ce récepteur dans la présente thèse.

#### 1.2.2.2.2 Hétérodimère $RB_1$ - $RB_2$

Le  $RB_1$  pourrait former un complexe hétérologue avec le  $RB_2$  impliquant la protéolyse de ce dernier (Barki-Harrington *et al.*, 2003). Cet hétérodimère pourrait faciliter la transition de la réponse de type  $B_2$  vers une réponse  $B_1$  accentuée lors d'insultes chroniques (Kang *et al.*, 2004). Un tel complexe protéolytique  $RB_1$ -  $RB_2$  présente une activité signalétique accrue en réponse à la [des-Arg<sup>9</sup>]BK (Kang *et al.*, 2004).

#### 1.2.2.2.3 Autres liens SRA-kinines

Outre le lien classique déjà évoqué entre les kinines et le SRA (dégradation des kinines par l'ECA), d'autres connexions existent et demeurent plus ou moins controversées (Shen & El-Dahr, 2006). Premièrement, des interactions entre les récepteurs de l'angiotensine et le système des kinines ont été décrites. En formant un hétérodimère stable  $AT_1$ -  $RB_2$  dont la présence augmente en situation de pré-éclampsie, la signalisation en aval du récepteur  $AT_1$  se trouve accentuée et semble activer l'expression du  $RB_2$  (Abd Alla *et al.*, 2001b). De plus, l'Ang II, via son récepteur  $AT_1$ , augmente le niveau d'ARNm du  $RB_2$  dans les cardiomyocytes et les CML vasculaires (Kintsurashvili *et al.*, 2001). Deuxièmement, de nombreux indices expérimentaux récents provenant d'un seul groupe supportent le concept d'un lien direct entre l'ECA et l'activation des récepteurs des kinines. Tout d'abord, les iECA pourraient potentialiser la stimulation du  $RB_2$  (et sa resensibilisation) en induisant une interaction protéique entre l'ECA et le  $RB_2$  à la membrane cellulaire (Marcic *et al.*, 1999; Marcic *et al.*, 2000). Ensuite, il a été suggéré que les iECA puissent activer directement le  $RB_1$  dans les cellules endothéliales en s'y liant, créant une relâche prolongée de NO (Ignjatovic *et al.*, 2002). Toutefois, de solides manipulations produites il y a plus de 20 ans (Babiuk *et al.*, 1982) et répétées récemment (Fortin *et al.*, 2003) désapprouvent la stimulation du  $RB_1$  par les iECA et nient donc que les iECA soient de véritables agonistes  $B_1$ . Les controverses soulevées par certaines de ces données ne sont pas sans rappeler celle impliquant la kallikréine dans la stimulation de la

relâche de rénine (Doi *et al.*, 1983). Il a également été rapporté que les kinines stimulent la relâche de rénine via le RB<sub>2</sub> (Beierwaltes *et al.*, 1985). Cette observation est soutenue par la réduction de moitié du niveau d'ARNm de la rénine dans le rein de souris nouveau-né dont le RB<sub>2</sub> a été invalidé (Yosipiv *et al.*, 2001), mais pas par une étude montrant que le blocage du RB<sub>2</sub> n'affecte pas les niveaux de rénine (Campbell *et al.*, 1999).

### **1.2.2.3 Kinines et physiopathologie cardiovasculaire**

Les kinines et leurs récepteurs constituent un système particulier du fait que ces médiateurs peuvent générer des effets opposés, notamment en ce qui a trait au contrôle du tonus vasculaire et de la prolifération cellulaire. Ces effets sont non seulement fonction du récepteur impliqué mais également fonction du type cellulaire et de l'état dans lequel les cellules ciblées se trouvent, le système de second messenger ainsi activé dictant la réponse initiée.

#### *1.2.2.3.1 Tension artérielle*

Les kinines jouent un rôle, majoritairement via le RB<sub>2</sub>, dans l'homéostasie de la tension artérielle normale (Duka *et al.*, 2006). Les souris pour lesquelles le RB<sub>2</sub> a été invalidé présentent une plus grande réponse hypertensive à l'Ang II (Cervenka *et al.*, 2001), et la tension artérielle de SHR recevant une diète faible en sel (stimulant le SRA) augmente suite au blocage de l'action des kinines (Waeber *et al.*, 1986). De plus, les rats déficients en kininogènes ou ne possédant pas le RB<sub>2</sub> présentent une plus grande susceptibilité à développer une hypertension artérielle sévère avec des dommages aux organes cibles lorsque nourris avec une diète riche en sel, confirmant le rôle rénal et natriurétique des kinines. Des études de génétique ont montré une forte association entre des polymorphismes dans le loci du gène de la kallibréine et le phénotype hypertendu (Pravenec *et al.*, 1991). En effet, des niveaux anormalement bas de kallibréine sont décelés chez les patients hypertendus. Une excrétion urinaire de kallibréine réduite s'observe dans plusieurs modèles expérimentaux d'hypertension, dont le SHR (Geller *et al.*, 1975), et une corrélation inverse existe entre les niveaux de kallibréine rénale ou urinaire et la tension

artérielle. Bref, plusieurs indications soulignent que le système kallibréine-kinines est sous-exprimé lors de diverses formes d'hypertension.

Les agonistes B<sub>1</sub> génèrent un bref effet hypotenseur entre autres chez le lapin (Nwator & Whalley, 1989), le chien (Lamontagne *et al.*, 1996), le rat (McLean *et al.*, 1999) et le cochon (Siebeck *et al.*, 1989). En général, une telle réponse s'observe seulement suite à un stimulus inflammatoire et le contrôle normal de la pression sanguine ne semble pas impliquer le RB<sub>1</sub> étant donné que les souris pour lesquelles ce récepteur a été invalidé ne sont pas prédisposées à l'hypertension ou l'hypotension (Pesquero *et al.*, 2000). Chez le lapin prétraité au LPS, cet effet hypotenseur biphasique peut être prolongé par un prétraitement avec le captopril, un iECA, ou avec l'amastatine, un inhibiteur de l'AmM; la deuxième phase peut être inhibée par l'indométhacine, révélant la participation de la synthèse de prostaglandines faisant suite à la relâche rapide de NO (Drapeau *et al.*, 1991). Le RB<sub>1</sub> participe au contrôle central de la pression sanguine, car une élévation s'observe suite à l'administration d'agonistes B<sub>1</sub> et une réduction lors du blocage des RB<sub>1</sub> centraux (Emanuelli *et al.*, 1999a).

#### 1.2.2.3.2 *Tonus vasculaire*

Les récepteurs des kinines déterminent le tonus vasculaire par divers mécanismes. Le RB<sub>2</sub> favorise tout d'abord la relaxation de CML vasculaires suite à la relâche de NO à partir de l'endothélium (D'Orleans-Juste *et al.*, 1989) et ensuite par la production de PGI<sub>2</sub> conduisant à une hausse d'AMPC. Par ailleurs, une étude récente suggérant la nécessité de récepteurs AT<sub>2</sub> de l'Ang II fonctionnels pour observer la vasodilatation dépendante des kinines rappelle la complexité du mécanisme mis en jeu (Bergaya *et al.*, 2004). À l'inverse, lorsque les CML s'exposent à la BK (ex : lors d'une blessure endothéliale) ou lorsqu'elles produisent elles-mêmes la BK, on observe une contraction des CML vasculaires relayée entre autres par l'augmentation de calcium intracellulaire. Une telle contraction dépendante du RB<sub>2</sub> se produit dans la vessie.

La réactivité vasculaire en réponse aux ligands B<sub>1</sub> ne semble pas présente constitutivement; elle s'acquiert plutôt suite à une incubation ou à l'application d'un stimulus inflammatoire. La vasodilatation produite par le RB<sub>1</sub> est en général dépendante de l'endothélium et, dans un large éventail de vaisseaux, relayée par la relâche de NO à partir de l'endothélium (D'Orleans-Juste *et al.*, 1989; McLean *et al.*, 2000), bien qu'elle implique parfois la relâche d'eicosanoïdes, notamment la PGI<sub>2</sub> (McLean *et al.*, 1999). À l'opposé, le RB<sub>1</sub> peut aussi produire une réponse vasoconstrictrice. Cela s'observe sur l'artère carotidienne lorsque étudiée suite à la blessure endothéliale et à la formation de la néointima (Pruneau *et al.*, 1994) ainsi que sur l'aorte de lapin (Regoli *et al.*, 1977), une réponse amplifiée lorsque l'endothélium est enlevé avant d'appliquer l'agoniste B<sub>1</sub>. L'induction du RB<sub>1</sub> dans la média de l'artère coronaire porcine suite à 6 heures d'incubation dans un bain à 37°C produit une contraction en réponse à la [des-Arg<sup>9</sup>]BK révélée à la fois par l'inhibition de la NOS et par l'absence de l'endothélium (Drummond & Cocks, 1995). Au niveau des veines, les agonistes B<sub>1</sub> produisent généralement une contraction (McLean *et al.*, 2000). D'une façon similaire, une contraction survient suite à l'application d'un agoniste B<sub>1</sub> sur la vessie, un tissu reconnu pour présenter une induction du RB<sub>1</sub> lorsque isolé dans un bain d'organe (Butt *et al.*, 1995), sur la vésicule biliaire et sur le muscle lisse de l'iléum. La contraction du muscle lisse vasculaire par le RB<sub>1</sub> pourrait impliquer, indépendamment de l'endothélium, l'activation de PKC, la relâche de calcium, des prostaglandines ainsi que la stimulation de la relâche de catécholamines activant leur récepteur α<sub>1</sub>-adrénergique (McLean *et al.*, 2000). Bref, le contrôle du tonus vasculaire par le RB<sub>1</sub> constitue un processus complexe loin d'être parfaitement compris.

#### 1.2.2.3.3 Prolifération cellulaire et apoptose

Le RB<sub>2</sub> peut, selon les conditions, activer ou inhiber la prolifération cellulaire. La BK stimule la prolifération des cellules quiescentes, notamment des fibroblastes (Owen & Villereal, 1983), des cellules mésangiales (Bascands *et al.*, 1993) et des CML (Yang *et al.*, 2003), via le RB<sub>2</sub>. Les voies activées lors d'une telle prolifération cellulaire ressemblent à celles mises en route lors de la réponse mitogénique au PDGF, c'est-à-dire l'activation de Ras/Raf/MEK/MAPK (Yang *et al.*, 2003), relayée entre autres par l'activation de PKCε (Velarde *et al.*, 1999) et la génération de ROS (Greene *et al.*, 2000). Les effets produits par

la BK (génération de IP<sub>3</sub>, translocation de PKC, activation de ERK1/2, etc.) ressemblent aux signaux générés par de puissants agents hypertrophiant les cardiomyocytes, telles que l'Ang II, l'endothéline et la phényléphrine. Cependant, la BK ne possède que de faibles propriétés hypertrophiques sur les cardiomyocytes (Clerk *et al.*, 1996). À l'opposé, sous des conditions prolifératives, la BK produit un effet anti-mitotique dans plusieurs types cellulaires (CML, cellules mésangiales, etc.) (Dixon & Dennis, 1997; Agata *et al.*, 2000; Duchene *et al.*, 2002). Au niveau des cellules mésangiales, cet effet antiprolifératif de la BK lors d'une stimulation avec des facteurs de croissance implique une interaction protéique entre le RB<sub>2</sub> et la protéine tyrosine phosphatase SHP-2 (Duchene *et al.*, 2002), suivie d'une augmentation de l'activité tyrosine phosphatase cellulaire totale conduisant à l'inhibition de la phosphorylation de ERK1/2 (Cellier *et al.*, 2003). La protéine SHP-2 peut relayer aussi bien des signaux mitogéniques qu'anti-prolifératifs. Les voies anti-prolifératives en aval de SHP-2 demeurent mal comprises et pourraient impliquer la déphosphorylation du récepteur à l'insuline ou de composantes de la voie JAK/STAT.

Le rôle du RB<sub>1</sub> dans le contrôle de la prolifération a jusqu'à présent été moins étudié. Il semblerait que ce récepteur favorise la prolifération des cellules endothéliales (Morbidelli *et al.*, 1998; Agata *et al.*, 2000) et de CML entre autres via ERK1/2 (Christopher *et al.*, 2001). À l'opposé, il inhibe la prolifération de CML vasculaires de rat induite par du sérum (Agata *et al.*, 2000) ou par le PDGF (Dixon & Dennis, 1997), un mécanisme impliquant la prolongation de l'activation de ERK et la hausse de p27<sup>Kip1</sup> (Dixon *et al.*, 2002). Les études *in vivo* suggèrent que la hausse de l'activité du système kallikréine-kinines prévient la prolifération de CML vasculaires conduisant à la formation de la néo-intima suite à une angioplastie (Murakami *et al.*, 1999; Agata *et al.*, 2000), un stimulus reconnu pour augmenter l'expression du RB<sub>1</sub> de façon transitoire (Agata *et al.*, 2000). Cet effet a été attribué à des voies de signalisation impliquant le NO-GMPc produit aussi bien suite à une stimulation du RB<sub>1</sub> (Agata *et al.*, 2000) que du RB<sub>2</sub> (Murakami *et al.*, 1999).

Les kinines affectent également le processus de mort cellulaire programmée par apoptose, bien que peu d'études aient été réalisées à cet égard. La hausse du niveau de

kallikréine-kinines protège les cardiomyocytes et les cellules neuronales de l'apoptose suite à un protocole d'ischémie/reperfusion (Yin *et al.*, 2005a; Xia *et al.*, 2006) et les cellules rénales suite à l'administration de la gentamicine, un antibiotique (Bledsoe *et al.*, 2006). De plus, les kinines, via le RB<sub>2</sub> et la hausse de l'activité de eNOS, semblent protéger les cellules endothéliales de l'apoptose en situation d'hypoxie (Matsumoto *et al.*, 2003). Il a également été suggéré que des antagonistes de la BK puissent stimuler l'apoptose de cellules cancéreuses (Stewart, 2003). Un lien intéressant a également été tracé entre le RB<sub>1</sub> et la génération de céramide, un facteur pro-apoptotique, via l'activation d'une sphingomyélinase dans les petites artères de rat (Kleine *et al.*, 2002). Le NO, qui, tout dépendant de sa concentration, agit en tant qu'inhibiteur de croissance et stimule l'apoptose de CML et de fibroblastes, pourrait participer à ces effets des kinines sur la prolifération et l'apoptose.

En revanche, la recherche de nouveaux traitements contre l'hypertension pulmonaire sévère a permis de révéler qu'un agoniste stable du RB<sub>2</sub>, le B9972, active la caspase-3 et induit l'apoptose de cellules hyperprolifératives dans les artérioles pré-capillaires pulmonaires (Taraseviciene-Stewart *et al.*, 2005). Quant au RB<sub>1</sub>, il semble inhiber l'apoptose de cellules endothéliales humaines en culture en favorisant la survie (Emanuelli *et al.*, 2002). Par contre, chez les souris n'exprimant pas le RB<sub>1</sub>, l'apoptose de neutrophiles requise pour résorber un processus inflammatoire persistant est altérée (Araujo *et al.*, 2001). Le kininogène de haut poids moléculaire, clivé (Sun & McCrae, 2006) ou non (Al-Fakhri *et al.*, 2003), peut quant à lui induire l'apoptose de cellules vasculaires (endothéliales et CML) via ses propriétés anti-adhésives.

#### *1.2.2.3.4 Autres actions des kinines*

Les kinines participent à de nombreux autres processus (développement, modulation de la matrice extracellulaire, angiogenèse, perméabilité vasculaire) et sont ainsi impliquées dans plusieurs pathologies (Leeb-Lundberg *et al.*, 2005). Sans entrer dans des détails n'étant pas essentiels à la compréhension de cette thèse, les kinines font partie de la physiopathologie de l'asthme (relâche d'histamine suite à une stimulation B<sub>2</sub> sur les mastocytes), du diabète (hausse de l'expression du RB<sub>1</sub> dans un modèle expérimental et

prévention du diabète dépendant de l'insuline par un antagoniste B<sub>1</sub>), du choc septique, de la douleur et de l'inflammation (Couture *et al.*, 2001). En particulier, l'injection de BK reproduit les quatre signes cardinaux de l'inflammation, et la stimulation du RB<sub>1</sub> produit un œdème de la patte chez le rat ainsi qu'une hyperalgésie. À cet égard, le RB<sub>2</sub> semble relayer la réponse aiguë alors que la douleur chronique implique le RB<sub>1</sub>.

En résumé, il peut parfois s'avérer utile d'augmenter l'activité du système des kinines, soit en favorisant leur production par les kallikréines, soit en bloquant leur dégradation entre autres au niveau de la kininase II. Le groupe de Chao et Chao (Chao & Chao, 2005) a démontré dans une série de publications les effets bénéfiques chez le rat du transfert du gène humain de la kallikréine tissulaire. Cela réduit la tension artérielle chez le SHR, le rat Dahl sensible au sel et le rat hypertendu Goldblatt, atténue le remodelage cardiaque hypertensif (masse cardiaque, hypertrophie des cardiomyocytes et densité de collagène), favorise la néovascularisation cardiaque (capillaires), protège la fonction rénale lors de l'hypertension artérielle, prévient la resténose post-angioplastie et atténue l'infarctus du myocarde et ses dommages suite à une ischémie/reperfusion. De plus, l'inactivation du RB<sub>2</sub> chez la souris entraîne l'hypertension artérielle, le remodelage cardiaque et une dysfonction diastolique sévère (Emanuelli *et al.*, 1999b). Ces études confirment les effets préventifs de la BK (relayés par le NO et le GMPc) quant à l'hypertrophie cardiaque induite par l'Ang II, identifiés sur le cœur isolé (Rosenkranz *et al.*, 2002) ou sur des cardiomyocytes cultivés en présence de cellules endothéliales (Ritchie *et al.*, 1998). La hausse de l'expression du RB<sub>1</sub> au niveau rénal et cardiaque chez le SHRSP semble protéger contre les dommages rénaux (Hagiwara *et al.*, 2004) et contre le remodelage cardiaque (Moriwa *et al.*, 2006) lors de l'hypertension artérielle, possiblement via l'inhibition de TGF- $\beta$  et l'activation de eNOS. En revanche, les troubles introduits par une surstimulation du système des kinines (douleur, inflammation, asthme, angio-œdème, etc.) cautionnent l'emploi de manœuvres visant à activer ce système.

#### 1.2.2.4 Implication des kinines dans les effets pharmacologiques des inhibiteurs de l'enzyme de conversion de l'angiotensine et des antagonistes AT<sub>1</sub>

Les kinines, se trouvant augmentées dans la circulation et localement dans les tissus cardiovasculaires suite à l'inhibition de leur dégradation, participent à certains des effets cliniques des iECA, incluant la baisse de tension artérielle, la prévention de la resténose, la cardioprotection et certains effets secondaires telles la toux et des formes sévères d'angioedèmes (Linz *et al.*, 1995). Les kinines jouent également un rôle dans des effets moins bien caractérisés des iECA, comme l'amélioration de la résistance à l'insuline dans un modèle de souris diabétique (Shiuchi *et al.*, 2002).

L'effet antihypertenseur chronique des iECA peut être atténué par le blocage des récepteurs des kinines, mais pas systématiquement (Linz *et al.*, 1995). Les kinines participeraient particulièrement à la baisse de tension artérielle à long terme produite par les iECA dans les modèles réno-vasculaires d'hypertension, tels que la coarctation aortique et le rat 2-reins 1-pince, mais pas chez le SHR. Chez le SHR, les kinines participent plutôt à la chute de pression aiguë engendrée par les iECA (Cachofeiro *et al.*, 1992). Chez l'humain, d'une façon similaire, le blocage du RB<sub>2</sub> tend à atténuer plus fortement l'effet antihypertenseur aigu (les premières heures) (Squire *et al.*, 2000) du captopril chez les sujets présentant une activité normale à élevée de la rénine plasmatique que chez ceux avec une rénine basse (Gainer *et al.*, 1998). De plus, la correction de la dysfonction endothéliale par les iECA pourrait impliquer l'accumulation de kinines pouvant stimuler la formation de PGI<sub>2</sub>, de NO et de GMPc vasculaire (Tschope *et al.*, 1997). Les iECA, via les kinines, préviennent aussi la dysfonction endothéliale dans divers modèles d'athérosclérose (Berkenboom *et al.*, 1997). Plusieurs solides évidences suggèrent que le RB<sub>2</sub> des kinines relaie les mécanismes anti-prolifératifs mis en place par les iECA lors de l'inhibition de la formation de la néo-intima suite à une dénudation endothéliale par un ballonnet (Farhy *et al.*, 1993) ou à l'interruption du flot carotidien (Emanuelli *et al.*, 2000). La co-administration d'un antagoniste B<sub>1</sub> avec le captopril semble également prévenir la formation de la néo-intima et son hyperplasie (Emanuelli *et al.*, 2000). Divers effets cardioprotecteurs des iECA semblent dus à la potentialisation des kinines endogènes (Tschope *et al.*, 1997). Ainsi, les kinines participent à l'amélioration de la fonction cardiaque chez le SHR, à la prévention de changements structuraux suite à un infarctus du

myocarde (Martorana *et al.*, 1990; Hartman *et al.*, 1993; Liu *et al.*, 1997; Heusch *et al.*, 1997) et à la croissance des capillaires lors de l'hypertrophie ventriculaire gauche (Gohlke *et al.*, 1997), résultats tous obtenus lors du traitement avec un iECA. De plus, les iECA amplifient l'effet protecteur du pré-conditionnement ischémique par un mécanisme impliquant le RB<sub>2</sub> (Morris & Yellon, 1997), bien qu'il ait été démontré que le RB<sub>1</sub> participe à la protection de la fonction endothéliale coronarienne obtenue par un protocole similaire (Bouchard *et al.*, 1998). Les kinines participent aussi aux effets anti-hypertrophiques des iECA sur des cardiomyocytes en culture et dans un modèle d'hypertrophie ventriculaire en réponse à une surcharge pressive (Rouleau *et al.*, 2001), bien que cela n'ait pu être reproduit par un autre groupe (Rhaleb *et al.*, 1994). Par contre, chez le SHRSP, le blocage du RB<sub>2</sub> par le Hoe 140 n'empêche pas les effets du perindopril sur la prévention du remodelage structural du ventricule gauche (masse du ventricule, déposition de collagène, etc.) (Kim *et al.*, 2000), contrairement à ce qui avait été rapporté en ce qui a trait à la fonction cardiaque dans ce modèle (Gohlke *et al.*, 1994). L'effet secondaire principal des iECA, soit l'apparition d'une toux sèche, survient en raison du blocage de la dégradation des kinines.

Par ailleurs, les kinines pourraient aussi tenir un rôle dans certains effets observés lors de l'administration d'antagonistes AT<sub>1</sub>, une observation justifiée par la récente identification de l'augmentation des niveaux de kinines chez les patients hypertendus recevant un antagoniste AT<sub>1</sub> (Campbell *et al.*, 2005). Ainsi, l'inhibition des récepteurs AT<sub>1</sub> suite à un infarctus du myocarde prévient la hausse de l'activité de l'endopeptidase neutre dégradant la BK, ce qui favorise l'accumulation de BK (Walther *et al.*, 2002). Dans un environnement expérimental similaire (modèle d'ischémie/reperfusion), les effets cardioprotecteurs d'antagonistes AT<sub>1</sub> s'annulent lorsque co-administrés avec un antagoniste soit du RB<sub>1</sub> (Tschope *et al.*, 2004), soit du RB<sub>2</sub> (Jalowoy *et al.*, 1998; Zhu *et al.*, 1999). La stimulation des récepteurs AT<sub>2</sub> endothéliaux cause la relâche de médiateurs généralement associés aux kinines, le NO et le GMPc. La production de ces médiateurs au niveau vasculaire (coronaires et aorte) suite à l'infusion d'AngII peut être inhibée *in vivo* par le blocage de la kallikréine ou du RB<sub>2</sub> (Seyedi *et al.*, 1995; Gohlke *et al.*, 1998). De plus, la surexpression des récepteurs AT<sub>2</sub> au niveau vasculaire [CML (Tsutsumi *et al.*, 1999)] ou cardiaque [cardiomyocytes (Kurusu *et al.*, 2003)] augmente le niveau de kinines en activant

les kininogénases, ce qui produit une vasodilatation s'opposant aux effets du récepteur AT<sub>1</sub> (Tsutsumi *et al.*, 1999) et qui atténue la fibrose cardiaque périvasculaire (Kurisu *et al.*, 2003) (la fibrose interstitielle n'étant pas augmentée dans cet article) en réponse à l'Ang II. Toutefois, cette activation des kinines n'a pu empêcher l'hypertrophie des cardiomyocytes (Kurisu *et al.*, 2003). L'activation des kininogénases via le récepteur AT<sub>2</sub> impliquerait une acidification intracellulaire causée par l'inhibition de l'échangeur Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> en réponse à l'Ang II (Tsutsumi *et al.*, 1999). De tels mécanismes pourraient donc s'observer lors d'une surstimulation du récepteur AT<sub>2</sub>, comme pendant le blocage du récepteur AT<sub>1</sub>. En effet, les évidences soulignant un lien physiologique entre la stimulation du récepteur AT<sub>2</sub> et le système des kinines commencent à s'accumuler, notamment en ce qui a trait à la vasodilatation [vaisseaux de résistance (Katada & Majima, 2002) et microvaisseaux coronariens (Batenburg *et al.*, 2004)], le contrôle de la tension artérielle (Tsutsumi *et al.*, 1999; Israel *et al.*, 2000; Sosa-Canache *et al.*, 2000) et plus récemment dans la prévention de la formation de la néointima suite à une blessure vasculaire (Barker *et al.*, 2006). Des actions dépendantes des kinines ont récemment été décrites en réponse à des BCC; nous y reviendrons à la section 1.3.3.1 après avoir décrit le système du calcium.

## **1.3 Le calcium et son implication dans l'hypertension artérielle**

Le calcium ( $\text{Ca}^{2+}$ ) constitue un second messager contrôlant de nombreux processus cellulaires essentiels pour la vie, tels que la contraction, la sécrétion, le métabolisme, la fertilisation, la prolifération et la mort cellulaire. La signalisation intracellulaire associée au calcium permet de déployer des réponses soit rapides suite à un pic de calcium fin, comme lors de la contraction, soit plutôt lentes et contrôlées par des ondulations de calcium globales et répétées, comme lors de la prolifération cellulaire associée à des modifications de la transcription génique. Ces systèmes modulés par le calcium participent ainsi à certaines pathologies cardiovasculaires caractérisées par une modification de la contractilité cardiaque et du tonus vasculaire ainsi que par un déséquilibre du patron d'expression protéique. De plus, l'utilisation de bloqueurs de canaux calciques (BCC), entre autres dans le traitement de l'hypertension artérielle, perturbe les voies de signalisation associées au calcium. L'aperçu du système calcique présenté dans cette section sera suivi par une description succincte du rôle de cet ion au niveau cardiovasculaire, de son implication dans la physiopathologie de l'hypertension artérielle et des effets des BCC, dont les multiples actions ne demeurent que partiellement comprises.

### **1.3.1 Dynamique et homéostasie du système calcique**

Les voies de signalisation associées au calcium fonctionnent par la propagation d'influx calciques vers le cytosol, soit à partir du milieu extracellulaire soit en provenance de réservoirs intracellulaires. Des protéines effectrices du calcium deviennent ensuite activées, avant que des mécanismes homéostatiques retournant le calcium vers son origine ne soient initiés.

#### **1.3.1.1 Entrée du calcium dans la cellule**

Le fort gradient électrochimique séparant le milieu extracellulaire et le cytoplasme favorise l'entrée du calcium dans la cellule via des canaux aux propriétés variées. Les canaux calciques dépendant du voltage ( $\text{Ca}_V$ ) présents à la surface des cellules excitables génèrent des influx calciques rapides et contrôlent des processus cellulaires tels que la

contraction musculaire et l'exocytose (Berridge *et al.*, 2003). Parmi les autres canaux membranaires spécifiques au calcium, mentionnons les ROC (canaux modulés par des récepteurs), les SMOC (canaux modulés par des seconds messagers) ainsi que les SOC (canaux modulés par des réservoirs) (Berridge *et al.*, 2003), ces derniers étant moins bien caractérisés et s'ouvrant suite à une déplétion des réservoirs calciques intracellulaires (Parekh & Putney, Jr., 2005). Seules les caractéristiques des canaux  $Ca_v$  seront approfondies dans l'introduction de cette thèse.

#### 1.3.1.1.1 Canaux calciques dépendant du voltage

Les canaux  $Ca_v$ , dont la famille inclut présentement 10 membres caractérisés chez les mammifères (Catterall *et al.*, 2005), constituent des complexes protéiques formés de 4 ou 5 sous-unités (S.U.) distinctes. La S.U.  $\alpha_1$ , organisée en quatre domaines homologues contenant chacun six segments transmembranaires, contient le pore de conductibilité, le site de sensibilité au voltage et les principaux sites de modulation par les seconds messagers et les médicaments. Un complexe transmembranaire  $\alpha_2\delta$  et une S.U. régulatrice  $\beta$  intracellulaire altérant la vitesse d'inactivation complètent la majorité de ces canaux, une S.U.  $\gamma$  s'ajoutant parfois. La nomenclature actuelle divise les canaux perméables au calcium et dépendant du voltage en sous-familles, selon les propriétés des courants calciques générés et selon la famille du gène de la S.U. principale  $\alpha_1$  (Catterall *et al.*, 2005).

Les canaux  $Ca_v1$  génèrent les courants calciques de type L (de longue durée) apparaissant suite à une forte dépolarisation membranaire. Ces canaux sensibles aux dihydropyridines sont responsables des principaux courants enregistrés dans les cellules musculaires et endocrines, où ils initient respectivement la contraction et la sécrétion. Cette famille inclut les canaux possédant les S.U.  $\alpha_{1S}$  ( $Ca_v1.1$ , sur les muscles squelettiques),  $\alpha_{1C}$  ( $Ca_v1.2$ , entre autres sur les cardiomyocytes et les CML),  $\alpha_{1D}$  ( $Ca_v1.3$ , entre autres sur les cellules endocrines) et  $\alpha_{1F}$  ( $Ca_v1.4$ ). La S.U.  $\alpha_{1C}$  exprimée dans le muscle lisse représente un variant issu d'un épissage alternatif ( $\alpha_{1C-b}$ ) lui conférant une plus grande sensibilité aux dihydropyridines comparativement au variant présent dans les cardiomyocytes ( $\alpha_{1C-a}$ ). Cela

explique en partie la sélectivité vasculaire accrue de ces antihypertenseurs (Nordlander *et al.*, 1995; Welling *et al.*, 1997).

Les canaux  $Ca_v2$ , principalement exprimés sur les neurones et insensibles aux dihydropyridines, produisent les courants calciques de type P/Q ( $Ca_v2.1$ , S.U.  $\alpha_{1A}$ ), de type N ( $Ca_v2.2$ , S.U.  $\alpha_{1B}$ ) et de type R ( $Ca_v2.3$ , S.U.  $\alpha_{1E}$ ). Ils requièrent également une forte dépolarisation afin d'être activés, mais sont plutôt impliqués dans la transmission synaptique rapide et dans l'entrée de calcium au niveau des corps cellulaires et des dendrites.

Les canaux  $Ca_v3$  génèrent des courants calciques de type T (transitoires) activés par une faible dépolarisation et relativement insensibles aux dihydropyridines. Ils sont présents sur de nombreux types cellulaires où ils contrôlent entre autres la décharge à répétition, comme lors de la stimulation rythmique des cellules excitables dans le cœur et le cerveau. Cette famille inclut les canaux  $Ca_v3.1$  à  $3.3$  (sous-unités  $\alpha_{1G}$ ,  $\alpha_{1H}$  et  $\alpha_{1I}$ ). Le BCC mibéfradil présente une sélectivité de 3 à 5 fois plus grande pour les courants de type T comparés à ceux de type L (Perez-Reyes, 2003).

### 1.3.1.2 Mobilisation du calcium intracellulaire

Le réticulum endoplasmique (RE), appelé réticulum sarcoplasmique (RS) au niveau musculaire, constitue le réservoir principal de calcium intracellulaire. La mitochondrie ainsi que d'autres organelles participent aussi à l'homéostasie calcique. La mobilisation du calcium à partir des réservoirs intracellulaires est contrôlée par le calcium lui-même (relâche de calcium induite par le calcium ou CICR), par l'IP3 et par un groupe de messagers dont les mécanismes d'action restent à éclaircir (ADP-ribose cyclique, acide nicotinique adénine dinucléotide phosphate et sphingosine-1-phosphate) (Lee, 1997; Bootman *et al.*, 2002). Le récepteur à l'IP3 (IP3R, principale voie dans les cellules non excitables et présent dans les cellules excitables) et le récepteur à la ryanodine (RYR, équivalent du IP3R dans les cellules excitables) forment les canaux contribuant à la hausse rapide du calcium cytosolique via le CICR. Leur sensibilité au calcium se déploie en forme

de cloche (récepteurs inactifs à de faibles concentrations nanomolaires et lorsque la concentration de calcium devient trop élevée). L'IP<sub>3</sub>, produit par l'action de la phospholipase C en réponse à de nombreux stimuli, telle que l'activation des protéines G<sub>αq</sub>, augmente la sensibilité de son récepteur au calcium. D'autres voies dépendantes ou non du calcium modulent l'activité du canal IP<sub>3</sub>R, telles que la calmoduline (CaM) et la phosphorylation du canal par PKG, PKC, PKA ou par une kinase dépendante du Ca<sup>2+</sup>/CaM (CaMKII). Au niveau de RYR, l'ouverture du canal calcique est inhibée par la CaM, mais stimulée par PKA (Berridge *et al.*, 2003).

### 1.3.1.3 Protéines tampons et effectrices du calcium

Les protéines liant le calcium, au nombre d'environ 200 chez l'humain, profitent de la hausse de calcium cytosolique pour interagir rapidement avec celui-ci. Les protéines effectrices du calcium, telles que CaM, troponine C, synaptotagmine et les annexines, activent les nombreux processus cellulaires sensibles au calcium. Ces processus impliquent des enzymes modulées par le calcium (ex : CaMK, kinase de la chaîne légère de myosine (MLCK), PKC, eNOS, calcineurine et des protéases comme que les calpaïnes), des canaux ioniques sensibles au calcium (ex : les canaux potassiques BK<sub>Ca</sub>) et des facteurs de transcription [ex : NFAT (facteur nucléaire des cellules T activées), CREB (protéine liant l'élément de réponse à l'AMPc) et DREAM (modulateur de l'élément régulateur en aval)] (Mellstrom & Naranjo, 2001). De l'autre côté, les protéines tamponnant le niveau de calcium libre, telles que calréticuline et calsequestrine, permettent l'ajustement fin des propriétés spatio-temporelles des signaux calciques.

### 1.3.1.4 Retour du calcium vers son origine

Le calcium n'étant pas métabolisé comme la majorité des autres seconds messagers, la cellule contrôle étroitement les niveaux intracellulaires à l'aide de protéines spécialisées. Afin de maintenir l'homéostasie cellulaire, le calcium se libère des protéines effectrices et tampons pour ensuite être évacué du cytosol. Les mécanismes impliqués permettent de maintenir le niveau basal de calcium intracellulaire à environ 100 nM et de recharger les réservoirs. L'échangeur Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup> et la pompe Ca<sup>2+</sup>-ATPase sur la membrane plasmique

retournent le calcium à l'extérieur de la cellule tandis que la pompe  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase du RE/RS (SERCA) redirige le calcium vers son réservoir intracellulaire principal. L'activité de la pompe SERCA subit entre autres l'effet inhibiteur du phospholamban (Berridge *et al.*, 2003).

#### **1.3.1.5 Remodelage des systèmes de signalisation associés au calcium**

Les nombreuses composantes de la signalisation calcique spécifiques à différents types de cellules sont constamment remodelées, entre autres par le calcium lui-même, afin d'assurer les fonctions spécifiques à chaque type cellulaire. Ainsi, le calcium peut être considéré comme un activateur de la transcription génique (Mellstrom & Naranjo, 2001): directement en liant les facteurs de transcription énumérés plus haut ou indirectement soit en activant des protéines kinases (CaMK) ou phosphatases (calcineurine) altérant l'état de nombreux facteurs de transcription, soit en recrutant la voie de Ras/MAPK. Un remodelage anormal du système calcique s'observe dans plusieurs pathologies, tels que le diabète, la maladie d'Alzheimer et également l'hypertension artérielle, dont les caractéristiques seront décrites plus loin.

#### **1.3.2 Rôles du calcium dans la pathologie hypertensive**

Cette section présentera le rôle joué par le calcium dans le contrôle de la prolifération cellulaire, de la production de matrice extracellulaire, de la mort cellulaire ainsi que de la contractilité et de la structure cardiovasculaire. Un aperçu des effets pléiotropiques des BCC telle l'amlodipine clôturera ce chapitre. Les effets des BCC sur le remodelage cardiovasculaire dans l'hypertension artérielle seront revus en détail dans le chapitre couvrant les dommages aux organes cibles.

##### **1.3.2.1 Calcium, prolifération et cycle cellulaire**

La progression dans le cycle cellulaire et la prolifération cellulaire reposent sur des mécanismes dans lesquels la signalisation calcique joue un rôle crucial (Short *et al.*, 1993; Munaron *et al.*, 2004). Le calcium influence par exemple l'activité de protéines relayant le

signal mitogénique, telles que les MAP kinases ERK1/2 (Chao *et al.*, 1992), et joue un rôle direct et indirect dans l'activation de facteurs de transcription. Au niveau de la progression du cycle cellulaire, les oscillations calciques favorisent la sortie de l'état de quiescence au début de la phase G1, la transition entre la phase G1 et la phase S, l'initiation de la synthèse d'ADN menant à la phase S et participent aux multiples points de contrôle. Cela a été mis en évidence par l'arrêt en phase G0/G1 et en phase S suite à la déplétion du réservoir calcique contrôlé par IP3R ainsi que par le pic de calcium déclenchant la complétion de la méiose et l'initiation de la mitose (Kahl & Means, 2003; Choi *et al.*, 2006). De nombreux facteurs mitogéniques, incluant des facteurs de croissance, des cytokines et des hormones, augmentent le niveau de calcium cytosolique (Munaron *et al.*, 2004); de plus il a été démontré que les canaux  $Ca_v1$  participent au processus prolifératif dans différents types cellulaires, incluant les fibroblastes cardiaques et les CML vasculaires.

### **1.3.2.2 Calcium et matrice extracellulaire**

Le calcium participe à la production de matrice extracellulaire, un phénomène important activé lors des processus de remodelage structural, de prolifération cellulaire et de développement de la fibrose. Certains BCC, incluant des dihydropyridines telles l'amlodipine et la nifédipine, peuvent inhiber la synthèse de protéines de la matrice extracellulaire (ex : collagène, fibronectine et protéoglycans), augmenter l'activité catalytique de collagénases (ex : MMP) et réduire l'expression d'inhibiteurs tissulaires de MMP (ex : TIMP-2) (Heider *et al.*, 1987; Kim *et al.*, 1995; Roth *et al.*, 1996). Ces effets, pouvant être observés indépendamment du blocage des canaux calciques (Heider *et al.*, 1987), semblent bénéfiques lors du traitement de pathologies hypertrophiques, notamment l'hypertrophie vasculaire (Kim *et al.*, 1995; Ueno *et al.*, 1995) ainsi que les chéloïdes et autres cicatrices hypertrophiques (Palamaras & Kyriakis, 2005).

### **1.3.2.3 Calcium et mort cellulaire**

L'activation de multiples voies de signalisation par le calcium fait en sorte que cet ion peut également moduler des processus de dégradation, tels que ceux impliqués au niveau de la mort cellulaire par apoptose. Sans détailler les mécanismes moléculaires

apoptotiques (décrits à la section 1.5), un tour d'horizon des connaissances actuelles entourant le calcium et l'apoptose sera présenté ici.

Le point de vue prédominant estime que l'élévation soutenue des niveaux de calcium intracellulaire favorise l'apoptose (Trump & Berezsky, 1995). Par exemple, l'apoptose induite entre autres par l'ischémie-reperfusion, l'irradiation aux UV, la doxorubicine et la staurosporine dépend du calcium (Hajnoczky *et al.*, 2003). L'élévation de calcium intracellulaire peut conduire au clivage de l'ADN et ainsi à la perte de l'intégrité structurale de la chromatine soit directement par l'activation d'endonucléases, soit indirectement en activant des protéases, phosphatases et autres facteurs dépendant du calcium répartis principalement dans le RE, le cytoplasme et la mitochondrie (Nicotera & Orrenius, 1998). De façon simplifiée, la déplétion du RE en calcium induite par la mobilisation calcique, suivie de la hausse de calcium cytosolique ou mitochondrial, sont impliquées dans l'exécution de l'apoptose. Au niveau du RE, des protéines tamponnant le calcium modulent l'apoptose: les cellules déficientes en calréticuline sont résistantes à l'apoptose alors que celles surexprimant cette protéine présentent une sensibilité accrue à l'apoptose. Certains membres de la famille de Bcl-2 contrôlent le transport du calcium intracellulaire (Pinton & Rizzuto, 2006). Par exemple, la protéine anti-apoptotique Bcl-2 diminue le remplissage des réservoirs intracellulaires, ce qui favorise la survie cellulaire en atténuant les réponses calciques induites par divers stimuli pathologiques (Pinton & Rizzuto, 2006), tandis que les facteurs pro-apoptotiques Bax et Bak surexprimés induisent une redistribution rapide du calcium du RE vers la mitochondrie (Nutt *et al.*, 2002). Dans le cytoplasme, la calpaïne (une protéase à cystéine) et la calcineurine (en relayant la translocation de Bad à la mitochondrie) connectent la hausse de calcium à l'apoptose. Au niveau mitochondrial, l'excès de calcium favorise non seulement la production d'espèces réactives dérivées de l'oxygène par une chaîne respiratoire endommagée, mais également la relâche de facteurs pro-apoptotiques contenus dans l'espace intermembranaire mitochondrial en permettant l'ouverture du PTP (*permeability transition pore*) (Hajnoczky *et al.*, 2003).

Au milieu des années 1990, plusieurs chercheurs ont émis l'hypothèse que l'utilisation de BCC pourrait être associée à un risque accru de développement de tumeurs en raison de la perte d'un signal pro-apoptotique crucial, soit l'élévation du calcium intracellulaire (Whitfield, 1992; Fitzpatrick *et al.*, 1997). Cependant, ce lien n'a jamais été clairement prouvé et divers laboratoires ont plutôt montré que l'élévation de calcium intracellulaire n'est pas requise pour déclencher l'activation d'endonucléases et l'apoptose (Leszczynski *et al.*, 1994; Kluck *et al.*, 1994); une redistribution des réservoirs intracellulaires serait plutôt impliquée. L'activation d'endonucléases dépendantes du calcium sous-entend une élévation du calcium nucléaire et il appert que cette hausse résulte en fait de la mobilisation du calcium intracellulaire vers le noyau plutôt que d'un influx transmembranaire accru via les canaux  $Ca_v1$  (Nicotera *et al.*, 1994). De plus, à l'opposé de la hausse de calcium, il est maintenant clair qu'une baisse de calcium intracellulaire peut également conduire à l'apoptose. Il a été proposé que de faibles niveaux calciques puissent empêcher la neutralisation de la charge de l'ADN par les cations, stimulant ainsi l'apoptose (Mason, 1999). Plusieurs études démontrent que les antagonistes calciques stimulent ou inhibent l'induction de l'apoptose en fonction du type cellulaire, mais à des doses allant jusqu'à 1000 fois celles requises pour obtenir l'effet pharmacologique sur les canaux  $Ca_v1$ . La modulation de l'apoptose par les BCC serait donc parfois indépendante de leur effet sur le flux calcique à travers les canaux membranaires (Kondo *et al.*, 1995; Li *et al.*, 1997a). Néanmoins, certains BCC (incluant la nifédipine, le vérapamil, la nimodipine et l'amlodipine) favorisent l'apoptose de cellules cancéreuses lorsque administrés seuls ou encore en combinaison avec des agents anti-cancéreux tel le *cis*-platine (Kondo *et al.*, 1995; Li *et al.*, 2006). Au niveau des CML vasculaires du rat, le vérapamil (Leszczynski *et al.*, 1994) et la nifédipine (Stead *et al.*, 2000) induisent l'apoptose *in vitro*, tandis que l'amlodipine (Sharifi & Schiffrin, 1998) et la nifédipine (deBlois *et al.*, 1997) font de même *in vivo*. Toujours *in vivo*, des BCC provenant des trois sous-classes (ex : vérapamil, diltiazem et nicardipine) initient l'apoptose de thymocytes chez le rat (Balakumaran *et al.*, 1996). À l'opposé, les BCC peuvent également protéger les cellules de la destruction par apoptose, notamment dans les cellules  $\beta$  du pancréas (Juntti-Berggren *et al.*, 1993), les cellules endothéliales (Escargueil-Blanc *et al.*, 1997), les neurones (Mason *et al.*, 1999a) et les cardiomyocytes (Yamanaka *et al.*, 2003; Liu *et al.*, 2004).

### 1.3.2.4 Calcium, Contractilité cardiaque et structure cardiaque

Dans les cardiomyocytes, le couplage excitation-contraction représente le processus par lequel l'excitation électrique du myocyte conduit à la contraction du cœur permettant l'éjection du sang. Brièvement, lors du potentiel d'action cardiaque, le calcium entre dans la cellule à partir du milieu extracellulaire, déclenchant la relâche de calcium du RS vers le cytosol via le canal RYR2. Cette forte hausse de calcium intracellulaire permet au calcium de se lier à une composante de la myofibrille, la troponine C, activant ainsi la machinerie contractile (Bers, 2002). Le mécanisme le plus accepté pour expliquer la relâche de calcium à partir du RS est le CICR, en particulier celui initié par le courant calcique créé via les canaux  $Ca_v1$  activés lors de la dépolarisation membranaire (Bers, 2002).

#### 1.3.2.4.1 Calcium et hypertrophie cardiaque

Le remodelage phénotypique survenant lors de la phase compensée de l'hypertrophie cardiaque et celui observé lors de la transition vers l'insuffisance cardiaque sont contrôlés par de multiples voies de signalisation (tel que décrit à la section 1.4) dans lesquelles le calcium joue un rôle majeur. En variant la quantité de calcium circulant à chaque cycle, la force de la contraction cardiaque peut être ajustée.

Lors de l'hypertrophie cardiaque compensatoire, la voie de l'AMPC / PKA relaie la réponse inotropique positive à une stimulation  $\beta$ -adrénergique accrue en agissant de trois façons sur la signalisation calcique : stimulation des canaux  $Ca_v1$  (augmentant la quantité de calcium entrant à chaque potentiel d'action), phosphorylation du phospholamban (levant son effet inhibiteur sur la pompe SERCA) et phosphorylation de RYR (permettant de relâcher plus de calcium à partir du RS). Les agonistes de RCPG couplés à  $G_{\alpha q}$  et PLC, telles que l'Ang II et l'endothéline impliquées dans l'hypertrophie cardiaque, augmentent aussi la réponse calcique. Ils favorisent la production d'IP3 conduisant entre autres à l'activation de PKC (pouvant stimuler ou non les canaux  $Ca_v1$  selon l'isoforme impliquée), de la voie calcineurine-NFAT et de la voie de Ras (Schaub *et al.*, 2006). En ce qui a trait à la signalisation en aval de la petite GTPase Ras, soit Raf/MEK/ERK, son activation transitoire suivie d'un faible signal soutenu participe à la prolifération cellulaire dans

plusieurs systèmes (Agell *et al.*, 2002). Le calcium favorise également l'hypertrophie cardiaque via l'activation de l'isoforme  $\delta$  de la CaMKII, principale isoforme exprimée dans le cœur. Le variant cytoplasmique CaMKII  $\delta$ C phosphoryle entre autres le phospholamban (Zhao *et al.*, 2004) et les canaux  $Ca_v1$  [facilitant l'entrée de calcium (Wu *et al.*, 2001)], tandis que le variant nucléaire CaMKII  $\delta$ B module à la hausse l'expression de marqueurs caractéristiques de l'hypertrophie, tels que l'ANP, le BNP, la chaîne lourde de la  $\beta$ -myosine et l' $\alpha$ -actine de muscle squelettique (Passier *et al.*, 2000). D'autre part, la déphosphorylation des facteurs de transcription NFAT3 et MEF2 par la calcineurine activée par le calcium permet à ceux-ci d'initier la transcription de gènes, incluant des gènes foetaux exprimés à nouveau dans de nombreux modèles d'hypertrophie cardiaque. La calcineurine apparaît d'ailleurs comme l'élément principal traduisant la hausse chronique de la signalisation calcique en une activation de la machinerie transcriptionnelle nucléaire (Molkentin, 2004). Contrairement à CaMKII pouvant être activée par des pics de calcium de forte amplitude, la calcineurine répond plutôt à des élévations soutenues et de faibles amplitudes de calcium (Molkentin, 2004). Les canaux calciques de type T ( $Ca_v3$ ) semblent également impliqués dans le contrôle de la prolifération cardiaque puisque suite à leur disparition à la fin du développement du cœur, ils réapparaissent lors de la croissance cellulaire pathologique associée à l'hypertrophie cardiaque (Nuss & Houser, 1993).

Globalement, le rôle central de la signalisation calcique dans l'hypertrophie cardiaque se dégage des études réalisées sur des souris transgéniques surexprimant diverses composantes du système calcique, tels que les canaux  $Ca_v1$  (Song *et al.*, 2002), la calcineurine et NFAT (Molkentin *et al.*, 1998) et la calsequestrine (Jones *et al.*, 1998): elles présentent toutes une hypertrophie. Ainsi, une prévention de l'hypertrophie s'obtient par l'inhibition individuelle de la majorité de ces composantes. De plus, le cœur du SHR présente une surexpression des canaux  $Ca_v1$  (Zwadlo & Borlak, 2005) et une entrée de calcium accrue à travers ceux-ci (Manso *et al.*, 1999) lors de la phase compensée de l'hypertrophie cardiaque.

À l'opposé, un remodelage causé par une baisse de l'amplitude des courants calciques caractérise l'initiation de l'insuffisance cardiaque. Entre autres, une diminution de

l'activité de la pompe SERCA (résultant d'une inhibition accrue par le phospholamban) (Schwinger *et al.*, 1999) et une modulation à la baisse de la signalisation  $\beta$ -adrénergique (Naga Prasad *et al.*, 2001) peuvent expliquer les sérieuses difficultés à faire entrer le calcium et à l'entreposer dans les réservoirs intracellulaires, se traduisant par de faibles courants calciques dans le cœur en insuffisance. Chez l'humain, une réduction de l'expression des canaux  $Ca_v1$  s'observe lors de l'insuffisance cardiaque (Borlak & Thum, 2003).

### 1.3.2.5 Calcium, contractilité vasculaire et structure vasculaire

Le calcium contrôle la lente (par opposition au système cardiaque) contraction et relaxation vasculaire principalement en activant les enzymes responsables de la transition entre l'état phosphorylé et non-phosphorylé d'une chaîne légère régulatrice de la myosine, MLC2. Ainsi, la kinase de cette protéine, MLCK, permet le couplage excitation-contraction dans le muscle lisse, tandis que la phosphatase MLCP déphosphoryle la myosine, entraîne son détachement de l'actine et permet la relaxation musculaire.

Les canaux  $Ca_v1$  laissant entrer le calcium dans la cellule participent à la modulation du diamètre des artères et au maintien du tonus myogénique artériel. De cette façon, il est prévu que toute hausse d'expression ou d'activité des canaux  $Ca_v1$  déclenche un état de vasoconstriction et soit impliquée dans la pathophysiologie de l'hypertension artérielle (Wilde *et al.*, 1994). Ainsi, les nombreuses formes d'hypertension présentent toutes ou presque un tonus vasculaire anormal régi par l'influx calcique à travers les canaux  $Ca_v1$  de même qu'un niveau de calcium intracellulaire élevé dans plusieurs types cellulaires, incluant les CML (Sonkusare *et al.*, 2006). Ce rôle majeur des canaux  $Ca_v1$  dans l'hypertension se révèle par l'analyse de souris dont le gène codant pour la S.U.  $\alpha_{1C}$  a été inactivé spécifiquement dans le muscle lisse. Les artères de ces souris ne présentent plus de tonus myogénique ni de contractions induites par une dépolarisation, tandis que leur tension artérielle chute de 30 mm Hg par rapport à leur témoin de type sauvage (Moosmang *et al.*, 2003).

Lors d'une hausse de pression aiguë, les CML des petites artères et artérioles développent tout d'abord une réponse myogénique (dépolariation et contraction induites par l'étirement) qui, si la pression ne retourne pas à un niveau normal, est suivie d'une réponse adaptative visant à soutenir le plus grand influx calcique requis pour maintenir un certain niveau de vasoconstriction (Cox & Rusch, 2002). Outre la perte de la conductance potassique au repos déclenchant l'ouverture de canaux calciques (Harder *et al.*, 1985), plusieurs rapports suggèrent que l'exposition, même aiguë, à une forte pression intravasculaire module à la hausse le nombre de canaux  $Ca_v1$  fonctionnels dans les CML (Wilde *et al.*, 1994; Pesic *et al.*, 2004). La dépolariation membranaire en tant que telle semble être impliquée dans cette hausse du nombre de canaux  $Ca_v1$  (Pesic *et al.*, 2004).

Les canaux  $Ca_v1$  présentent également une modulation positive de leur activité lors de conditions associées à l'hypertension. Bien que l'AngII favorise la relâche de calcium à partir du RS principalement via la production d'IP3 (Pfeilschifter *et al.*, 1989), un mécanisme impliquant l'influx calcique via les canaux  $Ca_v1$  a été identifié (Arnaudeau *et al.*, 1996). Entre autres, les effets vasoconstricteurs de l'AngII impliquent l'activation de canaux calciques (Macrez-Lepretre *et al.*, 1996; Seki *et al.*, 1999) via différents mécanismes incluant l'activation de PKC (Fish *et al.*, 1988; Macrez-Lepretre *et al.*, 1996), de Pi3K (Seki *et al.*, 1999) et celle de protéines à activité tyrosine kinase (Seki *et al.*, 1999).

#### 1.3.2.5.1 Calcium et hypertrophie vasculaire

Bien que de nombreux liens existent entre les changements de calcium intracellulaire et l'expression génique spécifique du type cellulaire au niveau des muscles squelettiques, du muscle cardiaque et des neurones, ces interactions n'ont été étudiées que récemment dans les CML. Ainsi, les mêmes signaux contrôlant le couplage excitation-contraction peuvent moduler des programmes d'expression génique sélectifs ou non pour les CML (Wamhoff *et al.*, 2006). Par exemple, l'activation des canaux  $Ca_v1$  par la dépolariation membranaire détermine l'expression de marqueurs de différenciation des CML et ce par un mécanisme sensible à la nifédipine (Wamhoff *et al.*, 2004).

Tel que mentionné précédemment, le calcium joue un rôle important dans les processus prolifératifs, notamment ceux observés dans le compartiment vasculaire lors du développement de l'hypertension (Schwartz, 1984). Le rôle des canaux  $Ca_v1$  dans le contrôle de la croissance des CML est bien établi. Déjà en 1992, Jackson et Schwartz (Jackson & Schwartz, 1992) recensaient une quinzaine d'études démontrant l'effet inhibiteur des BCC sur la prolifération de CML *in vitro* par la mesure de la synthèse d'ADN et/ou du nombre de cellules, dont 10 incluaient des dihydropyridines. Ces études ont montré que l'influx calcique via les canaux  $Ca_v1$  est critique pour l'initiation de la prolifération chez les cellules quiescentes. Toutefois, les fortes doses d'antagonistes calciques employées laissent planer des doutes sur la spécificité des effets sur les canaux  $Ca_v1$ , argument renforcé par des études plus récentes. Ainsi, bien que l'effet antiprolifératif des dihydropyridines, incluant l'amlodipine (Stepien *et al.*, 1997; Lai *et al.*, 2002), semble être contrôlé par l'inhibition des canaux  $Ca_v1$  et par l'inhibition de l'expression de proto-oncogènes (ex : c-myc et c-fos) et de MAPK (ex : ERK1/2) stimulée par des facteurs de croissance (Zhu *et al.*, 1994; Herembert *et al.*, 1995; Stepien *et al.*, 1998), des mécanismes autres que l'inhibition des canaux  $Ca_v1$  pourraient intervenir (Corsini *et al.*, 1996; Stepien *et al.*, 1998; Yin *et al.*, 2005b). Ces effets anti-prolifératifs de l'amlodipine pourraient entre autres être reliés à la translocation nucléaire du récepteur des glucocorticoïdes suivie de l'induction du gène codant pour la protéine inhibitrice de la progression du cycle cellulaire  $p21^{Waf1/Cip1}$  (Ziesche *et al.*, 2004). Les antagonistes calciques modulent également la structure vasculaire *in vivo* en prévenant et en renversant l'hypertrophie vasculaire associée à l'hypertension artérielle. Les détails de ces effets seront décrits dans le chapitre traitant de la modulation pharmacologique de l'hypertrophie cardiovasculaire.

Le rôle des canaux calciques de type T ( $Ca_v3$ ) dans la pathologie hypertensive demeure peu étudié, leur expression ayant été décelée au niveau de CML pour la première fois dans l'artère cérébrale moyenne et par la suite dans plusieurs autres lits vasculaires, incluant l'aorte chez le rat (Cribbs, 2006). Bien qu'ils ne contribuent pas significativement à la vasoconstriction artérielle, ils peuvent participer à la fois à la modulation de la microcirculation rénale et à la croissance et réplication lors du développement de la pathologie, étant impliqués dans les phases G1 et S du cycle cellulaire (Cribbs, 2006). Le canal  $Ca_v3.1$  a récemment été impliqué dans la prolifération de CML de l'artère

pulmonaire *in vitro* grâce à l'utilisation de siRNA beaucoup plus spécifiques que le mibéfradil. De plus, ces canaux activés à de faibles voltages pourraient être sensibles à certaines dihydropyridines (Neveu *et al.*, 1993; Hayashi *et al.*, 2003), bien qu'aucun site de liaison équivalent à celui présent sur les  $Ca_v1$  n'ait été identifié.

### 1.3.3 Effets pléiotropiques des bloqueurs de canaux calciques

De nombreuses évidences fondamentales et cliniques accumulées par divers groupes indépendants suggèrent de plus en plus fortement que les dihydropyridines de troisième génération, incluant l'amlodipine et la nercanidipine, possèdent des effets indépendants du blocage des canaux  $Ca_v1$ , tel que relevé tout au long de ce chapitre, particulièrement en relation avec les effets des BCC sur le contrôle de la prolifération et de l'apoptose. Jusqu'à présent, les données les plus convaincantes demeurent les effets observés en réponse aux énantiomères de BCC dénués d'action sur les canaux  $Ca_v1$  (Corsini *et al.*, 1996; Orth *et al.*, 1996; Zhang *et al.*, 2002; Yin *et al.*, 2005b), ainsi que les études réalisées sur les cellules endothéliales, les fibroblastes cardiaques et les monocytes, tous des types cellulaires non excitables n'exprimant donc pas les canaux  $Ca_v1$  en condition normale. Les effets pléiotropiques de l'amlodipine seront décrits dans la présente section, et les mécanismes actuellement suggérés pour expliquer ces effets seront présentés.

#### 1.3.3.1 Actions pléiotropiques de l'amlodipine

L'amlodipine possède des propriétés anti-oxydantes dose-dépendantes, particulièrement en ce qui a trait à l'inhibition de la peroxydation des lipides membranaires et la modification oxydative des lipoprotéines de faible densité (LDL) aussi bien *in vitro* que *in vivo* (Mason *et al.*, 2003). Ces effets participant à la prévention de l'athérosclérose par l'amlodipine s'observent à de faibles concentrations (jusqu'à 10 nM) et indépendamment de la modulation de canaux calciques (Chen *et al.*, 1997). Les radicaux libres interagissant avec les constituants des membranes lipidiques entraînent une augmentation de la perméabilité membranaire. L'effet anti-oxydant de l'amlodipine pourrait donc également être impliqué dans la modulation de la perméabilité membranaire observée dans un modèle d'athérosclérose (Tulenko *et al.*, 1999).

L'effet vasorelaxant de l'amlodipine (Zhang & Hintze, 1998; Asanuma *et al.*, 2005), ainsi que celui d'autres BCC (Dhein *et al.*, 1995; Ding & Vaziri, 1998; Kitakaze *et al.*, 2000), est en partie relayé par une biodisponibilité accrue du NO assurée par deux mécanismes non mutuellement exclusifs. Premièrement, l'amlodipine augmente la production de NO en stimulant l'activité de eNOS (Loke *et al.*, 2001; Lenasi *et al.*, 2003; Asano *et al.*, 2003; Berkels *et al.*, 2004). Cette hausse de l'activité de eNOS s'effectue par un mécanisme dépendant des kinines et de leur récepteur B<sub>2</sub> dans certains lits vasculaires, telles que la circulation coronarienne chez le porc et le chien (Zhang *et al.*, 2002; Lenasi *et al.*, 2003) et l'artère fémorale chez le lapin (Xu *et al.*, 2002). Loke *et al.* (Loke *et al.*, 1999) ont d'ailleurs démontré, à l'aide de souris pour lesquelles le récepteur B<sub>2</sub> a été invalidé, que l'effet de l'amlodipine sur la consommation d'oxygène par le myocarde dépend du NO par un mécanisme requérant le récepteur B<sub>2</sub> des kinines. Par contre, dans les cellules endothéliales en culture et dans l'aorte de rat, l'activité eNOS accentuée par l'amlodipine fait plutôt intervenir l'activation de p38 MAPK (Asano *et al.*, 2003) et/ou l'inhibition de PKC (Lenasi *et al.*, 2003). Une seule étude a tenté d'expliquer le lien entre l'amlodipine et les kinines: une inhibition de l'activité de l'ECA a pu être observée sur du sérum humain par l'amlodipine à des concentrations 1000 fois plus élevées que celles requises par un iECA (Xu *et al.*, 2002). Deuxièmement, la hausse de la biodisponibilité du NO par l'amlodipine s'effectue également par la prolongation de la demi-vie du NO via les propriétés antioxydantes de l'amlodipine (Berkels *et al.*, 2004).

Par ailleurs, l'inhibition de PKC dans des cellules non excitables participe aux effets des BCC, dont la réduction de l'adhésion des cellules monocytiques THP-1 à l'endothélium vasculaire par l'amlodipine, (Yu *et al.*, 2003), la production de NO par l'amlodipine (Lenasi *et al.*, 2003) et l'atténuation de la perméabilité endothéliale en ischémie par la nifédipine (Hempel *et al.*, 1999). Il a également été avancé que l'amlodipine puisse causer une inhibition de l'agrégation plaquettaire chez les patients hypertendus (Hernandez-Hernandez *et al.*, 1999) ou angineux, par un mécanisme impliquant en partie la voie du NO et accompagné de l'inhibition de la formation de thromboxane B<sub>2</sub> (Chou *et al.*, 1999).

### 1.3.3.2 Mécanismes suggérés des effets pléiotropiques de l'amlodipine

Les mécanismes de ces diverses actions demeurent mal compris, mais des particularités propres à certaines dihydropyridines ainsi que les doses auxquelles elles sont parfois employées laissent présager certaines explications.

Premièrement, la structure de l'amlodipine diffère suffisamment de celle des autres dihydropyridines pour lui conférer des effets qui lui sont spécifiques. À un pH physiologique, plus de 90% de la fonction aminoéthoxy associée à l'anneau dihydropyridine de l'amlodipine se trouve à l'état chargé positivement (Mason *et al.*, 1989). Cela lui confère ses propriétés lipophiliques, favorisant les fortes interactions électrostatiques de l'amlodipine avec les groupements phospholipides des membranes et des lipoprotéines. Son coefficient de partition membranaire supérieur à  $10^4$  permettrait l'accumulation de l'amlodipine dans les membranes cellulaires à des concentrations excédant de beaucoup les niveaux plasmatiques, générant ainsi un réservoir d'amlodipine disponible pour se lier aux canaux  $Ca_v1$  sur une période de temps prolongée (Burges *et al.*, 1987; Mason *et al.*, 2000). Cette charge positive et cette forte affinité lipidique sont entre autres impliquées dans l'effet anti-athérogénique de l'amlodipine en inhibant l'agrégation de LDL oxydés, un effet ne pouvant être reproduit par d'autres BCC non chargés ni par le ramipril (Phillips & Preston, 2003). De plus, les propriétés physico-chimiques de l'amlodipine permettent la mise en place de mécanismes éteignant la réaction radicalaire en chaîne à la base de la peroxydation lipidique. Ces mécanismes anti-oxydants incluent la formation de structures de résonance et le don de protons (Mason *et al.*, 1999b).

Deuxièmement, diverses dihydropyridines présentent des interactions fonctionnelles avec plusieurs structures autres que la S.U.  $\alpha_1$  des canaux  $Ca_v1$  lorsqu'elles sont étudiées à de fortes doses (Zernig, 1990). Le transporteur de nucléosides (Striessnig *et al.*, 1985) ainsi que la glycoprotéine P (Yang *et al.*, 1988) et le transporteur ABCG2 associés à la résistance multiple aux médicaments (Shukla *et al.*, 2006) figurent parmi les structures pouvant interagir avec des antagonistes calciques lors d'essais de liaisons. Ces cibles pourraient être impliquées dans les effets pléiotropiques des BCC, incluant l'amlodipine.

## **1.4 Les dommages aux organes cibles de l'hypertension artérielle et leur modulation pharmacologique**

La tension artérielle chroniquement élevée, de par les dommages structuraux et fonctionnels qu'elle engendre dans la majorité des organes vitaux, constitue un facteur de risque majeur de morbidité et de mortalité cardiovasculaire. Les organes cibles de l'hypertension artérielle et les dommages qui leur sont associés incluent les yeux (rétinopathie), le cerveau (démence, ischémie, accident vasculaire cérébral), les reins (microalbuminurie, glomérulopathie, insuffisance rénale), le cœur (ischémie, insuffisance cardiaque) et le réseau vasculaire périphérique (artériosclérose, etc.) (Cohuet & Struijker-Boudier, 2006). Ces événements sont reliés par des atteintes du réseau vasculaire et plus particulièrement de la microcirculation. L'objectif de cette thèse étant dirigé sur le remodelage structural vasculaire et cardiaque à l'origine de ces conséquences physiologiques, le présent chapitre décrira les altérations structurales de ces systèmes dans l'hypertension artérielle, les mécanismes impliqués et la pharmacothérapie du remodelage cardiovasculaire hypertensif.

### **1.4.1 Système vasculaire**

#### **1.4.1.1 Structure des artères**

Les vaisseaux sanguins normaux englobent trois couches tissulaires bien distinctes, soit l'intima, la média et l'adventice. L'intima tapisse l'intérieur des vaisseaux et se compose d'une fine monocouche de cellules endothéliales supportée par une couche aussi mince de tissu conjonctif. Son intégrité est critique, car une lésion de l'endothélium peut éventuellement conduire à l'athérosclérose. Cette première couche contrôle de nombreuses activités en synthétisant et libérant des médiateurs endothéliaux pouvant entre autres moduler la contraction / relaxation vasculaire ainsi que la croissance / survie des CML. Dans le réseau artériel, une couche de tissu élastique (lamelle élastique interne) marque la frontière entre l'intima et la média. La média, située au milieu d'un vaisseau sanguin, représente généralement la plus épaisse des trois tuniques. Elle est formée principalement de CML déterminant le tonus vasculaire, et qui, étant entourées de tissu élastique dans des

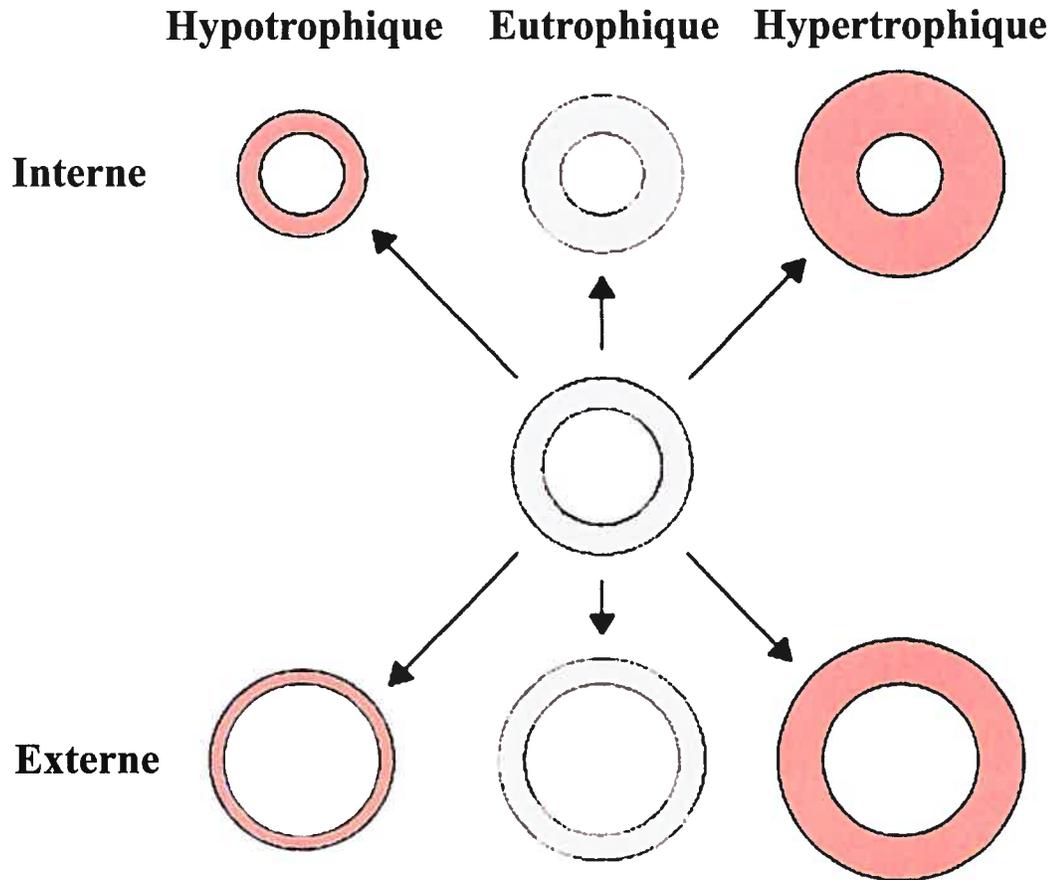
proportions variées, déterminent les rôles principaux des divers vaisseaux. Les grosses artères de conductance, telles que l'aorte et la carotide, présentent une tunique médiale dominée par le tissu élastique. Les nombreuses couches de muscle lisse de ces artères se trouvent ainsi séparées par des lamelles élastiques, leur conférant une force nécessaire pour supporter la pression hémodynamique lorsque le sang quitte le cœur et l'élasticité requise pour amortir le débit pulsatile créé par le cœur battant. La majorité des autres artères, incluant les petites artères de résistance, possèdent plutôt un caractère musculaire, étant dominées par du muscle lisse. Au niveau des artérioles, le nombre de couches de muscle lisse chute à un point tel que la média des plus petites, soit celles situées tout juste avant le lit capillaire, ne présente qu'une simple couche de CML. La lamelle élastique externe délimite la média de l'adventice. Cette adventice, composée de tissu conjonctif fibreux, forme la couche externe des vaisseaux sanguins. Outre les fibroblastes prédominants, l'adventice comprend aussi des terminaisons nerveuses, quelques CML et d'autres types cellulaires variés étant tous disposés entre des fibres de collagène.

#### **1.4.1.2 Pathophysiologie dans l'hypertension artérielle**

L'architecture des vaisseaux sanguins peut faire l'objet d'un remodelage en réponse à certains stimuli (ex : hypertension (Folkow, 1990), variabilité du débit (Kamiya & Togawa, 1980), etc.), dont le plus fort demeure sans contredit l'élévation chronique de la tension artérielle. Ainsi, suite à une coarctation aortique, seulement la région hypertensive présente un accroissement de l'espace occupé par la paroi vasculaire (Ollerenshaw *et al.*, 1988). La hausse de pression sanguine élève la tension pariétale, qui accroît quant à elle le stress sur les parois vasculaires (contrainte circonférentielle). Les moyens de normaliser ce stress (sans altérer la pression sanguine) incluent la réduction du rayon de la lumière et l'épaississement de la paroi vasculaire.

L'effet classique du remodelage vasculaire hypertensif demeure une augmentation du ratio entre l'espace occupé par la média et celui occupé par la lumière vasculaire. Cette modification survient suite au réarrangement du matériel préexistant autour d'un diamètre interne réduit, sans augmentation des dimensions de la média. Un tel remodelage est dit eutrophique interne, par opposition au remodelage hypertrophique caractérisé par un

volume pariétal accru, tel que présenté à la figure 4 indiquant la nomenclature proposée en 1996 (Mulvany *et al.*, 1996). Le remodelage vasculaire s'accompagne d'un mélange de modifications cellulaires (hypertrophie, hyperplasie, polyploïdie, mort ou migration cellulaire) et matricielles (déséquilibre entre synthèse et dégradation de matrice extracellulaire). Le remodelage hypertrophique sous-entend une augmentation de la masse tissulaire, soit par une hypertrophie cellulaire caractérisée par une augmentation de la taille des cellules suite à la synthèse accrue de protéines sans modification du contenu en ADN, soit par une hyperplasie cellulaire caractérisée par une augmentation du nombre de cellules et du contenu en ADN. Une combinaison de ces deux situations s'observe fréquemment. La mise en place de ces processus dépend fortement du calibre du vaisseau en question et des stimuli auxquels il répond. Les études sur des modèles expérimentaux d'hypertension artérielle et plus récemment chez l'humain révèlent, de façon simplifiée, la présence d'un remodelage hypertrophique dans les grosses artères de conductance (externe pour les artères proximales et sans modification du diamètre interne pour les artères distales), et d'un remodelage eutrophique interne dans les petites artères de résistance.



**Figure 4. Les différents modes du remodelage vasculaire.**

Le diagramme montre comment le remodelage modifie les vaisseaux sanguins, montrés suite à une coupe transversale. À partir du point de départ (niveau basal au centre du diagramme), l'aire de section transversale peut soit augmenter (hypertrophique), ne pas changer (eutrophique) ou être réduite (hypotrophique). Ces modifications peuvent s'effectuer de façon à réduire le diamètre de la lumière (interne) ou à l'augmenter (externe). Les situations rencontrées dépendent à la fois du stimulus initiateur et du calibre du lit vasculaire, tel que décrit dans le texte.

#### *1.4.1.2.1 Remodelage des grosses artères*

Le remodelage hypertrophique associé aux gros troncs artériels résulte principalement d'une hypertrophie des CML favorisant l'épaississement de la média (Lee, 1987; Owens, 1989). Toutefois, l'analyse de l'aorte de divers modèles d'hypertension artérielle révèle également une hausse du contenu en ADN (Bevan *et al.*, 1976) et/ou de la synthèse d'ADN (De Mey *et al.*, 1991), suggérant la participation de mécanismes autres qu'une simple hypertrophie cellulaire. Aussi bien l'apparition de cellules polyploïdes

préférentiellement dans les grosses artères comparées aux petites artères (Owens, 1989; Black *et al.*, 1989) que la présence d'une hyperplasie cellulaire dans les gros troncs (Bevan *et al.*, 1976; Jurukova *et al.*, 1976; Wiener *et al.*, 1977; Olivetti *et al.*, 1982; Levy *et al.*, 1994), bien que non observée par tous (Olivetti *et al.*, 1980; Lee, 1987), peuvent expliquer cette modulation de l'ADN. Les conclusions divergentes concernant l'hyperplasie soulignent à la fois une réponse dépendante de l'espèce et du modèle expérimental à l'étude [hypertrophie plus fréquente dans les modèles chroniques d'hypertension artérielle et hyperplasie plutôt associée à une hypertension artérielle sévère aiguë (Owens, 1989)] ainsi que la variabilité des méthodes de détection employées (à deux dimensions versus à trois dimensions). L'augmentation de la synthèse de composantes de la matrice extracellulaire (collagène, élastine, protéoglycans, etc.) participe aussi au remodelage vasculaire hypertensif. Toutes ces modifications surviennent habituellement suite à la hausse de pression sanguine; ils ne précèdent pas l'hypertension et surviennent lorsque les anomalies neuro-humorales responsables de l'élévation de la tension artérielle sont déjà enclenchées. Ce remodelage permet donc aux vaisseaux de composer avec une tension pariétale accentuée, mais limite du même coup la distension des artères et contribue ainsi à la perte de compliance caractéristique des gros vaisseaux dans l'hypertension artérielle (Safar & Laurent, 1993). En effet, à court et à moyen terme, les gros troncs élastiques arborant un élargissement progressif de leur diamètre interne (telles l'aorte et la carotide, mais non les artères musculaires un peu moins grosses comme la fémorale, la brachiale et la radiale) présentent une réduction de la compliance vasculaire (Mayet & Hughes, 2003). Elle est le résultat d'un amalgame de facteurs allant de l'altération de la composition de la matrice extracellulaire à l'augmentation du tonus, de l'épaisseur de la paroi et du nombre de cellules vasculaires. Les vaisseaux sanguins deviennent plus rigides lorsqu'ils sont distendus. En conséquence, la vitesse à laquelle l'onde de pulsation voyage est augmentée, ce qui en fait une mesure de la rigidité artérielle. Cette rigidité artérielle contribue à l'augmentation de la pression pulsée, qui est en soit un facteur de développement de l'hypertrophie ventriculaire gauche. À long terme, ce remodelage potentialise le développement de l'athérosclérose et de ses complications: les anomalies hémodynamiques liées aux dommages pariétaux de ces grosses artères peuvent conduire à la déposition de cholestérol et de lipides aux sites de lésion, et éventuellement à l'obstruction de ces vaisseaux.

#### 1.4.1.2.2 Remodelage des petites artères

Les artères de résistance soumises à une forte pression intravasculaire se remodelent en augmentant le ratio média/lumière (Heagerty *et al.*, 1993), une situation associée avec une hausse de la prévalence d'événements cardiovasculaires sur une période de 10 ans (Rizzoni *et al.*, 2003). Contrairement à l'hypertrophie cellulaire prédominante dans les grosses artères, les petites artères répondent précocement [possiblement la première manifestation de dommages aux organes cibles (Park & Schiffrin, 2001)] en présentant un remodelage eutrophique (Heagerty *et al.*, 1993) sans augmentation de la prévalence de cellules polyploïdes. Afin de maintenir le caractère eutrophique de ce remodelage, une apoptose accrue de CML peut s'observer (Intengan & Schiffrin, 2001). Un tel remodelage eutrophique interne a été identifié sur des biopsies cutanées fessières obtenues de patients présentant une hypertension essentielle (Heagerty *et al.*, 1993; Schiffrin & Deng, 1996). Le mode de remodelage des petites artères semble toutefois dépendant des stimuli initiateurs puisque les CML des petites artères présentent plutôt une hypertrophie dans l'hypertension secondaire (hypertension rénovasculaire) (Owens, 1989; Rizzoni *et al.*, 2000a). Le remodelage vasculaire eutrophique s'accompagne d'une déposition accrue de matrice extracellulaire permettant de réorganiser le matériel cellulaire autour d'une lumière réduite et l'intégrant dans un état de vasoconstriction chronique (Intengan & Schiffrin, 2000). Ce remodelage semble être une adaptation vasculaire en réponse à une forte tension artérielle, même si quelques groupes ont suggéré au fil des ans que ces dommages surviendraient avant la hausse de pression et seraient donc à la base du développement de l'hypertension artérielle. Par contre, il ressort clairement que ce remodelage interne des petites artères contribue au maintien et à l'augmentation de la résistance vasculaire périphérique (en diminuant la vasodilatation maximale) puisque selon la loi de Poiseuille, même une réduction mineure de la lumière augmente significativement la résistance au flot, celle-ci étant inversement proportionnelle à la puissance quatrième du rayon de la lumière. Ce remodelage hypertensif des petites artères favorise donc à la fois une réduction de la réserve vasodilatatrice, particulièrement au niveau des coronaires, et une réponse vasoconstrictrice exagérée bien que celle-ci demeure controversée (Izzard *et al.*, 1996). Au niveau de la microcirculation, le changement majeur lors de l'hypertension artérielle consiste en une réduction de la densité d'artéioles et de capillaires due à une absence de

perfusion de ces vaisseaux ou encore à leur oblitération (Serne *et al.*, 2001). La perte de cellules endothéliales par apoptose contribue à la raréfaction microvasculaire hypertensive (Gobe *et al.*, 1997) et favorise les dommages aux organes cibles en restreignant la perfusion de ceux-ci lorsque leur demande s'accroît. Les altérations structurales à la microcirculation sont considérées comme des manifestations précoces de l'hypertension artérielle et des maladies cardiovasculaires, étant donné que ce segment vasculaire contrôle en grande partie la résistance périphérique.

#### 1.4.1.2.3 Dysfonction endothéliale

Outre les changements structuraux décrits ci-dessus, la dysfonction endothéliale représente une caractéristique fondamentale de la pathophysiologie du réseau vasculaire dans l'hypertension artérielle. Elle décrit une multitude d'altérations à la fonction normale de l'endothélium, autant au niveau de la vasoréactivité, de l'équilibre entre les mécanismes pro- et anti-inflammatoires, de l'adhésion de cellules circulantes et du contrôle de la croissance et de la survie endothéliale. L'altération principale à laquelle nous référerons concerne la dysfonction de la relaxation vasculaire dépendante de l'endothélium (Vanhoutte, 1989). Celle-ci est créée par une réduction de la biodisponibilité du NO pouvant être causée soit par une baisse de la production de NO [réduction de l'expression de l'enzyme produisant le NO dans l'endothélium (eNOS) et/ou de son activité via un manque du substrat (L-arginine), du co-facteur essentiel tétrahydrobioptérine (BH4) ou par la présence d'un inhibiteur endogène de eNOS, la dyméthylarginine asymétrique (ADMA) (Dayoub *et al.*, 2003)], soit par une dégradation rapide du NO par les espèces réactives dérivées de l'oxygène (tel que le superoxyde réagissant avec le NO pour former du peroxynitrite). Une telle altération de la relaxation endothélium-dépendante a été identifiée dans plusieurs modèles d'hypertension, de diabète, d'insuffisance cardiaque et de tabagisme, de même que dans les vaisseaux de patients hypertendus (Panza *et al.*, 1990). La dysfonction endothéliale peut être renversée chez l'humain par l'ajout de BH4, dont le catabolisme est accéléré dans les artères exposées à un fort stress oxydant (Katusic, 2001). À l'opposé, la production accrue d'ET-1 vasoconstrictrice pourrait contribuer à l'élévation de la tension artérielle et aux complications de l'hypertension.

#### 1.4.1.2.4 Mécanismes moléculaires impliqués dans le remodelage vasculaire

Les mécanismes contribuant au remodelage artériel sont intégrés au niveau des CML multifonctionnelles qui permettent de déclencher de multiples processus, incluant la croissance (hypertrophie), la prolifération (hyperplasie), l'apoptose, la vasoconstriction, la migration et la réorganisation de ces cellules dans une matrice extracellulaire à la composition altérée.

La croissance cellulaire exagérée, hypertrophique, et la réplication des CML peuvent être stimulées par des facteurs de croissance (FGF, PDGF, etc.), des hormones (catécholamines, Ang II, ET-1, etc.) et autres (thrombine, TNF- $\alpha$ , etc.) (Jackson & Schwartz, 1992). En particulier, l'Ang II stimule la synthèse protéique et peut activer des systèmes de transport transmembranaire influençant les mouvements ioniques et ceux de l'eau. Ces réponses sont accentuées chez les patients hypertendus et impliquent les MAPKs ERK1/2 et JNK continuellement activées lors du développement de l'épaississement des parois vasculaires dans les modèles murins d'hypertension artérielle (Kim & Iwao, 1999). Les autres mécanismes en aval de la stimulation des récepteurs de l'Ang II ont été revus à la section 1.2.1. La croissance exagérée des CML vasculaires dans un individu adulte implique une modification phénotypique de celles-ci, passant d'un phénotype différencié/contractile à un phénotype dédifférencié/synthétique (Pauletto *et al.*, 1994). Les mécanismes endothéliaux qui normalement favorisent l'inhibition de la croissance vasculaire (ex : NO et TGF- $\beta$ ) peuvent également être altérés, et ainsi ne pas être en mesure de stopper la croissance, pouvant même au contraire la favoriser (ex : TGF- $\beta$ ) (Hamet *et al.*, 1991). De plus, une déficience de l'activité du système kallikréine-kinines a été associée au remodelage eutrophique interne de l'artère brachiale humaine, suggérant qu'une réduction de l'activité de ce système puisse permettre le remodelage vasculaire pathologique (Azizi *et al.*, 2005), tandis qu'une hausse de son activité présenterait des effets bénéfiques (Carretero, 2005).

La prolifération cellulaire à la base de l'hyperplasie peut entre autres être activée par l'Ang II tout dépendant du lit vasculaire (Geisterfer *et al.*, 1988; Gibbons *et al.*, 1992; Touyz *et al.*, 1999). Cette réplification accrue de CML persiste en culture, suggérant la contribution de facteurs génétiques, et n'est pas contrebalancée parfaitement par l'apoptose lors du remodelage hypertrophique, résultant en l'épaississement de la média et révélant le rôle crucial du maintien de l'équilibre entre la prolifération (hyperplasie) et la mort cellulaire (apoptose) dans l'homéostasie structurale vasculaire (Vega *et al.*, 1999; Rizzoni *et al.*, 2000b). La mort cellulaire par apoptose participe à la raréfaction capillaire et l'anoïkose (mort cellulaire par détachement de la matrice) pourrait participer à la dysfonction vasculaire dans l'hypertension. En plus de ces divers facteurs neuro-humoraux et de croissance contrôlant la structure vasculaire, des signaux relayés par des facteurs mécaniques tel l'étirement participent à la croissance/prolifération (hausse de la synthèse protéique et du contenu en ADN) et à la production de matrice extracellulaire (Williams, 1998). La réponse générée par ces facteurs mécaniques implique la production d'Ang II, de PDGF et le stress oxydant; la méchanotransduction (conversion du stimulus mécanique en signal biologique) conduisant au remodelage eutrophique semble impliquer les intégrines, particulièrement  $\alpha_v\beta_3$  (VanBavel & Mulvany, 2006). Le calcium joue également un rôle prépondérant dans les mécanismes favorisant la croissance et la prolifération, tel que décrit à la section 1.3.

La hausse de déposition de matrice extracellulaire résulte non seulement d'une synthèse accrue de collagène favorisée entre autres par l'Ang II (Touyz *et al.*, 2001), mais également d'une atténuation de la dégradation de matrice via une diminution de l'activité de MMP ou encore une augmentation de la production d'inhibiteurs tissulaires de MMP chez les patients hypertendus (Laviades *et al.*, 1998) pouvant également être relayée par l'Ang II (Castoldi *et al.*, 2003). Cet effet de l'Ang II sur la déposition de collagène s'observe à des doses sub-pressives dans les vaisseaux de résistance, suggérant que le remodelage dans ces vaisseaux n'est pas strictement secondaire à la hausse de pression.

Le stress oxydant (principalement les espèces réactives superoxyde et peroxyde d'hydrogène) généré entre autres par l'Ang II et l'endothéline participe au remodelage

vasculaire. Il contribue (en augmentant la concentration de calcium intracellulaire, en influençant des voies de signalisation sensibles à l'état d'oxydoréduction du microenvironnement et en créant des modifications oxydatives sur diverses protéines) à la croissance, à la prolifération et à la mort cellulaire, à la vasoconstriction (directement ou par l'atténuation de la relaxation endothélium-dépendante), à la déposition de matrice extracellulaire, etc. (Paravicini & Touyz, 2006). L'Ang II active la production de superoxyde par la NADPH oxydase, et l'activité accrue de la tyrosine kinase c-Src amplifie cette production de stress oxydant (Touyz *et al.*, 2003).

#### **1.4.1.3 Pharmacothérapie du remodelage vasculaire hypertensif**

La thérapie antihypertensive, en plus de la réduction de la pression sanguine, vise à normaliser les changements structuraux apparus lors du développement de l'hypertension artérielle et sa chronicité de façon à en prévenir les conséquences délétères, notamment en ce qui a trait au développement de l'athérosclérose (Mulvany, 1992). Dès les années 1970, il a été établi que le remodelage vasculaire pathologique hypertensif pouvait être renversé, du moins partiellement, par la réduction de la tension artérielle et que cela implique en partie une réduction de la masse du muscle lisse et/ou une réduction du nombre de cellules (Wolinsky, 1971; Warshaw *et al.*, 1980). Il a ensuite été suggéré que l'inhibition de l'Ang II puisse réduire l'hypertrophie vasculaire au-delà de l'effet prédit par la baisse de pression (Owens, 1987). Des études cliniques récentes suggèrent que ces antihypertenseurs, principalement les iECA et les antagonistes AT<sub>1</sub>, puissent réduire la morbidité et mortalité cardiovasculaire et rénale au-delà de la simple baisse de pression. Ces médicaments, de même que les BCC, permettent de normaliser la structure des vaisseaux de résistance chez l'humain (Schiffrin *et al.*, 2000; Rizzoni *et al.*, 2005).

Les iECA semblent particulièrement efficaces pour réduire l'hypertrophie artérielle et l'accumulation de matrice extracellulaire chez l'animal hypertendu, en plus de corriger la structure des vaisseaux chez des patients hypertendus (Schiffrin *et al.*, 1995). Les iECA inhibent la migration et la prolifération de CML, réduisent le stress oxydant et possèdent des propriétés anti-athérogéniques (Lonn *et al.*, 1994). Les effets des antagonistes AT<sub>1</sub>, quoique bien démontrés, semblent dépendre du modèle étudié. Ainsi, dans le modèle

indépendant de la rénine 1-rein 1-pince présentant une tension artérielle indépendante de l'activation du SRA, le losartan ne prévient pas la hausse de l'aire de section de la média aortique ni carotidienne (Parker *et al.*, 2000). Cela suggère que dans ce modèle, tout comme chez le rat DOCA-sel, la pression et non l'Ang II contribue principalement à l'hypertrophie vasculaire. Les multiples études cliniques réalisées sur l'efficacité des BCC, incluant l'amlopidine (Schiffrin *et al.*, 2002), démontrent leurs effets positifs sur les lésions vasculaires, la progression de l'athérosclérose et la réduction du ratio de l'épaisseur intima / média (Cohuet & Struijker-Boudier, 2006). De plus, la régression de l'hypertrophie des gros troncs artériels du SHR avec l'isradipine est reliée à la réduction de l'hyperplasie médiale, mais seulement au niveau aortique (Levy *et al.*, 1994). Ces résultats obtenus avec les BCC reflètent bien l'influence de l'influx calcique sur les mécanismes impliqués dans la migration et la prolifération des CML. Ces divers traitements semblent prévenir / renverser l'hypertrophie des gros troncs artériels en partie en empêchant l'apparition ou en éliminant les cellules polyploïdes, qui peuvent représenter jusqu'à 20% des CML au niveau aortique chez le SHR ayant dépassé l'âge de 30 semaines (Devlin *et al.*, 1995a). L'élimination de ces cellules implique soit leur division en deux cellules filles, soit leur mort, possiblement par un mécanisme apoptotique. De plus, les iECA, les antagonistes AT<sub>1</sub> et les BCC réduisent la rigidité artérielle, souvent de façon plus prononcée que les prédictions basées sur la baisse de pression (Mahmud & Feely, 2004; Lacourciere *et al.*, 2004) et selon une cinétique remarquablement divergente de la baisse de pression aiguë (Shargorodsky *et al.*, 2002). Ces mêmes traitements permettent de corriger la dysfonction endothéliale.

Toutefois, les traitements antihypertenseurs ne sont pas tous égaux du point de vue de la modulation de la masse vasculaire (Schachter, 1991). Ainsi, même lorsqu'ils réduisent efficacement la pression artérielle, les  $\beta$ -bloqueurs, tel l'aténolol, ne renversent pas le remodelage pathologique des vaisseaux de résistance (Thybo *et al.*, 1995; Schiffrin *et al.*, 2000; Schiffrin *et al.*, 2002). De façon similaire, bien que certains diurétiques particuliers comme l'indapamide (Richard *et al.*, 1996) puissent augmenter la compliance systémique et carotidienne indépendamment de la baisse de pression dans certains modèles animaux, les diurétiques en général demeurent peu efficaces quant à la correction du ratio média/lumière chez des patients hypertendus (Asmar *et al.*, 1993; Sihm *et al.*, 1998). De plus, l'hydralazine, un vasodilatateur direct, ne permet pas de renverser le remodelage

aortique pour une baisse de pression équivalente à celle obtenue avec un antagoniste AT<sub>1</sub>, un BCC ou un iECA (Freslon & Giudicelli, 1983; Soltis, 1993; deBlois *et al.*, 1997). Une divergence d'efficacité entre les classes d'antihypertenseurs couramment employés s'observe également au niveau de la préservation de la qualité (perfusion optimale des organes vitaux) et de la densité de la microcirculation artériolocapillaire. Les iECA présentent de tels effets, mais pas les  $\beta$ -bloqueurs ni l'hydrochlorothiazide, un diurétique (Dahlof & Hansson, 1993; Chillon & Baumbach, 1999). Ainsi, la variabilité des différentes classes d'antihypertenseurs quant à leur efficacité à corriger la structure des vaisseaux et la dysfonction endothéliale pourrait influencer la morbidité et la mortalité cardiovasculaire à plus long terme que la période généralement couverte par les essais cliniques randomisés actuels (Rizzoni *et al.*, 2003) pour lesquels les divers antihypertenseurs (iECA, BCC et diurétiques) présentent une efficacité similaire lorsque la tension artérielle est bien contrôlée, comme dans l'étude ALLHAT (ALLHAT Officers and Coordinators for the ALLHAT Collaborative Research Group, 2002).

Bien que l'efficacité des inhibiteurs du SRA et des BCC quant à la prévention et/ou la régression du remodelage artériel hypertensif soit généralement admise, les mécanismes impliqués ne demeurent étudiés qu'en surface. Au niveau de la prévention, il est aisé d'imaginer que l'inhibition des mécanismes décrits à la section 1.4.1.2.2 puisse participer à ces effets bénéfiques. Toutefois, une divergence entre les mécanismes impliqués dans la prévention et ceux de la régression est apparente. Par exemple, (Gohlke *et al.*, 1996) ont rapporté un effet préventif de l'iECA ramipril sur l'hypertrophie / hyperplasie mésentérique chez le SHR, sans toutefois que cet iECA ne soit en mesure de régresser ce remodelage lorsque le traitement est initié suite à son apparition. La capacité de l'hydralazine de prévenir mais pas renverser l'hyperplasie / hypertrophie vasculaire en est un autre exemple. Parmi les mécanismes gouvernant la régression du remodelage vasculaire hypertensif, il a été suggéré que l'induction de l'apoptose de CML puisse initier le renversement de l'hypertrophie aortique chez le SHR (deBlois *et al.*, 1997; Sharifi & Schiffrin, 1998; Marchand *et al.*, 2003).

## **1.4.2 Remodelage cardiaque hypertensif**

La maladie cardiaque hypertensive se caractérise par des manifestations structurales précoces de dommages à cet organe cible, incluant l'hypertrophie ventriculaire gauche (HVG), la fibrose cardiaque et l'épaississement des artères coronaires intramyocardiques. Ces changements anatomiques se répercutent au niveau physiologique par des perturbations du débit sanguin myocardique, par le développement d'une arythmogénicité ainsi que par une dysfonction diastolique (Diamond & Phillips, 2005). Suite au développement de l'HVG permettant de compenser pour la charge de travail accentuée (principalement causée par une résistance vasculaire périphérique accrue), ainsi qu'à l'apparition de la fibrose interstitielle et périvasculaire, la phase décompensée du remodelage cardiaque hypertensif survient. Celle-ci est caractérisée par une dysfonction diastolique représentée par des anomalies du remplissage diastolique et de la relaxation du ventricule gauche qui accentuent la transition vers l'insuffisance cardiaque.

Le remodelage cardiaque hypertensif s'étend sur plusieurs mois et même plusieurs années chez l'humain et peut être ramené à une échelle de semaines dans des conditions expérimentales sur des petits animaux. L'HVG constitue un facteur de risque indépendant pour le développement de maladies cardiovasculaires : risque accru de maladies coronariennes, d'insuffisance cardiaque, d'accidents vasculaires cérébraux, d'arythmies ventriculaires et de mort soudaine (Gosse, 2005). La prévention et la régression de l'HVG par les antihypertenseurs constitue donc un des objectifs du traitement.

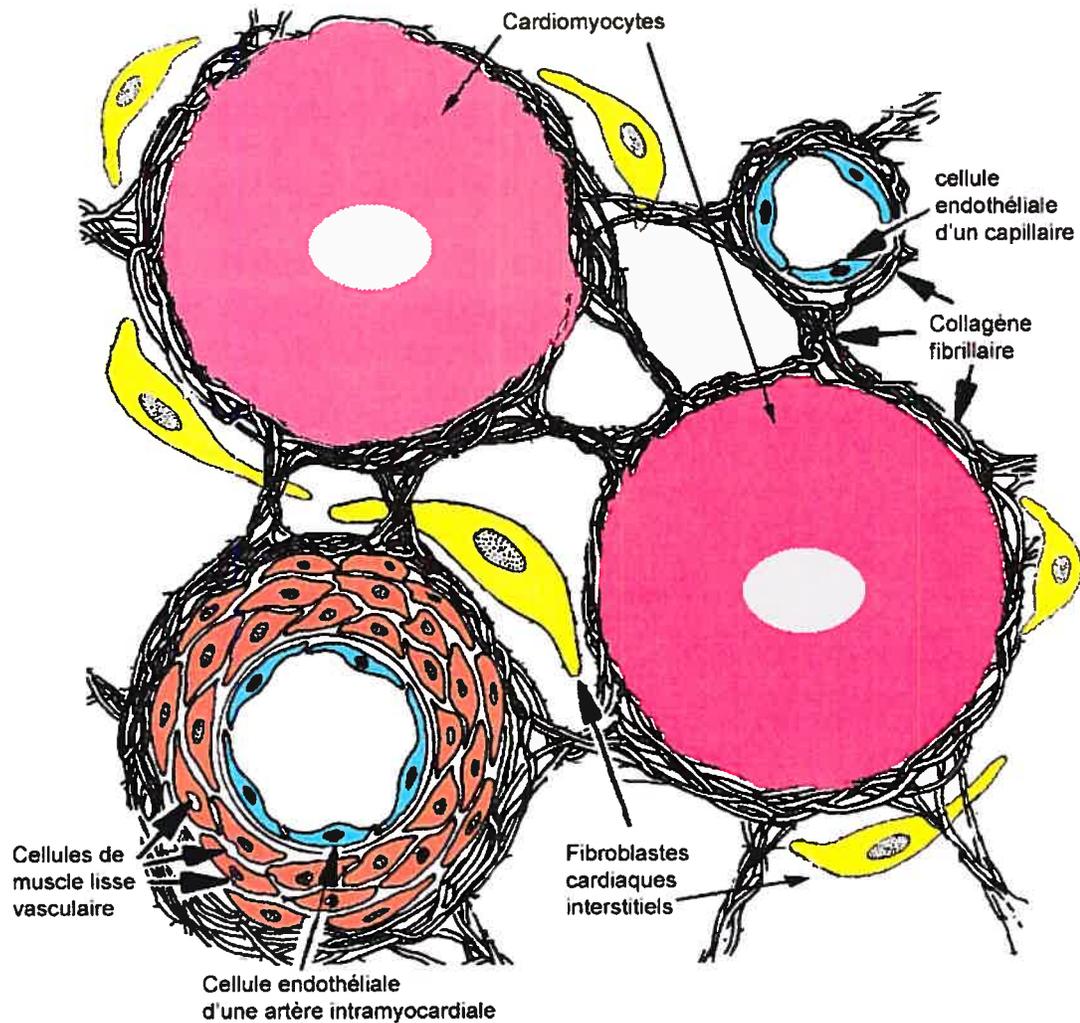
Après un aperçu de l'architecture cellulaire ventriculaire, cette section décrira le remodelage cardiaque hypertensif d'un point de vue structural, cellulaire et moléculaire, ainsi que les effets de traitements pharmacologiques sur la prévention et la régression de ce remodelage.

### **1.4.2.1 Architecture cellulaire cardiaque**

Le muscle cardiaque forme un syncytium fonctionnel reposant sur deux grandes catégories de cellules, soit les cardiomyocytes du compartiment contractile et les non-

cardiomyocytes regroupant tous les autres types cellulaires présents dans le cœur. Le compartiment cardiaque non myocytaire inclut donc les fibroblastes, les cellules vasculaires (CML formant la couche médiale des artères intramyocardiques et cellules endothéliales tapissant ces artères et les capillaires), les cellules mésothéliales présentes dans le péricarde, les cellules du système immunitaire local (mastocytes, macrophages, etc.) ainsi que, dans une plus faible proportion, les cellules embryonnaires aux phénotypes variés. Parmi tous ces non-cardiomyocytes, les fibroblastes constituent la sous-population principale en terme de quantité. Le réseau élastique de cardiomyocytes est emmêlé dans une matrice de collagène connectant les cardiomyocytes et supportant le réseau vasculaire coronarien.

Les cardiomyocytes occupent environ les trois quarts de l'espace physique (masse) du cœur en raison du volume de l'appareil contractile présent dans ces cellules. Par contre, l'évaluation de la contribution des cardiomyocytes au nombre total de cellules cardiaques révèle l'inverse : ils ne comptent que pour le quart des quelques millions de cellules dans le cœur, les fibroblastes étant les plus nombreuses (entre 60% et 70% des cellules cardiaques, selon les études). L'organisation spatiale de ces différents types cellulaires est présentée à la figure 5.



**Figure 5. Représentation schématisée des myocytes et des non-myocytes dans le cœur.**

Les non-cardiomyocytes présents en très faible proportion ne sont pas représentés (mastocytes, macrophages, cellules souches embryonnaires, etc.), et les proportions entre les différentes composantes du tissu cardiaque ne sont pas à l'échelle. Adaptée de Weber & Brilla, 1991.

#### 1.4.2.2 Hypertrophie ventriculaire gauche

L'organe dynamique qu'est le cœur peut se modifier de façon à accommoder des altérations au niveau de sa charge de travail. Il s'hypertrophie, avec croissance ubiquitaire des cardiomyocytes, lors de son développement (entre la naissance et l'âge adulte), en réponse à un stimulus physiologique (exercice ou grossesse) ou encore lors d'insultes

pathologiques (ex : résistance vasculaire périphérique accrue). Cette adaptation à la hausse de pression et/ou du stress exercé sur la paroi ventriculaire gauche permet d'abaisser la tension pariétale ventriculaire et/ou d'augmenter la fonction cardiaque en multipliant les unités contractiles. L'état ainsi décrit correspond à l'hypertrophie compensée. Lors de l'hypertrophie physiologique ou associée au développement, la croissance de la paroi ventriculaire et du septum s'accompagne d'une augmentation des dimensions de la cavité ventriculaire. Cette forme d'hypertrophie, dite excentrique, apparaît suite à l'élongation des cardiomyocytes réalisée par l'addition prédominante de sarcomères en série par rapport à ceux ajoutés en périphérie (en parallèle). Une surcharge volumique favorise aussi le développement d'une hypertrophie excentrique. Ces situations présentent un dénominateur commun, soit la durée transitoire de la charge hémodynamique excessive à l'opposé de l'augmentation persistante de la charge caractérisant les conditions pathologiques. Ainsi, l'hypertrophie développée en réponse à une hypertension chronique (surcharge pressive) se caractérise par une augmentation de l'épaisseur de la paroi ventriculaire gauche et du septum sans changement appréciable du volume de la chambre, si ce n'est une réduction de la cavité. Cette hypertrophie, dite concentrique, se caractérise par un épaississement des cardiomyocytes (hausse de l'aire de section) produit par la déposition prédominante de nouveaux sarcomères en parallèle (Heineke & Molkentin, 2006); le SHR constitue un modèle d'hypertension artérielle avec HVG concentrique. Sans égard au phénotype cellulaire, la caractéristique fondamentale de l'HVG demeure une masse cardiaque augmentée (Anversa *et al.*, 1986).

Lors du développement de l'HVG, le remodelage ne dépend pas uniquement de l'hypertrophie des cardiomyocytes, mais également de modifications dans le compartiment non myocytaire. En effet, les non-cardiomyocytes peuvent aussi s'hypertrophier, mais en plus ils se divisent par mitose, favorisant l'hyperplasie de cellules interstitielles. La croissance des cardiomyocytes et l'hyperplasie de non-cardiomyocytes peut survenir de façon indépendante et s'observe chez le SHR où une hyperplasie des fibroblastes cardiaques apparaît uniquement dans le ventricule gauche (Der Sarkissian *et al.*, 2003). Outre la modification majeure concernant le nombre de fibroblastes, une légère augmentation de la densité de cellules inflammatoires myocardiques (macrophages, cellules T, lymphocytes cytotoxiques, etc.) s'observe lors de l'hypertension expérimentale

(Nicoletti *et al.*, 1996). De plus, la raréfaction des capillaires survenant lors du remodelage cardiaque hypertensif indique une réduction de la densité de cellules endothéliales dans le cœur hypertendu et produit une situation ressemblant à un état ischémique (Rakusan *et al.*, 1984).

#### 1.4.2.2.1 Mécanismes moléculaires de l'HVG

De nombreux mécanismes participent à l'élaboration du phénotype hypertrophique suite à l'augmentation de la tension sur les parois du ventricule. Ce phénotype dépend en revanche de la contribution relative de chaque facteur impliqué dans la conversion de la tension pariétale accrue entre autres en hypertrophie des cardiomyocytes. Les stimuli déterminant le développement et le maintien de l'HVG peuvent être séparés en deux vastes catégories, soit les mécanismes neuro-humoraux [Ang II, ET-1, catécholamines, cytokines et facteurs de croissance (Heineke & Molkentin, 2006)], soit les mécanismes biomécaniques répondant à l'étirement des cardiomyocytes. Ces mécanismes modifient l'expression génique et augmentent le taux de production de protéines tout en diminuant leur dégradation cytoplasmique.

##### 1.4.2.2.1.1 Hypertrophie des cardiomyocytes

L'activation de récepteurs couplés aux protéines  $G_{\alpha_q/\alpha_{11}}$  par des agonistes tels l'Ang II et l'ET-1 représente un événement clé de l'induction de l'HVG pathologique. Cela a été démontré aussi bien par la surexpression de  $G_{\alpha_q}$  dans le cœur (HVG conduisant à l'insuffisance cardiaque) (Adams *et al.*, 1998; Fan *et al.*, 2005a) que par l'inhibition de la signalisation activée par  $G_{\alpha_q/\alpha_{11}}$  (atténuation de la réponse hypertrophique activée par une surcharge pressive) (Wettschureck *et al.*, 2001). L'Ang II favorise de plus le développement de l'HVG via la transactivation de récepteurs de facteurs de croissance (Asakura *et al.*, 2002). Les catécholamines, comme la noradrénaline, favorisent aussi l'hypertrophie des cardiomyocytes, même à des doses sub-pressives (Scheuer, 1999). Les signaux de déformation mécanique ou d'étirement des cardiomyocytes répondant au stress myocardique impliquent quant à eux des protéines structurales [ex : intégrines (Ross & Borg, 2001)], mais également des voies alternatives comme la production d'Ang II

stimulant la croissance cellulaire autocrine (Sadoshima *et al.*, 1993) ou encore l'activation directe du récepteur AT<sub>1</sub> (sans l'implication de l'Ang II) (Zou *et al.*, 2004).

Le calcium, à travers des protéines telles la calcineurine (Molkentin *et al.*, 1998), CaMK et PKC, constitue un des médiateurs clés du couplage entre les multiples signaux hypertrophiques dirigés vers la membrane cellulaire et la reprogrammation de l'expression génique dans les cardiomyocytes, contribuant entre autres à la hausse transitoire de l'expression de proto-oncogènes et de protéines contractiles lors du développement de l'HVG. La calcineurine permet la translocation nucléaire du facteur de transcription NFAT initiant en collaboration avec GATA4 l'expression de gènes pro-hypertrophiques, tels que ceux de la chaîne lourde de  $\beta$ -myosine et l' $\alpha$ -actine squelettique (Molkentin *et al.*, 1998). Cette voie calcineurine-NFAT est également modulée par les MAPK JNK et ERK1/2 (Sanna *et al.*, 2005). La voie PI3K-Akt-mTOR et les MAPK constituent d'autres médiateurs intracellulaires de l'HVG (Proud, 2004). Au niveau des MAPK, les protéines ERK1/2 jouent un rôle de modulateurs centraux de l'hypertrophie compensatoire tandis que les évidences actuelles concernant JNK et p38 laissent planer des rôles plus ambigus (Heineke & Molkentin, 2006). Par exemple, l'activation de p38 augmente lors de l'HVG (Pellieux *et al.*, 2000; Behr *et al.*, 2001) et peut aussi bien stimuler l'hypertrophie des CM (via p38 $\beta$ ) que leur apoptose (via p38 $\alpha$ ) (Wang *et al.*, 1998), et l'administration d'un inhibiteur de p38 atténue la mortalité et la morbidité associées à la progression vers l'insuffisance cardiaque chez le rat (Behr *et al.*, 2001).

À l'opposé, des modulateurs négatifs de l'HVG pathologique existent et certains d'entre eux sont augmentés de façon coordonnée avec les modulateurs positifs. Ces <<inhibiteurs>> incluent la BK, le NO, des prostaglandines, les histones déacétylases de classe II, etc. Les peptides natriurétiques ANP et BNP, dont l'expression est augmentée dans le cœur hypertrophié, activent des guanylates cyclases produisant du GMPc qui active à son tour la PKG. La suractivation de la PKG de type I contrecarre efficacement l'hypertrophie de cardiomyocytes en réponse à une surcharge pressive (Takimoto *et al.*, 2005) ou en réponse à une stimulation  $\alpha_1$ -adrénergique (Fiedler *et al.*, 2002). Ainsi, bien qu'étant toujours considéré comme un marqueur moléculaire de la croissance cardiaque, il

a été suggéré que le rôle de l'ANP serait plutôt de rétablir l'homéostasie cardiaque en réponse à une croissance exagérée (Kempf & Wollert, 2004).

#### 1.4.2.1.2 Hyperplasie et hétérogénéité phénotypique des fibroblastes cardiaques

Les fibroblastes peuvent entrer en mitose et ainsi présenter une croissance hyperplasique produisant une perte de la proportion entre les compartiments myocytaires et non myocytaires caractéristique de l'HVG pathologique. Cela s'observe chez le SHR (Der Sarkissian *et al.*, 2003) et contribue à la production de matrice extracellulaire déposée dans l'interstitium. L'Ang II stimule la prolifération des fibroblastes via le récepteur AT<sub>1</sub> (Sadoshima & Izumo, 1993). Les fibroblastes participent ainsi au remodelage cardiaque hypertensif en proliférant, en migrant et en synthétisant des molécules d'adhésion et des protéines de la matrice extracellulaire.

La population de fibroblastes présente une hétérogénéité à l'intérieur d'un même organe (Fries *et al.*, 1994). L'augmentation du stress exercé sur la paroi ventriculaire provoque une modification phénotypique des fibroblastes préexistant en myofibroblastes (exprimant l' $\alpha$ -actine de muscle lisse) pouvant développer une réponse contractile (Powell *et al.*, 1999) et étant responsables de la formation de matériel fibreux dans plusieurs organes, dont le cœur (Weber *et al.*, 1997; Tomasek *et al.*, 2002). Lorsqu'ils sont stimulés, les myofibroblastes prolifèrent et augmentent la production de protéines matricielles (mais aussi de leurs protéases), de cytokines et de chémokines (Weber *et al.*, 1997). Ainsi, dans la fibrose pulmonaire, ces cellules représentent la source primaire responsable de la hausse de l'expression du gène de pro-collagène de type I. Outre le stress mécanique, l'exposition à des concentrations accrues de PDGF, TGF- $\beta$  ou interleukine-4 favorise l'apparition de myofibroblastes (Tomasek *et al.*, 2002); ce type cellulaire a été identifié dans différents modèles de pathologie cardiovasculaire, incluant la surcharge pressive (Black *et al.*, 1991) et la perfusion d'Ang II (Campbell *et al.*, 1995) ou de L-NAME (Pessanh & Mandarim-de-Lacerda, 2000). De plus, les fibroblastes mis en culture à partir du cœur de SHR présentent une plus grande incidence de transformation en myofibroblastes comparativement à ceux de rats WKY (Klett *et al.*, 1995). Les myofibroblastes ont été identifiés pour la première fois dans le tissu de granulation cutané, où leur présence s'avère essentielle pour la

guérison d'une lésion cutanée (Majno *et al.*, 1971). Dans ce modèle, le stress mécanique stimule tout d'abord les fibroblastes à acquérir le phénotype intermédiaire de proto-myofibroblastes (morphologie de myofibroblastes sans expression d' $\alpha$ -actine de muscle lisse). Les forces tensionnelles et les facteurs de croissance stimulent la production de TGF- $\beta$  par ces proto-myofibroblastes, les transformant en myofibroblastes par une boucle de rétro-action positive (Tomasek *et al.*, 2002). Suite à la guérison de la plaie, ils sont éliminés par apoptose, sans quoi le tissu évolue vers une cicatrice hypertrophique produisant de la matrice extracellulaire de façon inappropriée (Desmouliere *et al.*, 1995). Ce schéma de formation de fibrose semble s'appliquer à de nombreux organes (reins, poumons, foie, cœur, etc.) suite à diverses insultes. Récemment, la présence de canaux calciques  $Ca_v1.2$  a été rapportée sur des cellules stellaires hépatiques (similaires aux myofibroblastes) impliquées dans la fibrose hépatique (Bataller *et al.*, 2001), ce qui suggère une sensibilisation possible de ces cellules aux effets des BCC. Il a été suggéré que l'apoptose forcée et sélective de myofibroblastes puisse renverser l'état fibrotique dans plusieurs pathologies, incluant la fibrose pulmonaire (Selman *et al.*, 2001), rénale (Lane *et al.*, 2002) ou hépatique (Iredale, 2001), la pancréatite (Klonowski-Stumpe *et al.*, 2002) et les cicatrices cutanées hypertrophiques (O'Leary *et al.*, 2003). Les myofibroblastes pulmonaires présentent une susceptibilité accrue à l'apoptose relayée par le NO comparativement aux fibroblastes. Bien que leur présence au niveau cardiaque n'ait pas encore été rapportée dans la littérature, le patron d'expression de la glycoprotéine Thy-1 définit dans plusieurs tissus deux populations de fibroblastes aux propriétés distinctes, soit Thy-1<sup>+</sup> ou Thy-1<sup>-</sup> (Phipps *et al.*, 1997). Au niveau pulmonaire, la majorité des fibroblastes issus d'un poumon normal sont Thy-1<sup>+</sup>, alors qu'une augmentation de fibroblastes Thy-1<sup>-</sup> s'observe lors de la fibrose pulmonaire (Hagood *et al.*, 2005). Même si les fibroblastes Thy-1<sup>+</sup> présentent des propriétés pro-fibrogéniques (forte synthèse constitutive de collagène), ce sont les fibroblastes Thy-1<sup>-</sup> qui répondent le plus fortement aux cytokines (hausse de prolifération, migration vers le site de lésion, synthèse de TGF- $\beta$ , différenciation en myofibroblastes, etc.) (Sanders *et al.*, 2007).

Des interactions entre les cellules des compartiments myocytaire et non myocytaire déterminent également la croissance / survie des cardiomyocytes et des non-

cardiomyocytes (Manabe *et al.*, 2002). Les fibroblastes constituent une source de facteurs de croissance [ex : ET-1 (Gray *et al.*, 1998), TGF- $\beta$  (Gray *et al.*, 1998), PDGF et bFGF (Pellieux *et al.*, 2001)] agissant de façon paracrine sur les CM. L'importance de ces interactions se révèle chez des souris pour lesquelles le bFGF a été invalidé (incapacité de développer une réponse cardiaque hypertrophique) (Pellieux *et al.*, 2001). De plus, il a été clairement établi *in vitro* que le bFGF d'origine fibroblastique est essentiel pour l'activation paracrine de MAPKs dans les cardiomyocytes (Pellieux *et al.*, 2001), bien que d'autres agents (Long *et al.*, 1991; Booz *et al.*, 1999) stimulent l'hypertrophie des cardiomyocytes. En bref, la population de fibroblastes constitue un intégrateur des stimuli hypertrophiques dans le cœur.

#### 1.4.2.3 Fibrose cardiaque

La fibrose se définit par l'augmentation de la concentration de collagène; une simple hausse de la quantité de collagène visant à soutenir l'augmentation de la taille des cardiomyocytes lors de l'HVG ne correspond pas à un phénomène fibrotique. La fibrose myocardique distingue donc l'hypertrophie physiologique de celle dite pathologique. Une fibrose étendue s'observe sur des biopsies prélevées chez des patients hypertendus présentant une HVG, comparativement à son absence dans des cœurs normaux (Diez *et al.*, 2002). Dans le muscle cardiaque, l'équilibre entre la synthèse et la dégradation continue de constituants de la matrice extracellulaire se contrôle par de nombreuses hormones et cytokines. Les substances fibrogéniques incluent des constituants du SRA (ex : Ang II et aldostérone), des cytokines inflammatoires (ex : TGF- $\beta$ ) et des facteurs de croissance. À l'opposé, les molécules favorisant la dégradation du collagène incluent la BK, le NO et les peptides natriurétiques (Laurent, 1987). Cet équilibre fragile se brise lors de l'hypertension chronique et favorise la déposition de collagène.

Les protéines dites de collagène forment une famille comprenant plus de 20 membres jouant un rôle dominant dans le maintien de l'intégrité de nombreux tissus. Au niveau cardiaque, les protéines les plus reconnues de cette famille incluent le collagène de type I et III (en majorité, localisés entre autres au niveau interstitiel), de type IV (membranes basales) et de type V (constituant de l'espace périvasculaire). Ces protéines

sont formées par trois chaînes polypeptidiques contenant des triplets Gly-X-Y en répétition, où X est souvent une proline et Y une 4-hydroxyproline (HOP). Le contenu en HOP dans les divers collagènes varie entre 60 et 130 résidus par 1000 acides aminés (Myllyharju & Kivirikko, 2001). Le collagène le plus abondant, celui de type I, contient 10% de résidus HOP. Ceux-ci permettent le repliement des chaînes polypeptidiques en triple hélice et confèrent au collagène sa stabilité thermique. La majorité des résidus d'HOP se trouvent dans les collagènes, mais une quinzaine de protéines additionnelles contenant des domaines collagéniques possèdent également de tels résidus.

Deux types de fibrose co-existent lors du remodelage cardiaque hypertensif. La fibrose réactive survient habituellement en réponse à une inflammation, premièrement au niveau périvasculaire et ensuite dans l'espace interstitiel environnant (Silver *et al.*, 1990). L'élévation chronique des hormones effectrices du SRA favorise cette fibrose réactive, en particulier via la production de CTGF (Finckenberg *et al.*, 2003) et d'ostéopontine (Collins *et al.*, 2004) contrôlant la prolifération des fibroblastes interstitiels et/ou leur activité synthétique. La fibrose réparatrice survient quant à elle en réponse à une perte de cellules du parenchyme (microscopique suite à une crise hypertensive, macroscopique suite à un infarctus du myocarde). L'Ang II, de par ses effets pro-apoptotiques, peut stimuler le développement de cette fibrose de remplacement.

La matrice extracellulaire participe à la mécanique cardiaque et favorise l'intégrité structurale lors de la systole et de la diastole de trois façons. Premièrement, cette composante structurale maintient l'alignement des myocytes et des vaisseaux et prévient le glissement des myocytes lors de la contraction. Deuxièmement, elle joue un rôle fonctionnel actif lors de la systole en tant que transducteur de force. Troisièmement, elle est le déterminant majeur de la rigidité diastolique (Weber *et al.*, 1994). Cette matrice extracellulaire renferme de nombreuses protéines, incluant les divers types de collagène, les composants de la matrice péricellulaire (protéoglycans et fibronectine), les composants de la membrane basale (laminine et collagène de type IV), des protéases (collagénases) et des facteurs de croissance. La plus importante en terme de quantité demeure le collagène de

type I, synthétisé principalement par les fibroblastes, présentant une demi-vie d'environ 100 jours et s'accumulant lors des processus fibrotiques.

La hausse de concentration du collagène implique donc une hausse de sa synthèse, mais également des altérations dans les mécanismes déterminant sa dégradation. Ainsi, le dérèglement de l'interaction entre les diverses MMP et leurs inhibiteurs tissulaires TIMP participe au processus fibrotique. Dans le cœur se dirigeant vers l'insuffisance cardiaque, les MMP favorisent la dilatation du ventricule en augmentant la dégradation de collagènes dits «normaux» qui seront remplacés par la déposition de collagènes faiblement réticulés. Ainsi, lors de la transition vers l'insuffisance cardiaque, la hausse de l'activité des MMP n'est pas contrée adéquatement par la rétro-inhibition via TIMP-1 (Polyakova *et al.*, 2004).

La fibrose, en raison de la très forte rigidité du collagène de type I et de son accumulation à proximité des cardiomyocytes, participe à l'augmentation de la rigidité myocardique ainsi qu'à l'atténuation de l'éjection systolique en créant une hétérogénéité dans le myocarde (Anderson *et al.*, 1979). La fibrose cardiaque précède donc à la fois l'apparition de la dysfonction diastolique engendrée par une réduction de la distensibilité du muscle myocardique et l'apparition de la dysfonction systolique. Elle participe ainsi profondément à la transition entre l'HVG compensée et l'insuffisance cardiaque.

#### **1.4.2.4 Transition vers l'insuffisance cardiaque**

L'insuffisance cardiaque se définit par une déficience du cœur à pomper adéquatement le sang en réponse à la demande systémique. L'hypertension artérielle soutenue sur une longue période de temps constitue une des causes majeures de cet état, les autres incluant entre autres l'infarctus du myocarde (ou l'ischémie associée aux maladies coronariennes), l'insuffisance valvulaire, la myocardite et les cardiomyopathies familiales hypertrophiques et dilatées (Klein *et al.*, 2003). De nombreux changements délétères entraînent l'insuffisance cardiaque, suite à la phase d'HVG compensée, par l'affaiblissement et/ou la dégénération du myocarde. Ces modifications incluent une diminution de myofibrilles, une augmentation de mitochondries, de myéline et de lipides

(Frenzel *et al.*, 1987), une perte de cardiomyocytes par apoptose et le glissement côte à côte de cardiomyocytes (*slippage*), produisant l'amincissement de la paroi ventriculaire et la dilatation de la cavité (Olivetti *et al.*, 1990). De plus, une altération de la réserve coronarienne vasodilatatrice (causée entre autres par le remodelage des parois artériolaires créant un épaississement de la média et une réduction de la lumière) contribue à la perte d'efficacité de la microcirculation.

La perte soutenue de cardiomyocytes par apoptose s'observe lors de la transition vers l'insuffisance cardiaque et semble y jouer un rôle déterminant (Anversa, 2000), autant dans les modèles animaux [ex : SHR (Li *et al.*, 1997b) et infusion d'Ang II (Nemer *et al.*, 2006)] que chez l'humain (Guerra *et al.*, 1999). La hausse de signaux pro-apoptotiques dirigés vers les cardiomyocytes pourrait même déclencher plusieurs des changements délétères (ex : détérioration mitochondriale, glissement côte à côte de cardiomyocytes, restructuration de la paroi, dilatation de la cavité, activation de fibroblastes, réduction de la fonction ventriculaire, etc.) précipitant la mort (Anversa, 2000; Nemer *et al.*, 2006). Bien que les cardiomyocytes ne soient pas identifiés comme une population cellulaire pouvant se renouveler, des études réalisées dans les années 1960-70 et plus récemment par le groupe d'Anversa soutiennent que le nombre absolu de myocytes chez l'humain et dans les modèles animaux augmente suite à un long épisode d'hypertrophie cardiaque (Astorri *et al.*, 1977; Nadal-Ginard *et al.*, 2003). Les divisions mitotiques de cardiomyocytes pourraient constituer une réserve de croissance pour le myocarde sévèrement endommagé (et ayant possiblement perdu des cardiomyocytes par apoptose). Cela s'explique par le paradigme actuel qui considère le compartiment myocytaire comme un organe majoritairement post-mitotique comprenant une petite sous-population de myocytes constamment renouvelés à partir de cellules souches cardiaques (Urbanek *et al.*, 2003).

#### **1.4.2.5 Pharmacothérapie du remodelage cardiaque hypertensif**

Plusieurs études réalisées au cours des dix dernières années sur des populations recevant des antihypertenseurs ont mis en évidence les implications pronostiques de changements apportés au remodelage cardiaque, particulièrement au niveau de l'HVG (Agabiti-Rosei, 1997; Verdecchia *et al.*, 2001; Devereux *et al.*, 2004b). Une baisse

significative de la mortalité et morbidité cardiaque a ainsi été rapportée chez les patients présentant une régression plus prononcées de la masse ventriculaire gauche (Redon, 2005). La forte tension systolique étant le déterminant majeur du développement de l'HVG, il est prévu que tout traitement réduisant la tension artérielle produise une certaine régression de l'HVG; cela a été observé dans plus de 400 études cliniques. Ainsi, la réduction de la tension artérielle par les antihypertenseurs est en corrélation avec leurs effets sur la structure cardiaque, mais la faiblesse de cette corrélation laisse planer la contribution de facteurs non hémodynamiques faisant en sorte que les antihypertenseurs ne possèdent pas tous la même efficacité en ce qui a trait à la modulation du remodelage cardiaque hypertensif (Gottdiener *et al.*, 1997).

Certains traitements permettent de prévenir et/ou de renverser le remodelage cardiaque hypertensif tandis que d'autres n'induisent pas une telle régression. En effet, une méta-analyse examinant l'effet sur la masse ventriculaire gauche a clairement démontré que pour une réduction de tension artérielle équivalente, l'impact des différentes classes d'antihypertenseurs est fort différent (Klingbeil *et al.*, 2003). Par exemple, les antagonistes AT<sub>1</sub> (réduction de 13% de l'index de masse ventriculaire), les BCC (11%) et les iECA (10%) seraient plus efficaces que les antihypertenseurs «classiques» tels que les diurétiques (8%) et les β-bloqueurs (6%) (Klingbeil *et al.*, 2003). Toutefois, l'interprétation de méta-analyses doit être faite avec prudence puisque celles-ci incluent des études de courte durée, réalisées sur un faible nombre de patients, et surtout n'évaluent pas un médicament par rapport à un autre, mais bien la classe entière. Des médicaments d'une même classe peuvent présenter des propriétés pharmacologiques différentes, en particulier au niveau des β-bloqueurs : certains (acébutolol), mais pas tous (aténolol), possèdent une activité sympathomimétique intrinsèque masquant l'effet antihypertrophique. Cependant, l'analyse d'un sous-groupe de patients de l'étude LIFE confirme le plus grand effet du losartan versus l'aténolol sur la régression de l'HVG et ce pour une baisse de tension artérielle similaire (Devereux *et al.*, 2004a). Parmi toutes ces études, certaines suggèrent plutôt que les diurétiques sont aussi efficaces que les autres classes de médicaments en ce qui a trait à la réduction de la masse cardiaque (Neaton *et al.*, 1993; Gottdiener *et al.*, 1997). Par ailleurs, les vasodilatateurs directs tels l'hydralazine et le minoxidil n'induisent pas une régression de l'HVG malgré une forte baisse de pression (Sen *et al.*, 1974;

Jespersen *et al.*, 1985; Tsoporis *et al.*, 1993). Une des raisons pouvant expliquer l'efficacité réduite de certains diurétiques puissants et l'absence d'effet des vasodilatateurs directs sur la régression de l'HVG est l'activation de mécanismes compensatoires par ces traitements, dont l'activation respective du SRA et du système nerveux sympathique. Il semblerait qu'en plus de la masse du ventricule, la modification de sa géométrie influence le pronostic; la persistance de l'HVG concentrique nuit aux effets bénéfiques des traitements (Muiesan *et al.*, 2004).

L'influence sur le remodelage peut se remarquer d'une part sur le compartiment myocytaire, où l'hypertrophie des cardiomyocytes et leur perte irréversible sont ciblés, et d'autre part sur le compartiment non myocytaire, où la prolifération excessive des fibroblastes interstitiels et la déposition de matrice extracellulaire sont ciblées. Ces diverses études apportent des indices quant aux mécanismes des effets bénéfiques additionnels fournis par certaines classes d'antihypertenseurs.

Les effets bénéfiques additionnels des iECA favorisant la prévention et/ou la régression de l'HVG incluent d'une part la réduction de la production d'Ang II, de cytokines myocardiques, de facteurs de croissance, de ROS et de collagène, et d'autre part l'augmentation de la relâche de NO. En particulier, la prévention du développement de l'hypertrophie ventriculaire par les iECA, obtenue à des doses sub-antihypertensives, est relayée par la BK via son récepteur B<sub>2</sub> plutôt que par l'inhibition de la production d'Ang II (Linz & Scholkens, 1992). Par contre, les mécanismes moléculaires impliqués dans la prévention et la régression peuvent différer : l'hydralazine prévient l'HVG induite par la perfusion d'Ang II sans toutefois pouvoir la renverser (Griffin *et al.*, 1991) et aucune donnée n'implique jusqu'à présent les kinines dans la régression de l'HVG observée avec les iECA. En ce qui a trait aux BCC, outre la baisse de tension artérielle, leurs effets additionnels sur la régression de l'HVG pourraient impliquer la réduction de l'activation de la calcineurine (Zou *et al.*, 2002) ou encore la relâche accrue de NO tel que discuté à la section 1.3.3. Bien que le rôle du récepteur AT<sub>2</sub> en ce qui a trait au développement de l'HVG demeure controversé [absence d'hypertrophie en réponse à une coarctation aortique chez la souris pour laquelle le récepteur AT<sub>2</sub> a été invalidé (Senbonmatsu *et al.*, 2000)], sa

surstimulation participe à la régression supérieure de l'HVG obtenue avec les antagonistes AT<sub>1</sub>, comme il a été démontré par l'atténuation de la régression de la masse ventriculaire gauche lors du blocage concomitant des récepteurs AT<sub>1</sub> et AT<sub>2</sub> (Mukawa *et al.*, 2003). Toutefois, les mécanismes précis impliqués dans ces effets positifs des médicaments demeurent mal compris, notamment en ce qui concerne l'initiation du renversement du remodelage pathologique et la prévention / retardement de l'insuffisance cardiaque. En particulier, il a été suggéré que la modulation de l'apoptose par certains antihypertenseurs puisse participer aux effets bénéfiques de ces médicaments tant au niveau de la régression du remodelage cardiaque pathologique qu'au niveau de la prévention de la détérioration de la condition. Le prochain chapitre approfondira donc l'apoptose, ses mécanismes moléculaires et son implication dans l'hypertension artérielle.

## 1.5 Apoptose : définitions et rôles dans l'hypertension artérielle

Un déséquilibre du rapport croissance / mort cellulaire favorise le développement de l'hypertrophie cardiovasculaire et certains antihypertenseurs semblent corriger ce remodelage pathologique en favorisant la mort des CML vasculaires et de fibroblastes cardiaques au détriment de la prolifération. Afin de comprendre et d'élucider les mécanismes enclenchés par ces agents, cette section détaillera la mort cellulaire programmée (MCP), son implication dans les dommages aux organes cibles de l'hypertension artérielle et sa modulation par les antihypertenseurs.

### 1.5.1 Description de l'apoptose et sa détection

Le terme apoptose a été suggéré en 1972 pour décrire une forme de mort cellulaire possédant une fonction homéostatique et au profil morphologique distinct de la nécrose (Kerr *et al.*, 1972). Contrairement à une mort cellulaire accidentelle provoquant une réaction inflammatoire (nécrose), la capacité des cellules à s'autodétruire lorsque nécessaire par un processus physiologique permet entre autres aux tissus de contrebalancer une prolifération excessive et contribue à l'homéostasie cellulaire. Cette MCP est requise lors de nombreux processus liés au développement embryonnaire [ex : élimination de cardiomyocytes dans le ventricule droit pendant la maturation post-natale du cœur (Kajstura *et al.*, 1995)] et permet de freiner l'accumulation de cellules ayant un ADN endommagé. Une inhibition ou une activation inappropriée de la machinerie complexe contrôlant la MCP peut entraîner le développement de pathologies variées. Ainsi, une MCP réduite s'observe par exemple lors de certaines maladies auto-immunitaires et lors du développement de multiples néoplasies, tandis qu'une MCP accrue accompagne entre autres des neurodégénérescences, tels que la maladie de Parkinson et la sclérose latérale amyotrophique, des complications liées à l'ischémie-reperfusion, tel que l'infarctus du myocarde, et des maladies aiguës du foie, comme l'hépatite C. Dans un tissu au taux de renouvellement élevé, tel que la crypte intestinale, la MCP survient continuellement et devient facilement détectable. Toutefois, dans un tissu sain et mature au taux de renouvellement bas, comme dans les cardiomyocytes et les CML vasculaires, elle atteint moins de 1% des cellules, et est alors pratiquement indétectable.

### 1.5.1.1 Différentes formes de mort cellulaire

La vision présentant l'apoptose et la nécrose comme deux entités entièrement distinctes a évolué considérablement au cours de la dernière décennie. Le paradigme actuel définit ces deux voies partageant des caractéristiques communes sur un même spectre de réponse «aponecrotique» (Formigli *et al.*, 2004). La nécrose et l'apoptose pures se situent aux extrémités de ce continuum, et la réponse tissulaire à un stimulus de mort cellulaire présente plutôt un mélange des caractéristiques associées à la nécrose et à l'apoptose. Les modes alternatifs de MPC récemment identifiés diffèrent de la nécrose par leur signalisation cellulaire hautement contrôlée. Ils émergent comme des mécanismes de sauvegarde protégeant l'organisme lorsque la voie classique des caspases fait défaut et ils peuvent être stimulés par des agents cytotoxiques (Broker *et al.*, 2005). L'autophagie permet l'élimination bénéfique d'organelles / protéines usées et se caractérise par leur séquestration à l'intérieur de vésicules suivi de leur livraison aux lysosomes de la cellule où des protéases, telles que les cathepsines, s'activent. Lorsque ce procédé normal devient excessif, les cellules meurent sans activation de caspases. La paraptose se distingue par la formation de vacuoles cytoplasmiques lors du gonflement de la mitochondrie et du RE, sans activation de caspases ni présence des caractéristiques morphologiques de l'apoptose. La catastrophe mitotique se déclenche lors de la détection d'un défaut mitotique pour limiter le développement de cellules aneuploïdes destinées à la mort et peut s'accompagner de l'activation de caspases sans pour autant en dépendre.

Toutefois, des définitions exclusives semblent inadéquates puisque ces différents modes de MCP opèrent par des voies de signalisation communes et que plus d'un programme de mort peut être activé en même temps. Ainsi, un modèle descriptif classifiant les MCP selon la morphologie nucléaire apparaît plus adéquat. Dans ce modèle (Leist & Jäättelä, 2001), l'apoptose, hautement énergétivore et dépendante des caspases, se caractérise par une condensation de la chromatine en figures compactes et s'accompagne d'un rétrécissement de la cellule, de protrusions membranaires et de la formation de corps apoptotiques. La MCP s'apparentant à l'apoptose présente une condensation moindre de la chromatine générant des formes plus complexes via l'activation de différentes protéases,

telles que les cathepsines lysosomiales et les calpaïnes activées suite à un stress du RE, et de facteurs libérés par la mitochondrie, tels que l'AIF (facteur induisant l'apoptose) et l'endonucléase G. Ce mode peut aussi faire intervenir des caractéristiques de l'apoptose, telle que l'activation des caspases effectrices via l'endonucléase G. La MCP s'apparentant à la nécrose, indépendante des caspases et sans condensation de la chromatine, survient lorsque les réserves énergétiques de la cellule sont faibles (Leist *et al.*, 1997). Étant donné la nature récente de l'identification des variantes de la MCP et l'emploi courant du terme apoptose pour désigner toute forme de MCP accompagnée d'une activation de caspases et par une fragmentation de l'ADN résultant en une réduction du nombre de cellules, ce terme sera employé pour décrire un tel phénomène dans la suite de cette thèse.

#### **1.5.1.2 Critères morphologiques de détection**

La description initiale de l'apoptose par Kerr *et al.* (1972) repose sur des critères morphologiques observés en microscopie sur des coupes de foies ischémiques et sur des cellules de carcinomes répondant à la radiothérapie. Suite à un signal de mort et à l'activation de la cascade apoptotique, les changements morphologiques survenant dans le tissu peuvent se séparer en trois phases plus ou moins distinctes. Premièrement, la chromatine se condense à partir de la périphérie, le long de la membrane nucléaire, formant une structure qui ressemble à un croissant. Au niveau cytoplasmique, les membranes et organelles demeurent intactes, si ce n'est que les filaments du cytosquelette permettent le rapprochement des organelles. Les appareils de synthèse (RE) et énergétiques (mitochondries) demeurent intacts, contrairement à ce qui survient très tôt dans la nécrose. Deuxièmement, la condensation de la chromatine s'amplifie et le noyau commence à se fragmenter, générant des fragments cellulaires reliés par des ponts cytoplasmiques. La membrane cytoplasmique affiche des protrusions (*blebs*) et le volume cellulaire diminue à un point tel que les fragments cellulaires se séparent, générant les corps apoptotiques de haute densité contenant les organelles et les fragments nucléaires. Troisièmement, les corps apoptotiques sont phagocytés. Puisque les constituants cellulaires demeurent entourés d'une membrane et que les corps apoptotiques disparaissent rapidement, engouffrés par les phagocytes, aucune réaction inflammatoire lymphocytaire, fibrose ou modification de l'architecture tissulaire ne sont généralement observées. Toutefois, si l'apoptose est

massive et/ou les cellules avoisinantes inaptées à phagocyter, les corps apoptotiques peuvent se dégrader, et une inflammation accompagne cette nécrose secondaire (Schaub *et al.*, 2000). Ces modifications peuvent survenir en l'espace de quelques heures, démontrant l'extrême efficacité et toute l'organisation requise.

En comparaison, la nécrose produit des changements majeurs dans le noyau et le cytoplasme, telles qu'une perte de structure et une fragmentation aléatoire. Cela se répercute au niveau morphologique par le gonflement des organelles suivi du déversement du contenu cellulaire dans le milieu extracellulaire en raison de l'augmentation de perméabilité membranaire, entraînant une réaction inflammatoire.

### 1.5.1.3 Critères biochimiques de détection

L'apoptose constitue un processus hautement conservé entre les organismes multicellulaires. L'identification de gènes contrôlant ce processus chez le nématode *Caenorhabditis elegans*, tels que *ced-3*, *ced-4* et *ced-9* (Ellis & Horvitz, 1986), a permis la découverte d'homologues chez les mammifères, dont les caspases (Nicholson *et al.*, 1995), Apaf-1 (*apoptosis protease-activating factor*) (Zou *et al.*, 1997) et Bcl-2 (Hengartner & Horvitz, 1994), respectivement. Des critères biochimiques allant de pair avec les critères morphologiques ont donc été établis pour caractériser l'apoptose; les plus fréquemment employés seront décrits ci-dessous.

La présence de phosphatidylsérine (PS, localisée uniquement du côté interne de la membrane plasmique saine) à la surface externe de la membrane plasmique constitue un des premiers changements biochimiques détectables.

Le clivage des pro-caspases permet la libération du fragment actif essentiel pour mener à terme l'apoptose (Siegel, 2006). Suite à la découverte de l'homologie entre le gène codant pour l'enzyme de conversion de l'interleukine 1 $\beta$  (ICE/Caspase-1) et le gène effecteur de l'apoptose *ced-3* chez le nématode (Nicholson *et al.*, 1995), au moins 14 caspases, toutes synthétisées sous la forme de zymogènes, ont été identifiées. Ces protéases

à cystéines présentent un site actif conservé Gln-Ala-Cys-X-Gly, où X peut être Arg, Gln ou Asp, et contiennent un pro-domaine en N-terminal suivi d'une grosse et d'une petite sous-unités (p20 et p10) qui, suite au largage du pro-domaine, clivent des substrats au niveau d'un résidu d'acide aspartique. Les acides aminés entourant ce résidu déterminent la sélectivité pour les nombreux substrats. Les caspases se divisent en trois groupes selon leur fonction principale (Fan *et al.*, 2005b). Premièrement, on trouve celles plutôt impliquées dans l'inflammation (caspase-1, -4, -5, -11, -12, -13 et -14). Deuxièmement, les caspases initiatrices de l'apoptose présentent un long pro-domaine avec un domaine DED (domaine effecteur de mort) (caspases-8 et -10) ou un domaine CARD (domaine de recrutement et d'activation de caspases) (caspases-2 et -9). Troisièmement, les caspases effectrices (caspase-3, -6 et -7) possèdent un court pro-domaine, sont activées par les initiatrices et clivent de multiples substrats. Certaines caspases apoptogéniques possèdent d'autres fonctions, dont le développement et la différenciation de cellules immunitaires, la progression du cycle cellulaire et même des effets pro-survie (ex : caspase-8 et survie de cellules T activées) (Siegel, 2006; Nhan *et al.*, 2006).

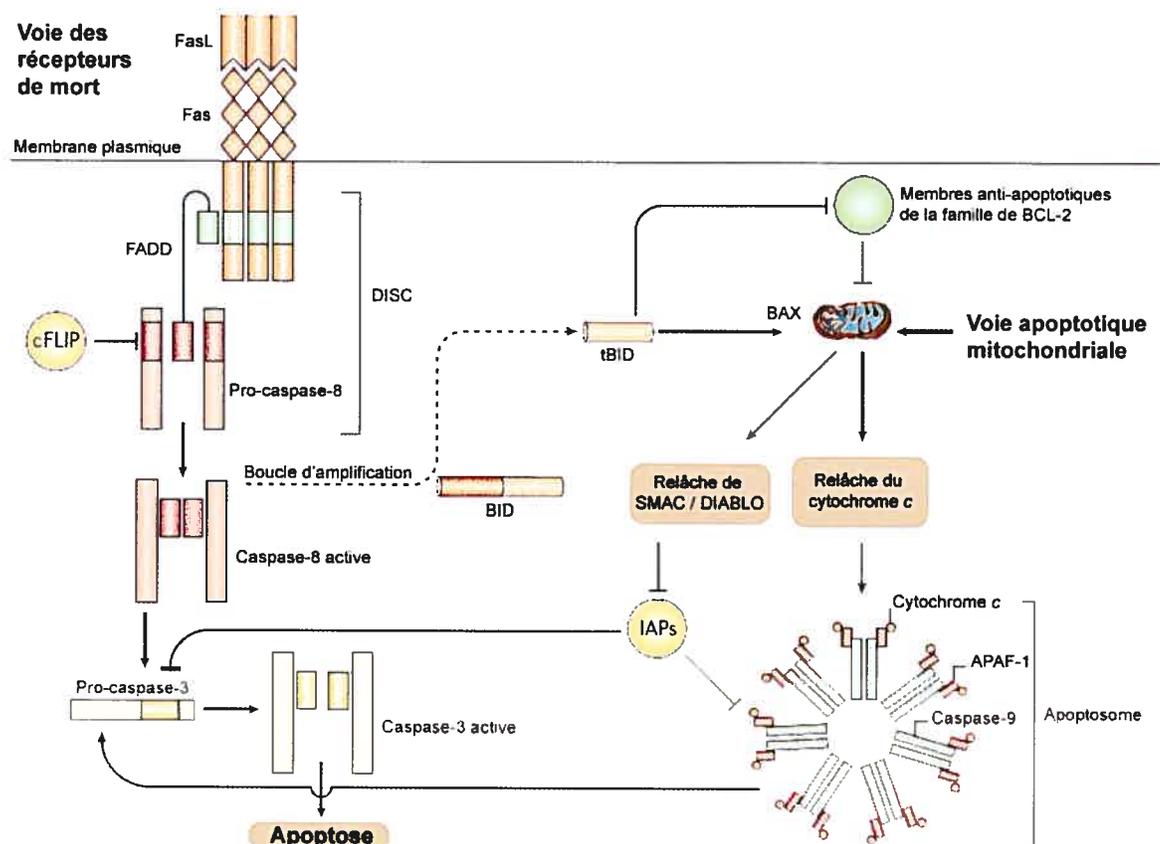
La fragmentation internucléosomale de l'ADN, typique de l'apoptose et décrite premièrement en 1980 par Wyllie (Wyllie, 1980), distingue l'apoptose de la nécrose lors de laquelle l'ADN se dégrade sans patron précis. Les endonucléases activées par les caspases clivent l'ADN en segments de 180 paires de bases ou en ses multiples, générant un motif en barreaux d'échelle suite à l'électrophorèse de l'ADN sur gel d'agarose, tandis qu'une traînée d'ADN caractérise la nécrose. Elle correspond au remaniement profond de l'ADN lors de la condensation de la chromatine. D'autres marqueurs, dont le clivage de Bid, la relâche du cytochrome *c* et la perte du potentiel membranaire mitochondrial, dépendent de la voie empruntée, et leur absence n'exclut donc pas une réponse apoptotique.

### **1.5.2 Voies de signalisation et cascades apoptotiques**

Les mécanismes moléculaires gouvernant l'initiation de l'apoptose, son exécution et la phase de dégradation seront maintenant revus, en association avec les points de contrôle possibles à chaque étape. Ces voies sont schématisées à la figure 6.

### 1.5.2.1 La phase d'initiation

Un nombre sans cesse grandissant de stimuli exogènes (stress, privation de sérum, agents anti-cancer, etc.) et endogènes (ex : erreurs dans l'ADN) ont été identifiés comme pouvant déclencher l'apoptose. Ces signaux sont intégrés par l'une des voies majeures d'initiation de l'apoptose, soit la voie des récepteurs de mort ou la voie mitochondriale, conduisant toutes deux à l'activation des caspases initiatrices.



**Figure 6. Les deux voies classiques de l'apoptose.**

Les cascades biochimiques impliquées dans la voie des récepteurs de mort et celles participant à la voie apoptotique mitochondriale sont décrites dans le texte.

APAF, Apoptosis protease-activating factor; DIABLO, Direct IAP binding protein; DISC, Complexe de signalisation induisant la mort; FADD, Domaine de mort associé à Fas; FasL, Fas ligand; FLIP, FLICE (FADD-like IL-1 $\beta$ -converting enzyme) inhibitory protein; IAP, protéines inhibitrices de l'apoptose ; SMAC, Second mitochondria-derived activator of caspases. Adaptée de Siegel, 2006.

### 1.5.2.1.1 La voie des récepteurs de mort

Classiquement, la voie des récepteurs de mort (extrinsèque) est représentée par la liaison de Fas ligand (FasL) à Fas (CD95), membre de la superfamille des récepteurs du TNF (Curtin & Cotter, 2003). Outre FasL, les ligands activant cette voie incluent aussi TNF- $\alpha$  et TRAIL (*TNF-related apoptosis-inducing ligand*). Hormis Fas, les récepteurs de mort TNF-R1, DR4 (TRAILR1) et DR5 (TRAILR2) sont jusqu'à présent les mieux caractérisés chez les mammifères (Curtin & Cotter, 2003). Suite à la liaison du ligand, des interactions homophiliques entre les domaines DD (domaine de mort) des récepteurs de mort et ceux de protéines cytoplasmiques, tel que FADD (domaine de mort associé à Fas), créent un échafaudage permettant le recrutement de protéines formant le complexe actif de cette voie, le DISC (complexe de signalisation induisant la mort). Un autre jeu d'interactions homophiliques entre les domaines DED présents sur la protéine FADD et sur les caspases-8 et -10 permet le recrutement de celles-ci. L'activation de caspase-8 suite à la formation du DISC détermine la formation d'agrégats de récepteurs Fas à la membrane, accroissant l'activité du DISC. Caspase-8 émerge en tant que principale caspase initiatrice de cette voie (Sprick *et al.*, 2002). Des perturbations peuvent nuire à la formation du DISC : la mise en place de larges agrégats de récepteurs de mort dépend alors de la production du céramide, favorisant leur attachement à des micro-domaines lipidiques. La participation du céramide au processus apoptotique ne se limite pas à ce rôle. En effet, ce sphingolipide est un médiateur clé de l'apoptose agissant par une variété de mécanismes, incluant l'activation de la kinase suppresseur de Ras (Zhang *et al.*, 1997), de phosphatases (PP1 et PP2A (Chalfant *et al.*, 2002), de la cathepsine D (Heinrich *et al.*, 2000) et l'altération directe de propriétés des membranes plasmique et /ou mitochondriale (Siskind *et al.*, 2002).

#### 1.5.2.1.1.1 Modulation de la voie extrinsèque

Tout d'abord, des récepteurs homologues dépourvus du domaine DD (ne recrutant pas les protéines adaptatrices) réduisent la sensibilité à l'apoptose. Les leurres DcR1 (decoy receptor 1 / TRAILR3) et DcR2 (TRAILR4) ancrés dans la membrane se lient à TRAIL (Pan *et al.*, 1997), tandis que DcR3 soluble peut se lier à FasL. La surexpression de DcR3 dans près de la moitié des cancers du poumon et du tractus gastro-intestinal favorise la survie des tumeurs (Pitti *et al.*, 1998). Ensuite, le clivage des caspases initiatrices peut être

altéré par le niveau d'expression de Fas (et de sa forme soluble) et de FADD. De plus, des modifications post-traductionnelles de FADD (phosphorylation par PKC  $\zeta$  ou HIPK3) peuvent inhiber la formation du DISC. Par exemple, l'activité de HIPK3 est élevée dans plusieurs lignées de cellules résistantes à de multiples médicaments (Curtin & Cotter, 2003).

La modulation de cette voie s'effectue aussi sur caspase-8 (ex : hyper-méthylation du gène réprimant sa transcription, variant dépourvu d'activité catalytique, etc.). cFLIP (protéine inhibitrice de FLICE) possède un DED et une homologie de séquence avec caspase-8 : elle entre en compétition pour la liaison de FADD et altère l'activation de pro-caspase-8, bien que la forme cFLIP<sub>L</sub> puisse aussi parfois activer caspase-8 (Micheau *et al.*, 2002). Ces points de contrôle ne déterminent pas uniquement la réponse apoptotique puisque de nouvelles fonctions (ex : modulation de la prolifération, du cycle cellulaire et de l'inflammation) sont maintenant attribuées aux récepteurs de mort liant FADD (Park *et al.*, 2005), surtout dans les cellules hématopoïétiques.

#### 1.5.2.1.2 La voie mitochondriale

La majorité des réponses apoptotiques chez les vertébrés procèdent par la voie mitochondriale (intrinsèque), caractérisée par la perméabilisation de la membrane mitochondriale externe suivie de la relâche de protéines apoptogéniques et de la formation de l'apoptosome (Green & Kroemer, 2004). Les dommages à l'ADN, la privation de facteurs de croissance et le stress oxydant déclenchent cette voie, suggérant qu'elle soit responsable de l'apoptose initiée en situation de stress métabolique. La voie apoptotique intrinsèque débute lorsque la mitochondrie reçoit des signaux dictant la perméabilisation de sa membrane externe et provenant principalement de protéines de la famille de Bcl-2. La perméabilisation s'accompagne fréquemment d'une dissipation du potentiel membranaire mitochondrial et conduit à la relâche de facteurs de mort entreposés dans l'espace intermembranaire, tels que le cytochrome *c*, SMAC/DIABLO (*second mitochondria-derived activator of caspases/direct IAP binding protein*) et AIF. Différents modèles pourraient expliquer la relâche de ces facteurs. Ils incluent entre autres la formation de canaux protéiques ou de pores lipidiques permettant le passage des protéines et l'ouverture

du PTP hypothétique laissant entrer l'eau dans la matrice et causant éventuellement la rupture de la membrane externe (Green & Kroemer, 2004). Dans le cytosol, le cytochrome *c* se lie au domaine C-terminal de Apaf-1 alors monomérique et inactif, déclenchant un changement de sa conformation qui libère sa queue N-terminale contenant le domaine CARD. En présence de dATP, le complexe Apaf-1/cytochrome *c* s'oligomérisent en une structure heptamérique exposant les 7 domaines CARD. L'interaction homophile entre les domaines CARD de pro-caspase-9 (à proximité de la mitochondrie) et de Apaf-1 complète la formation du complexe actif de cette voie, l'apoptosome (Schafer & Kornbluth, 2006). La relâche d'un dimère de caspase-9 (avec une sous-unité catalytiquement active) permet le clivage de pro-caspases effectrices (caspase-3 et -7) situées en aval.

#### 1.5.2.1.2.1 Modulation de la voie intrinsèque

Cette section requiert une brève description des protéines de la famille de Bcl-2. Elles contiennent au moins un des quatre domaines d'homologie Bcl-2 (BH) et sont réparties selon leur effet pro- ou anti-apoptotique ainsi que l'occurrence des domaines BH. Les anti-apoptotiques présentent les quatre domaines BH (ex : Bcl-2, Bcl-X<sub>L</sub> et Mcl-1), les pro-apoptotiques à multi-domaines ne possèdent pas le domaine BH4 (ex : Bax et Bak) et le dernier groupe inclut les pro-apoptotiques avec seulement BH3 (ex : Bid, Bad et Puma) (Reed, 2006). De façon générale, les membres pro-apoptotiques à multi-domaines ont une activité apoptotique intrinsèque, alors que celles présentant seulement BH3 engagent d'autres membres pour inhiber (Bcl-2) ou stimuler (Bax) l'activité de ceux-ci (Reed, 2006).

Ces protéines de la famille de Bcl-2 déterminent la relâche de facteurs apoptogéniques par la mitochondrie via plusieurs mécanismes (Parone *et al.*, 2002; Green & Kroemer, 2004). Premièrement, l'ancrage de Bax et Bak dans la membrane mitochondriale suite à leur activation permet la formation d'oligomères ou de pores lipidiques favorisant la diffusion de facteurs situés dans l'espace intermembranaire. Deuxièmement, ces protéines interagissent avec des canaux dans la membrane mitochondriale laissant s'échapper le cytochrome *c*, tel que le VDAC (*voltage-dependant activated channel*), affectant ainsi leur ouverture et leur fermeture. Troisièmement, l'hétérodimérisation entre membres de cette famille détermine leur activité. Bcl-2 ou Bcl-

X<sub>L</sub> empêchent ainsi les membres pro-apoptotiques de former un oligomère à la surface de la membrane mitochondriale. Quatrièmement, la phosphorylation de ces protéines détermine leur activité. Ainsi, Bad phosphorylé entre autres par Akt est retenu dans le cytosol, mais sa déphosphorylation par la calcineurine favorise sa relocalisation à la membrane mitochondriale (Wang *et al.*, 1999b). Cinquièmement, le suppresseur de tumeurs p53 agit entre autres en induisant l'expression de Puma (Jeffers *et al.*, 2003), en activant Bax et Bad ou encore en séquestrant Bcl-2 et Bcl-X<sub>L</sub>, ce qui libère leurs comparses pro-apoptotiques. Bref, ces protéines contrôlent l'intégrité de la membrane mitochondriale externe par dimérisation compétitive de paires spécifiques et entraînent une perturbation de cette membrane lors d'un surplus de protéines apoptogéniques disponibles pour s'y ancrer. Par ailleurs, les processus opposés de fusion et de fission (créant des changements morphologiques) bloquent et favorisent, respectivement, la diffusion du cytochrome *c* des régions délimitées par les repliements complexes de la membrane mitochondriale interne vers l'espace intermembranaire d'où il pourra ensuite accéder au cytosol (Cereghetti & Scorrano, 2006).

La modulation de la voie intrinsèque s'effectue également au niveau de l'apoptosome, dont la formation est altérée dans plusieurs types de tumeurs. Les protéines IAP (protéines inhibitrices de l'apoptose) se lient aux caspases (-3, -7 et -9) et inhibent leur activité (Deveraux & Reed, 1999). Smac/Diablo supprime l'action inhibitrice des IAP en interagissant avec celles-ci. L'efficacité de l'apoptosome est aussi modulée par de nombreux facteurs, entre autres par Akt et ERK1/2 qui, en phosphorylant caspase-9, empêchent son activation (Schafer & Kornbluth, 2006).

#### *1.5.2.1.3 Interconnexions entre les voies de l'apoptose*

Les deux voies majeures d'activation de l'apoptose ne sont pas étanches: des interconnexions amplifiant la réponse apoptotique existent. Ainsi, caspase-8 peut cliver Bid, générant le fragment Bid tronqué (tBID) transloqué du cytoplasme aux membranes mitochondriales où il stimule une oligomérisation plus efficace de Bax et déclenche la voie intrinsèque activant caspase-9 (Gross *et al.*, 1999). Inversement, l'activation de caspase-8 [par caspase-6 (Cowling & Downward, 2002)] a été rapportée suite à des stimuli activant la

voie intrinsèque, ce qui accélère l'apoptose. Certains stimuli peuvent activer les deux voies de façon concomitante, tel qu'observé avec p53 (activation de Puma et Bax et aussi hausse de l'expression de FasL et DR5), alors que d'autres protéines inhibent les deux voies majeures, telles que plusieurs HSP (protéines de choc thermique) (Beere, 2004) et ARC (modulateur de l'apoptose possédant un CARD) (Koseki *et al.*, 1998). Entre autres, Hsp27 prévient l'activation de caspase-9 en interagissant avec le cytochrome *c*. ARC, fortement exprimé dans le cœur, atténue soit la voie extrinsèque en liant pro-caspase-8, soit la voie intrinsèque en empêchant Bax de provoquer la relâche de cytochrome *c*.

### 1.5.2.2 La phase d'exécution

Le DISC et l'apoptosome déclenchent l'activation en cascade des caspases via leur oligomérisation, comme suggéré par l'activation spontanée de caspases lorsque leur concentration *in vitro* s'élève (Boatright *et al.*, 2003). La proximité de zymogènes dans l'agrégat formé par le DISC, visible en microscopie (Siegel, 2006), et la structure particulière de l'apoptosome décrite précédemment favorisent l'auto-activation des caspases initiatrices -8 et -9. Des analyses cristallographiques ont entre autres montré que deux hétérodimères de caspases, contenant chacun une grosse et une petite sous-unité, forment alors un hétérotétramère actif (Walker *et al.*, 1994). Les caspases initiatrices ainsi activées déclenchent le clivage des pro-caspases effectrices puisque celles-ci renferment la séquence peptidique reconnue par les initiatrices. Les voies intrinsèques et extrinsèques convergent à ce niveau constituant un point de non-retour marqué par une protéolyse hautement spécifique initiée par les caspases effectrices menant à la fragmentation de l'ADN.

#### 1.5.2.2.1 Modulation de la phase d'exécution

La régulation de l'exécution s'effectue par des molécules inhibitrices des caspases. Outre celles mentionnées plus haut (cFLIP, IAP, Hsp27 et ARC), il existe des inhibiteurs naturels des caspases (ex : p35 d'origine virale) et des inhibiteurs synthétiques. Les peptides synthétiques agissent en bloquant l'accès aux substrats endogènes. Surtout employés *in vitro*, ils possèdent la séquence de reconnaissance spécifique de certaines

caspases, couplée à une fonction aldéhyde (CHO, inhibiteurs réversibles) ou cétone (FMK, irréversibles) leur permettant de se fixer au site catalytique. Par exemple, le DEVD-CHO inhibe caspase-3 et -7, alors que le IETD-CHO inhibe caspase-8. Le z-VAD-FMK, moins spécifique, inhibe la plupart des caspases connues. Plus récemment, de petites molécules non peptidiques inhibitrices de caspases ont été développées. Parmi celles-ci, IDN6556 et IDN6734, des inhibiteurs à large spectre, sont en études cliniques pour améliorer le traitement de maladies hépatiques aiguës et l'infarctus aigu du myocarde, tous deux caractérisés par une apoptose excessive (Green & Kroemer, 2005).

### 1.5.2.3 La phase de dégradation

L'atteinte des multiples cibles des caspases (>100 substrats) affecte de nombreux processus, dirigeant la cellule vers sa dégradation irréversible en corps apoptotiques.

Parmi les protéines structurales touchées, le clivage de la fodrine et de la gelsoline détruit le réseau de filaments d'actine, tandis que le clivage de lamines mène au rétrécissement et bourgeonnement du noyau, démantelant l'architecture cellulaire (Kothakota *et al.*, 1997).

De nombreuses protéines régulatrices de la mort / survie / croissance sont clivées par les caspases. Outre Bid activée par caspase-8, les kinases PAK2 et MEKK1 sont activées par caspase-3, favorisant respectivement la formation de corps apoptotiques et une signalisation pro-apoptotique via JNK. À l'opposé, Bcl-2, Bcl-X<sub>L</sub>, IAP, Akt et FAK sont dégradées par les caspases sous certaines conditions, contribuant à la perte de signaux de survie et au détachement de la matrice. La destruction de NF- $\kappa$ B (clivage de la sous-unité p65 et de la kinase IKK $\beta$  l'activant) facilite aussi l'apoptose.

Des enzymes de réparation de l'ADN sont également inactivées par les caspases. La réparation de l'ADN étant un processus hautement énergétivore, son inhibition permet d'utiliser l'ATP à un autre usage, soit l'apoptose. ADN-PK, Rad51 et les protéines ATM constituent des substrats des caspases. Le plus connu de cette catégorie demeure PARP

(poly(ADP-ribose) polymérase) (Lazebnik *et al.*, 1994), activé lors de bris dans l'ADN et catalysant l'attachement de polymères d'ADP-ribose à de multiples facteurs nucléaires afin de favoriser la réparation de ces bris.

L'activation de DNAses favorise directement la fragmentation internucléosomale de l'ADN, générant des oligomères de grosseur proportionnelle à celle d'un nucléosome. La principale action des caspases à ce niveau s'effectue sur le couple ICAD/CAD (désoxyribonucléase activée par les caspases) chez la souris (Enari *et al.*, 1998) (DFF45 (facteur de fragmentation de l'ADN) / DFF40 chez l'humain). Le clivage du domaine N-terminal de ICAD brise l'interaction de cet inhibiteur avec la sous-unité catalytique du complexe. La CAD libérée se dirige au noyau et fragmente l'ADN. L'endonucléase G libérée de la mitochondrie ainsi que des DNAses activées par une baisse du pH intracellulaire (Counis & Torriglia, 2006) participent également à ce processus.

Suite à l'éclatement de la cellule en de multiples corps apoptotiques, leur phagocytose par un processus hautement contrôlé [7 des 14 gènes de *Caenorhabditis elegans* impliqués dans la mort cellulaire servant à éliminer les cellules mortes (Chung *et al.*, 2000)] permet leur élimination rapide et empêche le déversement de contenu cellulaire dans le milieu extracellulaire, ce qui prévient le développement de maladies auto-immunitaires et inflammatoires. Les macrophages (phagocytes professionnels) et les cellules environnantes (phagocytes amateurs) accomplissent cette tâche. Une grande variété de molécules de surface déclenchent l'attachement et l'engouffrement ou bien envoient des signaux prévenant l'activité phagocytaire. Lors de l'apoptose, ces signaux négatifs sont éliminés ou masqués par la cellule qui en exprime d'autres étant reconnus par les phagocytes, tout dépendant des types cellulaires impliqués, de la voie apoptotique déployée, de l'étape à laquelle l'apoptose se situe et du microenvironnement (de Almeida & Linden, 2005). Le signal le mieux caractérisé demeure l'exposition de PS suite à l'altération de mécanismes conservant ces groupements à l'intérieur de la cellule (inhibition d'une translocase et perte d'interactions avec des protéines du cytosquelette comme la fodrine) (Fadok *et al.*, 1992). Des récepteurs situés sur le phagocyte (ex : CD68, LOX-1, SRA et CD36) reconnaissent la PS et enclenchent la phagocytose. D'une autre façon,

plusieurs lectines reconnaissent des motifs d'hydrates de carbone sur la cellule apoptotique, et l'élimination d'acides sialiques (envoyant des signaux négatifs) expose des asialoglycoconjugués favorisant la phagocytose (de Almeida & Linden, 2005).

### **1.5.3 L'apoptose dans la pathologie hypertensive**

#### **1.5.3.1 Développement et traitement de pathologies par l'apoptose**

La description des multiples facteurs impliqués dans l'apoptose laisse entrevoir la possibilité qu'un dérèglement du processus, même mineur, puisse déstabiliser l'homéostasie tissulaire. Une association claire existe entre des pathologies variées et une modulation inappropriée de l'apoptose, tel que suggéré au début de cette section. La compréhension des dérèglements impliqués a stimulé la mise en place de stratégies visant à renverser la situation à l'aide d'inhibiteurs ou d'activateurs de l'apoptose. Dans l'ensemble, la difficulté d'atteindre spécifiquement les cellules ciblées *in vivo* a freiné le développement de thérapies modulant l'apoptose. Toutefois, quelques médicaments ciblant des joueurs clés du processus apoptotique apparaissent maintenant en clinique ou se retrouvent au stade des études cliniques (Green & Kroemer, 2005).

#### **1.5.3.2 Rôle de l'apoptose dans les maladies cardiovasculaires**

Au niveau des maladies cardiovasculaires, l'apoptose n'a été étudiée que depuis une dizaine d'années, mais se distingue maintenant comme un déterminant majeur des dommages aux organes cibles de ces pathologies, soit le cœur, le réseau vasculaire, le cerveau et les reins. D'ailleurs, une hausse de l'apoptose comparativement à la prolifération cellulaire s'observe lors de la progression vers l'insuffisance cardiaque et l'infarctus du myocarde (perte de cardiomyocytes), lors de l'atrophie vasculaire menant à un anévrisme (perte de CML) et lors de la raréfaction des capillaires associée à l'hypertension artérielle (perte de cellules endothéliales). En revanche, une baisse de l'apoptose relativement à la prolifération conduit à l'hyperplasie cellulaire lors du remodelage hypertensif du ventricule gauche (fibroblastes) et lors du remodelage artériel (CML) dans l'athérosclérose et

l'hypertension artérielle. De plus, une apoptose et une réplication cellulaire toutes deux accrues suggèrent qu'un taux de renouvellement accéléré puisse expliquer la sénescence prématurée de cellules endothéliales lors de maladies cardiovasculaires. La perte de cardiomyocytes par apoptose est à la base de la vision négative de l'apoptose dans notre champ d'études. Des résultats provenant de différents groupes, incluant le nôtre, suggèrent toutefois que des thérapies antihypertensives couramment employées modulent l'apoptose soit à la hausse pour renverser le remodelage hypertensif pathologique (deBlois *et al.*, 2005), soit à la baisse pour contrer la progression vers l'insuffisance cardiaque (Fortuno *et al.*, 2003). La prochaine section définira plus en détails ces résultats jetant les bases des expériences incluses dans cette thèse.

### **1.5.3.3 L'apoptose et ses mécanismes moléculaires dans les dommages associés à l'hypertension artérielle**

Les observations initiales suggérant un dérèglement de l'apoptose dans l'hypertension ont été obtenues par le groupe de Hamet. Le marquage radioactif de l'ADN génomique *in utero* a révélé une baisse de 50% de la demi-vie de l'ADN dans le cœur, l'aorte thoracique et les reins de SHR pré-hypertendus comparativement aux rats WKY, suggérant un taux de renouvellement accentué impliquant la voie de l'AngII (Thorin-Trescases *et al.*, 2001; Hamet *et al.*, 2001). Utilisant une technique insérant *in situ* un nucléotide radioactif aux sites de fragmentation internucléosomale de l'ADN, ce groupe a rapporté que le niveau d'apoptose variait selon l'âge des animaux : une apoptose atténuée chez le SHR nouveau-né comparativement aux rats WKY favorise le développement de l'hyperplasie cardiaque initiale (Hamet *et al.*, 1996; Moreau *et al.*, 1997), tandis qu'une hausse de l'apoptose dans les organes cibles de l'hypertension artérielle s'observe ensuite chez de jeunes adultes rats et souris spontanément hypertendus comparativement aux animaux normotendus (Hamet *et al.*, 1995). Une revue exhaustive de la littérature révèle que l'apoptose est modulée différemment dans de nombreux tissus du SHR comparativement aux rats normotendus, avec une accentuation remarquée dans le cerveau (hippocampe, cortex et neurones de la rétine), les cellules intestinales, la prostate, les ostéocytes et le système immunitaire (lymphocytes et thymocytes) (Hale *et al.*, 2006) (voir Annexe). Au niveau cardiovasculaire, ces différences seront traitées dans les sections

suivantes. Plusieurs de ces différences persistent suite à la réduction de la tension artérielle ou lorsque les cellules sont mises en culture. Ces données suggèrent que des mécanismes hémodynamiques et génétiques ou humoraux participent au contrôle de l'apoptose dans l'hypertension artérielle.

#### *1.5.3.3.1 Apoptose rénale dans l'hypertension artérielle*

La néphropathie hypertensive se caractérise par une fibrose interstitielle (accumulation de fibroblastes) ainsi que par une sclérose glomérulaire et une atrophie tubulaire (perte progressive de néphrons). L'apoptose dans les compartiments glomérulaires et tubulaires dans l'hypertension expérimentale (Ying *et al.*, 2000) peut conduire à la raréfaction microvasculaire. Des hausses de TGF- $\beta$  et d'espèces réactives de l'oxygène, relayées par l'Ang II et suivies de l'activation de p38 et de la liaison de FasL à son récepteur, ressortent comme les principales voies d'induction de l'apoptose rénale dans l'hypertension artérielle. Chez l'humain, malgré le peu de données dans l'hypertension, la masse rénale réduite et l'atrophie tubulaire observées chez des patients hypertendus ainsi que l'apoptose observée lors de néphropathies similaires suggèrent son rôle dans la progression vers l'insuffisance rénale hypertensive.

#### *1.5.3.3.2 Apoptose cardiaque dans l'hypertension artérielle*

Le processus apoptotique est également dysfonctionnel dans le cœur hypertendu, plus particulièrement au niveau du ventricule gauche. La dynamique des populations cellulaires lors du développement de l'organe et lors de pathologies varie selon le type cellulaire : la modulation de l'équilibre entre la croissance et la mort diffère entre les cardiomyocytes et les fibroblastes. Chez le SHR, l'hyperplasie cardiaque néonatale est associée à une hausse de la synthèse d'ADN et à une baisse de l'apoptose dans les 24 premières heures suivant la naissance (Walter & Hamet, 1986; Moreau *et al.*, 1997). Certaines études rapportent une hausse de l'apoptose des cardiomyocytes en fonction de l'âge chez le SHR: suite à l'apoptose réduite chez le nouveau-né, une augmentation de l'apoptose des cardiomyocytes est décelée à partir de l'âge de trois semaines et atteint un plateau à 16 semaines (Hamet *et al.*, 1995; Peng *et al.*, 1999; Liu *et al.*, 2000), en

corrélation avec le développement de l'hyperplasie des fibroblastes. De plus, une augmentation du ratio d'expression de Bax / Bcl-2 suggère que la susceptibilité cardiaque à l'apoptose est accrue chez le SHR (Fortuno *et al.*, 1998). D'autres modèles non génétiques d'hypertension [perfusion d'Ang II (Diep *et al.*, 2002) et surcharge pressive suite à une coarctation aortique (Leri *et al.*, 1998)] présentent également une augmentation rapide de l'apoptose des cardiomyocytes bien avant la diminution de la fonction cardiaque. En accord avec ces données, l'Ang II stimule l'apoptose de cardiomyocytes *in vitro* (Leri *et al.*, 1998; Ravassa *et al.*, 2000) et *in vivo* (Diep *et al.*, 2002) via le récepteur AT<sub>1</sub>. En culture, la réponse apoptotique à l'Ang II est plus grande chez les cardiomyocytes provenant de SHR que ceux de rats WKY, et pourrait faire intervenir le récepteur AT<sub>2</sub> (Ravassa *et al.*, 2000).

De nombreuses évidences expérimentales et cliniques accumulées lors des 10 dernières années indiquent que l'apoptose contribue à l'insuffisance cardiaque via la perte de cardiomyocytes (Teiger *et al.*, 1996; Anversa *et al.*, 1997). Lors de la transition entre l'HVG compensée et l'insuffisance cardiaque, chez le SHR (Diez *et al.*, 1997; Li *et al.*, 1997b) ou suite à la perfusion d'Ang II (Nemer *et al.*, 2006), une perte soutenue de cardiomyocytes par apoptose survient. Des données récentes suggèrent un lien direct entre la détérioration mitochondriale et l'apoptose des cardiomyocytes, le remodelage pathologique et même la mort prématurée suite à une insuffisance cardiaque, puisque toutes ces anomalies ont pu être empêchées en maintenant l'état de compensation par la surexpression de Bcl-2 (Nemer *et al.*, 2006).

Les données recueillies sur les modèles expérimentaux corrént avec les observations faites chez des patients présentant une hypertension essentielle sans cardiomyopathie ischémique ni insuffisance cardiaque. Ainsi, des biopsies endomyocardiques du septum droit de ces patients révèlent une hausse de l'apoptose cardiaque (par détection *in situ* de la fragmentation de l'ADN et de caspase-3 activée) tant dans les cardiomyocytes que dans les non-cardiomyocytes, comparativement à des cœurs normotendus autopsiés (Gonzalez *et al.*, 2002).

### 1.5.3.3 Apoptose vasculaire dans l'hypertension artérielle

La relation entre les niveaux de croissance et de mort cellulaire semble importante dans le développement du remodelage vasculaire hypertensif, suggérant un rôle de l'apoptose variant selon le type de vaisseau. Au niveau des artères de résistance, l'apoptose de CML chez le SHR augmente comparativement aux rats WKY dans le mésentère lors de l'augmentation du ratio média / lumière sans hausse de masse vasculaire (Rizzoni *et al.*, 2000b), favorisant ainsi le maintien du caractère eutrophique de ce type de remodelage. Au niveau des gros troncs de capacitance, telle que l'aorte, l'apoptose des CML d'animaux hypertendus adultes (SHR et rat DOCA-sel) se révèle plus fréquente que chez les rats normotendus, comme démontré par une élévation de la fragmentation de l'ADN, du ratio Bax / Bcl-2 et de l'activation de caspase-3 (Hamet *et al.*, 1995; Sharifi & Schiffrin, 1997). Les mécanismes conduisant à cette activation «chronique» de l'apoptose demeurent inexpliqués, mais pourraient faire intervenir une tentative de contrebalancer, quoique de façon inadéquate, l'hypertrophie et l'hyperplasie. D'un autre côté, cette mort cellulaire pourrait refléter une susceptibilité accrue des cellules présentant un phénotype plutôt synthétique que contractile à entrer en apoptose. Ces propositions sont supportées par des études montrant que l'Ang II perfusée à des rats (un puissant stimulus hypertrophique) augmente de façon paradoxale l'apoptose de CML (Diep *et al.*, 1999), et que les CML de SHR (et de SHRSP) mises en culture entrent plus facilement en apoptose en réponse à une privation de sérum ou à une stimulation de la voie de l'AMPc que des CML provenant de rats WKY. De plus, des études réalisées sur des CML transfectées avec *c-myc* ont suggéré que le risque des cellules proliférantes d'entrer en apoptose est plus élevé. Outre le remodelage associé aux modifications de pression et de débit sanguin, l'élévation de la tension longitudinale (Jackson *et al.*, 2002), tout comme son atténuation (Jackson *et al.*, 2005), produit un remodelage artériel impliquant entre autres l'induction de l'apoptose. L'apoptose de CML semble donc représenter un important mécanisme par lequel les vaisseaux peuvent adapter leur structure pour maintenir une perfusion adéquate des organes.

Chez l'humain, les petites artères glutéales (disséquées à partir de biopsies de gras sous-cutané) montrent un remodelage similaire à celui observé dans les modèles expérimentaux (Schiffrin *et al.*, 1993), suggérant que l'apoptose puisse aider à maintenir

constant le nombre de CML. Au niveau des grosses artères, la difficulté évidente de réaliser des études invasives limite nos connaissances sur le rôle de l'apoptose.

Comme mentionné au niveau rénal, les cellules endothéliales présentent aussi un équilibre altérée entre la mort et la survie dans l'hypertension artérielle. La raréfaction des capillaires fréquemment observée dans plusieurs organes d'animaux hypertendus suggère une viabilité réduite de ces cellules (Kiefer *et al.*, 2003). En effet, il a été rapporté que l'apoptose accrue de cellules endothéliales, tant chez le SHR que dans un modèle d'hypertension causée par les glucocorticoïdes et que dans un modèle d'hypertension rénale, contribue à cette raréfaction des capillaires (Gobe *et al.*, 1997; Vega *et al.*, 1999; Suematsu *et al.*, 2002).

#### **1.5.4 Rôle de la modulation de l'apoptose dans les effets bénéfiques des antihypertenseurs**

Dans la majorité des maladies cardiovasculaires, les fibroblastes cardiaques et les CML des gros vaisseaux prolifèrent, ce qui contribue à l'établissement, au maintien et/ou à l'aggravation de la maladie. Le point de vue traditionnel veut que les traitements ne peuvent que prévenir le développement de l'hyperplasie cardiovasculaire. Toutefois, nous avons proposé en premier que des médicaments sécuritaires et fréquemment prescrits en clinique peuvent renverser la situation. En utilisant le modèle du SHR, nous avons démontré que les antihypertenseurs capables de renverser l'hypertrophie cardiaque et/ou aortique induisent une apoptose transitoire dans ces organes (deBlois *et al.*, 1997; Tea *et al.*, 1999), survenant rapidement suite à l'initiation du traitement (à l'intérieur des dix premiers jours) pour ensuite retourner près des valeurs basales. Cependant, cela ne s'observe pas avec un vasodilatateur ne corrigeant pas l'hypertrophie, tel que l'hydralazine, suggérant une forte composante indépendante de la pression (deBlois *et al.*, 1997; Tea *et al.*, 1999). Ce concept d'apoptose thérapeutique prévaut déjà dans le domaine de la recherche contre le cancer et a été proposé pour le traitement de l'obésité (Kolonin *et al.*, 2004). Or, son application dans les thérapies cardiovasculaires fait office de nouveauté. Ainsi, Pollman *et al.* ont démontré pour la première fois en 1998 que dans une artère carotide de lapin, l'hyperplasie néointimale résultant d'une dénudation de l'endothélium

par un ballonnet peut être renversée par l'apoptose (Pollman *et al.*, 1998). Notre laboratoire a ensuite suggéré que des antihypertenseurs puissent aussi moduler l'apoptose néointimale afin de prévenir et de faire régresser la lésion vasculaire (Lemay *et al.*, 2000; Lemay *et al.*, 2001). Le rôle thérapeutique potentiel de l'induction de l'apoptose de CML dans l'hypertension pulmonaire, caractérisée par une hyperplasie de l'intima, a été démontré récemment dans des modèles expérimentaux à l'aide de multiples stratégies modulant l'apoptose (Cowan *et al.*, 2000a; Nishimura *et al.*, 2003; McMurtry *et al.*, 2005). De plus, plusieurs rapports démontrent que des inhibiteurs du SRA préviennent l'apoptose des cardiomyocytes lors de la transition vers l'insuffisance cardiaque, de même que l'apoptose rénale décrite plus haut. Une revue des différents effets des antihypertenseurs sur la modulation de l'apoptose cardiovasculaire présentera les prémisses des travaux réalisés dans le cadre de cette thèse.

#### **1.5.4.1 Modulation de l'apoptose rénale par les antihypertenseurs**

Plusieurs agents antihypertenseurs préviennent l'apoptose rénale (podocytes, cellules mésangiales et cellules tubulaires) dans les modèles expérimentaux et ralentissent la progression de la pathologie (Ding *et al.*, 2002; Lodha *et al.*, 2002; Bhaskaran *et al.*, 2003; Ono *et al.*, 2004; Durvasula *et al.*, 2004; Soto *et al.*, 2004; Wolf *et al.*, 2005). Le losartan prévient complètement l'apoptose tubulo-interstitielle (Aizawa *et al.*, 2001) suite à la perfusion d'Ang II (l'hydralazine ne la prévient qu'en partie); des BCC et des  $\beta$ -bloqueurs préviennent les dommages aux glomérules en inhibant l'apoptose dans la néphrosclérose hypertensive (Inada *et al.*, 2002; Zhou *et al.*, 2002) [l'hydrochlorothiazide exacerbe la pathologie (Ono *et al.*, 1996)]. La supériorité de certains agents serait reliée à l'atténuation du TGF- $\beta$  et/ou à une augmentation des kinines (Chao & Chao, 2005). En revanche, chez le SHR, plusieurs classes d'antihypertenseurs, sauf l'hydralazine, semblent augmenter transitoirement l'apoptose rénale (Tea, B.S. *et al.*, données non publiées), ce qui pourrait réduire l'excès de collagène en éliminant sélectivement des cellules interstitielles (fibroblastes?). Étant donné que la prévalence de l'insuffisance rénale dans la population hypertensive continue de croître, de nouvelles stratégies permettant de contrôler / renverser les dommages rénaux demeurent requises.

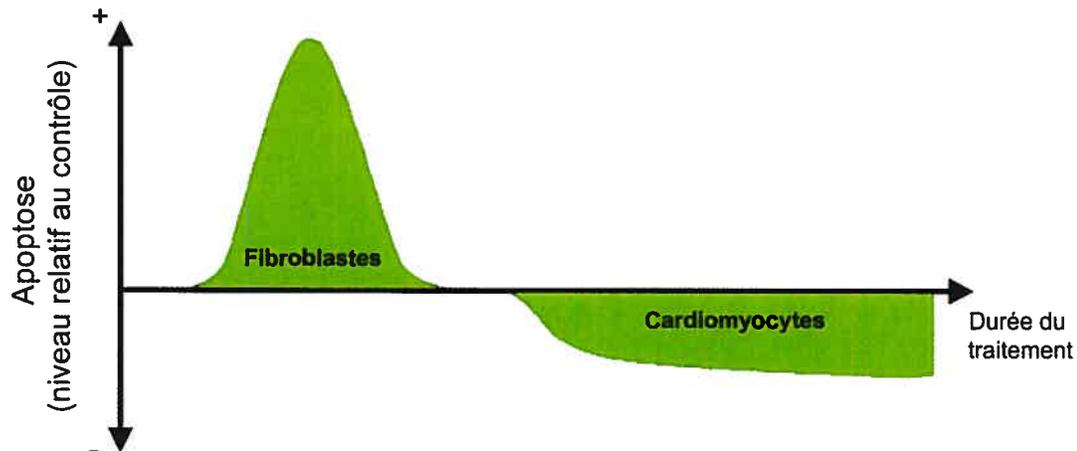
#### 1.5.4.2 Modulation de l'apoptose cardiaque par les antihypertenseurs

L'apoptose accrue de cardiomyocytes lors de la transition vers l'insuffisance cardiaque peut être prévenue par des iECA et des antagonistes AT<sub>1</sub>, que ce soit dans des modèles expérimentaux (SHR (Diez *et al.*, 1997; Li *et al.*, 1997b; Fortuno *et al.*, 1998; Groholm *et al.*, 2004), perfusion d'Ang II (Diep *et al.*, 2002), etc.) ou chez l'humain (Gonzalez *et al.*, 2002). Cet effet semble indépendant de la baisse de pression et corrèle plutôt, dans le cas des iECA, avec l'inhibition de l'ECA dans les ventricules (Diez *et al.*, 1997). Cette prévention de l'apoptose des cardiomyocytes à un moment crucial de la progression de la pathologie pourrait participer à la normalisation de l'espérance de vie du SHR (et du SHRSP) grâce à ces médicaments (Linz *et al.*, 1997; Linz *et al.*, 2000). Toutefois, une telle prévention de l'apoptose de cardiomyocytes n'a pu être observée chez des patients recevant l'amlodipine (Gonzalez *et al.*, 2002), quoique d'importantes différences entre les groupes avant le traitement nuisent à l'interprétation finale de ces données.

À l'opposé, nous avons suggéré que l'augmentation transitoire de l'apoptose cardiaque pourrait contribuer aux effets bénéfiques d'antihypertenseurs sur la structure cardiaque (Tea *et al.*, 1999). Les classes de médicaments présentant un tel effet incluent les iECA, les antagonistes AT<sub>1</sub>, les BCC et les  $\beta$ -bloqueurs (Tea *et al.*, 1999). Ainsi, chez de jeunes adultes SHR, l'inhibition de ECA ou le blocage des récepteurs AT<sub>1</sub> permet de renverser l'hyperplasie des non-cardiomyocytes en éliminant sélectivement les fibroblastes en excès par apoptose, alors qu'une simple baisse de pression avec l'hydralazine ne produit pas cet effet (Tea *et al.*, 1999; Der Sarkissian *et al.*, 2003). Une telle réduction du nombre de fibroblastes produisant du collagène participe possiblement aux effets bénéfiques des thérapies antihypertensives sur le développement de la fibrose cardiaque. Toutefois, la cinétique de l'apoptose dans le ventricule gauche de SHR traités avec un BCC, de même que le type cellulaire impliqué et sa distribution spatiale, demeurent inconnus.

Quelques explications réconcilient l'apparente contradiction entre le fait que les mêmes médicaments peuvent soit inhiber, soit activer l'apoptose cardiaque. Tout d'abord, l'apoptose cardiaque est contrôlée différemment lors de la progression de la maladie ou de

son traitement. Cette régulation temporelle permet l'élimination de fibroblastes en excès lors de l'initiation du traitement antihypertenseur chez un animal présentant une HVG compensée, alors qu'elle favorise la sauvegarde des cardiomyocytes lors du traitement antihypertenseur au moment où la préservation de la fonction cardiaque devient critique; ce concept est illustré à la figure 7.



**Figure 7. Effets des inhibiteurs du système rénine-angiotensine et des bloqueurs des canaux calciques sur l'apoptose dans le cœur hypertendu.**

À court terme, ces traitements renversent l'hyperplasie des fibroblastes en éliminant ceux en excès par une apoptose transitoire. À long terme, les inhibiteurs du SRA préservent la viabilité du myocarde en prévenant l'apoptose de cardiomyocytes (un tel effet demeure à confirmer en ce qui concerne les BCC). Un profil similaire pourrait décrire l'apoptose vasculaire en réponse à des inhibiteurs du SRA, avec cette fois une apoptose rapide et massive des CML (voir section suivante) en présence d'une survie accrue des cellules endothéliales. Adaptée de deBlois *et al.*, 2005.

D'un autre côté, le contrôle de l'apoptose cardiaque s'effectue de façon spécifique au type cellulaire, l'Ang II favorisant aussi bien la prolifération des fibroblastes et l'apoptose des cardiomyocytes via son récepteur  $AT_1$  (Sadoshima & Izumo, 1993; Horiuchi *et al.*, 1998). Ainsi, le losartan prévient l'apoptose de cardiomyocytes (Diep *et al.*, 1999) tandis qu'il atténue la prolifération et, parallèlement, la génération de signaux de survie vers les fibroblastes, accroissant leur susceptibilité à l'apoptose (Der Sarkissian *et al.*, 2003). La signalisation  $\beta$ -adrénergique représente un autre exemple de modulation de l'apoptose spécifique au type cellulaire, activant la mort de cardiomyocytes [via la voie de l'AMPC (Communal *et al.*, 1998; Iwai-Kanai *et al.*, 1999)] et la survie / prolifération de fibroblastes cardiaques [via la voie de PI3K / Akt (Colombo *et al.*, 2001)]. D'une façon

similaire aux bloqueurs du SRA, le contrôle de l'insuffisance cardiaque avec les  $\beta$ -bloqueurs est associé avec la prévention de l'apoptose de cardiomyocytes (Sabbah *et al.*, 2000), alors que le propranolol active l'apoptose de non-cardiomyocytes chez le jeune adulte SHR (Tea *et al.*, 1999).

#### **1.5.4.3 Modulation de l'apoptose vasculaire par les antihypertenseurs**

Comme il a été mentionné précédemment, les antihypertenseurs permettant de renverser l'hypertrophie aortique chez le SHR (iECA, antagoniste AT<sub>1</sub> et BCC) induisent également une apoptose transitoire et rapide de CML aortiques (deBlois *et al.*, 1997; Tea *et al.*, 2000; Marchand *et al.*, 2003; Der Sarkissian *et al.*, 2004). Pour une baisse de pression similaire, l'absence d'effet de l'hydralazine sur le remodelage aortique suggère la mise en place d'un mécanisme indépendant de la pression, bien que la baisse de débit sanguin (ou de la tension pariétale) puisse élever d'elle-même l'apoptose de CML dans certaines conditions (Cho *et al.*, 1997; Bayer *et al.*, 1999). Le laps de temps à l'intérieur duquel l'apoptose est détectée (fenêtre apoptotique) précède à la fois la réduction soutenue de la prolifération cellulaire (synthèse d'ADN) et la correction de la masse du vaisseau (deBlois *et al.*, 1997), suggérant que l'apoptose peut jouer un rôle important dans le déclenchement de la régression de l'hypertrophie aortique. Cette hypothèse a été testée en co-administrant à des SHR le losartan et l'inhibiteur général de caspases z-VAD-fmk : l'inhibition de l'apoptose par le Z-VAD-fmk, bien que sans effet sur l'action antihypertensive du losartan, a complètement prévenu la régression de l'hypertrophie du vaisseau, démontrant le caractère obligatoire de l'apoptose dans la correction du remodelage aortique pathologique (Marchand *et al.*, 2003). Lorsque le traitement se prolonge sur quatre semaines, aucune perte supplémentaire significative de CML n'est observée (deBlois *et al.*, 1997). De la même façon, lorsque la nifédipine est administrée de façon intermittente (traitement de deux semaines suivi d'une interruption de trois semaines puis d'un nouveau traitement de deux semaines), il n'y a pas de seconde vague d'apoptose permettant de réduire à nouveau le contenu aortique en ADN, même si une fragmentation de l'ADN se présente à nouveau (deBlois *et al.*, 2005). Un traitement à plus long terme (douze semaines) chez le SHR avec un iECA ou un BCC démontre que des protéines modulatrices de l'apoptose et la fragmentation de l'ADN demeurent élevées, favorisant une réduction soutenue de

l'hyperplasie vasculaire (Sharifi & Schiffrin, 1998). Étant donné que l'apoptose de CML en réponse à des antihypertenseurs semble survenir sélectivement dans les grosses artères plutôt que les petites, elle joue possiblement un rôle plus important dans le contrôle de la compliance vasculaire et de la progression de l'athérosclérose que dans le contrôle de la pression sanguine systémique.

Les mécanismes précis de l'induction de l'apoptose de CML *in vivo* par les trois classes de médicaments renversant l'hyperplasie aortique ne sont pas encore complètement compris et font l'objet des études décrites dans la présente thèse. Voici donc l'état des connaissances dans ce domaine, hormis les données qui seront présentées dans les chapitres des résultats.

#### *1.5.4.3.1 Apoptose des CML et les antagonistes AT<sub>1</sub>*

Les évidences *in vitro* actuelles montrant que le récepteur AT<sub>1</sub> augmente la croissance et la survie des CML alors que le récepteur AT<sub>2</sub> induit des effets opposés suggèrent que la stimulation unilatérale du récepteur AT<sub>2</sub> en présence d'un antagoniste AT<sub>1</sub> favoriserait l'apoptose, bien que des données contradictoires *in vivo* accordent aussi un effet pro-croissance au récepteur AT<sub>2</sub> (Levy *et al.*, 1996; Otsuka *et al.*, 1998). Dans notre modèle, le blocage des récepteurs AT<sub>2</sub> avec le PD123319 supprime l'induction de l'apoptose et la régression de l'hypertrophie aortique chez des SHR recevant le valsartan (Tea *et al.*, 2000). L'apoptose aortique induite par les antagonistes AT<sub>1</sub> implique donc la suractivation du récepteur AT<sub>2</sub> pro-apoptotique. Il a été rapporté que l'activation de caspase-3 et la diminution de l'expression de Bcl-2 surviennent avant l'activation de caspase-9 et l'expression accrue de Bax lors de l'apoptose de CML initiée par le losartan chez le SHR (Marchand *et al.*, 2003), suggérant que la voie mitochondriale intrinsèque amplifie plutôt qu'initie l'apoptose dans ce modèle. Toutefois, les événements survenant en aval du récepteur AT<sub>2</sub> et en amont de l'activation de Bax et des caspases demeurent inconnus.

#### 1.5.4.3.2 Apoptose des CML et les iECA

La co-administration de l'antagoniste AT<sub>2</sub> PD123319 avec l'énalapril ne prévient pas les effets pro-apoptotiques de celui-ci (Tea *et al.*, 2000), sans grande surprise puisque les iECA diminuent la stimulation des récepteurs AT<sub>1</sub> et AT<sub>2</sub>. De plus, étant donné que l'apoptose est absente lors d'un blocage combiné des récepteurs AT<sub>1</sub> et AT<sub>2</sub> (Tea *et al.*, 2000), une situation reproduisant l'inhibition de la production d'Ang II par les iECA, ceux-ci n'induisent vraisemblablement pas l'apoptose via une réduction d'Ang II.

D'autre part, nos plus récents résultats concernant l'apoptose vasculaire chez le SHR montrent que l'augmentation de la capacité du vaisseau à produire du NO (amplification de la fonction endothéliale par la co-administration du précurseur du NO, L-arginine, et du co-facteur de eNOS, le BH4) ne peut à elle seule initier l'apoptose de CML (Der Sarkissian *et al.*, 2004). Cependant, la supplémentation en L-arginine et BH4, lorsque combinée à l'administration de l'énalapril, devance l'induction de l'apoptose de CML, qui est alors activée en l'espace d'une semaine de traitement (Der Sarkissian *et al.*, 2004). Cela suggère que la correction de la dysfonction endothéliale obtenue avec un iECA ne constitue pas l'unique mécanisme menant à l'initiation de la réponse apoptotique, bien qu'elle puisse y participer activement. Il semblerait que l'énalapril sensibilise l'aorte de façon à ce que les CML médiales puissent ensuite tirer profit de l'efficacité accrue de eNOS à générer du NO, un inducteur connu de l'apoptose des CML. L'hypothèse actuelle suggère l'implication d'une autre cascade biochimique modulée par les iECA. À cet égard, la stimulation des récepteurs des kinines suite à la prolongation de la demi-vie de ces peptides par un iECA représente une possibilité plus qu'intéressante, puisque étant couplée à une hausse de l'activité de eNOS. Tel que mentionné précédemment, les kinines participent à plusieurs des effets bénéfiques ou secondaires des iECA. Leur récepteur constitutif RB<sub>2</sub> et leur récepteur inductible RB<sub>1</sub> peuvent relayer l'inhibition de la croissance des CML (Dixon & Dennis, 1997) ou de cellules mésangiales en culture notamment par un mécanisme faisant intervenir la phosphatase SHP-2 (Duchene *et al.*, 2002; Cellier *et al.*, 2003). De plus, dans des petites artères de rats, le RB<sub>1</sub> stimule la sphingomyélinase et la libération de céramide (Kleine *et al.*, 2002), un médiateur important dans l'induction de l'apoptose (notamment avec le récepteur AT<sub>2</sub>) (Hannun & Obeid, 1995; Gallinat *et al.*, 1999). En somme, le

mécanisme d'induction de l'apoptose par les iECA demeure inconnu et pourrait faire intervenir la voie des kinines et la production de NO.

#### *1.5.4.3 Apoptose des CML et les BCC*

Les BCC représentent la troisième classe d'antihypertenseurs pouvant induire l'apoptose de CML chez le SHR, comme démontré avec la nifédipine *in vivo* (deBlois *et al.*, 1997) et *in vitro* (Stead *et al.*, 2000) et avec l'amlodipine *in vivo* (Sharifi & Schiffrin, 1998). Toutefois, ni la corrélation temporelle entre l'induction de l'apoptose par les BCC et la régression de l'hypertrophie aortique, ni les mécanismes moléculaires impliqués dans l'induction de l'apoptose par les BCC n'ont été investigués jusqu'à présent. Étant donné que les trois classes d'antihypertenseurs étudiées chez le SHR (IECA, antagonistes AT<sub>1</sub> et BCC) éliminent tous environ 30% des CML aortiques, il est possible que ces médicaments induisent l'apoptose thérapeutique par des mécanismes modulant des voies endocrines distinctes convergeant vers des voies de signalisation intracellulaire apoptogéniques communes.

## **1.6 Considérations méthodologiques sur la mesure de l'apoptose *in vivo***

Les méthodes utilisées afin d'affirmer qu'une mort cellulaire programmée par apoptose a été enclenchée se basent sur les divers critères de détection soulevés à la section 1.5.1. La présente section offre une évaluation critique des méthodes employées.

### **1.6.1 Généralités**

Tout d'abord, il est essentiel de combiner ces méthodes afin d'agencer les multiples évidences permettant de décrire le processus apoptotique et d'éliminer la possibilité de la présence d'une autre forme de mort cellulaire, soit la nécrose. Des méthodes permettant une quantification adéquate de l'apoptose sont également requises afin de déterminer l'ampleur du processus dans un tissu donné. La méthode classique basée sur les critères morphologiques visualisés à l'aide de la microscopie optique et/ou électronique, bien que distinguant l'apoptose de la nécrose, se prête difficilement aux études *in vivo* prolongées sur quelques jours telles que celles présentées dans cette thèse. En effet, la méthode morphologique demeure très utile lorsque appliquée sur des cellules en culture entrant en apoptose sur un court laps de temps, mais la rapidité relative du processus apoptotique [seulement quelques heures entre l'initiation et l'éclatement en corps apoptotiques (Cho *et al.*, 1997)] fait en sorte qu'il est ardu d'utiliser ces critères pour identifier l'apoptose *in vivo* et surtout pour la quantifier. Il devient donc nécessaire d'employer d'autres méthodes, telles que celles basées sur la fragmentation internucléosomale de l'ADN et sur la détection de protéines régulatrices de l'apoptose, et de les appliquer sur des designs expérimentaux allant de la cinétique fine des réponses à un médicament (animaux sacrifiés à tous les jours du traitement) à l'étude de l'effet cumulatif du traitement (animaux sacrifiés après 3 ou 4 semaines de médication). De plus, les résultats obtenus avec ces méthodes devraient être corroborés par ceux résultant de l'analyse histologique / stéréologique du tissu permettant d'évaluer l'impact ultime de l'apoptose, soit la réduction du nombre de cellules dans un tissu donné. À l'inverse, une simple réduction de la densité cellulaire entre deux populations évaluées au même temps n'implique pas automatiquement la participation de

l'apoptose étant donné qu'une atténuation de la prolifération peut également produire un tel effet sur un tissu au temps de renouvellement relativement élevé. Il est donc essentiel de combiner plusieurs critères pour confirmer la présence d'un phénomène apoptotique.

### 1.6.2 Fragmentation internucléosomale de l'ADN

La détection d'un motif en barreaux d'échelles (*DNA ladder*) suite à l'électrophorèse de l'ADN sur gel d'agarose permet une évaluation relative de l'apoptose. Toutefois, l'importance du processus apoptotique, en terme de la quantité de cellules touchées, ne peut s'évaluer avec cette méthode puisque le degré de fragmentation de l'ADN varie énormément selon qu'une cellule se trouve en phase initiale ou terminale de l'apoptose. En effet, en phase terminale, l'ADN se trouve presque complètement à l'état fragmenté, ce qui génère un très fort signal de fragmentation, alors que si plusieurs cellules viennent tout juste d'entrer en apoptose, un faible signal sera décelé.

À l'opposé, la détection *in situ* (sur coupes de tissus) de la fragmentation internucléosomale de l'ADN suite à l'insertion par l'enzyme désoxynucléotidyl transférase terminale (Tdt) d'un nucléotide marqué permet quant à elle de quantifier adéquatement le nombre de noyaux apoptotiques, d'évaluer leur distribution à l'intérieur d'un tissu et même de déterminer le type cellulaire en apoptose en employant des techniques de double marquage (Gavrieli *et al.*, 1992). Par contre, les avantages de cette méthode nommée TUNEL (*Tdt-mediated dUTP nick-end labelling*) s'assombrissent par le fait que la Tdt peut incorporer le nucléotide marqué à des sites autres que ceux produits lors de l'apoptose, incluant les extrémités 3'-OH présentes lors de la synthèse d'ARN (Kockx *et al.*, 1998) (pouvant ainsi marquer les cellules en prolifération), lors de la réparation de l'ADN (Kano *et al.*, 1999) et sur les coupures franches du double brin d'ADN lors de la nécrose (Grasl-Kraupp *et al.*, 1995). Une telle limitation peut être contournée en incorporant plutôt, à l'aide de la T4 ligase, un oligonucléotide biotinylé en forme d'épingle à cheveux (*hairpin*); cette méthode est nommée ISOL (*in situ oligonucleotide ligation*) (Didenko *et al.*, 1998). Cet oligonucléotide, par sa configuration, ne peut se lier qu'aux sites de bris du double brin présentant une extrémité 3'-OH avec une seule base surplombant la coupure. Ces sites de coupure décalée d'une base apparaissent beaucoup plus spécifiquement lors de l'apoptose

que lors de la nécrose (Didenko & Hornsby, 1996; Didenko *et al.*, 1999). L'emploi du ISOL permet effectivement de réduire la présence de faux positifs détectés par le TUNEL (Lesauskaite *et al.*, 2004) ou encore de confirmer des résultats obtenus avec le TUNEL.

### **1.6.3 Protéines régulatrices de l'apoptose**

La participation des caspases à la réponse étudiée se détecte principalement de deux façons, soit en évaluant leur activité enzymatique, soit en évaluant leur expression. Premièrement, la capacité d'un extrait protéique à cliver un substrat fluorescent, reconnu spécifiquement par une des diverses caspases à l'intérieur d'une durée déterminée et la possibilité de bloquer cette action par l'ajout d'un inhibiteur spécifique de la caspase à l'étude, permet de calculer l'activité enzymatique propre à une caspase. Deuxièmement, en raison du fait que les caspases sont présentes dans les tissus sous la forme de zymogènes clivés lors de leur activation, il est possible d'employer la technique d'immunobuvardage de type Western pour déterminer un niveau relatif d'activation d'une caspase précise en ayant recours à un anticorps reconnaissant à la fois les formes latentes et actives de l'enzyme. Toutefois, dans un tissu complexe comme le cœur, il demeure impossible de déterminer quel(s) type(s) cellulaire(s) contribue(nt) aux modifications de l'expression des caspases. L'emploi d'anticorps, dirigés uniquement contre la forme active, sur des coupes histologiques (technique d'immunohistochimie) permet d'évaluer la distribution tissulaire des caspases activées et de déterminer le type cellulaire présentant une telle activation. De la même façon, l'expression de multiples autres protéines contrôlant l'apoptose, telles que Bax et Bcl-2, peut être évaluée semi-quantitativement à l'aide d'immunobuvardages de type Western.

### **1.6.4 Densité cellulaire et outils stéréologiques**

Une méthode générale pour évaluer la quantité de cellules consiste à mesurer quantitativement le contenu tissulaire en ADN. Toutefois, cette mesure présuppose que toutes les cellules possèdent la même quantité d'ADN et fait donc fi des cellules polyploïdes qui apparaissent dans le cœur et les vaisseaux lors de l'hypertension artérielle (Barrett *et al.*, 1983; Reilly *et al.*, 1988; Diez *et al.*, 1997). De plus, le contenu en ADN

représente à la fois l'impact d'un traitement, d'une pathologie, sur la synthèse ainsi que sur la dégradation de cet ADN. Bref, le contenu en ADN permet d'évaluer grossièrement la quantité de cellules dans un tissu donné et cette information se doit d'être confirmée par des méthodes évaluant la densité cellulaire. Bien que les décomptes de particules effectués sur une section isolée soient encore monnaie courante dans la majorité des sphères de recherche, une forte incertitude peut être introduite selon l'orientation, la forme et la taille des particules. Cela est à la base du débat qui sévit depuis fort longtemps dans ce domaine et qui remet en question la validité des données ainsi recueillies (Baddeley, 2001; Von, 2002), bien que des groupes considèrent toujours adéquate une telle méthode pour estimer une densité numérique d'objets (Benes & Lange, 2001). En revanche, les méthodes stéréologiques permettent de contourner ces biais et d'obtenir une évaluation plus juste des différentes variables à l'étude. Les outils stéréologiques visent à permettre la compréhension de l'arrangement structural tridimensionnel en se basant sur des coupes ne présentant de l'information qu'en deux dimensions (Mandarim-de-Lacerda, 2003), pour autant que les objets étudiés soit identifiables sans ambiguïté sur des sections parallèles ou des plans focaux successifs. Alors que la morphométrie constitue une méthode quantitative bidimensionnelle permettant une mesure directe, comme lorsque nous évaluons l'aire de section d'un vaisseau sur une coupe microscopique, la stéréologie emploie plutôt un système d'essai composé de points et de lignes formant une grille, une surface.

L'outil stéréologique nommé disecteur tridimensionnel, décrit pour la première fois en 1984 (Sterio, 1984), permet d'évaluer le nombre de particules arbitraires dans un volume déterminé sans introduire un biais relié à la taille, l'orientation ou la forme de ces particules. Cette méthode a été appliquée au réseau vasculaire l'année suivant son introduction et a permis de mettre en évidence une hyperplasie dans les artères mésentériques du SHR (Mulvany *et al.*, 1985). Cependant, le disecteur et l'emploi que nous en faisons ne sont pas à l'abri des critiques. Ainsi, certains biais (trop pointus pour être démontrés ici) demeurent inhérents à son utilisation sur des coupes histologiques préparées avec un microtome, soit le disecteur physique (Geuna, 2005). De plus, comme il est pratiquement impossible de couvrir toute l'aorte à une résolution de 400X avec le disecteur, nous devons choisir une région du vaisseau représentative de son ensemble, et cette sélection peut introduire une variabilité dans la méthode et les résultats obtenus. Au niveau

cardiaque, nous avons évalué le nombre de cellules à l'aide d'une analyse stéréologique en créant une grille de 165 points, et dont les détails sont fournis à la section 2.3. Cependant, nous n'avons pas travaillé à partir de coupes isotropiques ni uniformément randomisées (IUR) requises afin d'éliminer toute orientation du tissu et formant la base morphologique de l'utilisation de la stéréologie (Mandarim-de-Lacerda, 2003). Dans les organes présentant une structure homogène, tels que le foie et les glandes salivaires, il suffit de couper le tissu et de colorer les sections pour obtenir des coupes IUR. Par contre, dans les organes hétérogènes, comme le cœur et les reins, une technique supplémentaire appelée <<orienteur>> permet la production de coupes IUR (Mandarim-de-Lacerda, 2003). Toutefois, étant donné que nous avons analysé les photomicrographies provenant des différentes régions du ventricule gauche (sous-épicaarde, myocarde et sous-endocarde) séparément, et qu'individuellement, chacune de ces régions peut être considérée isotropique (non-orientée), les méthodes stéréologiques employées restent adéquates et valides.

## 1.7 Objectifs généraux

L'hypertrophie et l'hyperplasie cardiovasculaires sont couramment associées à l'hypertension artérielle et contribuent au développement des dommages aux organes cibles. Certains antihypertenseurs fréquemment employés en clinique permettent, en plus de la réduction efficace de la pression artérielle, de renverser l'hypertrophie cardiovasculaire, tandis que d'autres réduisent la pression sans toutefois corriger les divers remodelages pathologiques. Une hypertrophie cardiovasculaire marquée par une augmentation du contenu en ADN, telle qu'observée dans le ventricule gauche et dans l'aorte de SHR, est difficilement renversable puisqu'elle n'implique pas uniquement une réduction de l'accumulation de protéines: une normalisation du déséquilibre entre prolifération et mort cellulaire est requise. Les études initiales de notre laboratoire ont été les premières à démontrer que la régression de l'hypertrophie cardiovasculaire par diverses classes d'antihypertenseurs s'accompagne d'une phase transitoire d'apoptose touchant sélectivement les CMLs aortiques et les non-cardiomyocytes du ventricule gauche. Plus récemment, nous avons démontré le rôle obligatoire de cette apoptose avec les antagonistes  $AT_1$  dans l'initiation du remodelage cardiovasculaire. Toutefois, les mécanismes d'induction de l'apoptose avec les divers antihypertenseurs demeurent vagues.

L'objectif principal de cette thèse est donc de comprendre les mécanismes impliqués dans la phase précoce de la régression de l'hypertrophie cardiovasculaire lors du traitement antihypertensif, plus particulièrement l'identification des voies moléculaires déclenchant l'apoptose cardiaque et aortique en réponse aux iECA, aux antagonistes  $AT_1$  et aux BCC. Ainsi, en dessinant des études évaluant l'effet cumulatif des traitements et d'autres permettant de définir une cinétique plus détaillée des réponses observées, nous étudierons le rôle du système rénine-angiotensine et celui des kinines, la modulation de médiateurs clés de l'apoptose ainsi que l'implication, au niveau cardiaque, de divers types cellulaires. Notre hypothèse soutient premièrement que les mécanismes apoptotiques identifiés seront spécifiques au tissu étudié, suggérant des différences majeures entre les déterminants de la mort cellulaire cardiaque et aortique, et deuxièmement que des voies

apoptotiques communes, à l'intérieur d'un même tissu, seront recrutées par des antihypertenseurs de classes différentes.

Les deux premières études présentées (sections 3.1 et 3.2) ont été conçues de façon à déterminer le rôle des  $RB_2$  et  $RB_1$  des kinines dans l'apoptose cardiovasculaire en réponse à l'énalapril étant donné que les iECA élèvent les niveaux de kinines et initient une apoptose indépendante des récepteurs de l'Ang II au niveau aortique. Dans la section présentant des résultats additionnels (section 3.5), nous avons vérifié si les conclusions ainsi obtenues peuvent ou non être étendues à des antihypertenseurs de classes différentes, plus précisément aux antagonistes  $AT_1$  et aux BCC. Les troisième et quatrième études présentées dans cette thèse (sections 3.3 et 3.4, respectivement) ont été conçues de façon à définir la cinétique de la réponse apoptotique initiée par l'amlodipine, en corrélation avec la cinétique de la régression de l'hypertrophie aortique et cardiaque. Étant donné la rapidité de l'apoptose aortique observée avec ce BCC, la régulation de nombreux médiateurs apoptotiques a pu être définie, de façon à préciser les mécanismes intracellulaires recrutés. La conception de l'étude visant à caractériser l'apoptose cardiaque en réponse à ce BCC a par ailleurs également permis l'identification du type cellulaire ciblé.

## **CHAPITRE 2 – Méthodes et analyses**

La présente section offre une description des méthodes utilisées dans les prochains chapitres couvrant les résultats expérimentaux, et n'ayant pas été décrites en profondeur dans les sections « méthodologie » de ces articles scientifiques ou encore nécessitant des explications supplémentaires.

## 2.1 Fragmentation internucléosomale de l'ADN

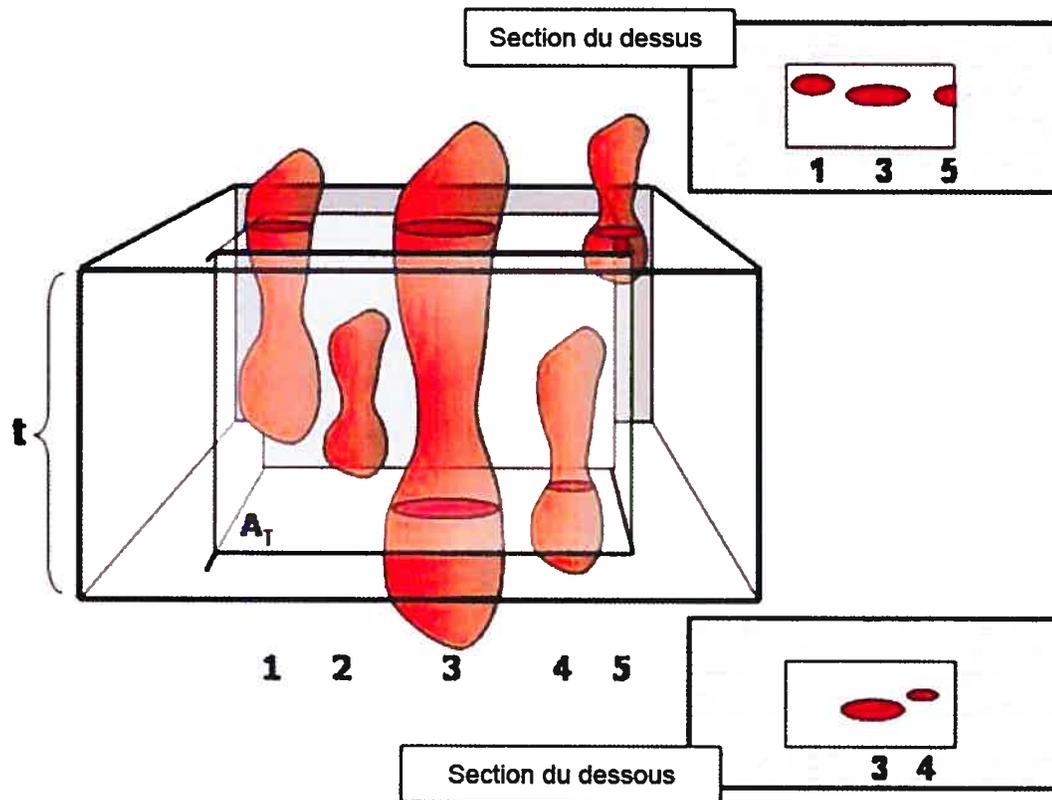
Le clivage de l'ADN sous l'action de DNAsés activées par la machinerie apoptotique génère des fragments qui présentent deux caractéristiques dont les méthodes de détection de l'apoptose prennent avantage, c'est-à-dire la présence de fragments dont la taille constitue un multiple de 180-200 paires de bases et la présence à l'extrémité 3' de ces fragments d'un groupement -OH libre suite à une coupure franche ou décalée du double brin d'ADN. Il devient alors possible d'insérer, sous l'action de la Tdt ou de la T4 ligase, un nucléotide marqué. Lorsque l'ADN extrait d'un tissu est ainsi marqué avec un nucléotide radioactif, généralement du  $^{32}\text{P}$ , l'étape suivante consiste à faire migrer cet ADN sur un gel d'agarose pour ensuite le déposer sur une membrane lors d'un transfert de type Northern. Le profil de radioactivité détecté sur une cassette ayant été exposée à cette membrane donnera un motif en barreaux d'échelle (*DNA ladder*) en présence d'une fragmentation apoptotique de l'ADN, à l'opposé de la traînée n'arborant aucun motif particulier plutôt caractéristique d'un phénomène nécrotique (Wyllie, 1980). Une telle détection de la fragmentation de l'ADN permet ainsi de distinguer des différences relatives entre les groupes expérimentaux.

La détection *in situ* de la fragmentation de l'ADN par la méthode TUNEL a été appliquée au ventricule gauche des SHR lors de l'étude de la cinétique de la réponse à l'amlodipine (section 3.4). Suite à la fixation du tissu dans la paraformaldéhyde 4% et à son inclusion dans un bloc de paraffine, des coupes d'une épaisseur de 5  $\mu\text{m}$  ont été produites au microtome. Ces coupes, déposées sur des lames de microscope, ont été déparaffinées et réhydratées avant d'être traitées avec une solution de saponine-EGTA. La réaction enzymatique permettant l'attachement de dUTP (2'-Désoxyuridine 5'-Triphosphate) biotinylé aux fragments 3'-OH libres a été réalisée avec la Tdt pendant 40 minutes, à 37°C. Suite à l'arrêt de cette réaction avec une solution contenant 0,5% de lait en poudre et 0,1% du détergent Triton X-100, les noyaux marqués ont été révélés par l'incubation des lames pendant une heure à la température ambiante avec la streptavidine couplée au fluorochrome AMCA (*7-Amino-4-Methylcoumarin-3-acetic Acid*). Les contrôles négatifs appropriés ont été réalisés, soit l'omission du nucléotide marqué, de l'enzyme Tdt ou de la streptavidine couplée au fluorochrome. Tous les noyaux TUNEL-positifs sur une section entière du

ventricule gauche ont été comptés à 400X. Le pourcentage de noyaux TUNEL-positifs a été déterminé en divisant ce nombre par la quantité de cellules présentes sur la coupe, évaluée à partir de la variable  $N_A$  décrite au point 2.3.

## 2.2 Nombre de cellules dans l'aorte

L'outil stéréologique appelé disecteur (Sterio, 1984) a été utilisé pour déterminer l'effet des traitements sur le nombre de cellules dans l'aorte. Lorsque la densité numérique ( $N_V$ ) ainsi déterminée (nombre de cellules /  $\text{mm}^3$ ) est multipliée par l'aire du vaisseau ( $\text{mm}^2$ ), nous obtenons le nombre de cellules par unité de longueur. Le paramètre  $N_V$  s'obtient en analysant un jeu de trois sections (photomicrographies) parallèles, consécutives, d'épaisseur connue (3  $\mu\text{m}$ ). Les noyaux présents sur la section du dessus sont suivis sur les deux sections subséquentes et le nombre d'extrémités de noyaux ayant disparus est divisé par le volume du disecteur (hauteur du disecteur multipliée par l'aire du cadre formé par le disecteur). Une présentation schématisée du disecteur se trouve à la figure 8.



**Figure 8. Schéma présentant la technique du disecteur tridimensionnel**

Cette méthode permet de déterminer une densité numérique ( $N_V$ ) de particules dans un tissu biologique. Dans cet exemple, seulement la particule #1 est présente au début et absente à la fin. La particule #5 a disparu en cours de route, mais elle se trouve sur une ligne interdite dont toutes les particules la touchant ne sont pas comptabilisées afin d'éviter une surestimation de la densité (Gundersen, 1977), tandis que la particule #3 est toujours présente sur le section du dessous et la #4 est apparue en cours de route. Adaptée de Mandarim-de-Lacerda, 2003.

## 2.3 Nombre de cellules dans le ventricule gauche

Au niveau du ventricule gauche, nous avons choisi d'utiliser une combinaison de méthodes morphométriques et stéréologiques afin d'évaluer la densité numérique de cellules ainsi que le nombre total de cellules dans le ventricule gauche, comme employé par Anversa *et al.* (1992). Les cellules du ventricule gauche ont été catégorisées en cardiomyocytes et en non-cardiomyocytes. En analysant morphométriquement plusieurs photomicrographies de sous-régions du ventricule gauche (sous-épicaarde, myocarde et sous-endocarde) d'un même animal, nous avons pu déterminer d'abord la densité numérique de chaque type cellulaire par surface ( $N_A$  = nombre de cellules sur la surface

divisé par l'aire de la surface) et ensuite la densité numérique de chaque type cellulaire par volume ( $N_V = N_A$  divisé par le diamètre moyen de la cellule). Afin de raffiner cette méthode, il serait possible de créer un disecteur optique pour évaluer la densité numérique  $N_V$ , comme rapporté par Aguila *et al.* (2005). Par la suite, nous avons commencé l'analyse stéréologique en créant une grille de 165 points et nous avons poursuivi en déterminant le nombre de cardiomyocytes touchant à un point ( $V$ ), la densité volumique de cardiomyocytes sur la grille ( $V_V = V$  divisé 165) et le volume total occupé par les cardiomyocytes ( $V_T = V_V$  multiplié par le volume du ventricule gauche). La dernière étape, permettant d'estimer le nombre total de cardiomyocytes dans le ventricule gauche ( $N_T$ ), consiste à multiplier  $N_V$  par  $V_T$ . Une procédure similaire a permis l'estimation du nombre de non-cardiomyocytes dans le ventricule gauche.

## **CHAPITRE 3 – Résultats**

### **3.1 Publication N°1**

## **Kinin B<sub>2</sub> Receptor Is Not Involved in Enalapril-induced Apoptosis and Regression of Hypertrophy in Spontaneously Hypertensive Rat Aorta: Possible Role of B<sub>1</sub> Receptor**

participation des différents auteurs de cette publication :

D Duguay: Conceptualisation de l'étude, stratégie expérimentale, expériences, analyses des résultats et écriture de l'article

SDS: Conceptualisation de l'étude

RK: Expériences

BO: Expériences

RC: Stratégie expérimentale

D deBlois: Conceptualisation de l'étude, analyses des résultats et écriture de l'article

**Kinin B<sub>2</sub> Receptor Is Not Involved in Enalapril-induced Apoptosis and Regression of Hypertrophy in Spontaneously Hypertensive Rat Aorta: Possible Role of B<sub>1</sub> Receptor**

*British Journal of Pharmacology 2004;141:728-736*

<sup>1</sup>David Duguay, <sup>1</sup>Shant Der Sarkissian, <sup>1</sup>Rémi Kouz, <sup>2</sup>Brice Ongali, <sup>2</sup>Réjean Couture & <sup>\*1</sup>Denis deBlois

Short title: Duguay *et al.* – Vascular hyperplasia regression with enalapril

<sup>1</sup>Department of Pharmacology, Université de Montreal Hospital (CHUM) Research Center  
3840, St-Urbain St., room 7-132B, Montréal, PQ Canada H2W 1T8;

<sup>2</sup>Department of Physiology, Université de Montréal, Montréal, PQ Canada H3C 3J7  
Tel. (514) 890-8000 ext.12919, Fax: (514) 412-7152, email: denis.deblois@umontreal.ca

\*Author for correspondence

### 3.1.1 Summary

- 1 Treatment with enalapril induces smooth muscle cell apoptosis and regression of aortic hypertrophy in spontaneously hypertensive rats (SHR), whereas combined blockade of angiotensin II AT<sub>1</sub> and AT<sub>2</sub> receptors does not. We postulated that vascular apoptosis with enalapril involves enhanced half-life of bradykinin (BK) and kinin B<sub>2</sub> receptor stimulation.
- 2 Eleven-weeks old SHR were treated for 4 weeks with enalapril (30 mg kg<sup>-1</sup> d<sup>-1</sup>), Hoe 140 (500 µg kg<sup>-1</sup> d<sup>-1</sup>; B<sub>2</sub> receptor antagonist), alone or in combination. Controls received vehicle.
- 3 The half-life of hypotensive responses to intra-arterial bolus injections of BK were significantly increased in SHR anesthetized after 4 weeks of enalapril, an effect prevented by Hoe 140. The magnitude of BK-induced hypotension was significantly attenuated in all rats treated with Hoe 140
- 4 As compared to placebo, enalapril treatment significantly reduced blood pressure (-34±2%), aortic hypertrophy (-20±3%), hyperplasia (-37±5%) and DNA synthesis (-61±8%), while it increased aortic DNA fragmentation by twofold. Hoe 140 given alone or in combination with enalapril affected none of these parameters.
- 5 As a possible alternative mechanism, aortae isolated during the second week of enalapril treatment showed a transient up-regulation of contractile responses to des-Arg<sup>9</sup>BK (EC<sub>50</sub><1 nM) which were significantly reduced by [Leu<sup>8</sup>]des-Arg<sup>9</sup>BK (10 µM). Moreover, *in vitro* receptor autoradiography revealed an increase in expression of B<sub>1</sub> and B<sub>2</sub> receptor binding sites by 8-11 days of enalapril treatment.
- 6 Aortic apoptosis induction and hypertrophy regression with enalapril does not involve kinin B<sub>2</sub> receptors in SHR. Kinins acting via B<sub>1</sub> receptors remains a candidate mechanism.

**Keywords:** Hypertension; vascular hypertrophy; apoptosis; enalapril; kinin B<sub>2</sub> receptor, kinin B<sub>1</sub> receptor

**Abbreviations:** ACE, Angiotensin I-converting enzyme; ACEi, ACE inhibitor; AT<sub>1</sub>, Angiotensin II type 1 receptor; BK, bradykinin; dBK, des-Arg<sup>9</sup>-

bradykinin; LVH, left-ventricular hypertrophy; SHR, Spontaneously hypertensive rats; SMC, smooth muscle cells; WKY, Wistar-Kyoto.

### 3.1.2 Introduction

The development of hypertension is accompanied by cardiovascular hypertrophy and by enhanced growth of cardiac fibroblasts and vascular smooth muscle cells (SMC) (Folkow, 1982; Hamet *et al.*, 2001; Lee *et al.*, 1995). In a genetic model of primary hypertension with low renin but high tissue angiotensin I-converting enzyme (ACE) levels, the spontaneously hypertensive rat (SHR), dysregulation of cell proliferation and death contributes to increased cardiovascular mass and DNA content (Hamet *et al.*, 1996; Thorin-Trescases *et al.*, 2001; Walter & Hamet, 1986). We previously reported that a transient burst of SMC apoptosis participates in the early phase of aortic mass regression in SHR treated with a variety of anti-hypertensive drugs (deBlois *et al.*, 1997; Marchand *et al.*, 2003; Tea *et al.*, 2000). In losartan-treated SHR, onset regression of vascular hypertrophy is blocked by the co-administration of the caspase inhibitor z-VAD-fmk suggesting an obligatory role for SMC apoptosis in this model of rapid vascular mass regulation (Marchand *et al.*, 2003). The transient increase in vascular SMC apoptosis follows a time-window that occurs within one week of treatment with AT<sub>1</sub> receptor antagonists and around two weeks of treatment with an ACE inhibitor (ACEi) (deBlois *et al.*, 1997; Tea *et al.*, 2000). In contrast, blood pressure reduction follows a similar time course with both treatments. The different time-course of apoptosis induction suggests that the underlying mechanisms differ for the two classes of drugs. We previously showed that regression of vascular mass and hyperplasia by valsartan is prevented completely by an antagonist of AT<sub>2</sub> receptors (PD123319), suggesting the implication of this receptor in SMC apoptosis induced by AT<sub>1</sub> receptor antagonists (Tea *et al.*, 2000). Because ACEi reduce angiotensin II generation, this results in a reduced stimulation of AT<sub>1</sub> and AT<sub>2</sub> receptors. Since combined blockade of AT<sub>1</sub> and AT<sub>2</sub> receptors fails to induce vascular apoptosis in rats treated with valsartan + PD123319 for 2 weeks (Tea *et al.*, 2000), these data further suggest distinct pathway for ACEi and AT<sub>1</sub> antagonists in regulating SMC apoptosis in this model.

ACEi increase the half-life of kinins (Bhoola *et al.*, 1992). Kinin B<sub>2</sub> receptors contribute to the prevention of cardiovascular growth by ACEi in several models (Benetos *et al.*, 1997; Farhy *et al.*, 1993; Linz and Schölkens, 1992; Linz *et al.*, 1995), although the role of kinins in regression of cardiovascular mass is less well defined (Black *et al.*, 1996). The augmentation in the circulating levels of bradykinin could lead to apoptosis via the increased stimulation of B<sub>2</sub> receptors and the subsequent increased release of nitric oxide, a known inducer of SMC apoptosis (Ishigai *et al.*, 1997; Pollman *et al.*, 1996). We therefore investigated the hypothesis that kinin B<sub>2</sub> receptors are involved in the regression of aortic and cardiac DNA accumulation via apoptosis induced in SHR treated with enalapril.

### 3.1.3 Methods

#### Animal procedure

Male SHR weighing 250 to 275 g were purchased from Charles-River (St-Constant, Canada) and housed for at least 1 week before initiation of drug treatment at 11 weeks of age. SHR (n=9 to 10 per group) were randomly assigned to a 4-week treatment with the ACEi enalapril (30 mg kg<sup>-1</sup> day<sup>-1</sup>) in the drinking water, the selective kinin B<sub>2</sub> receptor antagonist Hoe 140 (500 µg kg<sup>-1</sup> day<sup>-1</sup>) by continuous subcutaneous infusion with an 2ML4 osmotic minipump (Alzet, CA, U.S.A.) or a combination of both drugs. Hoe 140 was dissolved in saline. Control animals received vehicle. Age-matched Wistar-Kyoto (WKY) rats received vehicle and were used for the determination of vascular smooth muscle cell number. Food and water were administered ad libitum. Systolic blood pressure and heart rate were determined by tail-cuff plethysmography in conscious, restrained rats at -1, 4 and 25 days of treatment as previously described (deBlois *et al.*, 1997). Rats were anesthetized with a single subcutaneous injection of ketamine (80 mg kg<sup>-1</sup>), xylazine (4 mg kg<sup>-1</sup>) and acepromazine (2 mg kg<sup>-1</sup>). To evaluate DNA synthesis *in vivo*, rats were injected intravenously with [<sup>3</sup>H]-thymidine (0.5 mCi kg<sup>-1</sup>) 1.5 hour before death (Tea *et al.*, 1997). Rats were killed by an intravenous injection of 1.5 ml CdCl<sub>2</sub> (100 mmol L<sup>-1</sup>) via the vena cava to induce diastolic cardiac arrest. Ventricles were isolated, separated and weighed. The thoracic aorta was isolated as previously described (deBlois *et al.*, 1999) and a 3 mm-long ring of aorta was cut between the third and fourth intercostal arteries after weighing the vessel. The aortic rings were fixed in 4% paraformaldehyde overnight and processed

according to routine histological procedures for morphometric measurements in cross-sections of paraffin-embedded arteries. The cardiac tissue and aortic media (without endothelium) were immediately frozen in liquid nitrogen and stored at  $-80^{\circ}\text{C}$  until analysis.

To validate that chronic Hoe 140 treatment resulted in  $B_2$  receptor blockade, we examined the magnitude and half-life (time of half-recovery from the maximal response) of the hypotensive response following an intra-arterial bolus injection of BK as previously described (Drapeau *et al.*, 1991). Before killing, catheters (PE-50) were placed in a carotid artery in a subset of anesthetized rats ( $n= 4$  to 7 per group). Blood pressure was measured by a calibrated pressure transducer. When blood pressure stabilized, BK (0.01-1.00  $\mu\text{g}$  in 0.1 ml saline) was administered intra-arterially and the hemodynamic response was recorded. All animal manipulations were conducted according to institutional guidelines.

### **Hypertrophy and hyperplasia measurements**

The medial cross-sectional area was evaluated in 3  $\mu\text{m}$ -thick, hematoxylin-stained sections of aorta. Photomicrographs were taken at 40X magnification, digitized, and analyzed using the NIH Image 1.61 program (developed at the National Institute of Health; <http://rsb.info.nih.gov/nih-image/>). Vascular cross-sections were used to measure smooth muscle cell number per unit of length in the aortic media using the three-dimensional disector method as previously described (deBlois *et al.*, 1997). The left and right ventricle weights to body weight ratio were evaluated separately.

### **DNA analysis**

The whole aortic media was homogenized in liquid nitrogen using a mortar and pestle. An aliquot of the pulverized aortic media was weighed and total tissue DNA was extracted by the phenol and chloroform procedure, following tissue digestion steps with proteinase K and RNase A in the presence of EDTA (Teiger *et al.*, 1996). DNA concentration was determined by spectrophotometry and DNA content per unit of aortic length was calculated. DNA synthesis in the aortic media was quantified by evaluating [ $^3\text{H}$ ]-thymidine incorporated using the extracted DNA. The degree of oligonucleosomal

DNA fragmentation, a hallmark of apoptosis, in the aortic media was quantified as previously described (deBlois *et al.*, 1997). Briefly, 1  $\mu\text{g}$  of extracted DNA was radiolabeled on free 3'OH ends using terminal deoxynucleotidyl transferase and [ $^{32}\text{P}$ ]-dCTP. Increasing quantities of radiolabeled DNA (0.05, 0.1, 0.2 and 0.4  $\mu\text{g}$ ) were loaded in adjacent lanes of 1.5% agarose gels. After electrophoresis, DNA was transferred onto nylon membrane (Hybond N+, Amersham) and exposed to a  $^{32}\text{P}$ -sensitive screen. Radioactivity associated with 150 to 1500 bp DNA fragments (part of the "DNA ladder") was quantified using a PhosphoImager (Molecular Dynamics). Mean optical density per pixel for each lane was divided by the corresponding value obtained with an internal standard in the gel (1  $\mu\text{g}$   $\lambda\text{DNA}/\text{HindIII}$  fragments that underwent the same process). For each sample, the 4 values were plotted against quantity of DNA loaded on the gel and the slope of the linear regression was defined as the "DNA fragmentation index" (arbitrary units  $\mu\text{g}^{-1}$  DNA). The same procedures were performed on the homogenized left and right ventricles to determine their DNA content, DNA synthesis and DNA fragmentation. Rats that received the intra-arterial bolus injections of BK were not used for evaluation of DNA synthesis.

### **Vasoreactivity**

To evaluate the possible involvement of kinin B<sub>1</sub> receptors in ACEi-induced SMC apoptosis, their function was evaluated in 11 weeks-old male SHR also purchased from Charles-River (St-Constant, Canada). SHR (n=4 to 7 per group) were treated or not with enalapril (30 mg  $\text{kg}^{-1}$   $\text{day}^{-1}$ ) in the drinking water for 8 to 14 days, a time-period corresponding to SMC apoptosis induction with enalapril (deBlois *et al.*, 1997). The animals were then sacrificed by CO<sub>2</sub> inhalation and the aorta was immediately isolated, placed in ice-cold saline solution, and cleaned free of adventitial tissue. Vessels were cut into 3 mm-long rings and placed at 37°C in organ chambers filled with oxygenated Krebs solution containing in mM: dextrose, 11; NaCl, 117.5; MgSO<sub>4</sub>, 1.18; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1.2; NaHCO<sub>3</sub>, 25; KCl, 4.7; CaCl<sub>2</sub>, 2.5. Isometric contractions and relaxations were measured with the use of isometric force transducers (Harvard Apparatus Canada), a digital data acquisition system (Model MP100, Biopac System, Harvard). The arterial rings were placed under 2 g of tension and allowed to stabilize for 1 h before control stimulation with KCl (70 mM). After a 30 min recuperation period, acetylcholine (1  $\mu\text{M}$ ) was added to

phenylephrine (100 nM)-precontracted vessels to verify endothelial integrity. After a 1 h recuperation period, enalapril (0.1 mM) was added to prevent agonist degradation and the rings were stimulated with cumulative concentrations of des-Arg<sup>9</sup>bradykinin (dBK; 1-1000 nM) in absence or presence of the B<sub>1</sub> antagonist [Leu<sup>8</sup>]dBK (10 μM). In a subset of tissues, responses were recorded in the presence of indomethacine (100 μM – stock solution prepared in Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 0.1 mM). Vasoactive responses were expressed in mg.

### **Tissue preparation for autoradiography**

Immediately after sacrifice, aortae were removed and a segment (with endothelium) was frozen in 2-methyl butane cooled at -45 to -55 °C with liquid nitrogen, and then stored at -80 °C until use. Matched aorta segments of ten rats (4 untreated SHR and 6 SHR treated for 8 to 11 days with enalapril) were mounted together in a gelatine block and serially cut into 20 μm thick coronal sections with a cryostat fixed at temperature varied between -10 to -13 °C. A total of six sections per slide were then alternatively thaw-mounted on 0.2 % gelatine / 0.033 % chromium potassium sulphate coated slides. Two slides were taken for the total binding and one slide (adjacent sections) for the non specific binding. A total of 9 slides were produced for each receptor per animal giving 180 sections for all the study. Slides were then kept at -80 °C until use.

### ***In vitro* receptor autoradiography**

Mono-iodinated peptide radioligands were prepared as described previously (Cloutier *et al*, 2002; Ongali *et al*, 2003) and had a specific activity corresponding to 2000 cpm fmol<sup>-1</sup> or 1212 Ci mmol<sup>-1</sup>. Aortic sections were thawed and incubated at room temperature for 90 min in 25 mM PIPES buffer (pH 7.4; 4 °C) containing 1 mM 1,10-phenanthroline, 1 mM dithiothreitol, 0.014% bacitracin, 0.1 mM captopril, 0.2% bovine serum albumine (protease free) and 7.5 mM magnesium chloride in the presence of 150 pM of [<sup>125</sup>I]HPP-Aca-Lys[β-D-Nal<sup>7</sup>, Ile<sup>8</sup>]des -Arg<sup>9</sup>BK (for B<sub>1</sub> receptor) or 200 pM [<sup>125</sup>I]HPP-Hoe 140 (for B<sub>2</sub> receptor). The concentration chosen for [<sup>125</sup>I]HPP-Hoe 140 was based on previous studies (Cloutier *et al.*, 2002) while that of [<sup>125</sup>I]HPP-Aca-Lys[β-D-Nal<sup>7</sup>, Ile<sup>8</sup>]des-Arg<sup>9</sup>BK was based on preliminary experiments that provided maximal specific binding

(B<sub>max</sub>) at 150 pM with a dissociation constant (K<sub>d</sub>) of 54 pM (unpublished data). The non-specific binding was determined in the presence of 1 μM of unlabelled ligands HPP-Aca-Lys[β-D-Nal<sup>7</sup>, Ile<sup>8</sup>]des Arg<sup>9</sup>BK for B<sub>1</sub> receptor and HPP-Hoe 140 for B<sub>2</sub> receptor. At the end of the incubation period, slides were transferred sequentially through four rinses of 4 min each in 25 mM PIPES (pH 7.4; 4 °C) and dipped for 15 s in distilled water (4 °C) to remove the excess of salts and air-dried. Kodak Scientific Imaging Films BIOMAX TM MS<sup>®</sup> were juxtaposed onto the slides in the presence of [<sup>125</sup>I]-microscales and exposed at room temperature for 2 days for both radioligands.

The films were developed in D-19 (Kodak developer) and fixed in Kodak Ektaflo. Autoradiograms were quantified by densitometry using an image analysis system (MCID<sup>TM</sup>, Imaging Research Inc., Ontario, Canada). A standard curve from [<sup>125</sup>I]-microscales was used to convert density levels into femtomoles per milligram of tissue (fmol mg<sup>-1</sup> tissue). Specific binding was determined by subtracting values of non-specific labelling from that of total binding.

### Drugs & Materials

Hoe 140 was graciously supplied by Aventis Pharma (Montreal, Canada). Ketamine and acepromazine were from Ayerst (Montreal, Canada). Xylazine was from Bayer (Etobicoke, Canada) and [<sup>3</sup>H]-thymidine was from ICN (CA, U.S.A.). HPP-Aca-Lys[β-D-Nal<sup>7</sup>, Ile<sup>8</sup>]des-Arg<sup>9</sup>BK (3-4 hydroxyphenyl-propionyl-Aca-Lys[β-D-Nal<sup>7</sup>, Ile<sup>8</sup>]des-Arg<sup>9</sup>BK) and HPP-Hoe 140 (3-4 hydroxyphenyl-propionyl-D-Arg[Hyp<sup>3</sup>, Thi<sup>5</sup>, D-Tic<sup>7</sup>, Oic<sup>8</sup>]-BK) were developed from the selective B<sub>1</sub> receptor antagonists R715 or Aca-Lys[β-D-Nal<sup>7</sup>, Ile<sup>8</sup>]des-Arg<sup>9</sup>BK (Neugebauer *et al.*, 2002) and the B<sub>2</sub> receptor antagonist Hoe 140 or Icatibant (Hock *et al.*, 1991), respectively. They were kindly supplied by Dr W. Neugebauer (Department of Pharmacology, Université de Sherbrooke, Sherbrooke, Canada). Autoradiographic [<sup>125</sup>I]-microscales (20 μm) and Kodak Scientific Imaging Films BIOMAX TM MS<sup>®</sup> (double-coated, 24x30 cm) were purchased from Amersham Pharmacia Biotech Canada. All other chemicals were purchased from Sigma-Aldrich Canada.

### Statistical analysis

Data were analyzed by analysis of variance and unpaired Student's *t* test with Bonferroni correction for multiple comparisons when appropriate. DNA synthesis in aorta was analyzed using the nonparametric tests Kruskal-Wallis followed by Mann-Whitney because of unequal variance between the groups. Values are presented as mean  $\pm$  standard error of the mean (SEM) and  $p < 0.05$  was considered statistically significant.

## 3.1.4 Results

### Systemic and hemodynamic changes with therapy

Mean body weight of rats before treatment was  $260 \pm 2$  g ( $n=38$ ). All rats gained weight during the experimental period and final values of body weight were similar between all groups (not shown). Daily water consumption significantly increased by 35% in rats treated with enalapril or enalapril + Hoe 140. Rats used in this study were hypertensive before initiation of treatments, with an average systolic blood pressure of  $183 \pm 2$  mmHg ( $n=38$ ). Figure 1 shows the evolution of systolic blood pressure in control and treated rats over the 4-week experimental period. A significant reduction ( $p < 0.0001$ ) in systolic blood pressure was observed after 4 days of treatment in groups treated with enalapril with or without Hoe 140. At the end of the treatment with enalapril, systolic blood pressure was reduced by 34% vs control group ( $207 \pm 4$  mmHg,  $p < 0.0001$ ). Co-administration of Hoe 140 had no effect on blood pressure lowering induced by enalapril. Heart rate was not different between control and experimental groups before and after treatment (control pretreatment values:  $370 \pm 8$  bpm;  $n=9$ ). In order to validate the effective blockade of kinin B<sub>2</sub> receptors, a subset of rats were cannulated via the carotid artery as described in methods. Figure 2A shows the dose-response relationship between BK and the magnitude of the hypotensive response. Administration of 0.01 and 0.10  $\mu$ g BK intraarterially after the 4-week therapy induced a significantly smaller hypotension in both groups receiving Hoe 140 as compared to control and enalapril groups. As seen on figure 2B, enalapril treatment induced a significantly longer half-life for BK-induced hypotensive responses versus control and this effect was abolished by the co-treatment with Hoe 140 at doses of 0.01, 0.10 and 1.00  $\mu$ g of BK.

### **Vascular remodeling**

After 4 weeks of treatment, vascular mass was significantly reduced in enalapril-treated rats, as evaluated by the aortic cross-sectional area (20% reduction vs control:  $521 \pm 12 \mu\text{m}^2 \times 10^3$ ,  $p < 0.0001$ , Fig 3A). The vascular growth regression was further analyzed by evaluating aortic DNA content per length of vessel. Enalapril reduced aortic DNA content (37% reduction vs control:  $1.65 \pm 0.15 \mu\text{g mm}^{-1}$ ,  $p = 0.003$ ). SMC number in the arterial wall was evaluated by the three-dimensional disector method (Fig 3B). The number of SMC per unit of vessel length in control SHR ( $114 \pm 6$  SMC per  $\mu\text{m}$ ) was similar to previously published results (Owens, 1987; Tea *et al.*, 2000). Control SHR showed SMC hyperplasia in comparison to the value obtained in age-matched WKY ( $85 \pm 6$  SMC per  $\mu\text{m}$ ,  $p < 0.0001$ ). In SHR treated with enalapril, this value was reduced to  $72 \pm 4$  SMC per  $\mu\text{m}$  ( $p < 0.0001$  vs untreated SHR). To test whether kinins play a role in enalapril-induced SMC apoptosis, we evaluated the DNA fragmentation index as described in methods. A sustained elevation of fragmentation in DNA extracted from thoracic aorta was observed with enalapril when compared to untreated rats (Fig 3C and Fig 4). Treatment with enalapril caused a significant reduction in DNA specific activity in thoracic aorta as shown in Fig 3D (61% reduction vs control:  $406 \pm 38$  cpm  $100 \mu\text{g DNA}^{-1}$ ,  $p = 0.001$ ). The co-administration of Hoe 140 did not modulate any of these actions of enalapril and Hoe 140 given alone affected none of these parameters (aortic cross-sectional area, SMC number, DNA content, DNA fragmentation and DNA synthesis).

### **Functional and expression evidence of kinin B<sub>1</sub> receptor induction**

We evaluated the functional response of SHR aorta when stimulated with a kinin B<sub>1</sub> receptor agonist (dBK) after 0 to 14 days of enalapril treatment. dBK elicited a contraction response significantly higher after 8-9 days of treatment compared to control animals and it was back to control values after 14 days of therapy (Fig 5A). dBK-induced contractions were significantly reduced in the presence of [Leu<sup>8</sup>]dBK ( $10 \mu\text{M}$ ), a competitive B<sub>1</sub> receptor antagonist (Fig 5B) but were not affected by the presence of indomethacine (not shown). Autoradiograms show the distribution of total and non-specific B<sub>1</sub> and B<sub>2</sub> receptors binding sites in the wall of aortae from SHR and SHR treated for 8-11 days with enalapril

(Fig 6A). Densities of specific B<sub>1</sub> and B<sub>2</sub> receptors binding sites were respectively  $1.51 \pm 0.08$  fmol mg<sup>-1</sup> tissue and  $1.06 \pm 0.37$  fmol mg<sup>-1</sup> tissue in the aorta of untreated SHR. These values were significantly increased for both B<sub>1</sub> (1.5 fold, P < 0.01) and B<sub>2</sub> receptors (2.3 fold, P < 0.01) in the aorta of SHR treated with enalapril for 8-11 days (Fig 6A-B).

### Cardiac remodeling

Parameters evaluated in vascular tissue were also evaluated in cardiac tissue to gain insight into the role of kinin B<sub>2</sub> receptors in enalapril-induced cardiac hypertrophy regression. As shown in Table, enalapril treatment induced a significant 25% reduction in left-ventricular mass. This was accompanied by a significant reduction in left-ventricular DNA content. After 4 weeks of therapy, no difference was seen in left-ventricular DNA fragmentation index between any groups. However, DNA synthesis, evaluated by *in vivo* [<sup>3</sup>H]-thymidine incorporation in the left ventricle, was significantly reduced by 28% within the group treated with enalapril. Hoe 140 given alone or in combination with enalapril affected none of these measures. The right ventricle showed no changes with treatment in any of the parameters evaluated (Table).

### 3.1.5 Discussion

The kallikrein-kinin system is underexpressed in various forms of hypertension (Carretero *et al.*, 1993). Many beneficial effects of therapy with an ACEi have been linked directly to the elevation of kinins circulating levels (Gohlke *et al.*, 1997; Heusch *et al.*, 1997). Moreover, inhibition of cell growth by kinins involves endothelial NO production and subsequent generation of cyclic GMP in target cells (Ishigai *et al.*, 1997; Pollman *et al.*, 1996; Ritchie *et al.*, 1998). Several lines of evidence suggest, however, that the implication of kinins in the anti-hypertrophic actions of ACEi depends on the experimental model. In normotensive rats submitted to arterial injury, inhibition of neointima formation by enalapril is reversed by Hoe 140 (Farhy *et al.*, 1993). In young SHR, prevention of aortic hypertrophy development by quinapril is blocked by Hoe 140 (Benetos *et al.*, 1997). In rats with aortic banding, prevention of left-ventricular hypertrophy (LVH) development by an ACEi was blocked by Hoe 140 (Linz & Schölkens, 1992). However, in the same model, B<sub>2</sub>

receptor antagonism could not block the regression of LVH induced by an ACEi. Likewise, in adult SHR, regression of LVH by perindopril was not blocked by Hoe 140 (Black *et al.*, 1996). Kinins therefore seem more involved in the anti-hypertrophic actions of ACEi during prevention than regression of structural modifications.

One hypothesis for the induction of apoptosis with ACEi is the decrease in angiotensin II receptor stimulation due to inhibition of angiotensin II formation. We recently reported, however, that combined blockade of AT1 and AT2 receptors does not induce apoptosis in the SHR aorta (Tea *et al.*, 2000), suggesting an alternative mechanism possibly via increased kinin half-life and receptor stimulation. A significant new finding of the present study is that SMC apoptosis and regression of vascular hypertrophy induced within 4 weeks of enalapril treatment in SHR are not dependent on kinin B<sub>2</sub> receptor activation. Transient induction of aortic SMC apoptosis by enalapril occurs around the second week of treatment (deBlois *et al.*, 1997; Tea *et al.*, 2000). In order to evaluate the cumulative effect on SMC deletion, we examined the SHR aorta after 4 weeks of treatment. The depletion of medial SMC and the elevated internucleosomal DNA fragmentation index in the aorta suggest effective induction of SMC apoptosis within the first four weeks of treatment with enalapril with or without Hoe 140. To validate the effective blockade of kinin B<sub>2</sub> receptors, we examined BK-induced hypotensive effects in a subset of rats anesthetized at the end of the 4-week treatment period. As compared to control rats, the amplitude of the hypotensive response to an intra-arterial BK bolus was significantly attenuated in all rats treated with Hoe 140. Moreover, half-life of the hypotensive response to BK showed a significant increase in rats treated with enalapril and this effect was completely prevented in rats co-treated with Hoe 140, therefore validating the effectiveness of Hoe 140.

[<sup>3</sup>H]-thymidine incorporation into DNA, an indicator of DNA synthesis *in vivo*, was also reduced by enalapril independently of the presence of the B<sub>2</sub> receptor antagonist. Attenuation of [<sup>3</sup>H]-thymidine incorporation can be interpreted as an inhibition of DNA synthesis since we previously showed that aortic tissue uptake of [<sup>3</sup>H]-thymidine is unaffected by enalapril (deBlois *et al.*, 1997). Hoe 140 alone did not affect SMC DNA

synthesis. Together, these results suggest that B<sub>2</sub> receptors are not involved in aortic growth regulation within a 4-week period in adult SHR. We reported that SMC in the aorta of neonatal SHR exhibit an abnormally high turnover with a dysregulation of cell death leading to increased aortic DNA content. Treatment with enalapril normalizes SMC turnover mainly via the inhibition of SMC growth (Thorin-Trescases *et al.*, 2001).

Several studies showed that kinins are involved in the reduction of blood pressure by ACEi in renovascular models of hypertension (e.g. aortic banding, two-kidney 1-clip rat) but not in genetic models (Bao *et al.*, 1992; Sharma *et al.*, 1998; Zhu *et al.*, 1997). In the present model, the current evidence suggests a strong pressure independent component in the induction of SMC apoptosis during onset regression of aortic mass by various anti-hypertensive agents (deBlois *et al.*, 1997; Tea *et al.*, 2000). It is therefore unlikely that failure of Hoe 140 to prevent SMC apoptosis is related to its lack of effect on enalapril antihypertensive actions.

We recently showed that a 4-week treatment with either valsartan or enalapril reduced LVH and abolished fibroblast hyperplasia without affecting cardiomyocyte number in SHR (Der Sarkissian *et al.*, 2003). Transient fibroblast apoptosis with either AT<sub>1</sub> antagonist or ACEi was not affected by AT<sub>2</sub> receptor blockade (Der Sarkissian, S., unpublished observation). This suggests a possible role for a downregulation of AT<sub>1</sub> receptor signaling in cardiac apoptosis induction in SHR treated with renin-angiotensin system antagonists, unlike in aortic SMC. Since enalapril had no effect on cardiac remodeling in the right ventricle but reduced hypertrophy in the left ventricle, these effects could include a pressure-dependent component. The observation of a reduced left ventricular DNA content and DNA synthesis after 4 weeks of enalapril treatment with no apparent DNA fragmentation at this time point suggests that a transient cardiac apoptosis occurred earlier in the treatment period.

The mechanisms underlying the pro-apoptotic effect of enalapril in the SHR aorta remain elusive. Although constitutive B<sub>2</sub> receptors are primarily involved in mediating the actions of kinin under physiological conditions (Bhoola *et al.*, 1992), it is possible that

changes evaluated here results from the stimulation of the inducible B<sub>1</sub> receptor for kinins. Expression of kinin B<sub>1</sub> receptor can be induced by various inflammatory stimuli (Marceau & Bachvarov, 1998). Up-regulation of B<sub>1</sub> receptor expression occurs in the brain (Emanuelli *et al.*, 1999) and hypothalamus (Qadri *et al.*, 2002) in SHR with established hypertension. In rabbits, Marceau *et al* reported that treatment of rabbits with an ACEi does not regulate B<sub>1</sub> receptors (Marceau *et al*, 1999). In normotensive rats, however, convincing evidence for the induction of functional renal B<sub>1</sub> receptors during ACEi treatment has been reported recently (Marin-Castano *et al*, 2002). We recently reported an upregulation of B<sub>1</sub> receptors in the lamina I of the thoracic spinal cord after 4 weeks of therapy with an ACEi and a marked decrease after 8 and 16 weeks of therapy (Ongali *et al.*, 2003). Thus, the induction of B<sub>1</sub> receptors with ACEi treatment is controversial and may depend on the species or duration of treatment. Consistent with this, our functional evidence suggest that sensitization to a B<sub>1</sub> receptor agonist gradually decreases to baseline values by 14 days of enalapril treatment in the SHR aorta. The time-course of B<sub>1</sub> receptor sensitization is compatible with the previous observation that SMC apoptosis is triggered between 7 and 14 days of enalapril treatment (deBlois *et al*, 1997; Tea *et al*, 2000). One group reported the direct stimulation of B<sub>1</sub> receptor by enalaprilat (Ignjatovic *et al.*, 2002), while this observation could not be reproduced by others (Fortin *et al.*, 2003). Kinin B<sub>1</sub> receptor mediates inhibition of neointima formation after balloon angioplasty in rat artery (Agata *et al.*, 2000) and inhibits platelet-derived growth factor-stimulated mitogenesis in cultured SMC (Dixon & Dennis, 1997). A molecular mechanism for B<sub>1</sub> receptor mediated apoptosis remains to be defined, but may be analogous to the recently described inhibition of cell growth by B<sub>2</sub> receptor via release of NO (Dhaunsi *et al.*, 1997) or the stimulated activity of protein tyrosine phosphatase (Cellier *et al.*, 2003). Alternatively, SMC apoptosis induction by enalapril may involve N-acetyl-seryl-aspartyl-lysyl-proline (Ac-SDKP), a natural inhibitor of pluripotent hematopoietic stem cell proliferation, which is hydrolyzed exclusively by ACE and which inhibits proliferation of cardiac fibroblasts *in vivo* and *in vitro* (Rhaleb *et al.*, 2001a; Rhaleb *et al.*, 2001b).

In summary, we used five complementary parameters to rule out the implication of the kinin B<sub>2</sub> receptor in SMC apoptosis induction and vascular hyperplasia regression induced by enalapril in SHR. In contrast, preliminary data identify the induction of B<sub>1</sub>

receptors as a candidate mechanism. Further studies will be required to assess molecular mechanisms of this SMC apoptosis induction participating in hypertrophy regression.

#### ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by the Canadian Institutes of Health Research (CIHR #45452). D. deBlois is a Scholar of the Fonds de la Recherche en Santé du Québec. D. Duguay holds an award from the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada. S. Der Sarkissian holds an award from the Heart and Stroke Foundation of Canada / Canadian Institutes of Health Research (HSFC/CIHR).

#### 3.1.6 References

AGATA, J., MIAO, R.Q., YAYAMA, K., CHAO, L. & CHAO, J. (2000). Bradykinin B<sub>1</sub> receptor mediates inhibition of neointima formation in rat artery after balloon angioplasty. *Hypertension*, **36**, 364-370.

BAO, G., GOHLKE, P. & UNGER, T. (1992). Role of bradykinin in chronic antihypertensive actions of ramipril in different hypertension models. *J. Cardiovasc. Pharmacol.*, **20** (suppl 9), S96-S99.

BENETOS, A., LEVY, B.I., LACOLLEY, P., TAILLARD, F., DURIEZ, M. & SAFAR, M.E. (1997). Role of angiotensin II and bradykinin on aortic collagen following converting enzyme inhibition in spontaneously hypertensive rats. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, **17**, 3196-3201.

BHOOLA, K.D., FIGUEROA, C.D. & WORTHY, K. (1992). Bioregulation of kinins: kallikreins, kininogens, and kininases. *Pharmacol. Rev.*, **44**, 1-80.

BLACK, M.J., BERTRAM, J.F. & JOHNSTON, C.I. (1996). Cardiac growth during high and low dose perindopril treatment in spontaneously hypertensive rats. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.*, **23**, 605-607.

CARRETERO, O.A., CARBINI, L.A. & SCICLI, A.G. (1993). The molecular biology of the kallikrein-kinin system: I. General description, nomenclature and the mouse gene family. *J. Hypertens.*, **11**, 693-697.

CELLIER, E., MAGE, M., DUCHENE, J., PECHER, C., COUTURE, R., BASCANDS, J.L. & GIROLAMI, J.P. (2003). Bradykinin reduces growth factor-induced glomerular ERK1/2 phosphorylation. *Am. J. Physiol. Renal. Physiol.*, **284**, F282-F292.

CLOUTIER, F., DE SOUSA BUCK, H., ONGALI, B. & COUTURE, R. (2002). Pharmacologic and autoradiographic evidence for an up-regulation of kinin B<sub>2</sub> receptors in the spinal cord of spontaneously hypertensive rats. *Br. J. Pharmacol.*, **135**, 1641-1654.

DEBLOIS, D., TEA, B.S., THAN, V.D., TREMBLAY, J. & HAMET, P. (1997). Smooth muscle apoptosis during vascular regression in spontaneously hypertensive rats. *Hypertension*, **29**, 340-349.

DER SARKISSIAN, S., MARCHAND, E-L., DUGUAY, D., HAMET, P. & DEBLOIS, D. (2003). Reversal of interstitial fibroblast hyperplasia via apoptosis in hypertensive rat heart with valsartan or enalapril. *Cardiovasc. Res.*, **57**, 775-783

DHAUNSI, G.S., MATTHEWS, C., KAUR, K. & HASSID A. (1997). NO increases protein tyrosine phosphatase activity in smooth muscle cells: relationship to antimitogenesis. *Am. J. Physiol.*, **272**, H1342-H1349.

DIXON, B.S. & DENNIS, M.J. (1997). Regulation of mitogenesis by kinins in arterial smooth muscle cells. *Am. J. Physiol.* **273**, C7-C20.

DRAPEAU, G., DEBLOIS, D. & MARCEAU, F. (1991). Hypotensive effects of Lys-des-Arg<sup>9</sup>-bradykinin and metabolically protected agonists of B<sub>1</sub> receptors for kinins. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **259**, 997-1003.

EMANUELI, C., CHAO, J., REGOLI, D., CHAO, L., NI, A. & MADEDDU, P. (1999). The bradykinin B<sub>1</sub> receptor and the central regulation of blood pressure in spontaneously hypertensive rats. *Br. J. Pharmacol.*, **126**, 1769-1776.

FARHY, R.D., CARRETERO, O.A., HO, K.L. & SCICLI, A.G. (1993). Role of kinins and nitric oxide in the effects of angiotensin converting enzyme inhibitors on neointima formation. *Circ. Res.*, **72**, 1202-1210.

FOLKOW, B. (1982). Physiological aspects of primary hypertension. *Physiol. Rev.*, **62**, 347-504.

FORTIN, J.P., GOBEIL JR, F., ADAM, A. REGOLI, D & MARCEAU, F. (2003). Do angiotensin converting enzyme inhibitors directly stimulate the kinin B<sub>1</sub> receptor? *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*, **285**, 277-282

GOHLKE, P., KUWER, I., SCHNELL, A., AMANN, K., MALL, G. & UNGER, T. (1997). Blockade of bradykinin B<sub>2</sub> receptors prevents the increase in capillary density induced by chronic angiotensin-converting enzyme inhibitor treatment in stroke-prone spontaneously hypertensive rats. *Hypertension*, **29**, 478-482.

HAMET, P., DEBLOIS, D., DAM, T.V., RICHARD, L., TEIGER, E., TEA, B.S., ORLOV, S.N. & TREMBLAY, J. (1996). Apoptosis and vascular wall remodeling in hypertension. *Can. J. Physiol. Pharmacol.*, **74**, 850-861.

HAMET, P., THORIN-TRESCASES, N., MOREAU, P., DUMAS, P., TEA, B.S., DEBLOIS, D., KREN, V., PRAVENEC, M., KUNES, J., SUN, Y. & TREMBLAY, J. (2001). Workshop: excess growth and apoptosis: is hypertension a case of accelerated aging of cardiovascular cells? *Hypertension*, **37**, 760-766.

HEUSCH, G., ROSE, J. & EHRING, T. (1997). Cardioprotection by ACE inhibitors in myocardial ischaemia/reperfusion. The importance of bradykinin. *Drugs*, **54** (suppl 5), 31-41.

HOCK, F.J., WIRTH, K., ALBUS, U., LINZ, W., GERHARDS, H.J., WIEMER, G., HENKE, S.T., BREIPOHL, G., KÖNIG, W., KNOLLE, J. & SCHÖLKENS, B.A. (1991). Hoe 140 a new potent and long acting bradykinin-antagonist: in vitro studies. *Br. J. Pharmacol.*, **102**, 769-773.

IGNJATOVIC, T., TAN, F., BROVKOVYCH, V., SKIDGEL, R.A. & ERDOS, E.G. (2002). Novel mode of action of angiotensin I converting enzyme inhibitors: direct activation of bradykinin B<sub>1</sub> receptor. *J. Biol. Chem.*, **277**, 16847-16852.

ISHIGAI, Y., MORI, T., IKEDA, T., FUKUZAWA, A. & SHIBANO, T. (1997). Role of bradykinin-NO pathway in prevention of cardiac hypertrophy by ACE inhibitor in rat cardiomyocytes. *Am. J. Physiol.*, **273**, H2659-H2663.

LEE, R.M., OWENS, G.K., SCOTT-BURDEN, T., HEAD, R.J., MULVANY, M.J. & SCHIFFRIN, E.L. (1995). Pathophysiology of smooth muscle in hypertension. *Can. J. Physiol. Pharmacol.*, **73**, 574-584.

LINZ, W. & SCHOLKENS, B.A. (1992). A specific B<sub>2</sub> bradykinin receptor antagonist HOE 140 abolishes the antihypertrophic effect of ramipril. *Br. J. Pharmacol.*, **105**, 771-772.

LINZ, W., WIEMER, G., GOHLKE, P., UNGER, T. & SCHOLKENS, B.A. (1995). Contribution of kinins to the cardiovascular actions of angiotensin converting enzyme inhibitors. *Pharmacol. Rev.*, **47**, 25-49.

MARCEAU, F. & BACHVAROV, D.R. (1998). Kinin receptors. *Clin. Rev. Allergy Immunol.*, **16**, 385-401.

MARCEAU, F., LARRIVEE, J.F., BOUTHILLIER, J., BACHVAROVA, M., HOULE, S. & BACHVAROV, D.R. (1999). Effect of endogenous kinins, prostanoids, and NO on kinin B<sub>1</sub> and B<sub>2</sub> receptor expression in the rabbit. *Am. J. Physiol.*, **277**, R1568-R1578.

MARCHAND, E-L., DER SARKISSIAN, S., HAMET, P. & DEBLOIS, D. (2003) Caspase-dependent cell death mediated the early phase of aortic hypertrophy regression in losartan-treated spontaneously hypertensive rats. *Circ. Res.*, **92**, 777-784.

MARIN-CASTANO, M.E., SCHANSTRA, J.P., NEAU, E., PRADDAUDE, F., PECHER, C., ADER, J.L., GIROLAMI, J.P. & BASCANDS, J.L. (2002). Induction of functional bradykinin b(1)-receptors in normotensive rats and mice under chronic Angiotensin-converting enzyme inhibitor treatment. *Circulation*, **105**, 627-632.

NEUGEBAUER, W., BLAIS, P.A., HALLE, S., FILTEAU, C., REGOLI, D. & GOBEIL, F. JR. (2002). Kinin B<sub>1</sub> receptor antagonists with multi-enzymatic resistance properties. *Can. J. Physiol. Pharmacol.*, **80**, 287-292.

ONGALI, B., de SOUSA BUCK, H., CLOUTIER, F., LEGAULT, F., REGOLI, D., LAMBERT, C., THIBAUT, G & COUTURE, R. (2003). Chronic effects of angiotensin-converting enzyme inhibition on kinin receptor binding sites in the rat spinal cord. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*, **284**, H1949-H1958.

OWENS, G.K. (1987). Influence of blood pressure on development of aortic medial smooth muscle hypertrophy in spontaneously hypertensive rats. *Hypertension*, **9**, 178-187.

POLLMAN, M.J., YAMADA, T., HORIUCHI, M. & GIBBONS, G.H. (1996). Vasoactive substances regulate vascular smooth muscle cell apoptosis. Countervailing influences of nitric oxide and angiotensin II. *Circ. Res.*, **79**, 748-756.

QADRI, F., HAUSER, W., JOHREN, O. & DOMINIAK, P. (2002). Kinin B<sub>1</sub> and B<sub>2</sub> receptor mRNA expression in the hypothalamus of spontaneously hypertensive rats. *Can. J. Physiol. Pharmacol.*, **80**, 258-263.

RHALEB, N.E., PENG, H., HARDING, P., TAYEH, M., LAPOINTE, M.C. & CARRETERO, O.A. (2001a). Effect of N-acetyl-seryl-aspartyl-lysyl-proline on DNA and collagen synthesis in rat cardiac fibroblasts. *Hypertension*, **37**, 827-832.

RHALEB, N.E., PENG, H., YANG, X-P., LIU, Y-H., MEHTA, D., EZAN, E. & CARRETERO, O.A. (2001b). Long-term effect of N-acetyl-seryl-aspartyl-lysyl-proline on left ventricular collagen deposition in rats with 2-kidney, 1-clip hypertension. *Circulation*, **103**, 3136-3141.

RITCHIE, R.H., MARSH, J.D., LANCASTER, W.D., DIGLIO, C.A. & SCHIEBINGER, R.J. (1998). Bradykinin blocks angiotensin II-induced hypertrophy in the presence of endothelial cells. *Hypertension*, **31**, 39-44.

SHARMA, J.N., UMA, K. & YUSOF, A.P. (1998). Left ventricular hypertrophy and its relation to the cardiac kinin-forming system in hypertensive and diabetic rats. *Int. J. Cardiol.*, **63**, 229-235.

TEA, B.S., DAM, T.V., MOREAU, P., HAMET, P. & DEBLOIS, D. (1999). Apoptosis during regression of cardiac hypertrophy in spontaneously hypertensive rats. Temporal regulation and spatial heterogeneity. *Hypertension*, **34**, 229-235.

TEA, B.S., DER SARKISSIAN, S., TOUYZ, R.M., HAMET, P. & DEBLOIS, D. (2000). Proapoptotic and growth-inhibitory role of angiotensin II type 2 receptor in vascular smooth muscle cells of spontaneously hypertensive rats in vivo. *Hypertension*, **35**, 1069-1073.

TEIGER, E., THAN, V.D., RICHARD, L., WISNEWSKY, C., TEA, B.S., GABOURY, L., TREMBLAY, J., SCHWARTZ, K. & HAMET, P. (1996). Apoptosis in pressure overload-induced heart hypertrophy in the rat. *J. Clin. Invest.*, **97**, 2891-2897.

THORIN-TRESCASES, N., DEBLOIS, D. & HAMET, P. (2001). Evidence of an altered in vivo vascular cell turnover in spontaneously hypertensive rats and its modulation by long-term antihypertensive treatment. *J. Cardiovasc. Pharmacol.*, **38**, 764-774.

WALTER, S.V. & HAMET, P. (1986). Enhanced DNA synthesis in heart and kidney of newborn spontaneously hypertensive rats. *Hypertension*, **8**, 520-525.

ZHU, Y.C., ZHU, Y.Z., GOHLKE, P., STAUSS, H.M. & UNGER, T. (1997). Effects of angiotensin-converting enzyme inhibition and angiotensin II AT1 receptor antagonism on cardiac parameters in left ventricular hypertrophy. *Am. J. Cardiol.*, **80**, 110A-117A.

### 3.1.7 Figure legends, figures and table

**Figure 1: Systolic blood pressure regulation over the 4-week experimental period.** The graph represents arterial systolic blood pressure of SHR treated with a placebo, enalapril, Hoe 140 or a combination of both treatments and measured by plethysmography (mean  $\pm$  SEM; n = 9 to 10 per group). \* Significantly different (P<0.05) from placebo group.

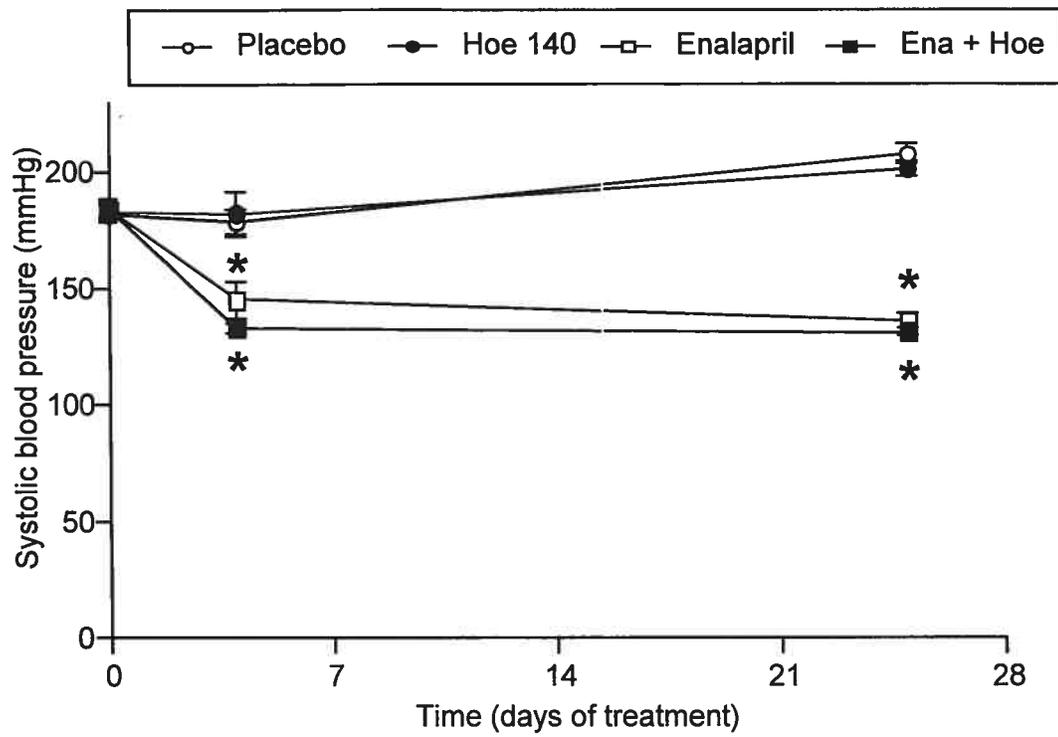
**Figure 2: Blockade of kinin B<sub>2</sub> receptors in anesthetized rat after 4 weeks of treatment.** Magnitude (A) and half-life (B) of the hypotension induced by various doses (0.01, 0.10 and 1.0  $\mu$ g dissolved in 0.1 ml saline) of intra-arterial BK bolus injection. Mean  $\pm$  SEM; n = 4 to 7 per group. \* Significantly different (P<0.05) from placebo group. † Significantly different (P<0.05) from enalapril group.

**Figure 3: Enalapril induces aortic hypertrophy regression and SMC apoptosis even in the presence of a kinin B<sub>2</sub> receptor antagonist.** A. Aortic medial mass, indicative of aortic hypertrophy, evaluated quantitatively by image analysis of the vessel medial cross-sectionnal area (CSA). B. Aortic hyperplasia evaluated using the three-dimensional disector method and presented as smooth muscle cell number per unit length. WKY rats showed 85 $\pm$ 6 SMC per  $\mu$ m, p<0.0001 vs control SHR. C. DNA fragmentation index was obtained after quantification of DNA ladders as those shown in Fig 4. D. Aortic SMC DNA synthesis. Mean  $\pm$  SEM; n = 9 to 10 per group. n = 6 per group for DNA synthesis, see Methods. \* Significantly different (P<0.05) from placebo group.

**Figure 4: Enalapril induces aortic DNA fragmentation even with the co-administration of Hoe 140.** DNA ladders were obtained with DNA extracted from the aorta of SHR treated for 4 weeks with placebo (PLA), enalapril alone (ENA), Hoe 140 alone (Hoe) or a combination of both treatments (ENA + Hoe). DNA free 3'OH ends were nick end labeled with dUTP-[P<sup>32</sup>] using terminal deoxynucleotidyl transferase. Increasing amounts of DNA (0.05 to 0.4 µg) were fractionated by electrophoresis on 1.5% agarose gel.

**Figure 5: Enalapril treatment transiently increased aortic contraction elicited by a kinin B<sub>1</sub> receptor agonist.** **A.** Isometric contractions elicited by increasing doses of dBK are expressed in mg. Aortic strips were isolated from SHR after the different time-period indicated. **B.** Vasoactive responses to dBK between 8 and 13 days (n=9) were significantly reduced by the addition of Leu<sup>8</sup>-dBK before stimulation. \* Significantly different (P<0.05) from untreated rats. † Significantly different (P<0.05) from responses observed in absence of leucine<sup>8</sup>-dBK.

**Figure 6: Increased expression of kinin B<sub>1</sub> and B<sub>2</sub> receptors after enalapril treatment.** **A.** Autoradiograms showing total binding sites of [<sup>125</sup>I]HPP-Aca-Lys[β-D-Nal<sup>7</sup>, Ile<sup>8</sup>]des-Arg<sup>9</sup>BK (for B<sub>1</sub> receptor) and [<sup>125</sup>I]HPP-Hoe 140 (for B<sub>2</sub> receptor) in aorta sections taken from control SHR or SHR treated with enalapril for 8-11 days. Non-specific binding (NS) in the presence of 1 µM unlabelled radioligand is shown on the right panels. **B.** Quantification of the specific binding sites in the aortae of SHR and SHR treated with enalapril for 8-11 days. \*\* Significantly different (P < 0.01) from SHR.

**Figure 1**

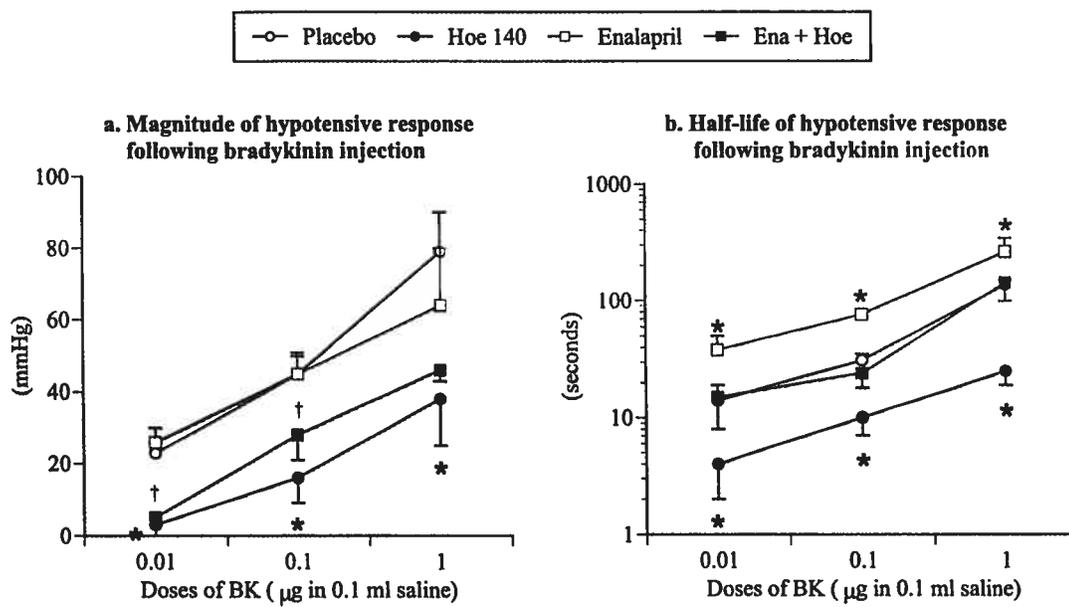
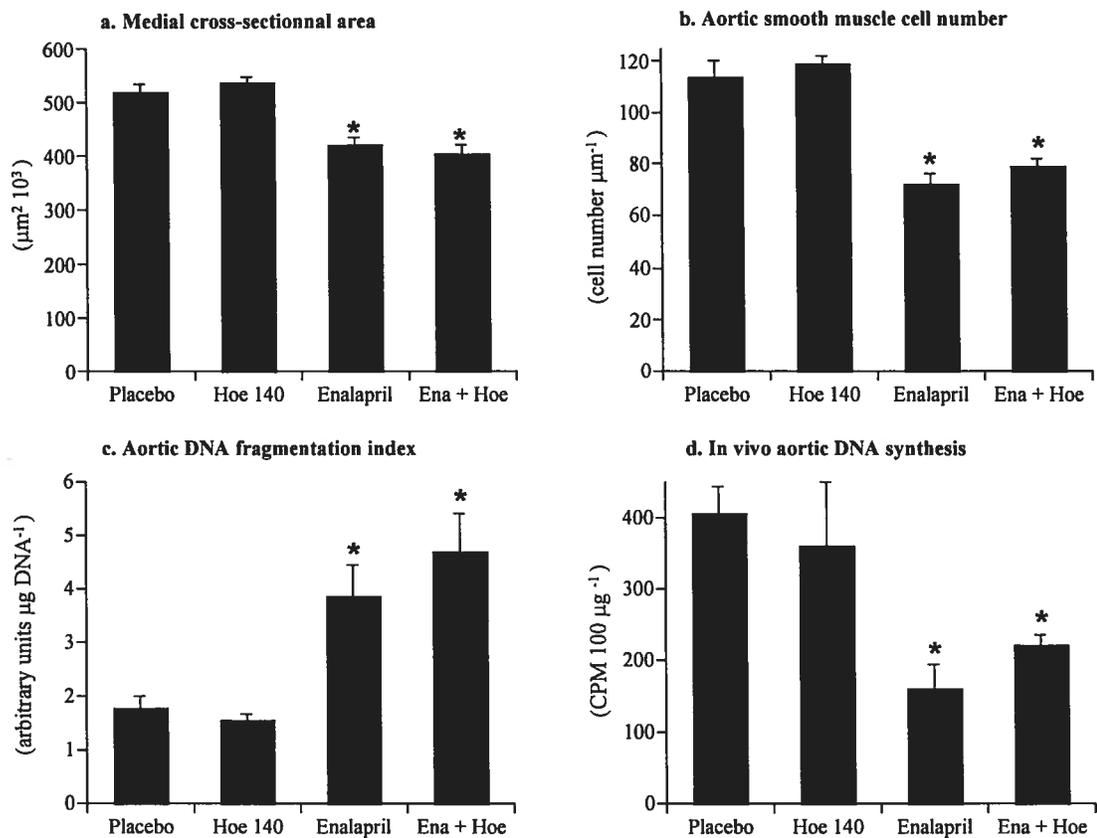
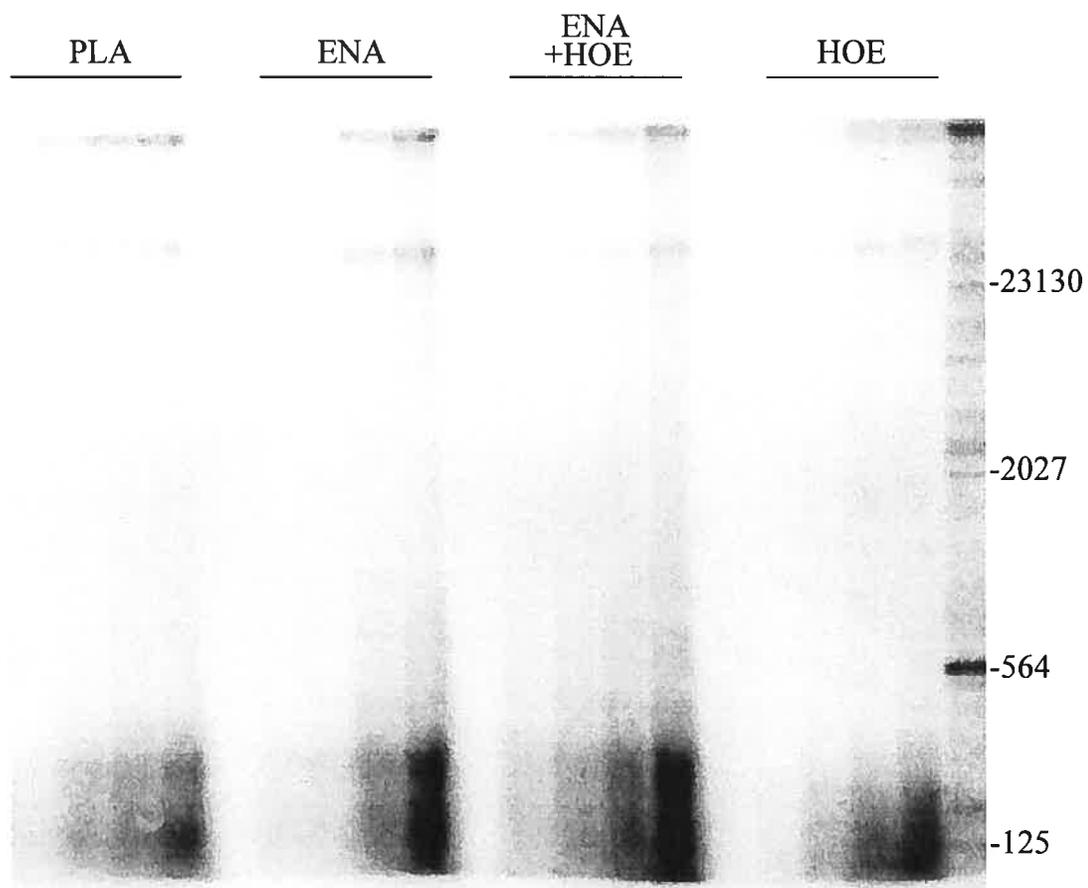
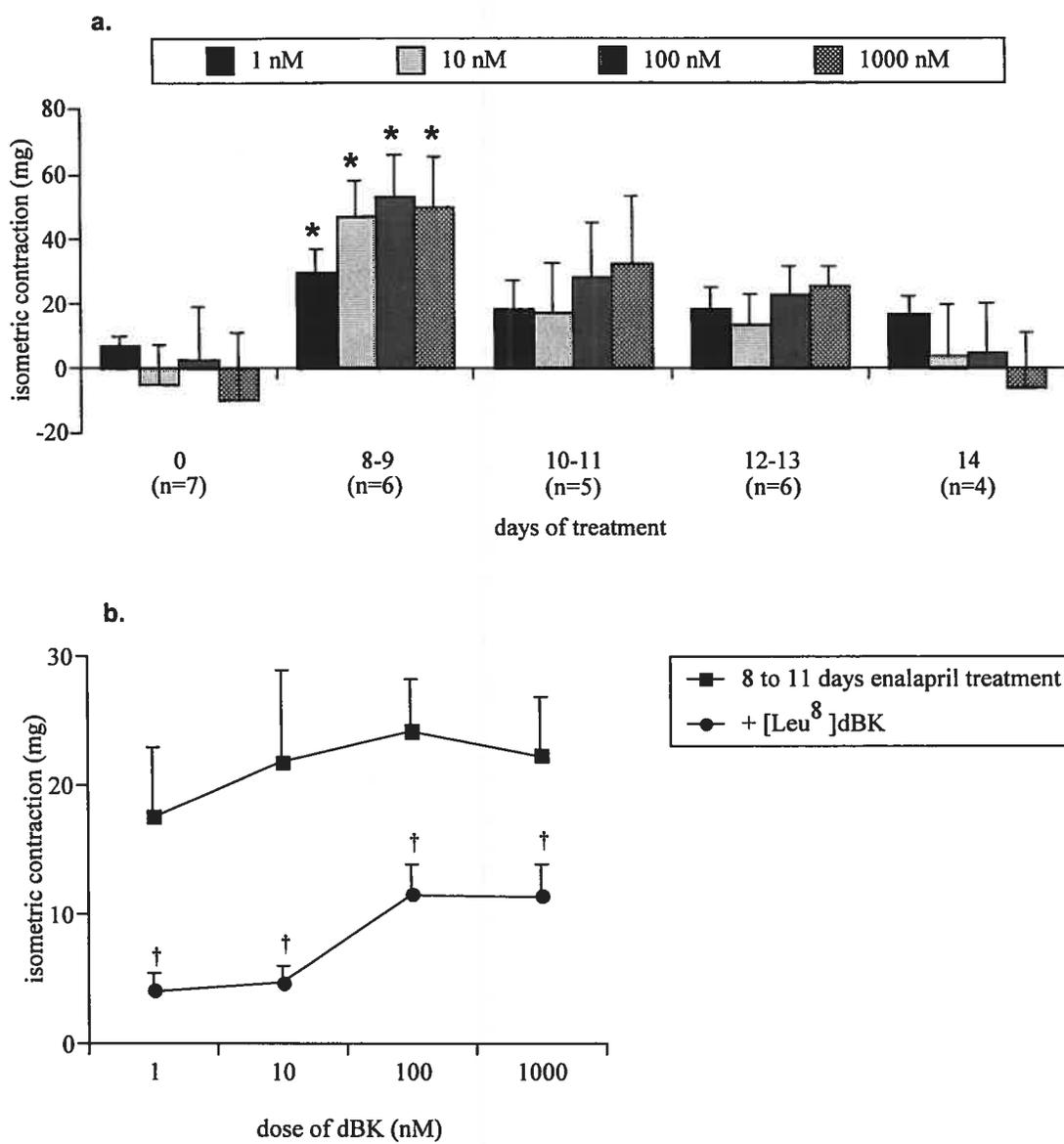


Figure 2

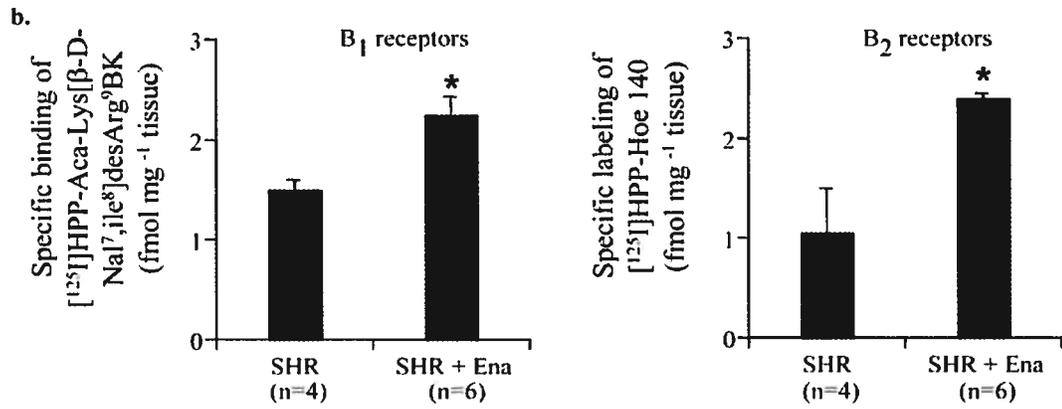
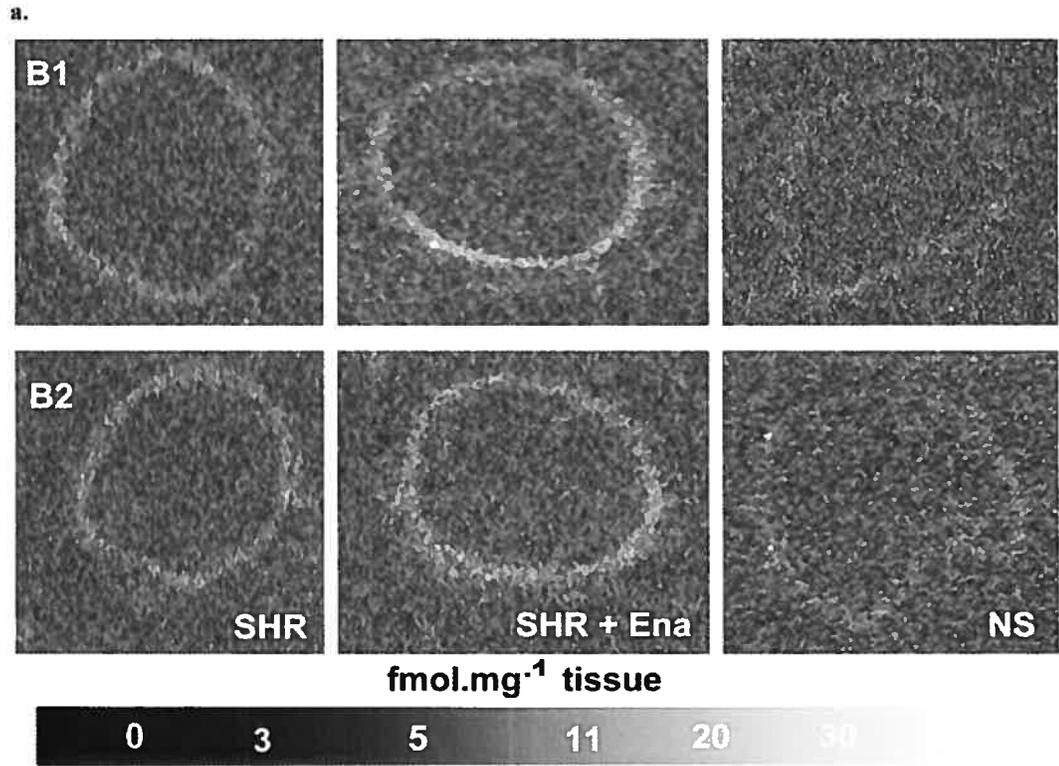
**Figure 3**



**Figure 4**



**Figure 5**



**Figure 6**

	Treatment (n)			
	Placebo (9)	Hoe 140 (10)	Enalapril (9)	Ena + Hoe (10)
<b>LEFT VENTRICLE</b>				
<b>Left-ventricular : Body</b>				
<b>Weight Ratio,</b> (mg / g)	2.64±0.04	2.58±0.05	1.97±0.06*	1.93±0.06*
<b>DNA content</b> (µg / g BW)	4.30±0.15	4.42±0.15	3.08±0.35*	3.58±0.26*
<b>DNA synthesis</b> (CPM / 100 µg)	1071±138	989±71	774±93*	654±74*
<b>DNA fragmentation index,</b> (Arbitrary units / µg DNA)	1.68±0.26	1.59±0.25	1.38±0.19	1.61±0.29
<b>RIGHT VENTRICLE</b>				
<b>Right-ventricular : Body</b>				
<b>Weight Ratio,</b> (m g / g)	0.51±0.04	0.51±0.04	0.50±0.05	0.50±0.06
<b>DNA content</b> (µg / g BW)	0.73±0.07	0.75±0.08	0.71±0.08	0.77±0.08
<b>DNA synthesis</b> (CPM / 100 µg)	645±117	600±98	604±97	567±90
<b>DNA fragmentation index,</b> (Arbitrary units / µg DNA)	ND	ND	ND	ND

**Table 1: Cardiac hypertrophy following SHR treatment with enalapril, Hoe 140 or a combination of both drugs for 4 weeks.**

Values are mean ± SEM. ND: Not determined. n = 6 for DNA synthesis, see Methods.

\* Significantly different (P<0.05) from placebo group.

### **3.2 Publication N°2**

## **Kinin B<sub>1</sub> Receptors Mediate Smooth Muscle Apoptosis During Regression of Aortic Hypertrophy in Enalapril-treated Hypertensive Rats**

participation des différents auteurs de cette publication :

D Duguay : Conceptualisation de l'étude, stratégie expérimentale, expériences, analyses  
des résultats et écriture de l'article

BO : Expériences

FN : Production de l'antagoniste B<sub>1</sub> utilisé

BB : Conceptualisation de l'étude

PS : Production de l'antagoniste B<sub>1</sub> utilisé

RC : Stratégie expérimentale

D deBlois : Conceptualisation de l'étude, analyses des résultats et écriture de l'article

**Kinin B<sub>1</sub> Receptors Mediate Smooth Muscle Apoptosis During Regression of Aortic Hypertrophy in Enalapril-treated Hypertensive Rats**

Article en préparation pour :

*Hypertension*

<sup>1</sup> David Duguay, <sup>2</sup> Brice Ongali, <sup>3</sup> François Nantel, <sup>4</sup> Bruno Battistini, <sup>3</sup> Pierre Sirois, <sup>2</sup> Réjean Couture & <sup>1,\*</sup> Denis deBlois

Short title: Duguay *et al.* – Kinin B<sub>1</sub> receptors mediate apoptosis

Departments of Pharmacology<sup>1</sup> and Physiology<sup>2</sup>, Université de Montréal, Montréal, PQ Canada H3C 3J7, Department of Pharmacology<sup>1</sup>, <sup>3</sup>Université de Sherbrooke, Sherbrooke, PQ Canada and <sup>4</sup>Centre de recherche de l'Hôpital Laval, Institut de cardiologie et de pneumologie, 2725 Chemin Ste-Foy, Ste-Foy, QC, Canada G1V 4G5

\*Author for correspondence

Tel. (514) 343-6111 ext.0915, Fax: (514) 343-2291, email: [REDACTED]

### 3.2.1 Summary

The regression of aortic hypertrophy induced by enalapril in spontaneously hypertensive rats (SHR) involves smooth muscle cell (SMC) deletion by apoptosis, an effect that is independent of angiotensin pathway inhibition or kinin B<sub>2</sub> receptor activation but that is associated with increased aortic expression of kinin B<sub>1</sub> receptors. Thus, we postulated that B<sub>1</sub> receptors are pro-apoptotic in this model. First, SHR were treated with enalapril (30 mg/kg/d p.o.) for up to 16 days to compare the time course of B<sub>1</sub> receptor expression, by *in situ* radioligand receptor binding, and that of SMC apoptosis. Aortic B<sub>1</sub> receptor expression and apoptotic SMC were both significantly increased only between days 9 and 12 of enalapril treatment, followed by reduced SMC hyperplasia (-19%) by day 12 and reduced aortic hypertrophy (-22%) by day 14. Next, the role of B<sub>1</sub> receptors was examined in SHR receiving either vehicle, enalapril or R-715 (selective B<sub>1</sub> antagonist; 400 µg/kg/d) alone or in combination for 9-10 or 21 days. Significant systolic blood pressure reduction with enalapril (-29%) was not affected by R-715. Enalapril for 9-10 days increased SMC apoptosis and cGMP levels in the aorta and these effects were prevented by co-administration of R-715. At day 21, enalapril-induced reduction of SMC hyperplasia (-32%) was completely prevented by R-715 whereas reduction in aortic hypertrophy (-21%) was significantly attenuated by 51%. This is the first demonstration that B<sub>1</sub> receptors for kinins induce apoptosis and that B<sub>1</sub> receptor-dependent SMC deletion is an essential component of aortic remodeling induced by enalapril.

**Keywords:** Hypertension; vascular hypertrophy; apoptosis; enalapril; kinin B<sub>1</sub> receptor

### 3.2.2 Introduction

Although the regression of cardiovascular hypertrophy is an important therapeutic target in controlling complications associated with hypertension, the underlying mechanisms remain incompletely understood. In the last decade, apoptosis has emerged as a key determinant of organ remodeling in disease and therapy (deBlois *et al.*, 2005). We previously reported that the regression of cardiovascular hypertrophy involves a transient burst of apoptosis in aortic smooth muscle cells (SMC) and cardiac fibroblasts in spontaneously hypertensive rats (SHR) treated with a variety of anti-hypertensive drugs including angiotensin converting enzyme inhibitors (ACEi) such as enalapril and angiotensin AT<sub>1</sub> receptor antagonists such as losartan or valsartan (deBlois *et al.*, 1997; Duguay *et al.*, 2004; Der Sarkissian *et al.*, 2004; Marchand *et al.*, 2003; Tea *et al.*, 2000). In contrast, treatment with the vasodilator hydralazine reduces blood pressure but does not affect cardiovascular mass or apoptosis, suggesting pressure-independent regulation of cell fate (deBlois *et al.*, 1997). Moreover, administration of the pan-caspase inhibitor z-VAD-fmk prevents SMC deletion and abolishes the early phase of aortic mass regression in SHR treated with losartan, suggesting an obligatory role for SMC apoptosis in therapeutic vascular remodeling (Marchand *et al.*, 2003).

Evidence suggest that selected mechanisms underlie SMC apoptosis induction with ACEi versus AT<sub>1</sub> receptor antagonists in SHR. Valsartan- but not enalapril-induced SMC apoptosis is abolished in the presence of PD123319, a blocker of pro-apoptotic AT<sub>2</sub> receptors for angiotensin II (Tea *et al.*, 2000). Since combined blockade of AT<sub>1</sub> and AT<sub>2</sub> receptors does not cause SMC apoptosis, these data suggest that enalapril-induced apoptosis occurs independently of reduced AT<sub>1</sub> and AT<sub>2</sub> receptor signaling.

ACEi increase the half-life of kinins (Bhoola *et al.*, 1992) and several lines of evidence suggest a role for kinins in the prevention of cardiovascular hypertrophy or hyperplasia with ACEi, in part via the activation of the nitric oxide (NO) / cyclic guanosine monophosphate (cGMP) pathway (Benetos *et al.*, 1997; Farhy *et al.*, 1993; Linz & Scholkens, 1992; Linz *et al.*, 1995). However, the role of kinins in mediating regression of

cardiovascular hypertrophy is less well defined (Black *et al.*, 1996). We recently reported that cardiovascular apoptosis and hypertrophy regression in enalapril-treated SHR is not affected by kinin B<sub>2</sub> receptor blockade but is associated with a transient up-regulation of B<sub>1</sub> receptor expression in the SHR aorta (Duguay *et al.*, 2004). Evidence of B<sub>1</sub> receptor up-regulation includes enhanced contractile responses to the B<sub>1</sub> agonist des-Arg<sup>9</sup>-bradykinin in aortic rings isolated after 8-9 days of enalapril but not in rings from control rats or rats treated with enalapril for 2 weeks. In addition, the contractile responses to des-Arg<sup>9</sup>-bradykinin are specific since they are blocked by Leu<sup>8</sup>-des-Arg<sup>9</sup>-bradykinin, a specific B<sub>1</sub> receptor antagonist. Finally, aortae isolated between 8 and 11 days of enalapril treatment show increased B<sub>1</sub> receptor expression by *in situ* binding autoradiography (Duguay *et al.*, 2004). Together, these data suggested a possible role for B<sub>1</sub> receptors in vascular remodeling with ACEi.

The present studies were designed to define the time-courses of aortic B<sub>1</sub> receptor up-regulation relative to SMC apoptosis induction in ACEi-treated SHR, and to determine whether SMC deletion by apoptosis is dependent on B<sub>1</sub> receptor activation. Evidence provided herein indicates that B<sub>1</sub> receptors mediate increased aortic cGMP production, SMC apoptosis and hypertrophy regression in the aorta of enalapril-treated SHR.

### 3.2.3 Methods

#### Animal procedures

Male SHR were purchased from Charles-River (St-Constant, Canada) and housed for at least 1 week before initiation of drug treatment at 12 weeks of age. Food and water were administered ad libitum. All animal manipulations were conducted according to institutional guidelines.

In order to examine the kinetics of SMC apoptosis induction during ACEi treatment, SHR received enalapril (30 mg/kg/d p.o.) for 0, 8, 9-10, 11-12, 13-14 and 15-16 ( $n=4$  to 11/group). Systolic blood pressure was measured by tail-cuff plethysmography at days 0, 10 and 14. At the end of the treatment, rats were killed with carbon dioxide. The thoracic

aorta was isolated and a 3 mm-long ring of aorta was cut between the third and fourth intercostal arteries after weighing the vessel. The aortic rings were fixed in 4% paraformaldehyde overnight and processed according to routine histological procedures for morphometric measurements in cross-sections of paraffin-embedded arteries. Another segment of the aorta was embedded in OTC compound and frozen sections were cut for receptor autoradiography as we previously described (Duguay *et al.*, 2004).

In order to examine the role of B<sub>1</sub> receptors in ACEi-induced SMC apoptosis, SHR were randomly assigned to treatment with enalapril (30 mg/kg/day) in the drinking water, the selective kinin B<sub>1</sub> receptor antagonist R-715 (400 µg/kg/day) by continuous subcutaneous infusion with an osmotic minipump (model 2004, Alzet, CA, U.S.A.) or a combination of both drugs. R-715 was dissolved in saline. Control animals received vehicle. Systolic blood pressure was measured by tail-cuff plethysmography at days 0, 4, 14 and 18. Half of the rats in each group were sacrificed at days 9-10 and the others at day 21. Rats were anesthetized with a single subcutaneous injection of ketamine (80 mg/kg), xylazine (4 mg/kg) and acepromazine (2 mg/kg) and were killed by an intravenous injection of 1.5 ml CdCl<sub>2</sub> (100 mM) via the vena cava to induce diastolic cardiac arrest. Cardiac ventricles were isolated, separated and weighed. The thoracic aorta was isolated and a 3 mm-long ring of aorta was cut and processed as described above. The rest of the vessel (without endothelium) was immediately frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C until analysis.

#### ***In vitro* receptor autoradiography**

Immediately after sacrifice, aortae were removed and a segment (with endothelium) was prepared on slides for autoradiography as previously described (Duguay *et al.*, 2004) and kept at -80°C until use. Mono-iodinated peptide radioligand was prepared as described previously (Ongali *et al.*, 2003). Aortic sections were thawed and incubated at room temperature for 90 min in 25 mM PIPES buffer (pH 7.4; 4°C) containing 1 mM 1,10-phenanthroline, 1 mM dithiothreitol, 0.014% bacitracin, 0.1 mM captopril, 0.2% bovine serum albumine (protease free) and 7.5 mM magnesium chloride in the presence of 150 pM of [<sup>125</sup>I]HPP-D-Arg<sup>0</sup>[Hyp<sup>3</sup>, Thi<sup>5</sup>, D-Tic<sup>7</sup>, Oic<sup>8</sup>]des-Arg<sup>9</sup>-BK (specific activity: 1,212

Ci/mmol). The non-specific binding was determined in the presence of 1  $\mu$ M of unlabelled ligand. After incubation, slides were transferred sequentially in 25 mM PIPES (pH 7.4; 4 °C) for four rinses and dipped for 15 s in distilled water (4°C) to remove the excess of salts and air-dried. Kodak Scientific Imaging Films BIOMAX TM MS<sup>®</sup> were juxtaposed onto the slides in the presence of [<sup>125</sup>I]-microscales and exposed at room temperature for 3 days. The films were developed in D-19 (Kodak developer) and fixed in Kodak Ektaflo. Autoradiograms were quantified by densitometry using an image analysis system (MCID<sup>TM</sup>, Imaging Research Inc., Ontario, Canada). A standard curve from [<sup>125</sup>I]-microscales was used to convert density levels into femtomoles per milligram of tissue (fmol/mg tissue).

### **Detection of apoptotic nuclei**

SMC nuclei showing evidence of internucleosomal DNA fragmentation, a hallmark of apoptosis, were detected using the *in situ* oligo ligation (ISOL) assay (Chemicon, CA) as described by the manufacturer, with minor modifications. Briefly, 5- $\mu$ m thick cuts made from the paraffin-embedded sections of aorta were deparaffinized and rehydrated, followed by a pre-treatment with proteinase K (50  $\mu$ g/mL). Sections were then incubated with the equilibration buffer before ligation of the biotinylated oligonucleotide with T4 DNA ligase for 19 h at 18°C. A streptavidin-horseradish peroxidase system with the substrate 3', 3'-diaminobenzidine (DAB, brown) was used to develop the stain. The slides were then lightly counterstained with methyl green. Slides for positive controls were pre-treated with DNase 1 (200  $\mu$ g/mL, 10 min) and negative controls had water instead of DNA ligase. Every ISOL-positive SMC nuclei per cross-section were counted using light microscopy. The ISOL method labels DNA presenting double-stranded breaks with single-base 3' overhangs (Didenko *et al.*, 1999), characteristics of apoptotic but not necrotic nuclei (Didenko & Hornsby, 1996).

### **Hypertrophy and hyperplasia measurements**

The aortic medial cross-sectional area (CSA) was evaluated in 3  $\mu$ m-thick, hematoxylin-phloxin-safran stained sections of aorta. Photomicrographs were taken at 400X magnification, digitized, and analyzed using the NIH Image 1.62 program (developed

at the National Institute of Health; <http://rsb.info.nih.gov/nih-image/>). Vascular cross-sections were used to measure smooth muscle cell number per unit of length in the aortic media using the three-dimensional disector method as previously described (deBlois *et al.*, 1997). For evaluation of DNA content, an aliquot of the pulverized tissue was weighed and total tissue DNA was extracted by the phenol and chloroform procedure, following digestion steps with proteinase K and RNase A in the presence of EDTA (Teiger *et al.*, 1996). DNA concentration was determined by spectrophotometry and DNA content per unit of aortic length or per cardiac ventricle, adjusted for body weight, was calculated.

### **cGMP**

cGMP levels in the aortic media were evaluated by enzymatic immunoassay as per the manufacturer's instructions (Amersham, NJ) and expressed as the amount of cGMP per mg protein.

### **Immunoblot**

Ratio of cleaved caspase-3 over total enzyme, as well as phosphorylation level of Akt and of mitogen-activated protein kinases (MAPK) [Extracellular regulated kinases 1/2 (Erk-1/2), p38 MAPK and c-Jun N-terminal kinase (Jnk)] were examined by western blot as previously described (Der Sarkissian *et al.*, 2003), with minor modifications. Briefly, aliquots containing 15  $\mu$ g of extracted aortic proteins were loaded onto 10% sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel and transferred to Hybond-C membrane after electrophoresis. Membranes were hybridized with anti-phospho Akt (1:4000), anti-Akt (1:1000), anti-phospho Erk-1/2 (1:4000), anti-Erk-1/2 (1:1000), anti-phospho p38MAPK (1:2000), anti-p38MAPK (1:1000), anti-phospho Jnk (1:500) or anti-Jnk (1:3000), all from Cell signaling, followed by incubation with goat anti-rabbit (1:2000, Santa Cruz Biotech, Santa Cruz, CA) horseradish peroxidase-conjugated secondary antibody. Membranes were then incubated with ECL Plus (Amersham), exposed to film and developed.

## Drugs & Materials

R-715 was supplied by IPS Pharma (Sherbrooke, Canada). Ketamine and acepromazine were from Ayerst (Montreal, Canada). Xylazine was from Bayer (Etobicoke, Canada) and [<sup>3</sup>H]-thymidine was from ICN (CA, U.S.A.). [<sup>125</sup>I]HPP-Aca-Lys[β-D-Nal<sup>7</sup>, Ile<sup>8</sup>]des-Arg<sup>9</sup>BK (3-4 hydroxyphenyl-propionyl-Aca-Lys[β-D-Nal<sup>7</sup>, Ile<sup>8</sup>]des-Arg<sup>9</sup>BK) was developed from the selective B<sub>1</sub> receptor antagonists R-715 or Aca-Lys[β-D-Nal<sup>7</sup>, Ile<sup>8</sup>]des-Arg<sup>9</sup>BK (Neugebauer *et al.*, 2002). They were kindly supplied by Dr W. Neugebauer (Department of Pharmacology, Université de Sherbrooke, Sherbrooke, Canada). Autoradiographic [<sup>125</sup>I]-microscales (20μm) and Kodak Scientific Imaging Films BIOMAX TM MS<sup>®</sup> (double-coated, 24x30 cm) were purchased from Amersham Pharmacia Biotech Canada. All other chemicals were from Sigma-Aldrich Canada.

## Statistical analysis

Analysis of variance followed by Dunnett's multiple comparisons test was applied for all data, except for cGMP levels in the aorta, which was analyzed using the nonparametric test Kruskal-Wallis followed by Dunn's multiple comparisons test. Values are presented as mean ± standard error of the mean (SEM) and p<0.05 was considered statistically significant.

## 3.2.4 Results

### Time course of enalapril effects

Mean body weight of rats before treatment was 263±2 g. All rats gained weight during the experimental period, ending at 309±6 g at days 15-16. Daily water consumption significantly increased by 87±4% in rats treated with enalapril for 15-16 days (p<0.01). Rats used in this study were hypertensive before initiation of treatment, with an average systolic blood pressure of 188±4 mmHg (n=14, measured in a subset of rats). Their systolic blood pressure was normalized at the time of the next measurement (135±2 mmHg, n=16, day 10, p<0.01), with no further reduction at day 14.

Using *in vitro* receptor autoradiography, we observed a transient increase of kinin B<sub>1</sub> binding sites in the aorta, occurring only between days 9 and 12 (Fig 1). The number of nuclei stained by the ISOL assay in the whole section of the aortic media, indicative of double-stranded DNA breaks with single-base 3' overhangs (specific to DNA fragmentation associated with apoptosis), was increased significantly at days 9-10 and 11-12 (Fig 2A). A representative photomicrograph of ISOL-positive nuclei at days 0 and 9-10 is showed in Fig 2B. Following the initiation of apoptosis, SMC number, showed an abrupt reduction by days 11-12 and was stable by days 15-16 (Fig 2C). Vascular mass regression, as evaluated by the aortic CSA, reached significance by days 13-14, i.e. following SMC deletion by apoptosis (Fig 2D).

### **Effects of a B<sub>1</sub> antagonist**

Next, we tested the hypothesis that enalapril induction of SMC apoptosis is dependent on kinin B<sub>1</sub> receptor activation. Rats were randomized to receive placebo, enalapril, R-715 or enalapril + R-715 and were sacrificed at days 9-10, to examine the active phase of apoptosis, or at day 21, to examine the cumulative effects on remodeling. All rats gained weight during the experiment and final body weight was not different between groups (not shown). Daily water consumption increased by 36% ( $p < 0.01$ ) in enalapril-rats but was not affected by the B<sub>1</sub> antagonist. The significant antihypertensive effect of enalapril was not affected by R-715 and R-715 alone had no significant effect on blood pressure (Fig 3).

Consistent with the previous studies, enalapril treatment for 9-10 days did not yet reduce aortic CSA (Fig 4A) although it increased the number of apoptotic SMC nuclei in the aortic media (Fig 4B). Interestingly, enalapril-induced apoptosis was abolished by R-715 (Fig 4B). We evaluated cGMP levels in the aortic media at days 9-10, as a possible signaling event downstream of B<sub>1</sub> receptor stimulation. cGMP was increased in the aortic media by enalapril treatment, but this effect was blunted in the presence of R-715 (Fig 4C). R-715 alone did not affect aortic remodeling or cGMP. At this time point, the aorta did not show detectable changes in phosphorylation of Akt, a strong survival signal in SMC, or in the ratio of cleaved caspase-3 (active) over total enzyme (not shown).

We next examined the cumulative effect of the treatments on vascular remodeling after 21 days. At this time point, enalapril significantly reduced SMC hyperplasia, an effect that was completely prevented by co-administration of the B<sub>1</sub> antagonist (Fig 5A). Consistent with these data, the reduction in aortic DNA content with enalapril ( $-45\pm 7\%$ ,  $p < 0.01$ ) was completely prevented in the presence of R-715 (not shown). The reduction of aortic CSA with enalapril at day 21 was partially prevented (51%) by R-715 (Fig 5B). Administration of R-715 alone did not affect aortic remodeling. In summary, the kinin B<sub>1</sub> receptor antagonist R-715 abolished SMC apoptosis induction and reversal of aortic hyperplasia and significantly attenuated the regression of aortic hypertrophy without affecting blood pressure lowering in SHR treated with enalapril.

To further investigate the mechanisms involved in aortic remodeling during enalapril treatment, we evaluated the phosphorylation level of members from the 3 major families of mitogen-activated protein kinases (MAPKs). As shown in Fig 6A, the ratio of the phosphorylated form of p38 over the total enzyme was significantly reduced only at day 21 of enalapril treatment, an effect that was not modulated by R-715. A similar pattern was observed for the ratio of p-Erk / Erk (Fig 6B) and of p-Jnk / Jnk (Fig 6C).

To gain insight into the mechanisms of cardiac remodeling, we assessed left ventricular hypertrophy and hyperplasia at 21 days. As shown in Table 1, enalapril-induced reductions in left ventricular hypertrophy and hyperplasia were not affected by the co-administration of R-715.

### 3.2.5 Discussion

This is the first study demonstrating that B<sub>1</sub> receptors for kinins mediate vascular SMC apoptosis, an effect that is required for maximal reversal of aortic hypertrophy in SHR treated with enalapril. Blockade of kinin B<sub>2</sub> receptor does not affect enalapril-induced SMC apoptosis and aortic remodeling in this model (Duguay *et al.*, 2004). In contrast, a B<sub>1</sub> receptor blocker was able to completely prevent the deletion of SMC and the reversal of

aortic hyperplasia without affecting the antihypertensive effect of enalapril, suggesting a pressure-independent, receptor-specific regulation of SMC fate. Furthermore, apoptosis induction by B<sub>1</sub> receptors was organ-specific since the B<sub>1</sub> antagonist did not prevent the reduction of cardiac hyperplasia by enalapril.

In SMC cultured from rat mesenteric arteries, B<sub>1</sub> receptors inhibit PDGF-induced mitogenesis (Dixon & Dennis, 1997; Dixon *et al.*, 2002). *In vivo*, local delivery of the human tissue kallikrein gene into the rat carotid artery post-angioplasty inhibits SMC proliferation and migration via the activation of B<sub>1</sub> receptors leading to NO, cGMP and cyclic adenosine monophosphate (cAMP) production (Agata *et al.*, 2000). In rats treated with the angiotensin II type 1 receptor antagonist valsartan, B<sub>1</sub> receptor blockade reduces tissue cGMP levels and enhances neointimal hyperplasia post-angioplasty (Barker *et al.*, 2006). In contrast, B<sub>1</sub> receptor activation stimulates mitogenesis in quiescent rabbit aortic SMC incubated in the presence of a cyclooxygenase inhibitor (Levesque *et al.*, 1995). Together, these data suggest that the trophic response to B<sub>1</sub> agonists is influenced by the proliferative status of SMC. Vascular SMC from SHR exhibit dysregulation of growth, with enhanced rates of DNA synthesis and incidence of polyploidy (deBlois *et al.*, 2005). The accumulation of polyploid SMC is reversed in the aorta of SHR treated with an ACEi (Devlin *et al.*, 1995). In this model, enalapril induce SMC apoptosis before the enhanced rates of aortic DNA synthesis are normalized (deBlois *et al.*, 1997). Thus it is intriguing to speculate that B<sub>1</sub> receptor-mediated apoptosis targets SMC showing a dysregulated growth behavior.

B<sub>1</sub> receptors activate MAPKs in SMC (Christopher *et al.*, 2001; Naraba *et al.*, 1998) and these signaling pathways have been implicated in the regulation of cell growth and survival (Touyz & Schiffrin, 2000). In order to gain insights into the downstream molecular mechanisms, we analyzed the regulation of MAPKs during enalapril-induced vascular apoptosis. The phosphorylation of Erk-1/2, p38 and Jnk MAPKs, were not influenced by enalapril at days 9-10, i.e. at a time when SMC apoptosis is ongoing as shown by *in situ* labeling of DNA fragmentation. At day 21 of enalapril, however, the phosphorylation of all MAPKs was reduced, and this was not affected by B<sub>1</sub> receptor blockade. Thus, inhibition of

MAPKs may not play a primary role in SMC apoptosis induction during enalapril treatment. In contrast, MAPK inhibition may be involved in the B<sub>1</sub>-receptor-independent reduction of aortic hypertrophy. Consistent with this, Erk-1/2 inhibition *in vivo* reduces protein synthesis in the aorta of hypertensive rats (Girardot *et al.*, 2003; Martens *et al.*, 2002).

Endothelial dysfunction in SHR vessels involves increased production of reactive oxygen species and decreased NO bioavailability (Vanhoutte *et al.*, 2005). In SMC, reactive oxygen species such as hydrogen peroxide and superoxide stimulate growth (Li *et al.*, 1997; Li *et al.*, 1999) while NO induce apoptosis (Fukuo *et al.*, 1996; Garg & Hassid, 1989; Iwashina *et al.*, 1998; Pilane & LaBelle, 2005). Several lines of evidence suggest a role for the correction of endothelial dysfunction in apoptosis induction in SHR. First, correction of endothelial dysfunction in SHR occurs between 7 and 14 days of enalapril treatment, i.e., during the period of aortic apoptosis induction (Der Sarkissian *et al.*, 2004). Second, although correction of endothelial dysfunction by daily administration of tetrahydrobiopterine and L-arginine for 1 week is not sufficient to induce aortic apoptosis, it interacts synergistically with enalapril to induce SMC apoptosis (Der Sarkissian *et al.*, 2004). An attractive hypothesis is that enalapril acts by increasing kinin levels, which in turn act on B<sub>1</sub> receptors to increase aortic apoptosis via the NO / cGMP pathway, a mechanism that would require correction of endothelial dysfunction to be fully functional. Enalaprilat may also directly stimulate the B<sub>1</sub> receptor / NO pathway in endothelial cells, as shown by some groups (Ignjatovic *et al.*, 2002), but not others (Fortin *et al.*, 2003). In the present study, we present the first evidence that B<sub>1</sub> receptors elevate cGMP levels in the aorta of SHR treated with enalapril. In addition, preliminary evidence indicates that B<sub>1</sub> receptors mediate vascular relaxations in isolated SHR aorta and that blockade of NO synthase activity with L-NAME abolishes these relaxations, unmasking a contractile effect of B<sub>1</sub> agonists only in aortae obtained after 9-12 days of enalapril (D Duguay *et al.*, unpublished observations). Potential sources of NO in the SHR aorta include type III NO synthase (eNOS) in the endothelium and type I NO synthase (nNOS) in SMC and adventitia (Boulanger *et al.*, 1998; Brophy *et al.*, 2000; Buchwalow *et al.*, 2002; Schwarz *et al.*, 1999). Thus, reversal of aortic hyperplasia with enalapril may involve NO-induced SMC apoptosis.

It should be mentioned that the SHR aorta expresses both receptor subtypes for kinins (Duguay *et al.*, 2004) and that kinin B<sub>2</sub> receptors have also been shown to increase cGMP levels in the aorta of SHR in a different experimental paradigm, i.e. ACEi treatment for 20 weeks starting *in utero* (Gohlke *et al.*, 1993). Since B<sub>1</sub> receptors show little desensitization and a markedly sustained pattern of intracellular signaling relative to B<sub>2</sub> receptors (Faussner *et al.*, 1999), signaling pathways specific for B<sub>1</sub> receptors may also contribute to apoptosis. In rat mesenteric arteries, B<sub>1</sub> receptors stimulate the release of ceramide, a known apoptotic mediator (Gulbins & Li, 2006; Perrotta *et al.*, 2005) via the activation of sphingomyelinase (SMase) (Kleine *et al.*, 2002)). NO-induced apoptosis is accompanied by SMase activation and ceramide release in SMC (Pilane & LaBelle, 2004). In contrast, B<sub>2</sub> receptor stimulation inhibits SMase in rabbit cortical collecting duct cells (Liu *et al.*, 1999).

Proposed mechanisms leading to the up-regulation of B<sub>1</sub> receptors remain incompletely understood. These include tissue damage, inflammatory cytokines, B<sub>1</sub> agonists themselves, B<sub>2</sub> receptor gene knock-out and exposure to ACEi. While the induction of B<sub>1</sub> receptors by ACEi treatment is controversial, it appears to be tissue and species dependent (Marceau *et al.*, 1999; Ongali *et al.*, 2003; Marin-Castano *et al.*, 2002). Chronic ACEi administration up-regulates functional B<sub>1</sub> receptors in nephrons and renal vessels of normotensive rats (Marin-Castano *et al.*, 2002) and transiently increase B<sub>1</sub> binding sites in the spinal cord of 8-week old SHR (Ongali *et al.*, 2003). We previously reported that functional B<sub>1</sub> receptors are significantly increased in vessels obtained after 8-9 days of enalapril treatment (Duguay *et al.*, 2004). The present study confirms and expands these data by showing that aortic up-regulation of B<sub>1</sub> binding sites by ACEi *in vivo* is a transient phenomenon occurring in temporal correlation with the apparition and clearance of DNA fragments in the aortic media during enalapril treatment. Thus, B<sub>1</sub> receptor induction may reflect a transient inflammatory response to the rapid production of apoptotic bodies in the vascular wall. Consistent with this, we recently observed that reversal of cardiac fibroblast hyperplasia by apoptosis in SHR treated with amlodipine induces a transient infiltration of monocytes in the myocardium (Duguay *et al.*, 2007). Cells expressing B<sub>1</sub> receptors *de novo* may also be those undergoing apoptosis.

Aortic hyperplasia in SHR is reversed also by AT<sub>1</sub> receptor blockers and calcium channel blockers (deBlois *et al.*, 1997; Marchand *et al.*, 2003; Tea *et al.*, 2000). Our current results evoke the possibility that B<sub>1</sub> receptors may act as a common apoptotic pathway in these models. First, angiotensin II AT<sub>2</sub> receptors mediate SMC apoptosis in SHR treated with an AT<sub>1</sub> antagonist (Tea *et al.*, 2000) and AT<sub>2</sub> receptor stimulation increases vascular kininogenase activity in mice (Tsutsumi *et al.*, 1999). Some effects of AT<sub>1</sub> antagonists are mediated by kinins receptors (Zhu *et al.*, 1999; Gohlke *et al.*, 1998; Jalowy *et al.*, 1998), including B<sub>1</sub> receptors (Barker *et al.*, 2006; Tschöpe *et al.*, 2004). Second, the calcium channel blocker amlodipine has been shown to increase the release of NO via a kinin B<sub>2</sub> receptor-dependent mechanism (Zhang & Hintze, 1998; Zhang *et al.*, 1999a; Zhang *et al.*, 1999b; Zhang *et al.*, 2000; Xu *et al.*, 2002; Lenasi *et al.*, 2003). Furthermore, an intriguing report revealed that *in vitro*, amlodipine at a high dose inhibit ACE activity to the same extent as enalapril (Xu *et al.*, 2002).

We previously reported that the beta-blocker propranolol induces apoptosis and reverses hyperplasia in the SHR heart but not aorta (deBlois *et al.*, 1997; Tea *et al.*, 1999). The present study further supports the notion that apoptosis during antihypertensive treatment is organ-specific. Enalapril-induced fibroblast apoptosis and reversal of left ventricular hyperplasia in SHR does not involve kinin B<sub>2</sub> receptors (Duguay *et al.*, 2004; Der Sarkissian *et al.*, 2003). Therefore, we can exclude activation of the kinin pathway as mechanism for apoptosis during rapid cardiac remodeling with antihypertensive drugs in SHR.

In summary, this study shows that therapeutic aortic remodeling involves B<sub>1</sub> receptor-mediated SMC apoptosis during enalapril treatment of hypertension. Together with the finding that gene polymorphism associated with low B<sub>1</sub> receptor expression is associated with a higher prospective coronary risk in hypertensive patients (Dhamrait *et al.*, 2003), the present study suggest that activation of B<sub>1</sub> receptors may provide cardiovascular protection and contribute to the clinical benefits of ACEi.

### 3.2.6 References

- AGATA,J., MIAO,R.Q., YAYAMA,K., CHAO,L. & CHAO,J. (2000). Bradykinin B(1) receptor mediates inhibition of neointima formation in rat artery after balloon angioplasty. *Hypertension*, **36**, 364-370.
- BARKER,T.A., MASSETT,M.P., KORSHUNOV,V.A., MOHAN,A.M., KENNEDY,A.J. & BERK,B.C. (2006). Angiotensin II type 2 receptor expression after vascular injury: differing effects of angiotensin-converting enzyme inhibition and angiotensin receptor blockade. *Hypertension*, **48**, 942-949.
- BENETOS,A., LEVY,B.I., LACOLLEY,P., TAILLARD,F., DURIEZ,M. & SAFAR,M.E. (1997). Role of angiotensin II and bradykinin on aortic collagen following converting enzyme inhibition in spontaneously hypertensive rats. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, **17**, 3196-3201.
- BHOOLA,K.D., FIGUEROA,C.D. & WORTHY,K. (1992). Bioregulation of kinins: kallikreins, kininogens, and kininases. *Pharmacol. Rev.*, **44**, 1-80.
- BLACK,M.J., BERTRAM,J.F. & JOHNSTON,C.I. (1996). Cardiac growth during high and low dose perindopril treatment in spontaneously hypertensive rats. *Clin. Exp Pharmacol Physiol*, **23**, 605-607.
- BOULANGER,C.M., HEYMES,C., BENESSIANO,J., GESKE,R.S., LEVY,B.I. & VANHOUTTE,P.M. (1998). Neuronal nitric oxide synthase is expressed in rat vascular smooth muscle cells: activation by angiotensin II in hypertension. *Circ. Res.*, **83**, 1271-1278.
- BROPHY,C.M., KNOEPP,L., XIN,J. & POLLOCK,J.S. (2000). Functional expression of NOS 1 in vascular smooth muscle. *Am. J Physiol Heart Circ. Physiol*, **278**, H991-H997.
- BUCHWALOW,I.B., PODZUWEIT,T., BOCKER,W., SAMOILOVA,V.E., THOMAS,S., WELLNER,M., BABA,H.A., ROBENEK,H., SCHNEKENBURGER,J. & LERCH,M.M. (2002). Vascular smooth muscle and nitric oxide synthase. *FASEB J*, **16**, 500-508.
- CHRISTOPHER,J., VELARDE,V. & JAFFA,A.A. (2001). Induction of B(1)-kinin receptors in vascular smooth muscle cells: cellular mechanisms of map kinase activation. *Hypertension*, **38**, 602-605.

DEBLOIS,D., TEA,B.S., BEAUDRY,D. & HAMET,P. (2005). Regulation of therapeutic apoptosis: a potential target in controlling hypertensive organ damage. *Can. J Physiol Pharmacol*, **83**, 29-41.

DEBLOIS,D., TEA,B.S., THAN,V.D., TREMBLAY,J. & HAMET,P. (1997). Smooth muscle apoptosis during vascular regression in spontaneously hypertensive rats. *Hypertension*, **29**, 340-349.

DER SARKISSIAN,S., MARCHAND,E.L., DUGUAY,D. & DEBLOIS,D. (2004). Synergistic interaction between enalapril, L-arginine and tetrahydrobiopterin in smooth muscle cell apoptosis and aortic remodeling induction in SHR. *Br. J Pharmacol*, **142**, 912-918.

DER SARKISSIAN,S., MARCHAND,E.L., DUGUAY,D., HAMET,P. & DEBLOIS,D. (2003). Reversal of interstitial fibroblast hyperplasia via apoptosis in hypertensive rat heart with valsartan or enalapril. *Cardiovasc. Res.*, **57**, 775-783.

DEVLIN,A.M., GORDON,J.F., DAVIDSON,A.O., CLARK,J.S., HAMILTON,C.A., MORTON,J.J., CAMPBELL,A.M., REID,J.L. & DOMINICZAK,A.F. (1995). The effects of perindopril on vascular smooth muscle polyploidy in stroke-prone spontaneously hypertensive rats. *J. Hypertens.*, **13**, 211-218.

DHAMRAIT,S.S., PAYNE,J.R., LI,P., JONES,A., TOOR,I.S., COOPER,J.A., HAWE,E., PALMEN,J.M., WOOTTON,P.T., MILLER,G.J., HUMPHRIES,S.E. & MONTGOMERY,H.E. (2003). Variation in bradykinin receptor genes increases the cardiovascular risk associated with hypertension. *Eur. Heart J*, **24**, 1672-1680.

DIDENKO,V.V., BOUDREAUX,D.J. & BASKIN,D.S. (1999). Substantial background reduction in ligase-based apoptosis detection using newly designed hairpin oligonucleotide probes. *Biotechniques*, **27**, 1130-1132.

DIDENKO,V.V. & HORNSBY,P.J. (1996). Presence of double-strand breaks with single-base 3' overhangs in cells undergoing apoptosis but not necrosis. *J. Cell Biol.*, **135**, 1369-1376.

DIXON,B.S. & DENNIS,M.J. (1997). Regulation of mitogenesis by kinins in arterial smooth muscle cells. *Am. J Physiol*, **273**, C7-20.

DIXON,B.S., EVANOFF,D., FANG,W.B. & DENNIS,M.J. (2002). Bradykinin B1 receptor blocks PDGF-induced mitogenesis by prolonging ERK activation and increasing p27Kip1. *Am. J Physiol Cell Physiol*, **283**, C193-C203.

DUGUAY,D., PESANT,S., DESCHEPPER,C.F. & DEBLOIS,D. (2007). Fibroblast apoptosis precedes cardiomyocyte mass reduction during left ventricular remodeling in hypertensive rats treated with amlodipine. *J. Hypertens.*, In press.

DUGUAY,D., SARKISSIAN,S.D., KOUZ,R., ONGALI,B., COUTURE,R. & DEBLOIS,D. (2004). Kinin B2 receptor is not involved in enalapril-induced apoptosis and regression of hypertrophy in spontaneously hypertensive rat aorta: possible role of B1 receptor. *Br. J. Pharmacol.*, **141**, 728-736.

FARHY,R.D., CARRETERO,O.A., HO,K.L. & SCICLI,A.G. (1993). Role of kinins and nitric oxide in the effects of angiotensin converting enzyme inhibitors on neointima formation. *Circ. Res.*, **72**, 1202-1210.

FAUSSNER,A., BATHON,J.M. & PROUD,D. (1999). Comparison of the responses of B1 and B2 kinin receptors to agonist stimulation. *Immunopharmacology*, **45**, 13-20.

FORTIN,J.P., GOBEIL,F., JR., ADAM,A., REGOLI,D. & MARCEAU,F. (2003). Do angiotensin-converting enzyme inhibitors directly stimulate the kinin B1 receptor? *Am. J. Physiol Heart Circ. Physiol.*, **285**, H277-H282.

FUKUO,K., HATA,S., SUHARA,T., NAKAHASHI,T., SHINTO,Y., TSUJIMOTO,Y., MORIMOTO,S. & OGIHARA,T. (1996). Nitric oxide induces upregulation of Fas and apoptosis in vascular smooth muscle. *Hypertension*, **27**, 823-826.

GARG,U.C. & HASSID,A. (1989). Nitric oxide-generating vasodilators and 8-bromo-cyclic guanosine monophosphate inhibit mitogenesis and proliferation of cultured rat vascular smooth muscle cells. *J Clin. Invest.*, **83**, 1774-1777.

GIRARDOT,D., DEMEILLIERS,B., DEBLOIS,D. & MOREAU,P. (2003). ERK1/2-mediated vasoconstriction normalizes wall stress in small mesenteric arteries during NOS inhibition in vivo. *J Cardiovasc. Pharmacol.*, **42**, 339-347.

GOHLKE,P., LAMBERTY,V., KUWER,I., BARTENBACH,S., SCHNELL,A., LINZ,W., SCHOLKENS,B.A., WIEMER,G. & UNGER,T. (1993). Long-term low-dose angiotensin converting enzyme inhibitor treatment increases vascular cyclic guanosine 3',5'-monophosphate. *Hypertension*, **22**, 682-687.

GOHLKE,P., PEES,C. & UNGER,T. (1998). AT2 receptor stimulation increases aortic cyclic GMP in SHRSP by a kinin-dependent mechanism. *Hypertension*, **31**, 349-355.

GULBINS,E. & LI,P.L. (2006). Physiological and pathophysiological aspects of ceramide. *Am. J. Physiol Regul. Integr. Comp Physiol*, **290**, R11-R26.

IGNJATOVIC,T., TAN,F., BROVKOVYCH,V., SKIDGEL,R.A. & ERDOS,E.G. (2002). Novel mode of action of angiotensin I converting enzyme inhibitors: direct activation of bradykinin B1 receptor. *J. Biol. Chem.*, **277**, 16847-16852.

IWASHINA,M., SHICHIRI,M., MARUMO,F. & HIRATA,Y. (1998). Transfection of inducible nitric oxide synthase gene causes apoptosis in vascular smooth muscle cells. *Circulation*, **98**, 1212-1218.

JALOWY,A., SCHULZ,R., DORGE,H., BEHREND,S., M. & HEUSCH,G. (1998). Infarct size reduction by AT1-receptor blockade through a signal cascade of AT2-receptor activation, bradykinin and prostaglandins in pigs. *J Am. Coll. Cardiol.*, **32**, 1787-1796.

KLEINE,L., LIU,G., LEBLANC,N. & HEBERT,R.L. (2002). Bradykinin stimulates ceramide production by activating specific BK-B(1) receptor in rat small artery. *Am. J. Physiol Heart Circ. Physiol*, **282**, H175-H183.

LENASI,H., KOHLSTEDT,K., FICHTLSCHERER,B., MULSCH,A., BUSSE,R. & FLEMING,I. (2003). Amlodipine activates the endothelial nitric oxide synthase by altering phosphorylation on Ser1177 and Thr495. *Cardiovasc. Res.*, **59**, 844-853.

LEVESQUE,L., LARRIVEE,J.F., BACHVAROV,D.R., RIOUX,F., DRAPEAU,G. & MARCEAU,F. (1995). Regulation of kinin-induced contraction and DNA synthesis by inflammatory cytokines in the smooth muscle of the rabbit aorta. *Br. J Pharmacol.*, **116**, 1673-1679.

LI,P.F., DIETZ,R. & VON HARSDORF,R. (1997). Differential effect of hydrogen peroxide and superoxide anion on apoptosis and proliferation of vascular smooth muscle cells. *Circulation*, **96**, 3602-3609.

LI,P.F., MAASCH,C., HALLER,H., DIETZ,R. & VON,H.R. (1999). Requirement for protein kinase C in reactive oxygen species-induced apoptosis of vascular smooth muscle cells. *Circulation*, **100**, 967-973.

LINZ,W. & SCHOLKENS,B.A. (1992). A specific B2-bradykinin receptor antagonist HOE 140 abolishes the antihypertrophic effect of ramipril. *Br. J Pharmacol.*, **105**, 771-772.

LINZ,W., WIEMER,G., GOHLKE,P., UNGER,T. & SCHOLKENS,B.A. (1995). Contribution of kinins to the cardiovascular actions of angiotensin-converting enzyme inhibitors. *Pharmacol. Rev.*, **47**, 25-49.

LIU,G., KLEINE,L., NASRALLAH,R. & HEBERT,R.L. (1999). Bradykinin inhibits ceramide production and activates phospholipase D in rabbit cortical collecting duct cells. *Am. J. Physiol.*, **276**, F589-F598.

MARCEAU,F., LARRIVEE,J.F., BOUTHILLIER,J., BACHVAROVA,M., HOULE,S. & BACHVAROV,D.R. (1999). Effect of endogenous kinins, prostanoids, and NO on kinin B1 and B2 receptor expression in the rabbit. *Am. J. Physiol.*, **277**, R1568-R1578.

MARCHAND,E.L., DER,S.S., HAMET,P. & DEBLOIS,D. (2003). Caspase-dependent cell death mediates the early phase of aortic hypertrophy regression in losartan-treated spontaneously hypertensive rats. *Circ. Res.*, **92**, 777-784.

MARIN-CASTANO,M.E., SCHANSTRA,J.P., NEAU,E., PRADDAUDE,F., PECHER,C., ADER,J.L., GIROLAMI,J.P. & BASCANDS,J.L. (2002). Induction of functional bradykinin b(1)-receptors in normotensive rats and mice under chronic Angiotensin-converting enzyme inhibitor treatment. *Circulation*, **105**, 627-632.

MARTENS,F.M., DEMEILLIERS,B., GIRARDOT,D., DAIGLE,C., DAO,H.H., DEBLOIS,D. & MOREAU,P. (2002). Vessel-specific stimulation of protein synthesis by nitric oxide synthase inhibition: role of extracellular signal-regulated kinases 1/2. *Hypertension*, **39**, 16-21.

NARABA,H., UENO,A., KOSUGI,Y., YOSHIMURA,M., MURAKAMI,M., KUDO,I. & OH-ISHI,S. (1998). Agonist stimulation of B1 and B2 kinin receptors causes activation of the MAP kinase signaling pathway, resulting in the translocation of AP-1 in HEK 293 cells. *FEBS Lett.*, **435**, 96-100.

NEUGEBAUER,W., BLAIS,P.A., HALLE,S., FILTEAU,C., REGOLI,D. & GOBEIL,F., JR. (2002). Kinin B1 receptor antagonists with multi-enzymatic resistance properties. *Can. J Physiol Pharmacol.*, **80**, 287-292.

ONGALI,B., BUCK,H.S., CLOUTIER,F., LEGAULT,F., REGOLI,D., LAMBERT,C., THIBAUT,G. & COUTURE,R. (2003). Chronic effects of angiotensin-converting enzyme inhibition on kinin receptor binding sites in the rat spinal cord. *Am. J Physiol Heart Circ. Physiol.*, **284**, H1949-H1958.

PERROTTA,C., DE,P.C., FALCONE,S., SCIORATI,C. & CLEMENTI,E. (2005). Nitric oxide, ceramide and sphingomyelinase-coupled receptors: a tale of enzymes and messengers coordinating cell death, survival and differentiation. *Life Sciences*, **77**, 1732-1739.

PILANE,C.M. & LABELLE,E.F. (2004). NO induced apoptosis of vascular smooth muscle cells accompanied by ceramide increase. *J. Cell Physiol*, **199**, 310-315.

PILANE,C.M. & LABELLE,E.F. (2005). Nitric oxide stimulated vascular smooth muscle cells undergo apoptosis induced in part by arachidonic acid derived eicosanoids. *J Cell Physiol*, **204**, 423-427.

SCHWARZ,P.M., KLEINERT,H. & FORSTERMANN,U. (1999). Potential functional significance of brain-type and muscle-type nitric oxide synthase I expressed in adventitia and media of rat aorta. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, **19**, 2584-2590.

TEA,B.S., DAM,T.V., MOREAU,P., HAMET,P. & DEBLOIS,D. (1999). Apoptosis during regression of cardiac hypertrophy in spontaneously hypertensive rats. Temporal regulation and spatial heterogeneity. *Hypertension*, **34**, 229-235.

TEA,B.S., DER,S.S., TOUYZ,R.M., HAMET,P. & DEBLOIS,D. (2000). Proapoptotic and growth-inhibitory role of angiotensin II type 2 receptor in vascular smooth muscle cells of spontaneously hypertensive rats in vivo. *Hypertension*, **35**, 1069-1073.

TEIGER,E., THAN,V.D., RICHARD,L., WISNEWSKY,C., TEA,B.S., GABOURY,L., TREMBLAY,J., SCHWARTZ,K. & HAMET,P. (1996). Apoptosis in pressure overload-induced heart hypertrophy in the rat. *J. Clin. Invest*, **97**, 2891-2897.

TOUYZ,R.M. & SCHIFFRIN,E.L. (2000). Signal transduction mechanisms mediating the physiological and pathophysiological actions of angiotensin II in vascular smooth muscle cells. *Pharmacol. Rev.*, **52**, 639-672.

TSCHOPE,C., SPILLMANN,F., ALTMANN,C., KOCH,M., WESTERMANN,D., DHAYAT,N., DHAYAT,S., BASCANDS,J.L., GERA,L., HOFFMANN,S., SCHULTHEISS,H.P. & WALTHER,T. (2004). The bradykinin B1 receptor contributes to the cardioprotective effects of AT1 blockade after experimental myocardial infarction. *Cardiovasc. Res.*, **61**, 559-569.

TSUTSUMI,Y., MATSUBARA,H., MASAKI,H., KURIHARA,H., MURASAWA,S., TAKAI,S., MIYAZAKI,M., NOZAWA,Y., OZONO,R., NAKAGAWA,K., MIWA,T., KAWADA,N., MORI,Y., SHIBASAKI,Y., TANAKA,Y., FUJIYAMA,S., KOYAMA,Y., FUJIYAMA,A., TAKAHASHI,H. & IWASAKA,T. (1999). Angiotensin II type 2 receptor overexpression activates the vascular kinin system and causes vasodilation. *J. Clin. Invest.*, **104**, 925-935.

VANHOUTTE,P.M., FELETOU,M. & TADDEI,S. (2005). Endothelium-dependent contractions in hypertension. *Br. J Pharmacol.*, **144**, 449-458.

XU,B., XIAO-HONG,L., LIN,G., QUEEN,L. & FERRO,A. (2002). Amlodipine, but not verapamil or nifedipine, dilates rabbit femoral artery largely through a nitric oxide- and kinin-dependent mechanism. *Br. J Pharmacol.*, **136**, 375-382.

ZHANG,X. & HINTZE,T.H. (1998). Amlodipine releases nitric oxide from canine coronary microvessels: an unexpected mechanism of action of a calcium channel-blocking agent. *Circulation*, **97**, 576-580.

ZHANG,X., KICHUK,M.R., MITAL,S., OZ,M., MICHLER,R., NASJLETTI,A., KALEY,G. & HINTZE,T.H. (1999a). Amlodipine promotes kinin-mediated nitric oxide production in coronary microvessels of failing human hearts. *Am. J Cardiol.*, **84**, 27L-33L.

ZHANG,X., RECCHIA,F.A., BERNSTEIN,R., XU,X., NASJLETTI,A. & HINTZE,T.H. (1999b). Kinin-mediated coronary nitric oxide production contributes to the therapeutic action of angiotensin-converting enzyme and neutral endopeptidase inhibitors and amlodipine in the treatment in heart failure. *J Pharmacol Exp Ther*, **288**, 742-751.

ZHANG,X., XU,X., NASJLETTI,A. & HINTZE,T.H. (2000). Amlodipine enhances NO production induced by an ACE inhibitor through a kinin-mediated mechanism in canine coronary microvessels. *J Cardiovasc. Pharmacol*, **35**, 195-202.

ZHU,P., ZAUGG,C.E., HORNSTEIN,P.S., ALLEGRINI,P.R. & BUSER,P.T. (1999). Bradykinin-dependent cardioprotective effects of losartan against ischemia and reperfusion in rat hearts. *J. Cardiovasc. Pharmacol.*, **33**, 785-790.

### 3.3.7 Figure legends, figures and table

**Figure 1: Increased expression and function of kinin B<sub>1</sub> receptors in the aorta after enalapril treatment.** **A.** Quantification of the specific binding sites of [<sup>125</sup>I]HPP-Aca-Lys[β-D-Nal<sup>7</sup>, Ile<sup>8</sup>]des-Arg<sup>9</sup>BK (for B<sub>1</sub> receptor) in the aortae of control SHR (day 0) or SHR treated with enalapril. The number of binding sites was significantly decreased at day 8 and increased at days 9-10 and 11-12. \* Significantly different (P < 0.05) from day 0.

**Figure 2: Time course of enalapril effects in the aorta.** **A.** Kinetics of the presence of apoptotic SMC nuclei (significantly increased at days 9-10 and 11-12). **B.** Representative photomicrograph of ISOL-positive nuclei at days 0 and 9-10. **C.** Kinetics of the reduction of SMC number (significantly reduced for the first time at days 11-12) and **(D)** the reduction of aortic hypertrophy (significantly reduced for the first time at days 13-14). \* Significantly different (P < 0.05) from day 0.

**Figure 3: Systolic blood pressure measured by tail-cuff plethysmography at days 0, 4, 14 and 18 of treatment.** Systolic blood pressure reduction induced by enalapril was not modified by the concomitant blockade of kinin B<sub>1</sub> receptors. \* Significantly different (P < 0.05) from age-matched untreated SHR.

**Figure 4: Evaluation of aortic hypertrophy and detection of apoptotic nuclei and cGMP at the time of active apoptosis.** **A.** Aortic CSA was not yet reduced at days 9-10 of enalapril treatment. **B.** The presence of increased ISOL-positive medial SMC nuclei (apoptotic) detected at days 9-10 of enalapril treatment was prevented by co-administration of the specific kinin B<sub>1</sub> receptors antagonist R-715. **C.** Increased production of cGMP with enalapril, quantified by an enzyme immunoassay, was prevented by the addition of R-715. \* Significantly different (P < 0.05) from age-matched untreated SHR.

**Figure 5: Cumulative effect of enalapril alone or in combination with kinin B<sub>1</sub> receptors antagonist on aortic SMC number and aortic hypertrophy.** **A.** The reduction of SMC number induced by enalapril, as measured at day 21 of treatment, was completely

prevented by co-administration of R-715. **B.** The reduction of aortic CSA induced by enalapril, as measured at day 21 of treatment, was partially prevented by co-administration of R-715. \*\* and \* Significantly different ( $P < 0.01$  and  $P < 0.05$ , respectively) from age-matched untreated SHR. † Significantly different ( $P < 0.05$ ) from enalapril-treated SHR.

**Figure 6: Expression ratio of the phosphorylated form over the total form of MAPKs at days 9-10 and day 21 of treatment.** The phosphorylation ratios of (A) p38, (B) Erk-1/2 and (C) Jnk were reduced in the aortic media of SHR treated with enalapril at day 21 (■) but not at days 9-10 (□). The co-administration of R-715 did not modify this effect of enalapril. \* Significantly different ( $P < 0.05$ ) from age-matched untreated SHR. Inset shows the representative expression of the phosphorylated form and the total form of each proteins.

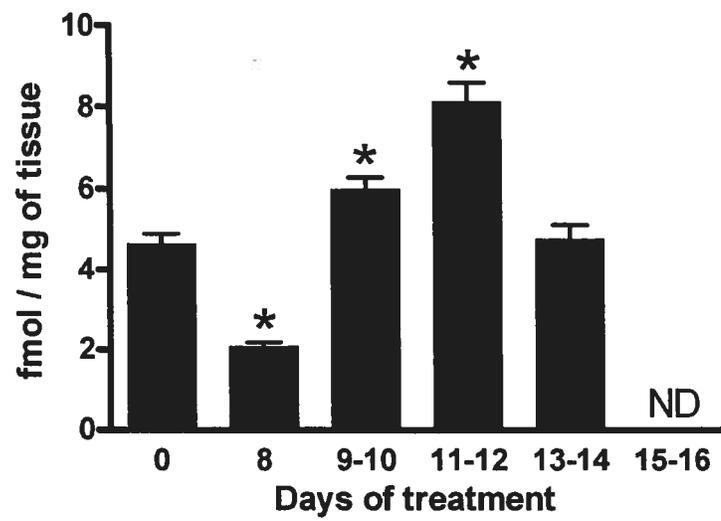


Figure 1

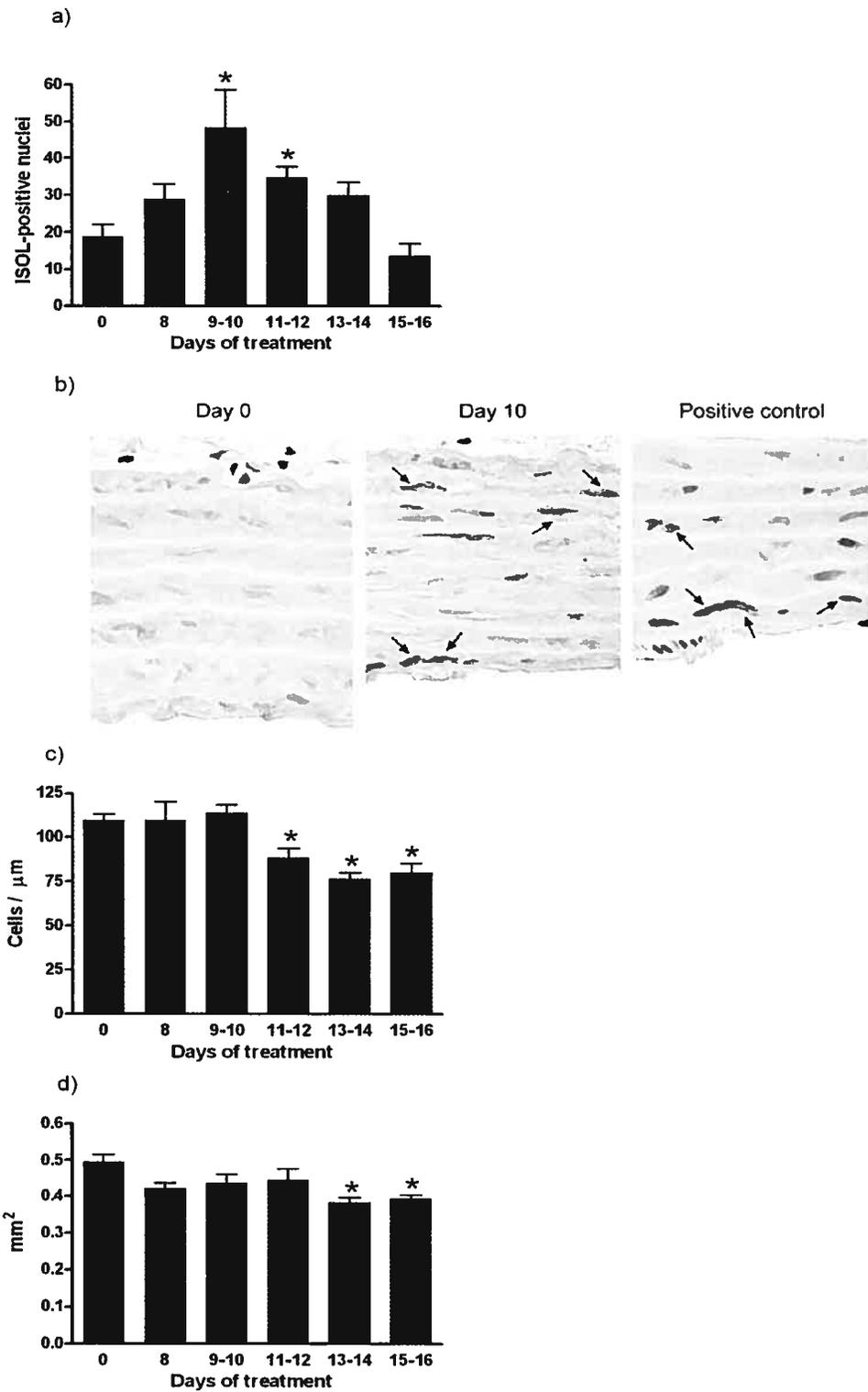


Figure 2

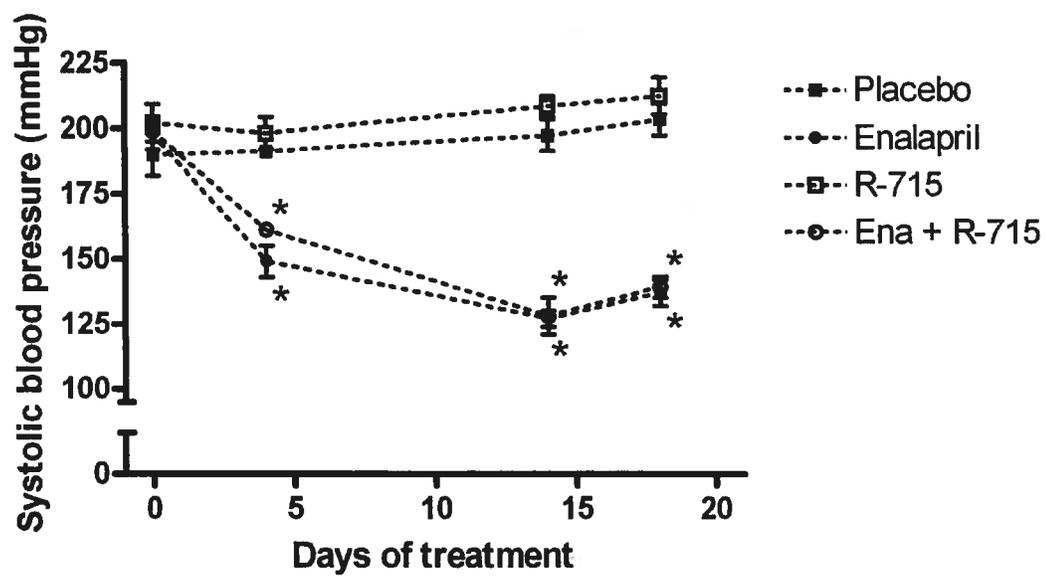
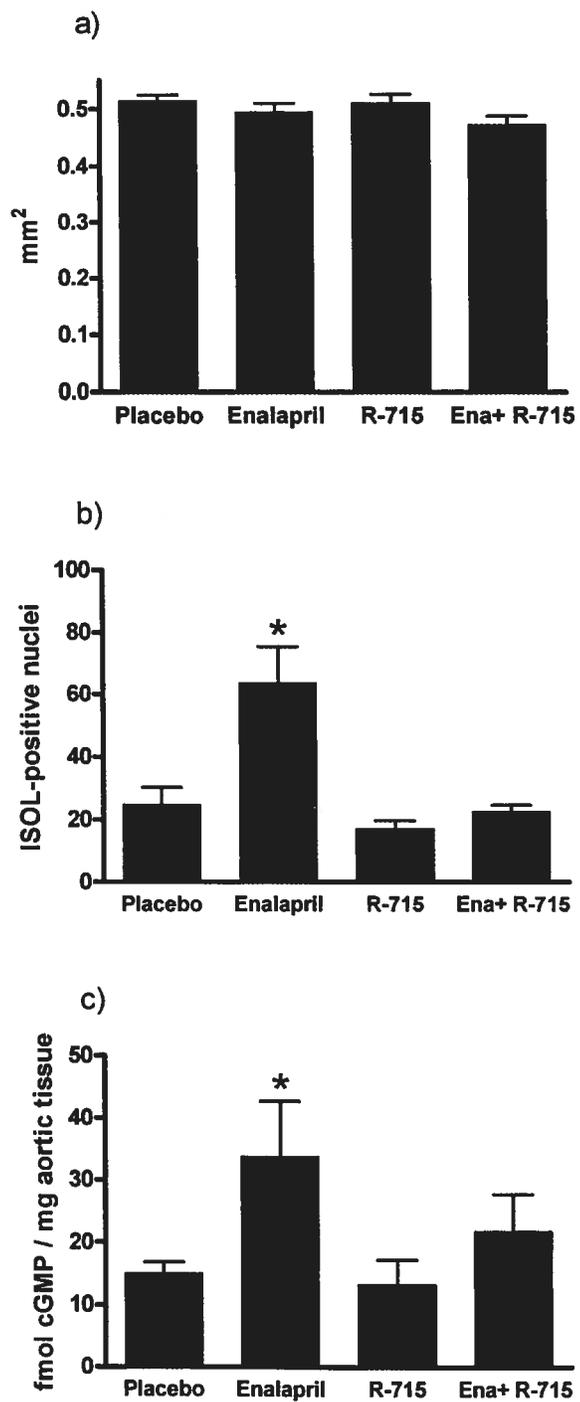


Figure 3

**Figure 4**

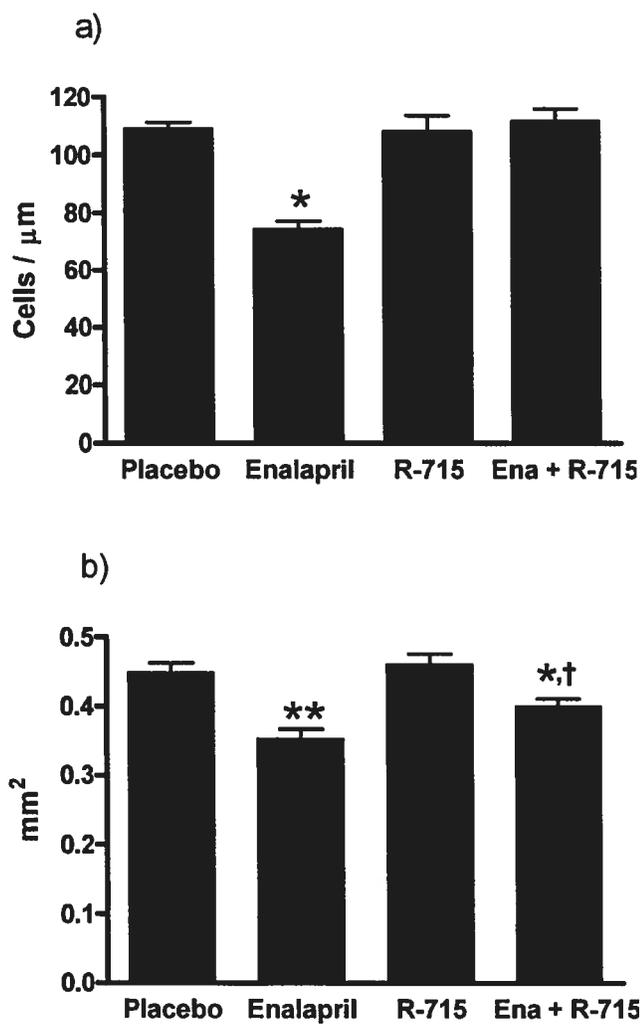


Figure 5

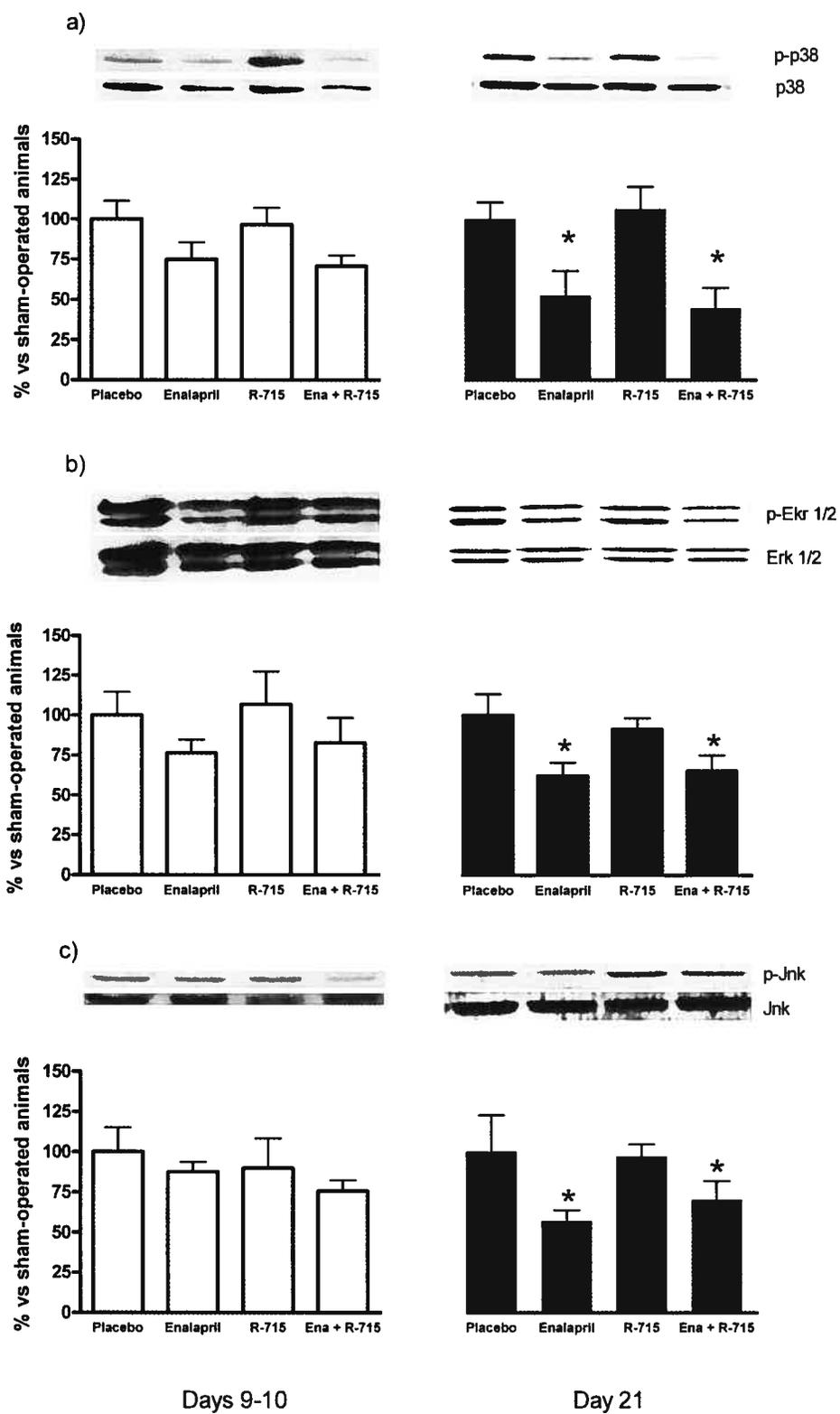


Figure 6

	Treatment			
	Placebo	Enalapril	R-715	Ena + R-715
<b>LEFT VENTRICLE</b>				
<b>Left-ventricular : Body Weight</b>				
<b>Ratio,</b> <b>mg/g 10<sup>-3</sup></b>	2.71±0.13	1.95±0.02*	2.54±0.06	1.91±0.06*
<b>Left ventricle weight</b>				
<b>mg</b>	767±25	548±17*	758±19	524±32*
<b>DNA content</b>				
<b>µg/g BW</b>	6.04±0.46	4.08±0.23*	5.18±0.18	4.12±0.21*
<b>RIGHT VENTRICLE</b>				
<b>Right-ventricular : Body</b>				
<b>Weight Ratio,</b> <b>mg/g 10<sup>-3</sup></b>	0.64±0.03	0.62±0.02	0.60±0.02	0.63±0.02
<b>Right ventricle weight</b>				
<b>mg</b>	183±10	173±7	179±8	173±9
<b>DNA content</b>				
<b>µg/g BW</b>	1.09±0.05	1.18±0.03	1.10±0.04	1.26±0.07

**Table 1: Cardiac hypertrophy and DNA content following SHR treatment with enalapril, R-715 or a combination of both drugs for 21 days.**

Values are mean ± SEM. \* Significantly different (P<0.05) from placebo group.

### 3.3 Publication N°3

#### **Differential Regulation of AKT, Caspases and MAP Kinases Underlies Smooth Muscle Cell Apoptosis During Onset Aortic Remodeling in Hypertensive Rats Treated With Amlodipine**

participation des différents auteurs de cette publication :

D Duguay : Conceptualisation de l'étude, stratégie expérimentale, expériences, analyses des résultats et écriture de l'article

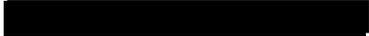
D deBlois : Conceptualisation de l'étude, analyses des résultats et écriture de l'article

**Differential Regulation of Akt, Caspases and MAP Kinases Underlies Smooth Muscle Cell Apoptosis During Onset Aortic Remodeling in Hypertensive Rats Treated With Amlodipine**

Accepté pour publication dans :  
*British Journal of Pharmacology*

David Duguay & Denis deBlois<sup>1</sup>

Running title: Amlodipine-induced smooth muscle cells apoptosis

Department of Pharmacology, University of Montreal, 2900, Edouard-Montpetit, Montreal,  
Quebec H3T 1J4, Canada,  
Tel. (514) 343-6111 ext. 0915, Fax: (514) 343-2291, email: 

<sup>1</sup>Author for correspondence

### 3.3.1 Summary

**Background and purpose:** The regression of aortic hypertrophy is initiated by a transient wave of smooth muscle cell (SMC) apoptosis in spontaneously hypertensive rats (SHR) treated with antihypertensive drugs, although the molecular pathways remain unclear. **Experimental approach:** Enzymes involved in apoptosis regulation were examined daily during onset aortic remodeling in SHR treated with amlodipine ( $20 \text{ mg kg}^{-1} \text{ day}^{-1}$ ). **Key results:** Significant reduction of aortic SMC number occurred by day 3 of amlodipine, reaching -24% at 28 days, followed by a significant regression of medial hypertrophy by day 5, reaching -14% at 28 days. ISOL-positive (apoptotic) SMC nuclei increased by 4.6-fold between days 2 and 4, in temporal correlation with the activation of caspase-8 (2.7-fold) at day 2 only, caspase-3 at days 3 and 4 (1.7-fold) and caspase-9 at day 3 only (3.1-fold). Akt phosphorylation, a pro-survival pathway, was reduced prior to apoptosis at day 1 (-52%) and until day 3. During the first 6 days of amlodipine treatment, significant reduction in phosphorylation of mitogen-activated protein (MAP) kinases was transient for p38 (-46% at day 3 only) but continuous for ERK 1/2 after 3 days (-40%), and for JNK after 4 days ( $> -50\%$ ). **Conclusions and implications:** Amlodipine inhibition of Akt occurred prior to and during SMC apoptosis induction, a process mediated by the early activation of caspase-8 followed by caspase-9 and -3 and associated with MAP kinase inhibition. These findings provide insights about the molecular pathways underlying SMC apoptosis leading to vascular remodeling during amlodipine treatment of hypertension.

**Keywords:** Hypertension; Hypertrophy / hyperplasia; Calcium channel blockers; Apoptosis; Smooth muscle cells.

**Abbreviations:** AT<sub>1</sub>, angiotensin II type 1 receptor; CSA, cross-sectional area; ERK 1/2, extracellular signal-regulated kinase 1/2; FLIP, FLICE-inhibitory protein; ISOL, *in situ* oligonucleotide ligation; JNK, c-Jun N-terminal kinase; MAP, mitogen-activated protein; p38, p38 MAP kinase; SHR, spontaneously hypertensive rat; SMC, smooth muscle cells.

### 3.3.2 Introduction

The importance of pleiotropic effects of antihypertensive drugs is increasingly being recognized (Ichihara *et al.*, 2006; Mason *et al.*, 2003; Nissen *et al.*, 2004). Notably, vascular hypertrophy contributes to the pathogenesis of hypertension and the reversal of this pathological remodeling is suggested to increase efficacy of anti-hypertensive drugs beyond the mere reduction of blood pressure (Intengan & Schiffrin, 2001). In conductance vessels of spontaneously hypertensive rats (SHR), a genetically determined model of hypertension, alterations in the replication and death rates of smooth muscle cells (SMC) contribute to establish hypertrophy observed in adults (Thorin-Trescases *et al.*, 2001). Pathological vascular remodeling associated with SMC hyperplasia is less readily reversible than remodeling associated with increased protein accumulation or cellular rearrangement around a smaller lumen. In recent years, SMC deletion by apoptosis has emerged as a mechanism by which vessels can control their mass in response to drugs or changes in hemodynamic influences (reviewed in (deBlois *et al.*, 2005; Gurbanov & Shiliang, 2006).

Studies in SHR showing an association between increased aortic SMC apoptosis and reversal of aortic hypertrophy in SHR treated with anti-hypertensive drugs shed a new light on the mechanisms of vascular remodeling (deBlois *et al.*, 1997; deBlois *et al.*, 2005; Tea *et al.*, 2000). A causal link between apoptosis and pharmacological reversal of vascular hypertrophy was suggested by the observation that only anti-hypertensive drug classes able to induce SMC apoptosis are also able to induce regression of hypertrophy in the aorta *in vivo* (deBlois *et al.*, 1997). This hypothesis was later confirmed in SHR receiving a pan-caspase inhibitor in combination with the angiotensin II type 1 receptor (AT<sub>1</sub>) antagonist losartan (Marchand *et al.*, 2003). In this study, caspase inhibition prevented the early phase of hypertrophy regression in the aorta. The kinetics and mechanisms involved during initiation of SMC apoptosis with AT<sub>1</sub> receptor antagonists and with angiotensin converting enzyme inhibitors are becoming clearer (Duguay *et al.*, 2004; Marchand *et al.*, 2003; Tea *et al.*, 2000). However, the mechanisms by which calcium channel blockers regulate SMC *in vivo* remain largely undefined. Studies have shown that nifedipine induces SMC apoptosis *in vivo* (SHR) (deBlois *et al.*, 1997) and *in vitro* in aortic cells derived from SHR (Stead *et al.*, 2000) and that long term treatment with amlodipine increases SMC susceptibility to

apoptosis in the SHR aorta (Sharifi & Schiffrin, 1998). Moreover, amlodipine can induce apoptosis in leukemia multidrug-resistant cells *via* a caspase-8-dependant pathway (Li *et al.*, 2006a). In the current investigation, we sought to define the time-course and molecular mechanisms of amlodipine-induced SMC apoptosis during aortic remodeling induced by amlodipine. Key enzymes regulating cell fate were examined, including the death-associated enzymes caspases-3, -8 and -9 (Lavrik *et al.*, 2005), members of the mitogen activated protein (MAP) kinases family (Pearson *et al.*, 2001), the pro-survival serine-threonine kinase Akt and the lipid phosphatase PTEN, involved in the metabolism of the Akt activator phosphatidylinositol (3,4,5) triphosphate (Datta *et al.*, 1999). By implicating Akt inhibition and caspase-8 activation but not MAP kinases regulation as early events leading to SMC apoptosis, our current results provide insights about the molecular mechanisms underlying initiation of vascular remodeling during amlodipine treatment of hypertension.

### 3.3.3 Methods

#### Animal procedures

Male SHR (n=116) were purchased from Charles-River (St-Constant, Canada) and housed for 1 week before initiation of the protocol. 11 week-old SHR (n=6 to 20 per group) were sacrificed after 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 10, 14 and 28 days of treatment with the calcium channel blocker amlodipine (20 mg kg<sup>-1</sup> day<sup>-1</sup>) in the drinking water. Food and water were administered *ad libitum* and animals were maintained under a 12-hour light/dark cycle. Body weight and water consumption were measured daily during the first week of treatment and three times a week for the remainder of the treatment, and the concentration of amlodipine in the drinking water was adjusted accordingly to ensure constant dosage of amlodipine. Systolic blood pressure and heart rate were measured by tail-cuff plethysmography in a subset of conscious, restrained SHR throughout amlodipine treatment (at days 0, 1, 2, 4, 6, 8, 12 and 25). At the time of sacrifice, rats were anesthetized with a single subcutaneous injection of ketamine (80 mg kg<sup>-1</sup>), xylazine (4 mg kg<sup>-1</sup>) and acepromazine (2 mg kg<sup>-1</sup>). To evaluate DNA synthesis *in vivo*, rats were injected intravenously with [<sup>3</sup>H]-thymidine (0.5 mCi kg<sup>-1</sup>) 1.5 hour before death and an intravenous injection of CdCl<sub>2</sub> (100 mmol l<sup>-1</sup>) was used to induce diastolic cardiac arrest. The thoracic

aorta was isolated, cleaned of blood and adventitial fat and weighed. A 3 mm-long ring was cut between the third and fourth intercostal arteries. The aortic rings were then fixed in 4% paraformaldehyde, processed according to routine histological procedures, paraffin-embedded and used for morphometric measurements. The endothelium was removed from the rest of the vessel, starting right after the aortic arch. The denuded vessel was immediately frozen in liquid nitrogen and later pulverized in liquid nitrogen using a mortar and pestle and stored at  $-80^{\circ}\text{C}$  until analysis. All animal manipulations were conducted according to institutional guidelines.

### **Hypertrophy and cell number measurements**

The aortic medial cross-sectional area (CSA) was evaluated in 3  $\mu\text{m}$ -thick, hematoxylin-phloxin-safran (HPS)-stained sections of aorta. Photomicrographs were taken at 40X magnification, digitized, and analyzed using the NIH Image 1.62 program (developed at the National Institute of Health; <http://rsb.info.nih.gov/nih-image/>). The three-dimensional disector method was used to measure smooth muscle cell number per unit of length. Photomicrographs of three consecutive 3  $\mu\text{m}$ -thick HPS-stained aortic sections were taken at 400X magnification and analyzed as previously described (deBlois *et al.*, 1997). In a subset of rats sacrificed at days 0, 7 and 14, one aliquot of the powdered aorta was weighed and total tissue DNA was extracted by the phenol and chloroform procedure, following digestion steps with proteinase K and RNase A in the presence of EDTA (Teiger *et al.*, 1996). DNA concentration ( $\mu\text{g}$  of DNA per mm of aorta) was determined by spectrophotometry. DNA content per mg of extracted tissue was multiplied by the weight of the aorta and then normalized for the length of the isolated aorta. *In vivo* DNA synthesis in the aorta was quantified by evaluating [ $^3\text{H}$ ]-thymidine incorporated into DNA 1.5 hour before diastolic cardiac arrest, using the extracted DNA.

### **Detection of apoptosis**

The degree of internucleosomal DNA fragmentation in the aortic media was quantified by radiolabeling DNA on free 3'OH ends using terminal deoxynucleotidyl transferase and [ $^{32}\text{P}$ ]-dCTP, as previously described (Duguay *et al.*, 2004). The slope of the linear regression of radioactivity associated with 150 to 1500 bp DNA fragments plotted

against the amount of DNA loaded on the gel (0.05, 0.1, 0.2 and 0.4  $\mu\text{g}$ ) was defined as the "DNA fragmentation index" (arbitrary units per  $\mu\text{g}$  DNA). In order to get a more precise evaluation of the number of apoptotic cells, SMC nuclei showing evidence of internucleosomal DNA fragmentation were detected using the *in situ* oligonucleotide ligation (ISOL) assay as described by the manufacturer, with minor modifications. Briefly, 5- $\mu\text{m}$  sections of paraffin-embedded aorta were deparaffinized and rehydrated, followed by a pre-treatment with proteinase K (50  $\mu\text{g ml}^{-1}$ ). Sections were then incubated with the equilibration buffer before ligation of the biotinylated "oligonucleotide A" with T4 DNA ligase for 19 hours at 18°C. Sections were then incubated with streptavidin-Alexa Fluor<sup>®</sup> 488 (25  $\mu\text{g ml}^{-1}$ ) and propidium-iodide (5  $\text{nmol l}^{-1}$ ) was used to stain all nuclei with red fluorescence. Slides for positive controls were pre-treated with DNase 1 (200  $\mu\text{g ml}^{-1}$ , 10 min) and negative controls had water instead of DNA ligase. Every ISOL-positive SMC nuclei (in green) per cross-section were counted using fluorescence microscopy. As described by Didenko *et al* (Didenko *et al.*, 1999), this method labels only DNA presenting double-stranded breaks with single-base 3' overhangs and is thus more specific to apoptosis than the TUNEL assay.

### **Immunoblot**

In rats sacrificed between days 0 and 6, proteins were extracted from the powdered aorta and used for western blot analysis as previously described (DerSarkissian S. *et al.*, 2003), with minor modifications. Briefly, aliquots containing 25  $\mu\text{g}$  of extracted aortic proteins were loaded onto 10 or 15% sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel and transferred to Hybond-C membrane after electrophoresis. For caspase expression analysis, antibodies recognizing both the cleaved and the pro-form of the enzymes were used. Membranes were hybridized with antibodies directed against caspase-3 (235412; Calbiochem, 1:2000), caspase-8 (D-8; Santa Cruz, 1:1000) or caspase-9 (9506; Cell Signaling, 1:500), followed by incubation with the appropriate horseradish peroxidase-conjugated secondary antibody (Jackson). Membranes were then incubated with ECL Plus, exposed to film and developed. A similar procedure was used to evaluate Akt phosphorylation (4051; Cell Signaling, 1:4000), total Akt (9272; Cell Signaling, 1:5000), PTEN phosphorylation (9554; Cell Signaling, 1:1000), total PTEN (9556; Cell Signaling,

1:2000), extracellular signal-regulated kinase 1/2 (ERK 1/2) phosphorylation (9101; Cell Signaling, 1:4000), total ERK 1/2 (9102; Cell Signaling, 1:1000), p38 MAP kinase (p38) phosphorylation (4631; Cell Signaling, 1:2000), total p38 (9212; Cell Signaling, 1:1000), c-Jun N-terminal kinase (JNK) phosphorylation (9251; Cell Signaling, 1:500) and total JNK (9252; Cell Signaling, 1:3000).

### **Statistical analysis**

Analysis of variance followed by Dunnett's multiple comparisons test was applied for all data. Values are presented as mean  $\pm$  standard error of the mean (SEM) and  $p < 0.05$  was considered statistically significant.

### **Drugs, chemical reagents and other materials**

Amlodipine was a gift of Pfizer Canada. Ketamine was from Bioniche Animal Health Canada (Ontario, Canada), xylazine was from Bayer (Ontario, Canada) and acepromazine was from Ayerst (Ontario, Canada). [ $^3\text{H}$ ]-thymidine and propidium iodide were from MP Biomedicals (CA, U.S.A.). The ISOL kit was purchased from Chemicon (CA, U.S.A.) and streptavidin-Alexa Fluor<sup>®</sup> 488 was from Invitrogen (Ontario, Canada). [ $^{32}\text{P}$ ]-dCTP, Hybond-C membrane and ECL Plus were purchased from GE healthcare Bio-Sciences (Quebec, Canada). All other chemicals were purchased from Sigma-Aldrich Canada.

### **3.3.4 Results**

Pre-treatment body weight was  $276 \pm 4\text{g}$  and after a small decrease (-6%) at day 1, it increased throughout treatment to reach  $308 \pm 12\text{g}$  at day 28. Water intake dropped at day 1 (-45%), returned to basal value at day 2 and remained unchanged afterwards. All rats were hypertensive before initiation of therapy, with a systolic blood pressure of  $185 \pm 2\text{ mmHg}$  ( $n=24$ ; Table 1). A reduction of  $42 \pm 5\text{ mmHg}$  was observed at day 1 and systolic blood pressure stabilized at  $148 \pm 2\text{ mmHg}$  after 25 days. Heart rate was significantly increased at day 2 only ( $409 \pm 11\text{ bpm}$  compared to  $371 \pm 6$  at day 0,  $p < 0.01$ ).

Aortic cross-sectional area, indicative of vessel hypertrophy, was rapidly reduced by amlodipine, reaching significance at day 5 (Fig. 1A). During the 28 days of treatment, the greatest reduction of the aortic hypertrophy occurred between days 0 and 5 ( $-8.2\pm 2.4\%$ ), with minor modifications occurring between days 5 and 28 (cumulative reduction of  $12.9\pm 2.7\%$ ).

As a first evaluation of cell population dynamics during the experimental period, DNA content, synthesis and fragmentation in the aorta were evaluated in a subset of SHR at days 0, 7 and 14 of amlodipine treatment. The reduction of aortic DNA content ( $-34\pm 11\%$ ,  $p < 0.05$  vs. day 0) and DNA synthesis ( $-52\pm 6\%$ ,  $p < 0.01$  vs. day 0) were maximal at day 7, while DNA fragmentation, indicative of apoptosis, was significantly increased at days 7 and 14 (Table 2). Change in cell number was evaluated by the three-dimensional disector method in order to confirm and better define the kinetics of aortic SMC deletion with amlodipine. In agreement with the DNA content values, cell number in the aortic media was reduced within the first week of amlodipine treatment (Fig 1B). The most drastic deletion of SMC nuclei occurred between days 2 ( $+3.4\pm 4.7\%$  vs day 0) and 4 ( $-18.5\pm 3.5\%$  vs day 0).

Since the structural changes initiated by amlodipine mostly occurred during the first week of treatment, apoptosis induction and the regulation of cell death / cell growth mediators was studied during this period. SMC nuclei with fragmented DNA, a hallmark of apoptosis, were detected *in situ* in the aortic media by the ISOL method. This technique specifically labels nuclei with double-stranded DNA breaks presenting single-base 3' overhangs that are generated only during DNA fragmentation associated with apoptosis. Amlodipine induced a transient increase of ISOL-positive nuclei in the aorta, in temporal correlation with the kinetics of cell number reduction, with a significant peak between days 2 and 4 (Fig 2). Next, the activation of apoptosis regulators was studied in the aorta of SHR treated with amlodipine. Caspases expression and activation were evaluated with antibodies detecting both pro- and cleaved forms of the enzymes. Initiator caspases (caspase-8 and -9) were significantly activated by amlodipine at days 2 and 3, respectively (Fig. 3A-B). The

ratio of cleaved caspase-8 over its pro-form increased by 2.7 fold at day 2 only ( $p < 0.01$  vs day 0), while the ratio of cleaved caspase-9 over its pro-form increased by 3.1 fold at day 3 only ( $p < 0.05$  vs day 0). The ratio of the cleaved form of the effector caspase-3 over its pro-form was significantly increased by amlodipine at days 3 and 4 (1.7 fold,  $p < 0.05$  vs day 0, Fig. 3C). Cleaved caspase-3 and -9 were also normalized over  $\beta$ -actin and this analysis showed similar results as the cleaved to pro-form ratios (not shown).

We then analyzed the regulation of Akt, one of the most important survival signals in SMC. Akt phosphorylation (ratio over total Akt) was significantly and transiently reduced for 3 days only starting at 1 day after initiation of treatment with amlodipine ( $-51.5 \pm 7.1\%$  vs. day 0,  $p < 0.01$ , Fig. 4A). In order to examine whether activation of PTEN is implicated in the inhibition of Akt activation, the ratio of total PTEN (including the non-phosphorylated active form) over phosphorylated (inactive) PTEN was measured. Treatment resulted in a trend toward an increase in response, although the change did not reach statistical significance (Fig. 4B). Members from the three families of MAP kinases showed differential regulation during the period of SMC apoptosis induction. p38 phosphorylation (ratio over total p38) was reduced by amlodipine only when apoptosis of SMC peaked, at day 3 ( $-45.8 \pm 8.8\%$ ,  $p < 0.01$ , Fig. 5A). In contrast, ERK 1/2 phosphorylation was significantly reduced in a sustained manner starting at day 3 (overall inhibition:  $39.8 \pm 10.8\%$  vs. day 0, Fig. 5B) while JNK phosphorylation was significantly reduced in a sustained manner starting at day 4 (overall inhibition:  $65.3 \pm 10.7\%$  vs. day 0, Fig. 5C).

### 3.3.5 Discussion

Despite their extensive use in treating cardiovascular diseases for more than two decades, mechanisms of vascular hypertrophy regression with calcium channel blockers remain incompletely defined and may include pleiotropic effects beyond the inhibition of SMC contraction (Mason *et al.*, 2003; Nissen *et al.*, 2004). Based on multiple criteria, we showed that amlodipine can induce therapeutic vascular SMC apoptosis *in vivo*. This effect lead to the normalization of SMC number down to levels seen in normotensive rats (Duguay *et al* 2004). The high-resolution time-course revealed that SMC apoptosis was

rapid and massive (~25% of cell deletion at 5 days). A key observation is that SMC apoptosis closely preceded the significant regression of aortic hypertrophy. The earliest event recorded was the reduction of Akt phosphorylation from day 1 to day 3, prior to caspase activation, associating apoptosis induction with reduced survival signals. The significant reduction in Akt phosphorylation was accompanied by a non-significant trend toward activation of the lipid phosphatase PTEN, suggesting that alternative mechanisms may also contribute (e.g. reduced phosphatidylinositol-3 kinase activity). Our results suggest that caspase-8 was the sole death enzyme activated at day 2, suggesting that apoptosis was triggered *via* the extrinsic death receptor pathway (Jin & El-Deiry, 2005). Consistent with these findings, amlodipine can induce apoptosis in leukemia multidrug resistant HL-60 cells (although at high concentrations) by a caspase-8-dependent mechanism (Li *et al.*, 2006a). Moreover, angiotensin II-induced apoptosis of nonquiescent SMC is mediated by reduced Akt phosphorylation and caspase-8 activation (Li *et al.*, 2006b). A growing body of evidence suggest that inhibition of Akt decreases expression of the caspase-8 homologue FLICE-inhibitory protein (FLIP), notably in human tumor cells (Panka *et al.*, 2001) and endothelial cells (Skurk *et al.*, 2004). FLIP, which functions as a caspase-8 dominant negative, is expressed in arterial SMC where it can inhibit death receptor-induced apoptosis (Imanishi *et al.*, 2000; Wang *et al.*, 2002). Thus, the down-regulation of FLIP following Akt inhibition may be permissive for caspase-8 activation. Suppression of Akt signaling induces Fas ligand expression and stimulates caspase activity and apoptosis in cultured SMC (Suhara *et al.*, 2002). This effect is dependent on JNK signaling, consistent with the pro-apoptotic influence of this MAP kinase pathway in most systems (Lin, 2003). In the present study, it is noteworthy that JNK activity did not decrease until after the transient wave of SMC apoptosis. Thus, the Fas receptor is a candidate pathway for caspase-8 activation and SMC apoptosis in our model. The late activation of caspase-9 and caspase-3 suggests caspase-8-mediated recruitment of the intrinsic mitochondrial pathway, possibly at the level of Bid cleavage by caspase-8 (Luo *et al.*, 1998) and leading to amplification of the death signal. It is intriguing to speculate that the downregulation of pro-apoptotic JNK signaling, along with the restoration of pro-survival Akt signaling, played a role in the termination of SMC apoptosis around day 4-5 of amlodipine treatment. These candidate mechanisms of SMC apoptosis initiation and termination with amlodipine are illustrated on figure 6.

A significant finding of our time course study is that reduced signaling via ERK 1/2 and p38 occurred after, and therefore was not involved in, apoptosis initiation. SMC growth is dependent on activation of both the ERK 1/2 and p38 (Touyz & Schiffrin, 2000). ERK 1/2 and p38 activities are increased in the aorta of SHR (Kubo *et al.*, 2002; Umemoto *et al.*, 2006) and these are reduced by long term treatment with amlodipine (Umemoto *et al.*, 2006). The fact that p38 was not inhibited in a sustained manner by amlodipine is probably due to the short treatment period (6 days). The transient inhibition of p38 synchronized with peak apoptosis activity is intriguing and may be related to the massive production of apoptotic bodies. Apoptotic bodies have been shown to modulate MAP kinases activity in macrophages, where they cause the inhibition of ERK 1/2 and activation of p38 and JNK (Patel *et al.*, 2006; Reddy *et al.*, 2002). Whether these effects are cell type specific is unknown.

Since aortic hypertrophy regression reached significance after the massive deletion of cells, we propose that apoptosis played a causative role in hypertrophy reversal. Accordingly, we previously showed that co-administration of a pan-caspase inhibitor with losartan prevents both apoptosis induction and aortic mass regression (Marchand *et al.*, 2003). Amlodipine also reduced *in vivo* DNA synthesis in a sustained manner, further contributing to reduce cell number by blunting proliferation. Possible mechanisms of growth inhibition include the modulation of SMC phenotype (Lai *et al.*, 2002; Umemoto *et al.*, 2006), the inhibition of growth factors (Lai *et al.*, 2002) or MAP kinases activity (Yin *et al.*, 2005; Zhang *et al.*, 2000), and the activation of growth suppressors such as p21/WAF1 (Ziesche *et al.*, 2004). The transient nature of apoptosis was highlighted by the short duration of caspases activation and the absence of further cell number reduction after the initial peak. Despite this, DNA fragmentation remained increased after the termination of caspase activation, possibly due to remaining apoptotic bodies as evidenced by small structures showing DNA fragmentation at day 5 (Fig. 2A), i.e. more than 48 hours after massive apoptosis termination. Remnant DNA fragmentation and increased Bax to Bcl-2 protein expression ratio have been observed in the SHR aorta after twelve weeks of amlodipine treatment (Sharifi & Schiffrin, 1998). Interestingly, a recent study showed that in normal (but not atherosclerotic) mouse arteries undergoing massive SMC apoptosis in

response to diphtheria toxin, surviving SMC can effectively clear apoptotic bodies without significant inflammatory cell infiltration (Clarke *et al.*, 2006). The same study revealed that contractile responses to receptor-dependent and -independent agonists were unaffected in vessels with more than 50% SMC deletion after 4 weeks of diphtheria toxin administration (Clarke *et al.*, 2006). These data suggest that, in the long-term, arteries can compensate for SMC loss, possibly through the development of cellular hypertrophy. In the short term, SMC deletion may reduce passive and active tension in arteries undergoing remodeling. The SHR model is remarkable in that apoptosis of up to 30% of SMC is induced in response to drugs that are routinely used in the clinic (deBlois *et al.*, 1997). The rapidity and extent of SMC deletion in amlodipine-treated rats are reminiscent of what is seen in losartan-treated rats and in enalapril-treated rats (deBlois *et al.*, 1997; Marchand *et al.*, 2003; Duguay *et al.*, unpublished observations), in which 30% SMC deletion also occurs within a time window of less than 2-3 days. Thus, to our knowledge this model shows one of the largest synchronized induction of cell death by apoptosis *in vivo*. This feature is possibly related to the enhanced rates of SMC growth and polyploidy development in SHR (reviewed in deBlois *et al.*, 2005). Consistent with this, SMC engaged in the cell cycle show an increased susceptibility to apoptosis induction (Bennett *et al.*, 1994).

As a limitation to the present study, we cannot exclude pressure-dependent mechanisms to explain the effects of amlodipine, particularly the sustained changes (inhibition of ERK 1/2 and JNK and DNA synthesis). It is unlikely, however, that the transient modulations were secondary to blood pressure reduction, including the inhibition of Akt and p38 and the induction of caspase-dependent cell death. Moreover, we previously reported that a similar reduction in blood pressure with hydralazine did not result in SMC apoptosis nor correction of vascular hypertrophy or hyperplasia in SHR (deBlois *et al.*, 1997).

In summary, we report that onset of aortic hypertrophy regression with amlodipine in SHR immediately followed the loss of ~25% of medial SMC *via* apoptosis. Mechanisms of SMC death induction by amlodipine include the reduction of Akt-associated survival signaling and the activation of the extrinsic caspase-8-associated apoptotic pathway. If

confirmed in humans, these conclusions may help develop better interventions to control vascular structure and reduce complications associated with hypertension.

### ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by the Canadian Institutes of Health Research (CIHR #45452). D. Duguay holds an award from the Canadian Institutes of Health Research.

### 3.3.6 References

BENNETT,M.R., EVAN,G.I. & NEWBY,A.C. (1994). Deregulated expression of the c-myc oncogene abolishes inhibition of proliferation of rat vascular smooth muscle cells by serum reduction, interferon-gamma, heparin, and cyclic nucleotide analogues and induces apoptosis. *Circ Res*, **74**, 525-36.

CLARKE,MC, FIGG,N, MAGUIRE,JJ, DAVENPORT,AP, GODDARD,M, LITTLEWOOD,TD & BENNETT,MR (2006). Apoptosis of vascular smooth muscle cells induces features of plaque vulnerability in atherosclerosis. *Nat Med*, **12**, 1075-1080.

DATTA,SR, BRUNET,A & GREENBERG,ME (1999). Cellular survival: a play in three Akts. *Genes Dev*, **13**, 2905-2927.

DEBLOIS,D, TEA,BS, BEAUDRY,D & HAMET,P (2005). Regulation of therapeutic apoptosis: a potential target in controlling hypertensive organ damage. *Can J Physiol Pharmacol*, **83**, 29-41.

DEBLOIS,D, TEA,BS, THAN,VD, TREMBLAY,J & HAMET,P (1997). Smooth muscle apoptosis during vascular regression in spontaneously hypertensive rats. *Hypertension*, **29**, 340-349.

DER SARKISSIAN S, MARCHAND,EL, DUGUAY,D, HAMET,P & DEBLOIS,D (2003). Reversal of interstitial fibroblast hyperplasia via apoptosis in hypertensive rat heart with valsartan or enalapril. *Cardiovasc Res*, **57**, 775-783.

DIDENKO,VV, BOUDREAUX,DJ & BASKIN,DS (1999). Substantial background reduction in ligase-based apoptosis detection using newly designed hairpin oligonucleotide probes. *Biotechniques*, **27**, 1130-1132.

DUGUAY,D, DER SARKISSIAN,S, KOUZ,R, ONGALI,B, COUTURE,R & DEBLOIS,D (2004). Kinin B2 receptor is not involved in enalapril-induced apoptosis and regression of hypertrophy in spontaneously hypertensive rat aorta: possible role of B1 receptor. *Br J Pharmacol*, **141**, 728-736.

GURBANOV,E & SHILIANG,X (2006). The key role of apoptosis in the pathogenesis and treatment of pulmonary hypertension. *Eur J Cardiothorac Surg*, **30**, 499-507.

ICHIHARA,A, KANESHIRO,Y, TAKEMITSU,T & SAKODA,M (2006). Effects of amlodipine and valsartan on vascular damage and ambulatory blood pressure in untreated hypertensive patients. *J Hum Hypertens*, **20**, 787-794.

IMANISHI,T, MCBRIDE,J, HO,Q, O'BRIEN,KD, SCHWARTZ,SM & HAN,DK (2000). Expression of cellular FLICE-inhibitory protein in human coronary arteries and in a rat vascular injury model. *Am J Pathol*, **156**, 125-137.

INTENGAN,HD & SCHIFFRIN,EL (2001). Vascular remodeling in hypertension: roles of apoptosis, inflammation, and fibrosis. *Hypertension*, **38**, 581-587.

JIN,Z & EL-DEIRY,WS (2005). Overview of cell death signaling pathways. *Cancer Biol Ther*, **4**, 139-163.

KUBO,T, IBUSUKI,T, CHIBA,S, KAMBE,T & FUKUMORI,R (2002). Altered mitogen-activated protein kinase activation in vascular smooth muscle cells from spontaneously hypertensive rats. *Clin Exp Pharmacol Physiol*, **29**, 537-543.

LAI,YM, FUKUDA,N, SU,JZ, SUZUKI,R, IKEDA,Y, TAKAGI,H, TAHIRA,Y & KANMATSUSE,K (2002). Novel mechanisms of the antiproliferative effects of amlodipine in vascular smooth muscle cells from spontaneously hypertensive rats. *Hypertens Res*, **25**, 109-115.

LAVRIK,IN, GOLKS,A & KRAMMER,PH (2005). Caspases: pharmacological manipulation of cell death. *J Clin Invest*, **115**, 2665-2672.

LI,X, RUAN,GR, LU,WL, HONG,HY, LIANG,GW, ZHANG,YT, LIU,Y, LONG,C, MA,X, YUAN,L, WANG,JC, ZHANG,X & ZHANG,Q (2006a). A novel stealth liposomal topotecan with amlodipine: apoptotic effect is associated with deletion of intracellular Ca<sup>2+</sup> by amlodipine thus leading to an enhanced antitumor activity in leukemia. *J Control Release*, **112**, 186-198.

LI,Y, SONG,YH, MOHLER,J & DELAFONTAINE,P (2006b). ANG II induces apoptosis of human vascular smooth muscle via extrinsic pathway involving inhibition of Akt phosphorylation and increased FasL expression. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, **290**, H2116-H2123.

LIN,A (2003). Activation of the JNK signaling pathway: breaking the brake on apoptosis. *Bioessays*, **25**, 17-24.

LUO,X, BUDIARDJO,I, ZOU,H, SLAUGHTER,C & WANG,X (1998). Bid, a Bcl2 interacting protein, mediates cytochrome c release from mitochondria in response to activation of cell surface death receptors. *Cell*, **94**, 481-490.

MARCHAND,EL, DER SARKISSIAN,S, HAMET,P & DEBLOIS,D (2003). Caspase-dependent cell death mediates the early phase of aortic hypertrophy regression in losartan-treated spontaneously hypertensive rats. *Circ Res*, **92**, 777-784.

MASON,RP, MARCHE,P & HINTZE,TH (2003). Novel vascular biology of third-generation L-type calcium channel antagonists: ancillary actions of amlodipine. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, **23**, 2155-2163.

NISSEN,SE, TUZCU,EM, LIBBY,P, THOMPSON,PD, GHALI,M, GARZA,D, BERMAN,L, SHI,H, BUEBENDORF,E & TOPOL,EJ (2004). Effect of antihypertensive agents on cardiovascular events in patients with coronary disease and normal blood pressure: the CAMELOT study: a randomized controlled trial. *JAMA*, **292**, 2217-2225.

PANKA,DJ, MANO,T, SUHARA,T, WALSH,K & MIER,JW (2001). Phosphatidylinositol 3-kinase/Akt activity regulates c-FLIP expression in tumor cells. *J Biol Chem*, **276**, 6893-6896.

PATEL,VA, LONGACRE,A, HSIAO,K, FAN,H, MENG,F, MITCHELL,JE, RAUCH,J, UCKER,DS & LEVINE,JS (2006). Apoptotic cells, at all stages of the death process, trigger characteristic signaling events that are divergent from and dominant over those triggered by necrotic cells: Implications for the delayed clearance model of autoimmunity. *J Biol Chem*, **281**, 4663-4670.

PEARSON,G, ROBINSON,F, BEERS,GT, XU,BE, KARANDIKAR,M, BERMAN,K & COBB,MH (2001). Mitogen-activated protein (MAP) kinase pathways: regulation and physiological functions. *Endocr Rev*, **22**, 153-183.

REDDY,SM, HSIAO,KH, ABERNETHY,VE, FAN,H, LONGACRE,A, LIEBERTHAL,W, RAUCH,J, KOH,JS & LEVINE,JS (2002). Phagocytosis of apoptotic

cells by macrophages induces novel signaling events leading to cytokine-independent survival and inhibition of proliferation: activation of Akt and inhibition of extracellular signal-regulated kinases 1 and 2. *J Immunol*, **169**, 702-713.

SHARIFI,AM & SCHIFFRIN,EL (1998). Apoptosis in vasculature of spontaneously hypertensive rats: effect of an angiotensin converting enzyme inhibitor and a calcium channel antagonist. *Am J Hypertens*, **11**, 1108-1116.

SKURK,C, MAATZ,H, KIM,HS, YANG,J, ABID,MR, AIRD,WC & WALSH,K (2004). The Akt-regulated forkhead transcription factor FOXO3a controls endothelial cell viability through modulation of the caspase-8 inhibitor FLIP. *J Biol Chem*, **279**, 1513-1525.

STEAD,S, WERSTIUK,ES & LEE,RM (2000). Nifedipine induces apoptosis in cultured vascular smooth muscle cells from spontaneously hypertensive rats. *Life Sci*, **67**, 895-906.

SUHARA,T, KIM,HS, KIRSHENBAUM,LA & WALSH,K (2002). Suppression of Akt signaling induces Fas ligand expression: involvement of caspase and Jun kinase activation in Akt-mediated Fas ligand regulation. *Mol Cell Biol*, **22**, 680-691.

TEA,BS, DER SARKISSIAN,S, TOUYZ,RM, HAMET,P & DEBLOIS,D (2000). Proapoptotic and growth-inhibitory role of angiotensin II type 2 receptor in vascular smooth muscle cells of spontaneously hypertensive rats in vivo. *Hypertension*, **35**, 1069-1073.

TEIGER,E, THAN,VD, RICHARD,L, WISNEWSKY,C, TEA,BS, GABOURY,L, TREMBLAY,J, SCHWARTZ,K & HAMET,P (1996). Apoptosis in pressure overload-induced heart hypertrophy in the rat. *J Clin Invest*, **97**, 2891-2897.

THORIN-TRESCASES,N, DEBLOIS,D & HAMET,P (2001). Evidence of an altered in vivo vascular cell turnover in spontaneously hypertensive rats and its modulation by long-term antihypertensive treatment. *J Cardiovasc Pharmacol*, **38**, 764-774.

TOUYZ,RM & SCHIFFRIN,EL (2000). Signal transduction mechanisms mediating the physiological and pathophysiological actions of angiotensin II in vascular smooth muscle cells. *Pharmacol Rev*, **52**, 639-672.

UMEMOTO,S, KAWAHARA,S, HASHIMOTO,R, UMEJI,K, MATSUDA,S, TANAKA,M, KUBO,M & MATSUZAKI,M (2006). Different effects of amlodipine and enalapril on the mitogen-activated protein kinase/extracellular signal-regulated kinase

kinase-extracellular signal-regulated kinase pathway for induction of vascular smooth muscle cell differentiation in vivo. *Hypertens Res*, **29**, 179-186.

WANG,W, PRINCE,CZ, MOU,Y & POLLMAN,MJ (2002). Notch3 signaling in vascular smooth muscle cells induces c-FLIP expression via ERK/MAPK activation. Resistance to Fas ligand-induced apoptosis. *J Biol Chem*, **277**, 21723-21729.

YIN,X, POLIDANO,E, FAVERDIN,C & MARCHE,P (2005). Role of L-type calcium channel blocking in epidermal growth factor receptor-independent activation of extracellular signal regulated kinase 1/2. *J Hypertens*, **23**, 337-350.

ZHANG,YZ, GAO,PJ, WANG,XY, STEPIEN,O, MARCHE,P, ZHANG,ZL & ZHU,DL (2000). The inhibitory mechanisms of amlodipine in human vascular smooth muscle cell proliferation. *Hypertens Res*, **23**, 403-406.

ZIESCHE,R, PETKOV,V, LAMBERS,C, ERNE,P & BLOCK,LH (2004). The calcium channel blocker amlodipine exerts its anti-proliferative action via p21(Waf1/Cip1) gene activation. *FASEB J*, **18**, 1516-1523.

### 3.3.7 Figure legends, figures and tables

**Figure 1:** Line graphs showing (a) the reduced aortic cross-sectional area after 5 days of treatment with amlodipine and (b) the reduced aortic SMC number after 3 days of treatment with amlodipine. \* Significantly different ( $P<0.05$ ) from day 0. N=20 (day 0), N=8 (days 1, 7 and 14), N=14 (day 2), N=10 (day 3), N=12 (day 4 and 6) and N=6 (days 5, 8, 10 and 28).

**Figure 2:** (a) Representative photomicrographs showing the increased number of aortic ISOL-positive (apoptotic) complete nuclei at day 3 and smaller fragments at day 5. (b) Bar graph of all ISOL-positive nuclei present on aortic sections of rats sacrificed during one week of treatment with amlodipine. \* Significantly different ( $P<0.05$ ) from day 0. N=7 (days 0 and 2), N=6 (days 1, 3 and 5) and N=8 (days 4 and 6).

**Figure 3:** Bar graphs showing the aortic expression of cleaved caspases in response to amlodipine. (a) Cleaved caspase-8 was increased at day 2 only. (b) Cleaved caspase-9

was increased at day 3 only. (c) Cleaved caspase-3 was increased at days 3 and 4. \* Significantly different ( $P<0.05$ ) from day 0. Insets show the representative expression of the cleaved form of each caspases studied. N = 6 per group for caspase-8. N=11 (days 0, 1, 4 and 6), N=12 (day 2), N=10 (day 3) and N= 6 (day 5) for caspase-3 and -9.

**Figure 4:** Bar graphs showing (a) the reduced phosphorylation level of Akt from days 1 to 3 and (b) the trend toward an increased PTEN / phospho-PTEN expression ratio from days 1 to 6. \* Significantly different ( $P<0.05$ ) from day 0. Insets show the representative expression of the phosphorylated form and the total form of both Akt and PTEN. N=6 (days 0, 4, 5 and 6), N=9 (days 1 and 3) and N=7 (day 2) for both Akt and PTEN.

**Figure 5:** Bar graphs showing (a) the reduced phosphorylation level of p38 at day 3 only and (b and c) the reduced phosphorylation level of ERK 1/2 from days 3 to 6 and of JNK from days 4 to 6. \* Significantly different ( $P<0.05$ ) from day 0. Insets show the representative expression of the phosphorylated form and the total form of each protein. For p38, N=14 (days 0, 1 and 4), N=15 (day 2), 13 (days 3 and 6) and N=8 (day 5). For ERK 1/2 and JNK, N=12 (day 0), N=11 (days 1, 2 and 6), N=9 (days 3 and 4) and N=6 (day 5).

**Figure 6:** Working hypothesis for amlodipine-induced aortic SMC apoptosis in SHR. The data suggests that amlodipine inhibition of Akt phosphorylation leads to the early activation of caspase-8 followed by caspase-9 and -3 activation. Based on findings in other systems (see discussion), putative pathways for apoptosis induction following attenuation of Akt include activation of the pro-death receptor Fas and down-regulation of the caspase-8 inhibitor FLIP in the arterial wall. Sustained elevation of JNK early during amlodipine treatment may contribute to Fas signaling and death. Late inhibition of JNK and restoration of Akt signaling may contribute to the termination of SMC apoptotic.

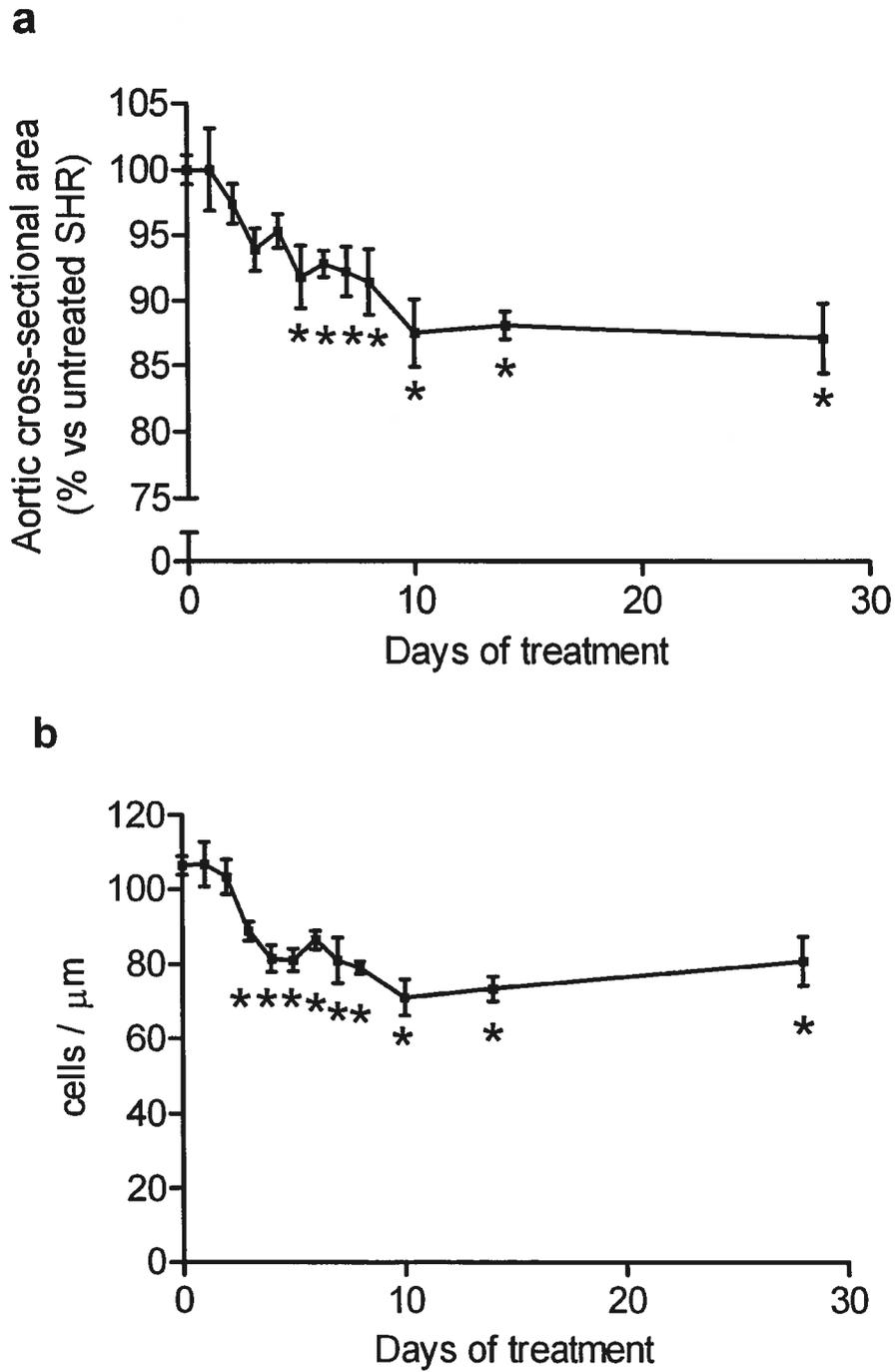
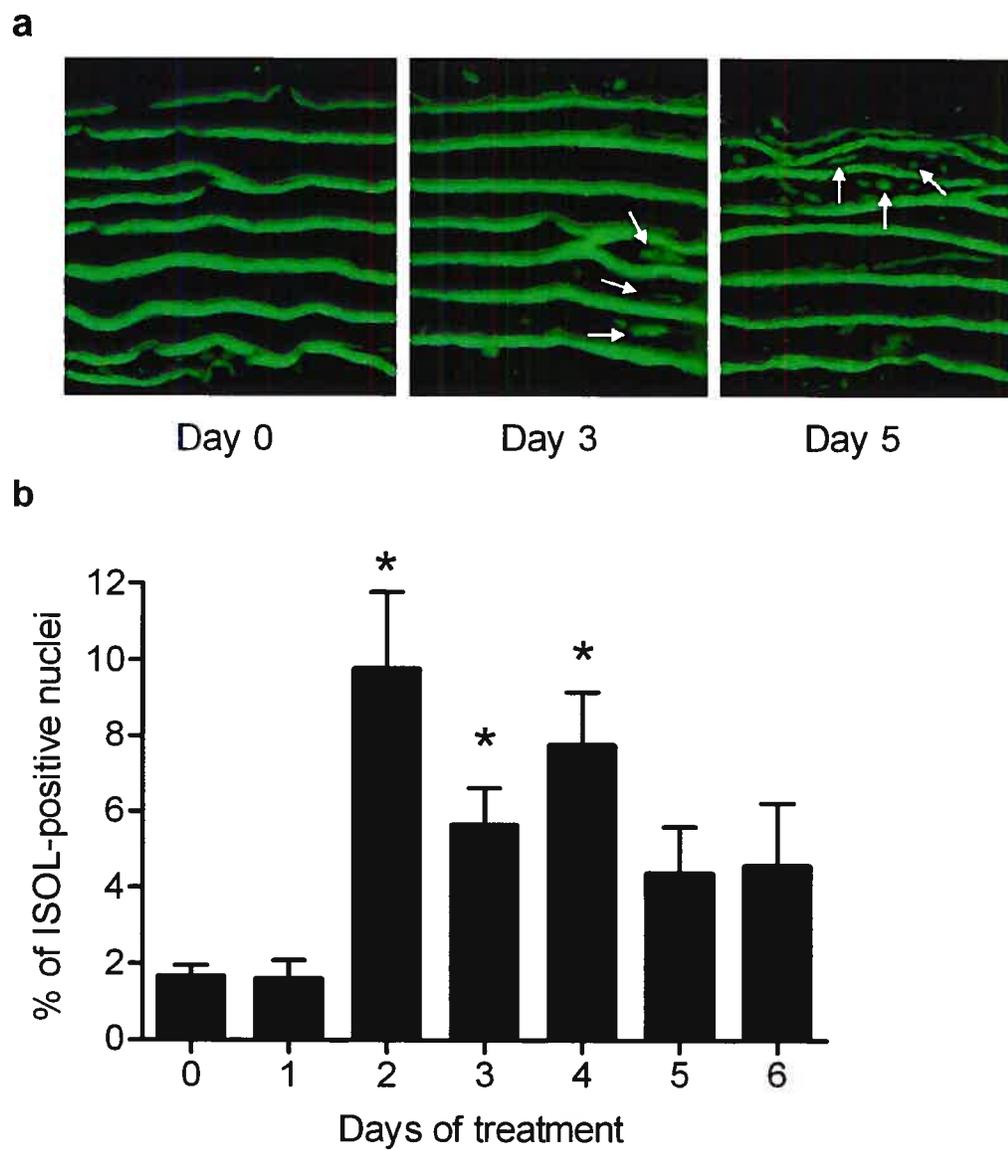
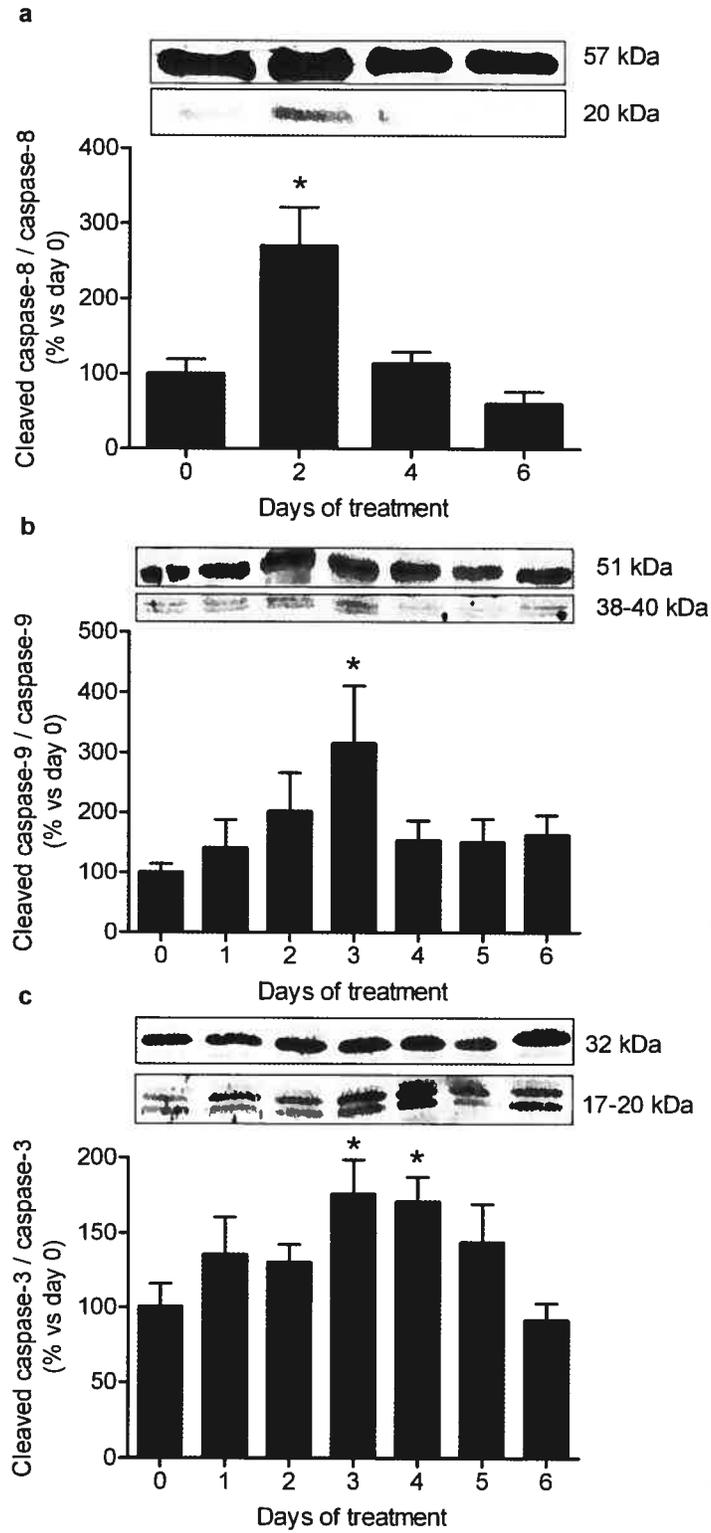
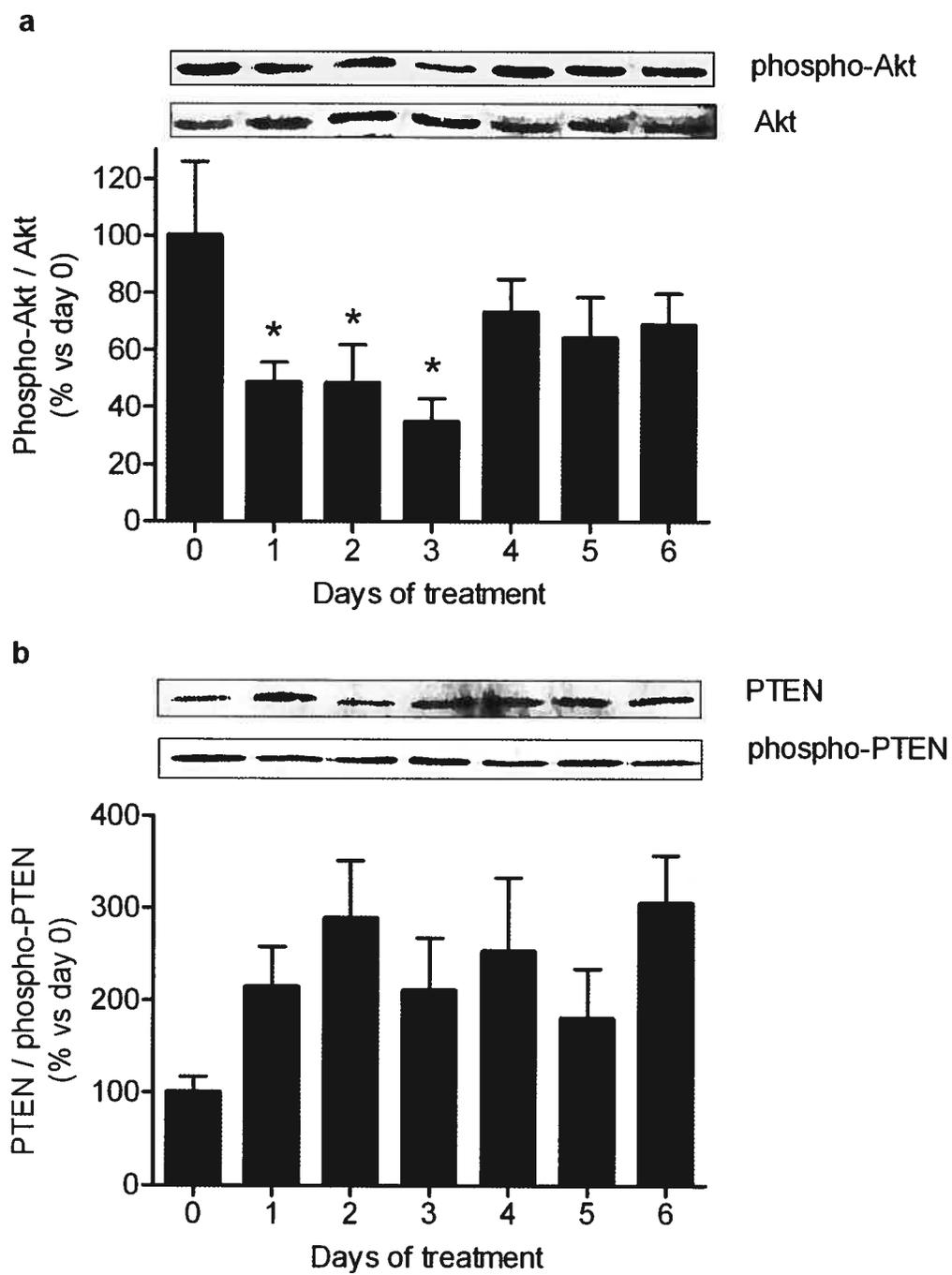


Figure 1



**Figure 2**

**Figure 3**

**Figure 4**

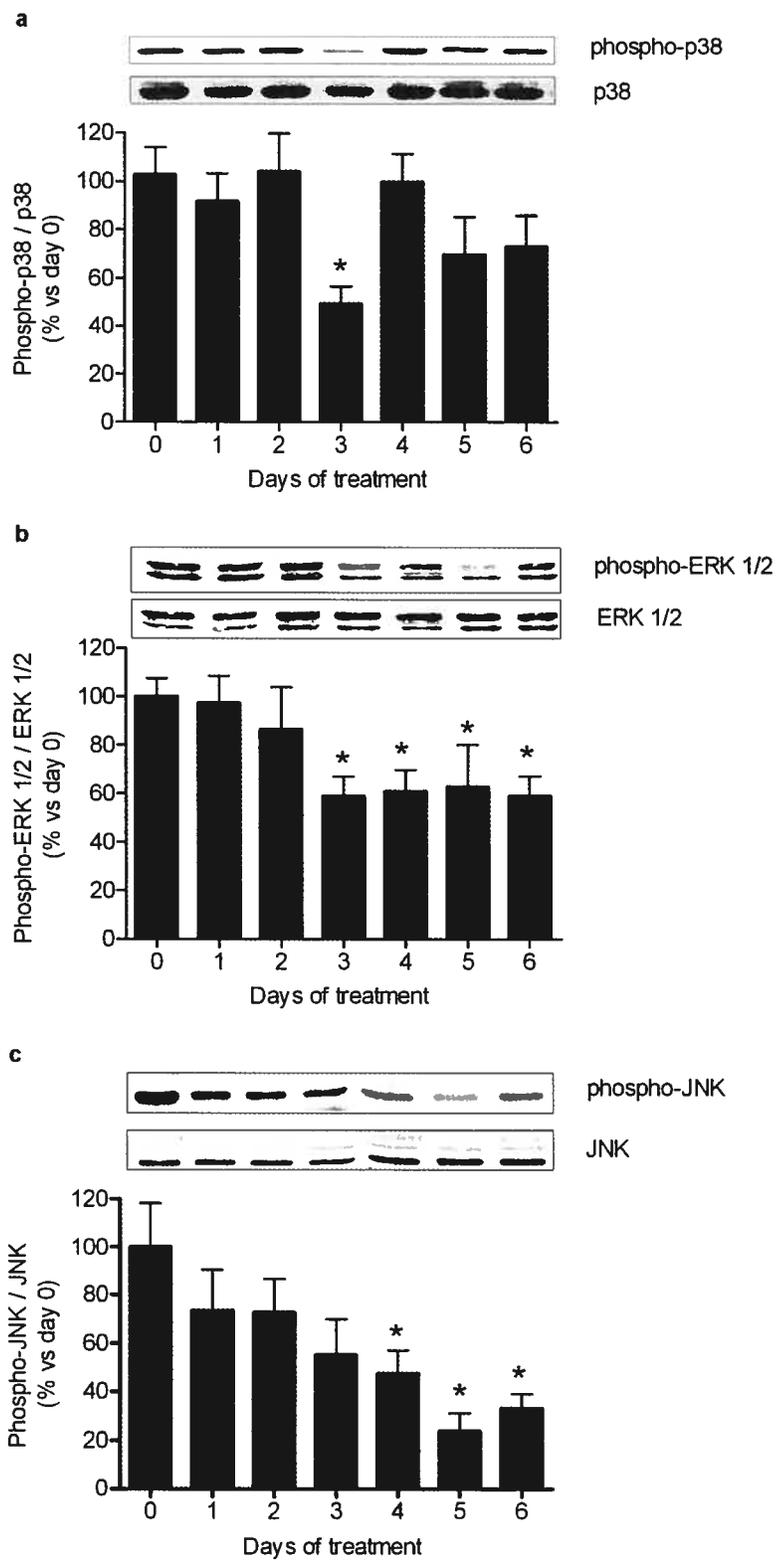
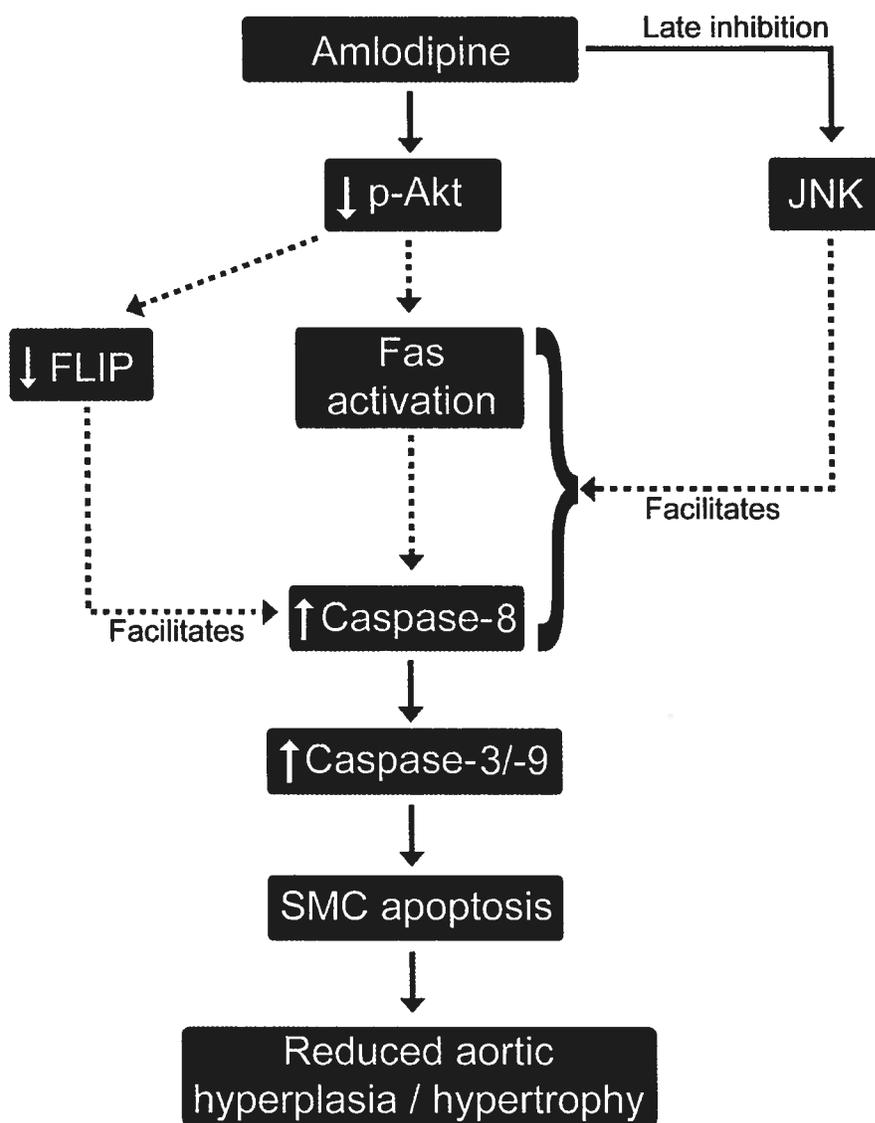


Figure 5

**Figure 6**

	Days of amlodipine treatment							
	0	1	2	4	6	8	12	25
Systolic blood pressure (mm Hg)	185±2 (n=24)	143±5* (n=6)	136±3* (n=12)	142±3* (n=20)	139±2* (n=12)	138±2* (n=12)	149±2* (n=10)	148±2* (n=6)

**Table 1. Systolic blood pressure measured by tail-cuff plethysmography during treatment with amlodipine.**

Values are mean ± SEM. \* Significantly different ( $P < 0.05$ ) from untreated SHR (day 0).

	Days of amlodipine treatment		
	0 (n=4)	7 (n=4)	14 (n=4)
DNA content ( $\mu\text{g} / \text{mm}$ )	1.31 $\pm$ 0.09	0.86 $\pm$ 0.15*	0.92 $\pm$ 0.11*
DNA synthesis (CPM / 100 $\mu\text{g}$ DNA)	500 $\pm$ 40	240 $\pm$ 31*	215 $\pm$ 44*
DNA fragmentation index (arbitrary units / $\mu\text{g}$ DNA)	4.77 $\pm$ 0.92	8.06 $\pm$ .86*	9.45 $\pm$ 1.31*

**Table 2. Aortic DNA content, synthesis and fragmentation of SHR treated with amlodipine.**

Values are mean  $\pm$  SEM.

\* Significantly different ( $P < 0.05$ ) from untreated SHR (day 0)

### **3.4 Publication N°4**

## **Fibroblast Apoptosis Precedes Cardiomyocytes Mass Reduction During Left Ventricular Remodeling in Hypertensive Rats Treated With Amlodipine**

participation des différents auteurs de cette publication :

D Duguay : Conceptualisation de l'étude, stratégie expérimentale, expériences, analyses  
des résultats et écriture de l'article

SP : Expériences

CFD : Stratégie expérimentale

D deBlois : Conceptualisation de l'étude, analyses des résultats et écriture de l'article

**Fibroblast Apoptosis Precedes Cardiomyocytes Mass Reduction During Left Ventricular Remodeling in Hypertensive Rats Treated With Amlodipine**

*Journal of Hypertension 2007; 25 :1291-1299*

David Duguay<sup>a</sup>, Stéphanie Pesant<sup>a</sup>, Christian F.Deschepper<sup>b</sup> & Denis deBlois<sup>a</sup>

Short title: Amlodipine-induced fibroblast apoptosis

<sup>a</sup>Department of Pharmacology, University of Montreal, 2900, Edouard-Montpetit, Montreal, Quebec H3T 1J4, Canada, Tel. (514) 343-6111 ext. 0915, Fax: (514) 343-2291,

  
<sup>b</sup>Institut de recherches cliniques de Montréal (IRCM)  
110 Pine Ave West, Montreal (QC) H2W 1R7, Canada.

This work was supported by the Canadian Institutes of Health Research (CIHR #45452).

There are no potential conflicts of interest to disclose.

Author for correspondence: Denis deBlois, Department of Pharmacology, University of Montreal, 2900, Edouard-Montpetit, Montreal, Quebec H3T 1J4, Canada.

Wordcount: 4691

### 3.4.1 Summary

A transient induction of apoptosis accompanies the normalization of left ventricular mass index in spontaneously hypertensive rats (SHR) treated with dihydropyridine calcium channel blockers. However, the cell type undergoing apoptosis in this model and the temporal correlation with onset cardiac remodeling remain undefined. SHR were treated either with vehicle or amlodipine (20 mg/kg/d) for 4, 7, 10, 14 or 28 days. Amlodipine stably reduced systolic blood pressure by day 2 ( $-26\pm 2\%$ ) and stably reduced the left ventricular concentration of ANP mRNA by  $\sim 50\%$  as early as day 4 suggesting the early reduction of cardiomyocyte stress. Left ventricular mass index was significantly reduced by day 7 ( $-4.6\pm 1.5\%$ ), in coordination with reduced DNA content ( $-23\pm 2\%$ ) and non-cardiomyocyte number ( $-17\pm 4\%$ ). However, the cardiomyocyte cross-sectional area was reduced only starting from day 14. Caspase-3 cleavage was significantly increased at day 7 only. Ultimately, amlodipine for 28 days induced a slight increase in capillary density without affecting total cardiomyocyte number, while reducing total number of non-cardiomyocytes down to levels seen in untreated normotensive Wistar-Kyoto rats. Bax to Bcl-2 protein ratios were increased from day 7 to day 28. *In situ* double labeling by the TUNEL method (apoptosis) combined with TRITC-labeled lectin binding (endothelial cell marker) revealed a significant increase ( $>3$  fold) in TUNEL-positive, lectin-negative non-cardiomyocytes in the interstitium between days 7 and 14. Thus, left ventricular remodeling induced by amlodipine in SHR involves selective deletion of excess fibroblasts via apoptosis prior to cardiomyocyte mass reduction, but after attenuation of ANP gene expression.

**Keywords:** Hypertension; Hypertrophy / hyperplasia; Calcium channel blockers; Apoptosis; Interstitial fibroblasts.

### 3.4.2 Introduction

Left ventricular hypertrophy (LVH, defined as an increased organ mass index, i.e. normalized for body weight) and fibroblast hyperplasia are observed in established stages of hypertension [1, 2]. In a genetic model of primary hypertension, the spontaneously hypertensive rat (SHR), dysregulation of cell proliferation and death contributes to increased cardiac mass and DNA content [3-6]. Cardiac remodeling leading to regression of hypertrophy can be induced by several classes of anti-hypertensive drugs, excluding vasodilators like hydralazine [7, 8].

Normalization of cardiac mass index by the angiotensin II type 1 (AT<sub>1</sub>) receptor antagonist valsartan, or by the angiotensin I-converting enzyme inhibitor enalapril, is marked by a transient increase in cardiac fibroblast apoptosis [1, 7]. As recently reviewed [9], cardiac fibroblasts are a source of paracrine growth factors for cardiomyocytes, including endothelin-1 [10], transforming growth factor  $\beta$  (TGF- $\beta$ ) [10] and basic fibroblast growth factor (bFGF) [11]. For instance, the inability of bFGF knock-out mice to develop LVH in response to renovascular hypertension has been attributed to a defective paracrine stimulation of cardiomyocyte growth by fibroblasts [11]. We also reported a transient increase of apoptosis during regression of LVH in SHR treated with nifedipine [7], although it had not been determined which particular cell type(s) undergo apoptosis.

Calcium channel blockers display cardiac anti-hypertrophic properties in several models of hypertension [12-16], although the mechanisms underlying these effects have not been entirely elucidated. Long term treatment of SHR with amlodipine prevents cardiomyocyte hypertrophy, cardiac fibrosis and LVH development [17, 18]. Furthermore, echocardiographic studies in patients with essential hypertension [19] and in SHR [20] confirmed that long-term amlodipine treatment induces the regression of left ventricular mass index. To further analyze the mechanisms by which dihydropyridine calcium channel blockers mediate cardiac remodeling, we examined whether amlodipine induces cardiac apoptosis in SHR, which cell type(s) are involved, and the time course of cell deletion relative to the reduction of cardiomyocyte size in different regions of the left ventricle.

### 3.4.3 Methods

#### Animal procedures

Male SHR (n=57) were purchased from Charles-River (St-Constant, Canada) and housed for 1 week before initiation of drug treatment at 11 weeks of age. SHR (n=6 to 8 per group) were treated for 4, 7, 10, 14 and 28 days with the calcium channel blocker amlodipine (20 mg/kg/day; gift of Pfizer Canada) in the drinking water. Age-matched Wistar-Kyoto rats (WKY, sacrificed at day 0, n=6) and SHR (sacrificed at days 0 (n=14) and 28 (n=9)) receiving vehicle were used as controls for analysis of cardiac remodeling. Food and water were administered ad libitum. Mean arterial blood pressure and heart rate were determined by tail-cuff plethysmography in a subset of conscious, restrained SHR throughout amlodipine treatment and in age-matched control SHR. At sacrifice, rats were anesthetized with a single subcutaneous injection of ketamine (80 mg/kg; Ayerst, Montreal, Canada), xylazine (4 mg/kg; Bayer, Etobicoke, Canada) and acepromazine (2 mg/kg; Ayerst, Montreal, Canada) and were killed by an intravenous injection of 1 ml CdCl<sub>2</sub> (100 mmol/L) to induce diastolic cardiac arrest. Cardiac ventricles were isolated, separated and weighed. The left and right ventricle weight to body weight ratio were evaluated separately. An equatorial cross-section from the left ventricle was fixed in 4% paraformaldehyde and processed according to routine histological procedures, paraffin-embedded and cut into 5 µm sections. The investigation conforms with the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals published by the US National Institutes of Health (NIH Publication NO. 85-23, revised 1996). The left and right ventricles were pulverized in liquid nitrogen using a mortar and pestle and stored at -80°C. One aliquot was weighed and was extracted as previously described for measurement of total tissue DNA [21]. DNA concentration was determined by spectrophotometry and DNA content per ventricle was normalized for body weight. In another aliquot, tissue hydroxyproline (HOP) content was determined by the method of acid hydrolysis [22]. Briefly, powdered left ventricles were weighted and dried at 65°C overnight. Concentrated HCl was added to hydrolyse the samples at 110°C for 36 hours and 50 µl of the hydrolysate was evaporated and dissolved in 1 ml of water. HOP oxidation, in a borate buffered solution, was performed by adding 0.3 ml ChloramineT for 20 minutes followed by addition of sodium thiosulfate to stop the reaction and potassium chloride to saturate all tubes. The tubes were then heated in boiling water for 20 minutes, followed by toluene extraction and centrifugation. Ehrlich's reagent was then added to 1.0

mL of the supernatant and the colorimetric reaction was analysed by reading absorbance at 565 nm 30 minutes later. A third aliquot of ~100 mg of pulverized tissue was used for total RNA extraction, and 10 µg of total RNA from each sample were used to quantitate ANP mRNA by Northern blot analysis, as described previously [23].

### **Expression of apoptosis-regulatory proteins and bFGF**

The level of expression of various proteins in the left ventricle was examined by western blot as previously described [1], with minor modifications. Briefly, aliquots containing 50 µg of extracted proteins were loaded onto 15% sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel and transferred to Hybond-C membrane after electrophoresis. Membranes were hybridized with anti-basic fibroblast growth factor (bFGF, 1:200, Santa Cruz Biotech, Santa Cruz, CA), anti-Bcl-2, anti-Bax or anti-caspase-3 antibodies (all at 1:500; Santa Cruz Biotech, Santa Cruz, CA), followed by incubation with goat anti-rabbit (for bFGF and caspase-3, 1:2000, Santa Cruz Biotech, Santa Cruz, CA) or goat anti-mouse (for Bax and Bcl-2, 1:10000, Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA) horseradish peroxidase-conjugated secondary antibodies.

### **Morphometric analysis of the left ventricle**

Cross-sectional area (CSA) of cardiomyocytes was measured in the sub-epicardium and sub-endocardium (~25 cardiomyocytes measured in each pictures and 3 pictures per region, for a total of ~150 cardiomyocytes measured in each left ventricle) as previously described [1]. Density of cardiomyocytes in three sub-regions and total number of cardiomyocytes within the left ventricle were assessed stereologically as per Anversa [24] in hematoxylin-phloxin-safran (HPS)-stained sections. A similar procedure was used to calculate non-cardiomyocyte density and total number as we previously reported [1].

### ***In situ* determination of apoptotic cell type**

To examine endothelial cells in the left ventricle, capillary density was assessed by lectin binding [1] in untreated SHR and after 14 and 28 days of amlodipine treatment. 5 µm thick sections were deparaffinized and incubated for 1 hour at 37°C with 100 µg/mL

TRITC-labeled lectin BS-1 (*Bandeiraea simplicifolia*) before photomicrographs from the left-ventricle subepicardium and subendocardium were taken at a magnification of  $\times 400$ . Results were expressed as number of capillaries/cardiomyocyte. Quantification of apoptotic nuclei using *in situ* terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP-biotin nick end labeling (TUNEL) was done as previously described [1] with AMCA as the fluorochrome. In a duplicate set of sections, TUNEL labeling was used in conjunction with lectin binding. Appropriate filters were used to quantify labeled cells by fluorescence microscopy.

#### **Immunohistochemistry staining for macrophages/monocytes**

To examine the presence of inflammatory cells in the left ventricle of SHR during amlodipine treatment, every ED-1 positive cells in the whole section was counted at 400X magnification [25, 26]. 5  $\mu\text{m}$  thick sections were deparaffinized and incubated overnight at 4°C with a mouse monoclonal antibody against rat ED-1 found on the surface of monocytes/macrophages (1:500, Serotec, Raleigh, NC). The slides were then incubated for 1 hour at room temperature with biotinylated goat anti-mouse secondary antibody (1:200, DakoCytomation, Mississauga, Canada). A streptavidin-horseradish peroxidase system with the substrate 3', 3'-diaminobenzidine was used to develop the stain. The slides were then lightly counterstained with hematoxylin. Appropriate negative controls were performed by omitting the primary antibody.

#### **Statistical analysis**

Data were analyzed by analysis of variance and unpaired Student's *t* test with Bonferroni correction for multiple comparisons when appropriate. Values are presented as mean  $\pm$  standard error of the mean (SEM) and  $p < 0.05$  was considered statistically significant.

#### **3.4.4 Results**

As shown in Figure 1, SHR used in this study were hypertensive before initiation of treatment and blood pressure continued to rise in absence of amlodipine. The

antihypertensive effect of amlodipine was significant starting from day 2 ( $p < 0.001$ ) and blood pressure did not decrease further thereafter. Heart rate was transiently increased with amlodipine at day 2 only ( $p < 0.001$ ) and back to control level by day 4.

### **Kinetics of LVH regression**

The left ventricular mass index in SHR at day 0 was significantly higher than in age-matched WKY rats, but it was similar between untreated SHR at days 0 and 28 (Fig. 2A). With amlodipine, LVH was significantly reduced in SHR starting from day 7 of therapy ( $-4.6 \pm 1.5\%$ ,  $p = 0.008$ , Fig. 2A), bringing the value of left ventricular mass index half-way between those of untreated SHR (day 0) and normotensive WKY rats. At the end of the treatment (28 days), left ventricular mass index reduction with amlodipine reached  $9.2 \pm 1.1\%$ . Furthermore, amlodipine prevented the increase of left ventricular mass observed in age-matched SHR sacrificed at day 28 (Table 1). In contrast to the early reduction of LVH, left ventricular cardiomyocyte CSA was not modified significantly during the first 10 days of amlodipine therapy. CSA of cardiomyocytes in the sub-epicardium was significantly reduced by  $16 \pm 3\%$  starting from day 14 ( $p = 0.008$ , Fig. 2C), whereas CSA of cardiomyocytes in the sub-endocardium was significantly reduced by  $14 \pm 3\%$  ( $p = 0.013$ ) only after 28 days (Fig. 2C). As compared to pretreatment values in SHR, the levels of left ventricular ANP mRNA were significantly reduced at all times studied during amlodipine treatment. The significant decrease in ANP mRNA in SHR was maximal as early as 4 days of amlodipine, suggesting that it is related to treatment rather than to older age. Collagen content was significantly higher in untreated SHR when compared to WKY rats and remained statistically different after 4 and 7 days, but not after 10, 14 and 28 days of amlodipine therapy (Table 1). However, this effect of amlodipine was marginal as collagen content was not reduced significantly by treatment when compared with day 0 SHR. In contrast to the left ventricle, right ventricular mass index was not affected by amlodipine (Fig. 2B). The absolute right ventricular mass remained unchanged in the 28 days age-matched untreated controls, while it was significantly increased by 10 days ( $p < 0.001$ ) of amlodipine treatment, normalizing the relative LV / RV mass (Table 1). This occurred without significant changes in right ventricular DNA content after 28 days of amlodipine treatment (as compared to day 0:  $1.12 \pm 0.05$   $\mu\text{g/g}$  of body weight).

### Kinetics of apoptosis induction

We next tested the hypothesis that reduced LVH at day 7 correlated with apoptosis induction. Expression of the pro-apoptotic protein Bax relative to the anti-apoptotic protein Bcl-2 was increased between days 7 and 28 ( $p < 0.005$ , Fig. 3A), suggesting an increased susceptibility to apoptosis. When taken separately, a trend toward increased protein expression of Bax between days 7 and 28 was observed (average of  $1.29 \pm 0.08$  fold), while Bcl-2 expression decreased non-significantly by  $27 \pm 5\%$  at these time-points. Expression of the active cleaved form of death enzyme caspase-3 was significantly increased at day 7 ( $p = 0.002$ , Fig. 3B), with no significant change in the abundance of the native uncleaved form. We next asked whether these changes in the expression of apoptotic regulatory proteins affected cell number in the left ventricle. There was no change in the density of cardiomyocyte nuclei in the subepicardium, midmyocardium and subendocardium throughout the 28 days of treatment as well as in age-matched controls at 28 days (data not shown). However, amlodipine induced a significant reduction in the density of non-cardiomyocytes nuclei in the subepicardium starting from day 7 ( $-19 \pm 4\%$ ,  $p < 0.001$ ) and in the midmyocardium and subendocardium starting from day 14 ( $-18 \pm 2\%$ ,  $p < 0.001$ ;  $-21 \pm 3\%$ ,  $p < 0.001$ , respectively), while this density remained unchanged in vehicle-treated SHR (Table 2). As shown in figure 4A, the left ventricle of vehicle-treated SHR (days 0 and 28) showed non-cardiomyocyte hyperplasia versus WKY rats. Interestingly, as highlighted in Table 2, non-cardiomyocyte hyperplasia in control SHR vs WKY rats was more prominent in the subepicardium ( $1.77 \pm 0.08$  fold increase of cell number as compared to  $1.18 \pm 0.03$  fold and  $1.35 \pm 0.07$  fold in midmyocardial and subendocardial areas, respectively). Moreover, amlodipine treatment reduced by  $21 \pm 4\%$  the total number of non-cardiomyocytes in the whole left ventricle between days 4 and 7 ( $p < 0.001$ ), generating a significant regression of non-cardiomyocyte hyperplasia that reached  $32 \pm 5\%$  after 28 days, whereas it did not affect total cardiomyocyte number throughout the experimental period (Fig. 4A). DNA content in the left ventricle was not changed at day 4, but was reduced by  $23 \pm 2\%$  by day 7, in correlation with the onset of LVH regression and the reversal of non-cardiomyocytes hyperplasia (Fig. 4B). After 14 days of therapy, DNA content in the SHR left ventricle reached the level of control WKY rats, while no further reduction occurred during the following 14 days.

### Identification of the apoptotic cell type

We next sought to identify which cell type(s) undergo apoptosis. Non-cardiomyocytes found in the heart are mainly fibroblasts and endothelial cells. As summarized in figure 5A, *in situ* TUNEL labeling revealed a significant increase in TUNEL-positive non-cardiomyocyte nuclei in the left ventricle at 7, 10 and 14 days (>3 fold increase,  $p < 0.001$ ), while the level of TUNEL-positive cardiomyocytes remained low and unchanged by treatment with amlodipine ( $0.019 \pm 0.004\%$  at day 0). Moreover, the quantification of lectin-positive cells (endothelial cells) indicated no modification of capillary density in the left ventricle subepicardium and an increase ( $p = 0.012$ ) in the subendocardium after 28 days of treatment (Fig. 5B). Consistent with these data, the increase in TUNEL-positive nuclei occurred in lectin-negative cells, as revealed by double labeling (Fig. 6). The number of cells positive for the monocyte/macrophage marker ED-1 per cross-section of the left ventricle increased significantly by day 7 (Fig. 5C). After this peak, the number of ED-1 positive cells fell back to control values. However, the number of inflammatory cells lost between days 7 and 28 ( $9/\text{mm}^2$ ) is well below the number of non-cardiomyocytes eliminated during the same period ( $303/\text{mm}^2$ ). Collectively, these data suggest that the increase in TUNEL-positive nuclei during amlodipine treatment occurred in interstitial fibroblasts. Since bFGF released by fibroblasts is required to stimulate cardiomyocyte growth [11], bFGF levels during amlodipine treatment were evaluated by western blotting. bFGF levels increased significantly at days 4 and 10 and showed a trend toward reduction after 14 and 28 days of therapy (not shown).

### 3.4.5 Discussion

The significant new finding of this study is that amlodipine induces a selective deletion of interstitial fibroblasts that coincides with the time when LVH regression is initiated, but occurs one week prior to the time when a reduction in cardiomyocyte mass becomes detectable. Fibroblasts deletion occurred by transient apoptosis induction which peaked during the first 10 days of treatment and resulted in the correction of fibroblast hyperplasia in the SHR left ventricle, down to levels seen in WKY rats. Although LVH was significantly reduced by day 7, evidence of cardiomyocyte mass reduction first appeared at

day 14. Thus, we clearly observed two temporally separated phases leading to the reduction of left ventricular mass index and involving different mechanisms: (1) massive apoptosis of excess interstitial fibroblasts and (2) reduction of cardiomyocyte mass. The influx of a significant but relatively small number of ED-1 positive cells in the left ventricle at day 7 suggests a transient inflammatory response to the massive production of apoptotic bodies around that period [27].

ANP mRNA expression, a well characterized marker of hemodynamic stress, was significantly reduced as early as 4 days after the beginning of amlodipine treatment, and probably reflects the rapid reduction of cardiac afterload resulting from the decreased blood pressure rather than an age-dependent change. In addition to these changes that are favorable to the regression of LVH, it is intriguing to speculate that reduced fibroblast number contributed to the reduction of cardiomyocyte hypertrophy. Several observations support this hypothesis. First, there was a spatial synchronization between both responses. Fibroblast apoptosis first occurred in the subepicardium (at day 7; Table 2), the region where cardiomyocyte CSA reduction also first occurred (at day 14; Fig 2C). Fibroblast apoptosis was then observed in the subendocardium (at day 14), where it was followed by cardiomyocyte mass regression (by day 28). Second, when SHR are given hydralazine [7], neither fibroblast apoptosis nor LVH regression do occur. Third, Pellieux *et al* [11] showed that integration of hypertrophic stimuli in the heart is achieved by fibroblasts, in part via bFGF release. We noted that cardiomyocyte CSA was not reduced as long as bFGF levels remained elevated during the first 10 days of treatment suggesting that bFGF production may have played a role in delaying cardiomyocyte mass reduction. Further studies are needed to define the relationship between fibroblast apoptosis and cardiomyocyte mass regulation.

The present results are consistent with our previous data showing that a 4-week treatment with either valsartan or enalapril reverses LVH and abolishes fibroblast hyperplasia without affecting cardiomyocyte number in SHR [1]. Others have shown that regression of cardiovascular hypertrophy with anti-hypertensive medication in SHR implicates a modulation of the cardiovascular cell growth – cell death balance [5, 28, 29].

Moreover, cardiomyocyte apoptosis is prevented by nifedipine *in vitro* [30] and by amlodipine *in vivo* [31], suggesting that apoptosis is regulated differently by calcium channel blockers depending on the cell type. The early reversal of fibroblast hyperplasia by transient apoptosis may provide long-term benefits that are not entirely dependent on continuous drug administration, as suggested by the persistent effects on cardiac hypertrophy and fibrosis 3 months after withdrawal of amlodipine in SHR [18].

Several possibilities emerge as mechanisms of fibroblasts apoptosis induction by amlodipine. A pressure-dependent component cannot be excluded since amlodipine reduced DNA content in the left but not the right ventricle. However, we showed that blood pressure reduction with hydralazine does not reverse cardiac hyperplasia [7]. Moreover, we previously reported that repeated blood pressure reduction with nifedipine does not cause further reductions in cardiac DNA content in SHR, suggesting that once susceptible cells are depleted, the heart is resistant to further induction of apoptosis [32]. Our present data show that fibroblast hyperplasia is found only in the left ventricle, possibly reflecting the accumulation of activated fibroblast subtype(s) with increased pressure afterload. Of particular interest, a study showed that activated hepatic stellate cells, presenting a myofibroblast-like phenotype, express voltage-operated calcium channels mediating calcium influx [33]. Amlodipine could therefore act directly on (myo)fibroblasts in the left ventricle or alternatively via reduction of left ventricular oxidative stress [26]. Finally, mechanism(s) independent of calcium channel blockade cannot be ruled out, such as the inhibition of protein kinase C (PKC) as shown in cell types that do not express L-type calcium channels [34, 35] and the paradoxal release of nitric oxide by the R<sup>+</sup> enantiomer of amlodipine [36].

The impact of amlodipine on reversal of collagen deposition was minimal, possibly because 11-week-old SHR do not present large areas of fibrosis. However, based on our results, prevention of fibrosis development with amlodipine in longer term studies [17, 18] may be achieved by the partial deletion of collagen-producing cells. The reduction of cardiac fibrosis by amlodipine appear less pronounced in humans than in animal models [37, 38]. Cardiac apoptosis regulation by amlodipine in humans remains poorly defined.

Gonzalez *et al* [39] reported no effect of amlodipine on the number of apoptotic cardiomyocytes or non-cardiomyocytes in right septal endomyocardial biopsies obtained from hypertensive patients after 12 months of treatment. However, an evaluation of the total number of left ventricular cells was not performed. If confirmed in humans, the early reversal of fibroblast hyperplasia by transient apoptosis may have an impact in our efforts to prevent end-organ damage.

In summary, irrespective of the mechanism involved, amlodipine treatment induced a coordinated induction of interstitial fibroblast apoptosis and LVH regression at day 7 that preceded by several days the reduction of cardiomyocyte mass. Collectively, these data suggest that selective deletion of fibroblast, rather than cardiomyocyte mass regulation, is associated with the onset cardiac remodeling induced by amlodipine in SHR.

#### ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by the Canadian Institutes of Health Research (CIHR #45452). D. Duguay holds an award from the Canadian Institutes of Health Research.

#### 3.4.6 References

1. DerSarkissian S., Marchand EL, Duguay D, Hamet P, deBlois D. Reversal of interstitial fibroblast hyperplasia via apoptosis in hypertensive rat heart with valsartan or enalapril. *Cardiovasc Res* 2003; **57**(3):775-783.
2. Liu JJ, Peng L, Bradley CJ, Zulli A, Shen J, Buxton BF. Increased apoptosis in the heart of genetic hypertension, associated with increased fibroblasts. *Cardiovasc Res* 2000; **45**(3):729-735.
3. Hamet P, Thorin-Trescases N, Moreau P, Dumas P, Tea BS, deBlois D, et al. Workshop: excess growth and apoptosis: is hypertension a case of accelerated aging of cardiovascular cells? *Hypertension* 2001; **37**(2 Part 2):760-766.

4. Hamet P, deBlois D, Dam TV, Richard L, Teiger E, Tea BS, et al. Apoptosis and vascular wall remodeling in hypertension. *Can J Physiol Pharmacol* 1996; **74**(7):850-861.
5. Thorin-Trescases N, deBlois D, Hamet P. Evidence of an altered in vivo vascular cell turnover in spontaneously hypertensive rats and its modulation by long-term antihypertensive treatment. *J Cardiovasc Pharmacol* 2001; **38**(5):764-774.
6. Walter SV, Hamet P. Enhanced DNA synthesis in heart and kidney of newborn spontaneously hypertensive rats. *Hypertension* 1986; **8**(6):520-525.
7. Tea BS, Dam TV, Moreau P, Hamet P, deBlois D. Apoptosis during regression of cardiac hypertrophy in spontaneously hypertensive rats. Temporal regulation and spatial heterogeneity. *Hypertension* 1999; **34**(2):229-235.
8. Izumi Y, Kim S, Zhan Y, Namba M, Yasumoto H, Iwao H. Important role of angiotensin II-mediated c-Jun NH(2)-terminal kinase activation in cardiac hypertrophy in hypertensive rats. *Hypertension* 2000; **36**(4):511-516.
9. Manabe I, Shindo T, Nagai R. Gene expression in fibroblasts and fibrosis: involvement in cardiac hypertrophy. *Circ Res* 2002; **91**(12):1103-1113.
10. Gray MO, Long CS, Kalinyak JE, Li HT, Karliner JS. Angiotensin II stimulates cardiac myocyte hypertrophy via paracrine release of TGF-beta 1 and endothelin-1 from fibroblasts. *Cardiovasc Res* 1998; **40**(2):352-363.
11. Pellioux C, Foletti A, Peduto G, Aubert JF, Nussberger J, Beermann F, et al. Dilated cardiomyopathy and impaired cardiac hypertrophic response to angiotensin II in mice lacking FGF-2. *J Clin Invest* 2001; **108**(12):1843-1851.
12. Islim IF, Watson RD, Ihenacho HN, Ebanks M, Singh SP. Amlodipine: effective for treatment of mild to moderate essential hypertension and left ventricular hypertrophy. *Cardiology* 2001; **96 Suppl 1**:10-18.
13. Kyselovic J, Krenek P, Wibo M, Godfraind T. Effects of amlodipine and lacidipine on cardiac remodelling and renin production in salt-loaded stroke-prone hypertensive rats. *Br J Pharmacol* 2001; **134**(7):1516-1522.
14. Lassila M, Davis BJ, Allen TJ, Burrell LM, Cooper ME, Cao Z. Cardiovascular hypertrophy in diabetic spontaneously hypertensive rats: optimizing blockade of the renin-angiotensin system. *Clin Sci (Lond)* 2003; **104**(4):341-347.

15. Nayler WG. The effect of amlodipine on hypertension-induced cardiac hypertrophy and reperfusion-induced calcium overload. *J Cardiovasc Pharmacol* 1988; **12 Suppl 7**:S42-S44.
16. Sanada S, Node K, Minamino T, Takashima S, Ogai A, Asanuma H, et al. Long-acting Ca<sup>2+</sup> blockers prevent myocardial remodeling induced by chronic NO inhibition in rats. *Hypertension* 2003; **41**(4):963-967.
17. Tomassoni D, Sabbatini M, Amenta F. Effect of Different Dihydropyridine-type Ca<sup>2+</sup> Antagonists on Left Ventricle Hypertrophy and Coronary Changes in Spontaneously Hypertensive Rats. *J Cardiovasc Pharmacol* 2003; **41**(4):544-552.
18. Sevilla MA, Voces F, Carron R, Guerrero EI, Ardanaz N, San Roman L, et al. Amlodipine decreases fibrosis and cardiac hypertrophy in spontaneously hypertensive rats: persistent effects after withdrawal. *Life Sci* 2004; **75**(7):881-891.
19. Klingbeil AU, Schneider M, Martus P, Messerli FH, Schmieder RE. A meta-analysis of the effects of treatment on left ventricular mass in essential hypertension. *Am J Med* 2003; **115**(1):41-46.
20. Yamazaki T, Komuro I, Zou Y, Kudoh S, Shiojima I, Mizuno T, et al. Efficient inhibition of the development of cardiac remodeling by a long-acting calcium antagonist amlodipine. *Hypertension* 1998; **31**(1):32-38.
21. Teiger E, Than VD, Richard L, Wisnewsky C, Tea BS, Gaboury L, et al. Apoptosis in pressure overload-induced heart hypertrophy in the rat. *J Clin Invest* 1996; **97**(12):2891-2897.
22. Stegemann H, Stalder K. Determination of hydroxyproline. *Clin Chim Acta* 1967; **18**(2):267-273.
23. Masciotra S, Picard S, Deschepper CF. Cosegregation analysis in genetic crosses suggests a protective role for atrial natriuretic factor against ventricular hypertrophy. *Circ Res* 1999; **84**(12):1453-1458.
24. Anversa P, Zhang X, Li P, Capasso JM. Chronic coronary artery constriction leads to moderate myocyte loss and left ventricular dysfunction and failure in rats. *J Clin Invest* 1992; **89**(2):618-629.
25. Dijkstra CD, Dopp EA, Joling P, Kraal G. The heterogeneity of mononuclear phagocytes in lymphoid organs: distinct macrophage subpopulations in the rat

- recognized by monoclonal antibodies ED1, ED2 and ED3. *Immunology* 1985; **54**(3):589-599.
26. Yamamoto E, Lai ZF, Yamashita T, Tanaka T, Kataoka K, Tokutomi Y, et al. Enhancement of cardiac oxidative stress by tachycardia and its critical role in cardiac hypertrophy and fibrosis. *J Hypertens* 2006; **24**(10):2057-2069.
  27. Bowen-Pope DF, Schaub FJ. Apoptosis of smooth muscle cells is not silent: Fas/FADD initiates a program of inflammatory gene expression. *Trends Cardiovasc Med* 2001; **11**(1):42-45.
  28. Diez J, Panizo A, Hernandez M, Vega F, Sola I, Fortuno MA, et al. Cardiomyocyte apoptosis and cardiac angiotensin-converting enzyme in spontaneously hypertensive rats. *Hypertension* 1997; **30**(5):1029-1034.
  29. Sharifi AM, Schiffrin EL. Apoptosis in vasculature of spontaneously hypertensive rats: effect of an angiotensin converting enzyme inhibitor and a calcium channel antagonist. *Am J Hypertens* 1998; **11**(9):1108-1116.
  30. Rabkin SW, Kong JY. Nifedipine does not induce but rather prevents apoptosis in cardiomyocytes. *Eur J Pharmacol* 2000; **388**(3):209-217.
  31. Yu G, Liang X, Xie X, Su M, Zhao S. Diverse effects of chronic treatment with losartan, fosinopril, and amlodipine on apoptosis, angiotensin II in the left ventricle of hypertensive rats. *Int J Cardiol* 2001; **81**(2-3):123-129.
  32. deBlois D, Tea BS, Beaudry D, Hamet P. Regulation of therapeutic apoptosis: a potential target in controlling hypertensive organ damage. *Can J Physiol Pharmacol* 2005; **83**(1):29-41.
  33. Bataller R, Gasull X, Gines P, Hellemans K, Gorbic MN, Nicolas JM, et al. In vitro and in vivo activation of rat hepatic stellate cells results in de novo expression of L-type voltage-operated calcium channels. *Hepatology* 2001; **33**(4):956-962.
  34. Hempel A, Lindschau C, Maasch C, Mahn M, Bychkov R, Noll T, et al. Calcium antagonists ameliorate ischemia-induced endothelial cell permeability by inhibiting protein kinase C. *Circulation* 1999; **99**(19):2523-2529.
  35. Yu T, Morita I, Shimokado K, Iwai T, Yoshida M. Amlodipine modulates THP-1 cell adhesion to vascular endothelium via inhibition of protein kinase C signal transduction. *Hypertension* 2003; **42**(3):329-334.

36. Zhang XP, Loke KE, Mital S, Chahwala S, Hintze TH. Paradoxical release of nitric oxide by an L-type calcium channel antagonist, the R<sup>+</sup> enantiomer of amlodipine. *J Cardiovasc Pharmacol* 2002; **39**(2):208-214.
37. Lopez B, Querejeta R, Varo N, Gonzalez A, Larman M, Martinez Ubago JL, et al. Usefulness of serum carboxy-terminal propeptide of procollagen type I in assessment of the cardioreparative ability of antihypertensive treatment in hypertensive patients. *Circulation* 2001; **104**(3):286-291.
38. Shibasaki Y, Nishiue T, Masaki H, Matsubara H, Iwasaka T. [Angiotensin II type 1 antagonist suppress left ventricular hypertrophy and myocardial fibrosis in patient with end stage renal disease (ESRD)]. *Nippon Rinsho* 2002; **60**(10):1992-1998.
39. Gonzalez A, Lopez B, Ravassa S, Querejeta R, Larman M, Diez J, et al. Stimulation of cardiac apoptosis in essential hypertension: potential role of angiotensin II. *Hypertension* 2002; **39**(1):75-80.

### 3.4.7 Figure legends, figures and tables

**Figure 1:** (A) Mean arterial blood pressure measured by plethysmography and (B) heart rate of vehicle-treated (■) and amlodipine-treated SHR (□) during the 28 days of therapy. \* Significantly different ( $P < 0.05$ ) from control SHR (day 0);  $n = 6$  to 24 per time-point.

**Figure 2:** (A) Left ventricle weight to body weight ratio, (B) right ventricle weight to body weight ratio, (C) left ventricular subepicardial (SEP) and subendocardial (SED) cardiomyocytes cross-sectionnal area and (D) left ventricular ANP level (corrected for the amount of 18S RNA) of untreated WKY rats (day 0), of SHR treated with amlodipine for 0, 4, 7, 10, 14 and 28 days and of SHR treated with vehicle for 28 day. \* Significantly different ( $P < 0.05$ ) from control SHR (day 0).  $N = 14$  and 9 for control SHR (days 0 and 28, respectively);  $n = 6$  for 4, 10 and 28 days and WKY;  $n = 8$  for 7 and 14 days.

**Figure 3:** (A) Changes of apoptotic regulatory proteins expression after 0, 4, 7, 10, 14 and 28 days of treatment with amlodipine. The protein expression ratio of Bax to Bcl-2 is presented as percentage of untreated SHR. Inset shows representative bands corresponding to the molecular weight of Bax (23 kDa) and Bcl-2 (26 kDa). (B) Protein expression of death enzyme caspase-3 during amlodipine treatment. Inset shows representative bands corresponding to the molecular weight of cleaved caspase-3 (17-20 kDa, ■) and caspase-3 proform (32 kDa, □). All parameters were also evaluated in age-matched WKY rats (day 0). \* Significantly different ( $P < 0.05$ ) from control SHR (day 0). N=14 for SHR (day 0); n=6 for 4, 10 and 28 days and WKY; n=8 for 7 and 14 days.

**Figure 4:** (A) Changes in the total number of non-cardiomyocytes nuclei (■) and cardiomyocytes nuclei (□) in the left ventricle of untreated WKY rats (day 0), of SHR treated with amlodipine for 0, 4, 7, 10, 14 and 28 days and of SHR treated with vehicle for 28 day. (B) DNA content in the left and right ventricles of rats described in (A). \* Significantly different ( $P < 0.05$ ) from control SHR (day 0). N=14 and 9 for control SHR (days 0 and 28, respectively); n=6 for 4, 10 and 28 days and WKY; n=8 for 7 and 14 days.

**Figure 5:** (A) Quantification of *in situ* TUNEL labeling showing an increased proportion of TUNEL-positive non-cardiomyocytes (■) nuclei, which were located around cardiomyocytes (□), at 7, 10 and 14 days of amlodipine treatment. N=11 for control SHR (day 0); n=6 for 4 days; n=8 for 7 and 14 days; n=5 for 10 and 28 days. (B) Number of capillaries per cardiomyocyte, evaluated by lectin binding (endothelial cells marker), was not modified by therapy in the subepicardium (■) and increased in the subendocardium (□). N=10 for untreated SHR; n=4 for 14 days; n=5 for 28 days. (C) Number of ED-1 positive cells (macrophages and monocytes) per cross-section of the left ventricle of SHR during amlodipine treatment. N=11 for untreated SHR; n=5 for 4, 10 and 28 days; n=8 for 7 and 14 days. \* Significantly different ( $P < 0.05$ ) from untreated SHR (day 0).

**Figure 6:** Double immunofluorescence with TUNEL-AMCA labeling (bright blue, A and D) and lectin-TRITC binding (bright red, B and E) in SHR left ventricle revealed the increase of TUNEL-positive non-cardiomyocytes nuclei in lectine-negative cells after 7 days of amlodipine treatment. Cardiomyocyte cell body autofluorescence appear in diffuse red. (C and F) Merged images confirmed the localization of TUNEL positive nuclei.

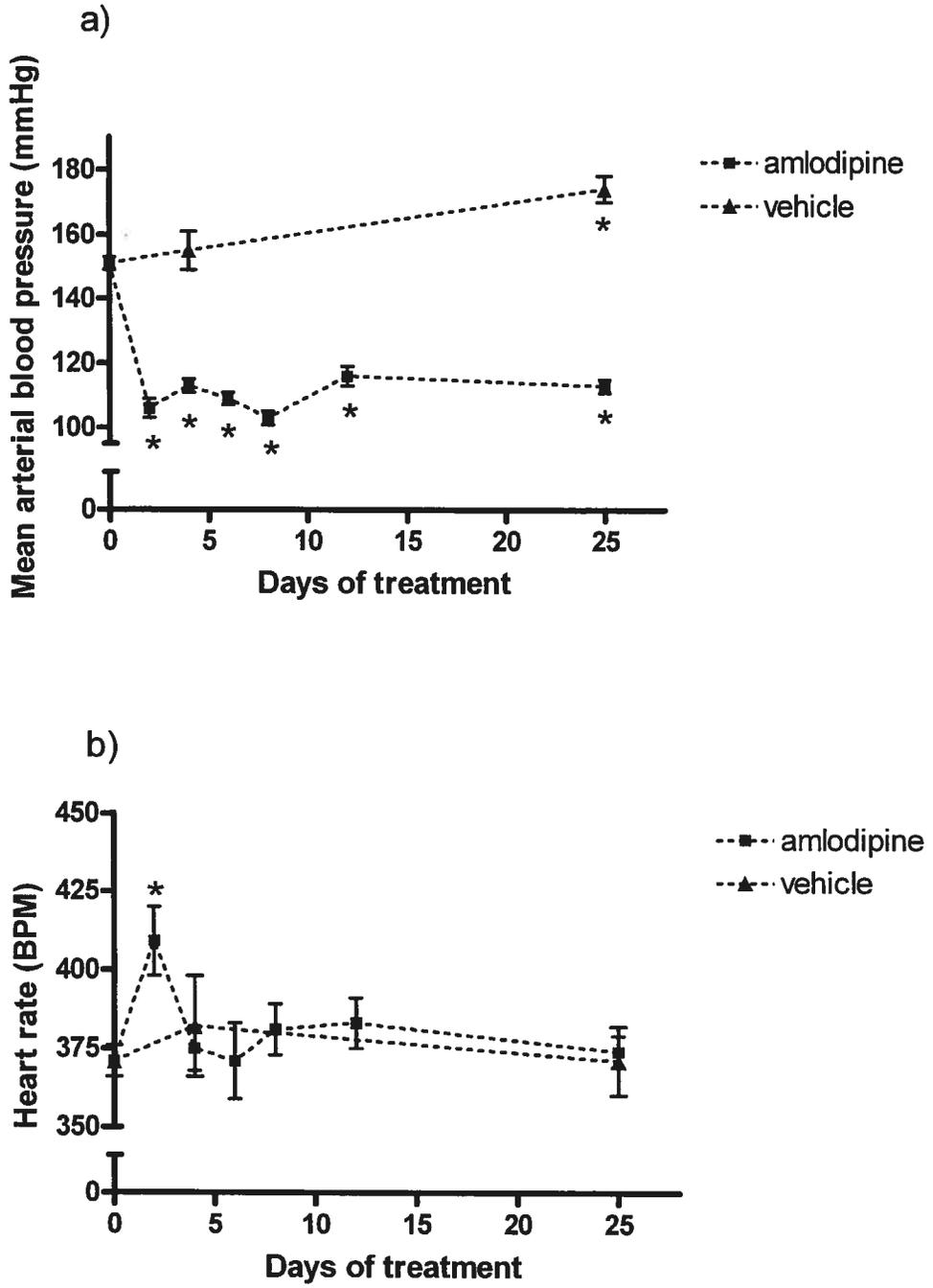
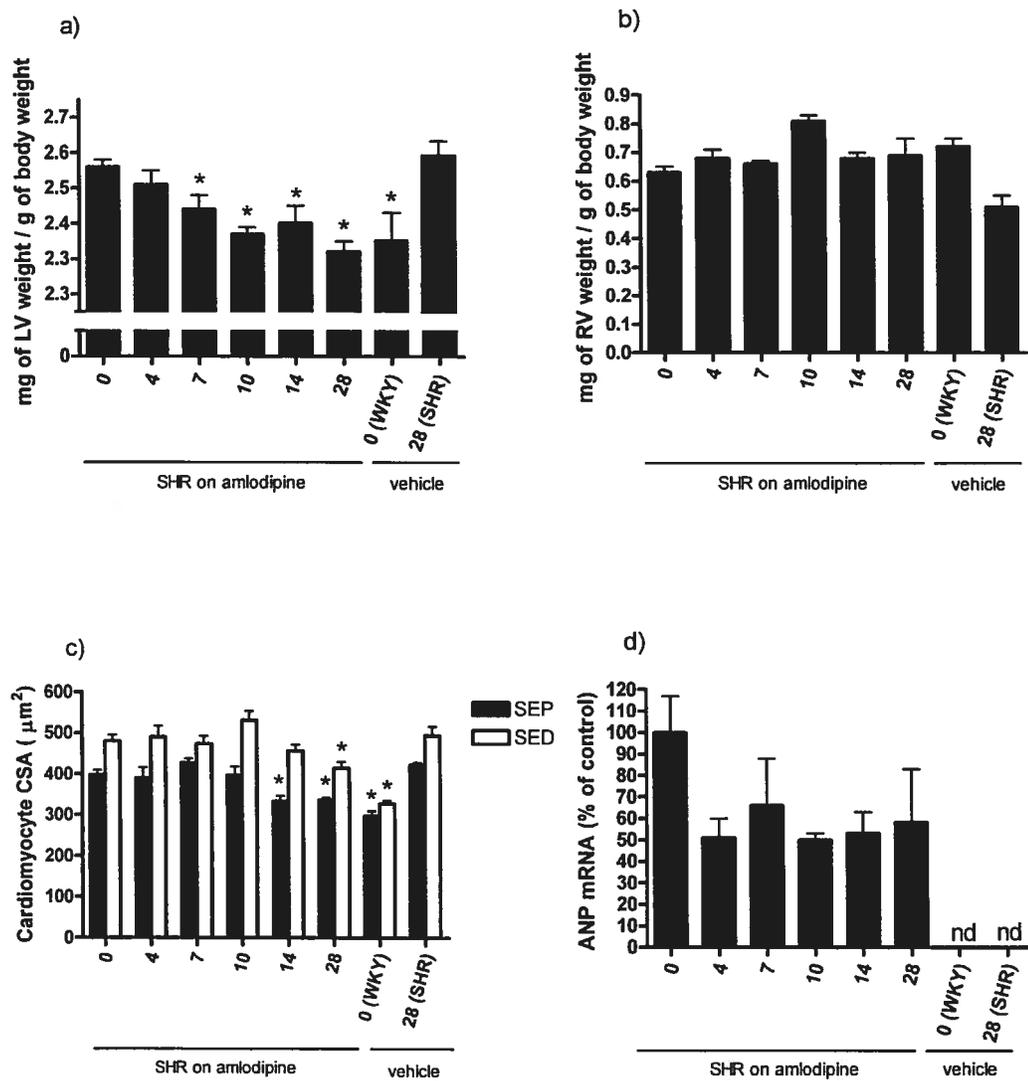


Figure 1



**Figure 2**

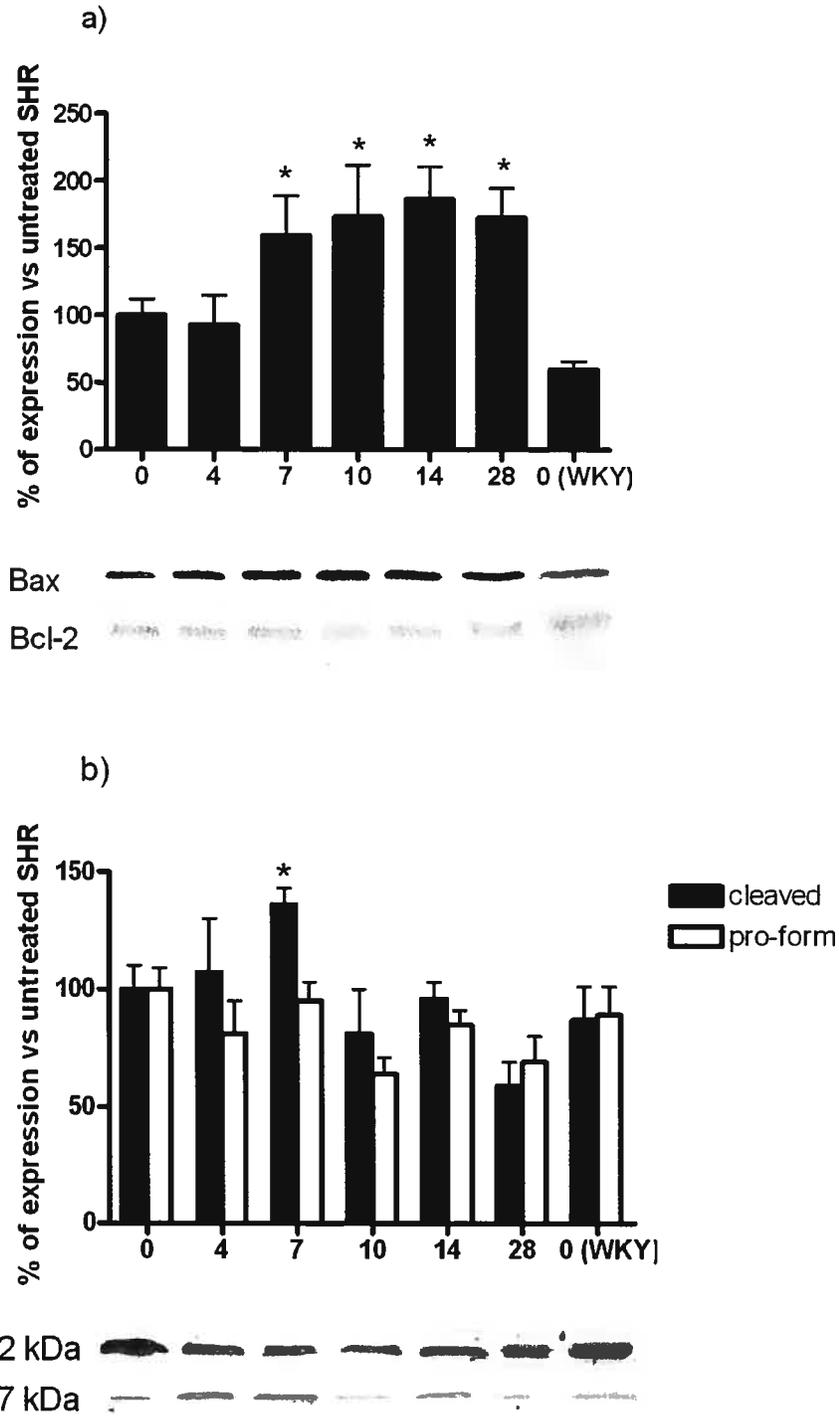


Figure 3

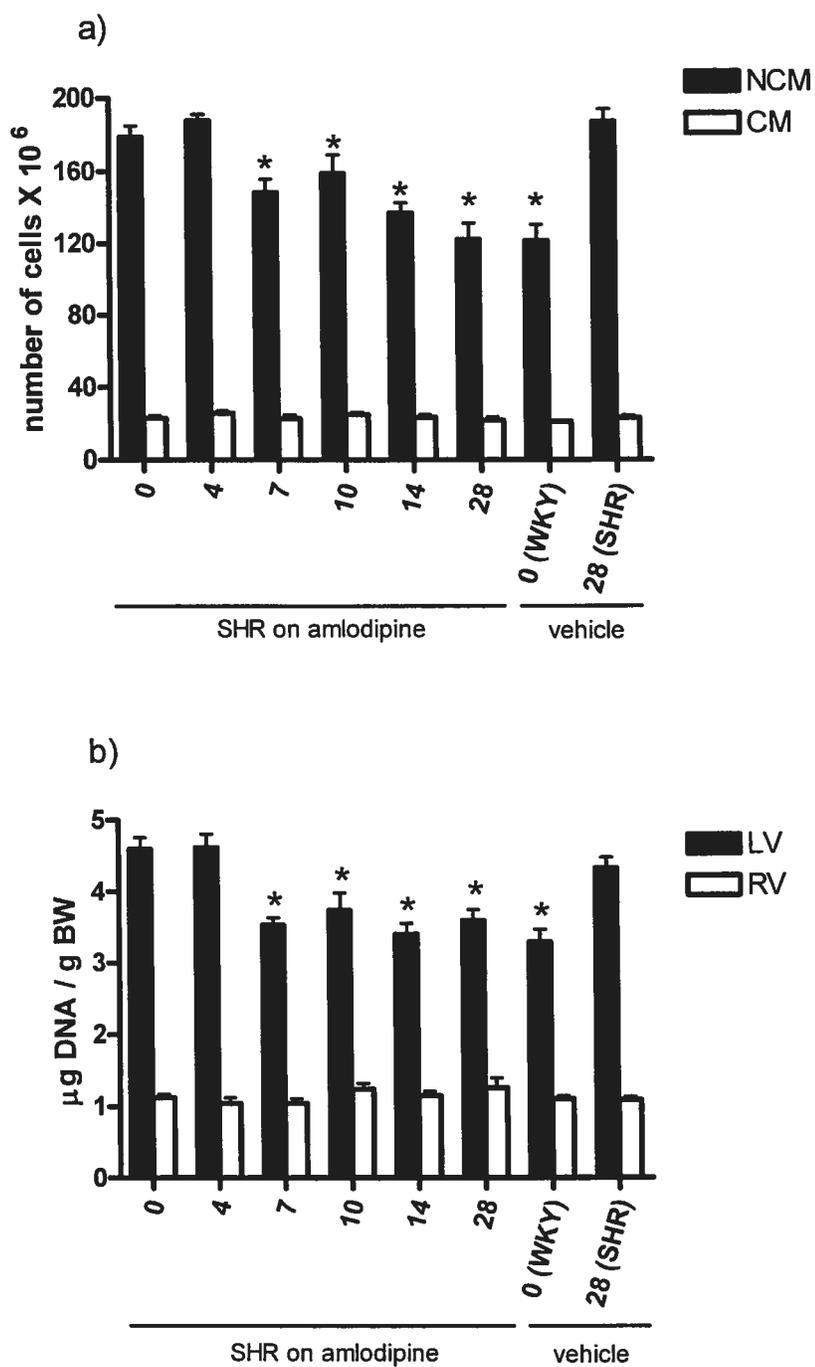


Figure 4

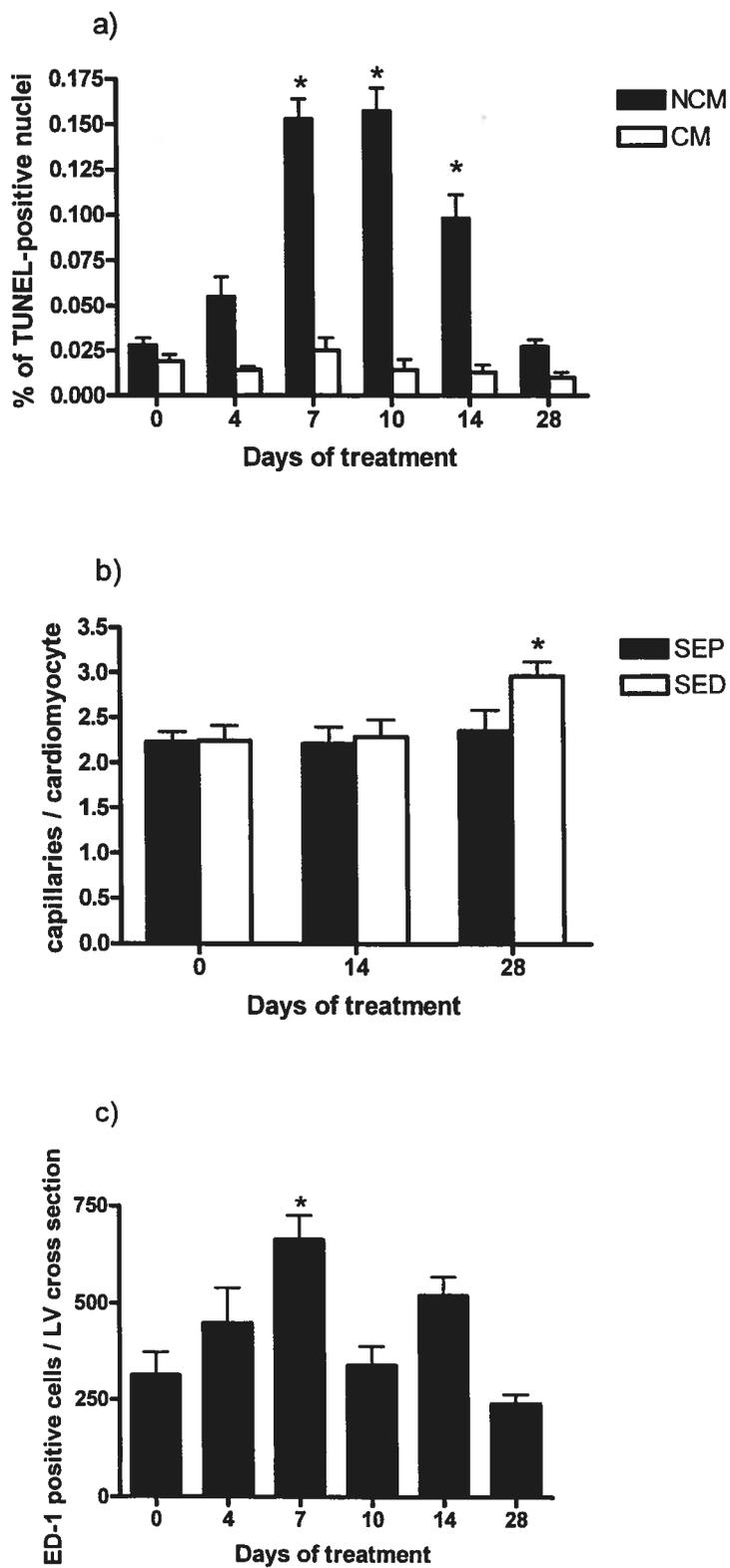


Figure 5

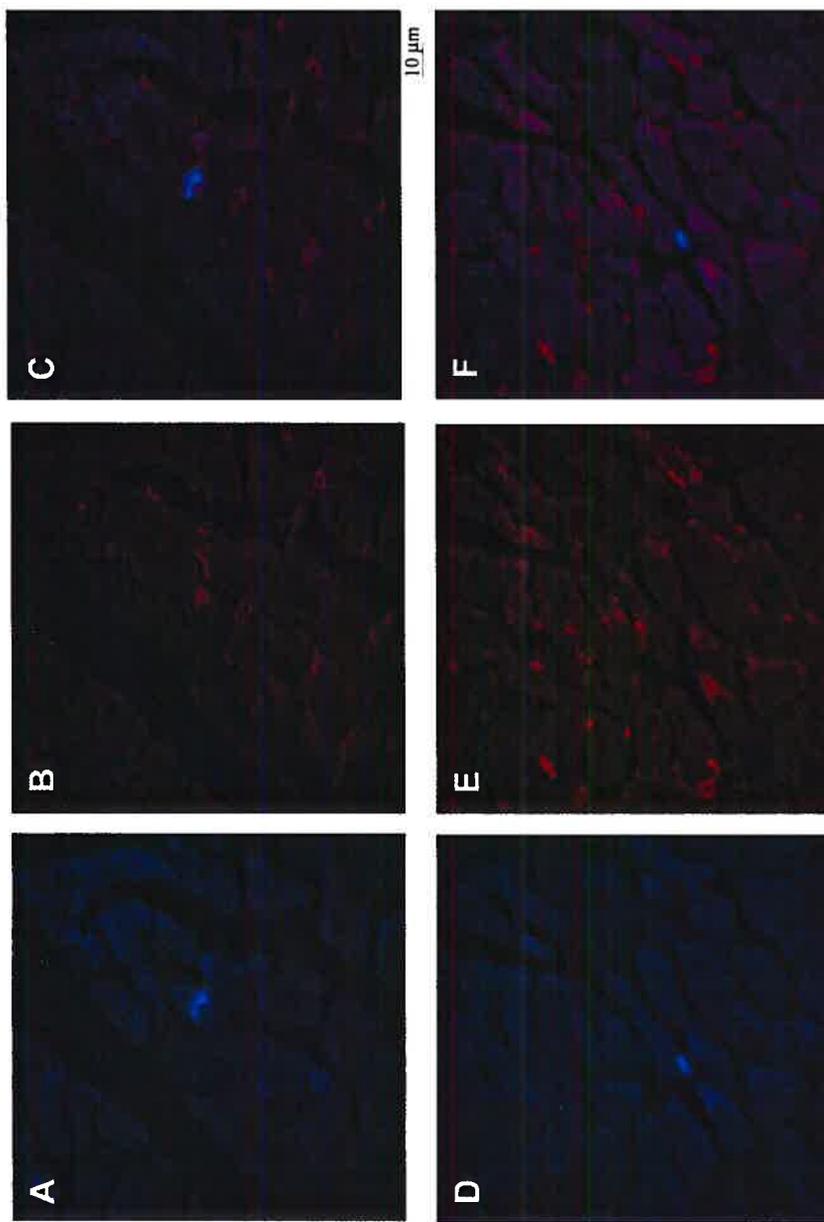


Figure 6

	SHR on amlodipine						vehicle	
	Day 0	Day 4	Day 7	Day 10	Day 14	Day 28	SHR	WKY
	(n=11)	(n=6)	(n=8)	(n=5)	(n=8)	(n=5)	Day 28 (n=9)	Day 0 (n=4)
Body weight (g)	277±2	282±2	286±4	288±3	294±4	308±12*	328±6*	282±11
LV mass (mg)	730±13	741±21	730±14	695±14	730±15	743±29	867±25*	678±33*
RV mass (mg)	174±4	196±7	193±6	231±3*	202±3*	218±26*	167±16	204±12
LV / RV mass ratio	4.2±0.1 <sup>†</sup>	3.8±0.2	3.8±0.1	3.0±0.1	3.6±0.1	3.6±0.3	5.4±0.4 <sup>†</sup>	3.4±0.2
LV HOP (% vs day 0 SHR)	100±3 <sup>†</sup>	99±12 <sup>†</sup>	96±6 <sup>†</sup>	88±6	85±7	91±2	N.D	68±4

**Table 1. Body weight, left and right ventricular weight and left ventricular collagen content of SHR during amlodipine treatment and of age-matched controls and normotensive WKY rats.**

Values are mean ± SEM. HOP, hydroxyproline; N.D, not determined. \* Significantly different (P<0.05) from day 0 SHR. <sup>†</sup> Significantly different (P<0.05) from untreated WKY rats.

Subregion	SHR on amlodipine							vehicle	
	Day 0	Day 4	Day 7	Day 10	Day 14	Day 28	SHR	WKY	
	(n=11)	(n=6)	(n=8)	(n=5)	(n=8)	(n=5)	Day 28 (n=9)	Day 0 (n=4)	
Subepicardium (nuclei / mm <sup>2</sup> )	2365±66	2313±61	1916±104*	1924±31*	1852±77*	1628±36*	2451±58	1627±20*	
Midmyocardium (nuclei / mm <sup>2</sup> )	2307±25	2256±76	2065±74	2109±112	1882±38*	1872±103*	2181±81	1975±166*	
Subendocardium (nuclei / mm <sup>2</sup> )	2340±65	2394±69	2123±85	2142±21	1831±74*	1553±59*	2592±98	1815±188*	

**Table 2. Density of non-cardiomyocytes nuclei in three subregions of the left ventricle of SHR during amlodipine treatment and in vehicle-treated SHR and WKY rats.**

Values are mean ± SEM. \* Significantly different (P<0.05) from untreated SHR (day 0)

### **3.5 RÉSULTATS ADDITIONNELS**

### 3.5.1 Objectifs

Les études précédentes ayant relevé le rôle du  $RB_1$  des kinines dans l'induction de l'apoptose de CML chez le SHR lors de la régression de l'hypertrophie aortique en réponse à l'énalapril, nous avons maintenant voulu déterminer si le  $RB_1$  participe également au remodelage cardiovasculaire initié par un BCC ou un antagoniste  $AT_1$ . Nous avons également cherché à identifier des mécanismes en aval de la stimulation du  $RB_1$  qui pourraient être impliqués dans la réponse apoptotique. De plus, certains résultats n'ayant pas été retenus pour publication dans les articles scientifiques inclus dans les sections précédentes seront présentés à l'intérieur de ce chapitre.

### 3.5.2 Hypothèse

Nous avons émis l'hypothèse que le  $RB_1$  participe aux mécanismes mis en jeu lors de la régression de l'hypertrophie aortique initiée par l'amlodipine et par le valsartan chez le SHR en relayant l'apoptose de CML, tout comme il le fait en réponse à l'énalapril. De plus, nous vérifierons les effets d'un inhibiteur de la synthèse de la voie de synthèse du céramide sur les actions pro-apoptotiques initiées par l'énalapril.

### 3.5.3 Méthodologie

#### Protocole animal et évaluation du remodelage cardiovasculaire

Les études ont été réalisées sur des SHR mâles âgés de 11 semaines au début du traitement. Ces SHR (n=8 par groupe) ont reçu l'énalapril (30 mg/kg/jour), l'amlodipine (20 mg/kg/jour), le valsartan (30 mg/kg/jour) ou le véhicule (eau de breuvage), la dose étant ajustée de 2 à 3 fois par semaine en fonction du poids de l'animal et de sa consommation d'eau. Pour chacun de ces traitements, un groupe supplémentaire a reçu une combinaison du médicament antihypertenseur (ou son véhicule) et du R-954 (400 µg/kg/jour; antagoniste spécifique du  $RB_1$  des kinines administré via une mini-pompe osmotique). Au 21<sup>e</sup> jour de traitement, les animaux ont été anesthésiés avec une injection sous-cutanée de pentobarbital avant d'être canulés au niveau carotidien afin de mesurer leur pression sanguine. Suite à la stabilisation de la lecture de pression, le cœur a été arrêté en diastole

par une injection intraveineuse de  $\text{CdCl}_2$  (100 mM). Le cœur et l'aorte ont été prélevés tel que décrit dans les chapitres précédents. Ainsi, les paramètres du remodelage cardiovasculaire largement décrits dans les chapitres précédents (aire de section de l'aorte, nombre de cellules dans l'aorte par unité de longueur, contenu en ADN dans le ventricule gauche et ratio d'HVG) ont été mesurés.

Un groupe supplémentaire a été ajouté aux rats décrits au chapitre 4. Ainsi, lors du traitement à l'énalapril (30 mg/kg/jour) s'étendant sur 10 jours, des SHR (n=4) ont reçu lors des 4 derniers jours du traitement une injection intrapéritonéale quotidienne de fumonisine  $B_1$  (2 mg/kg); inhibiteur de la céramide synthase). L'aorte de ces animaux a été utilisée pour déterminer le nombre de noyaux ISOL positifs (apoptotiques) et le contenu en GMPc, tel que décrit à la section 3.2.3. Les protéines extraites des aortes provenant des animaux décrits au chapitre 4 (énalapril +/- R-715 pendant 9-10 et 21 jours) ont été utilisées pour compléter l'analyse de l'expression de certaines protéines par immunobuvardage de type Western, soit Akt (1:1000, Cell signaling), Akt phosphorylé (1:4000, Cell signaling),  $p21^{\text{Cip1/Waf1}}$  (1:50, Santa Cruz biotechnologies) et  $p27^{\text{Kip1}}$  (1:2000, Cell signaling).

De plus, la technique d'autoradiographie permettant d'évaluer le nombre de sites de liaison pour les  $RB_1$  et  $RB_2$  des kinines décrite aux sections 3.1.3 et 3.2.3 a été appliquée au cœur et aux reins des animaux dont les résultats dans l'aorte sont rapportés à la section 3.1 (SHR témoins ou ceux ayant reçu l'énalapril pendant 8 à 11 jours).

### **Analyses statistiques**

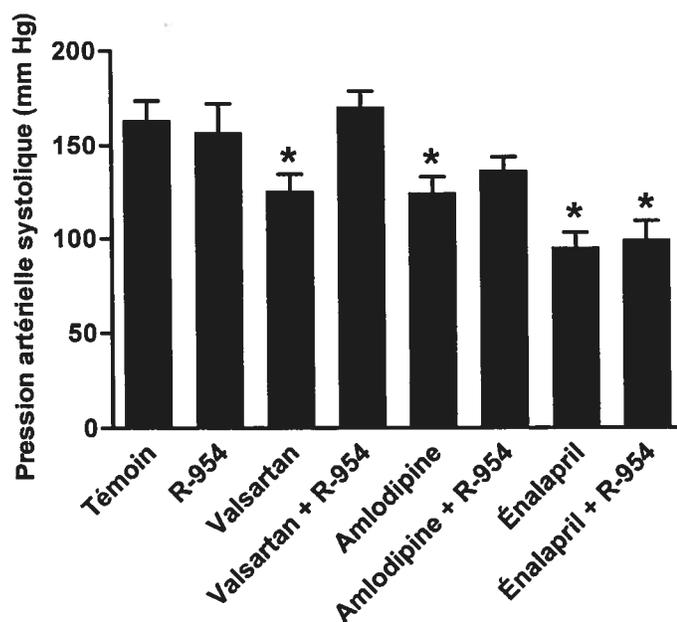
Les données ainsi recueillies ont été analysées à l'aide du logiciel GraphPad Prism 4. Les moyennes sont présentées avec leur erreur standard (SEM) et elles ont été comparées avec une analyse de variance (ANOVA) suivie du test de comparaison multiple Dunnet lors duquel le seuil de signification statistique a été posé à 0,05. Par ailleurs, le nombre de sites de liaisons pour les  $RB_1$  et  $RB_2$  suite au traitement à l'énalapril dans les divers organes a été comparé au groupe témoin avec un test t de Student.

### 3.5.4 Résultats

#### 3.5.4.1 Rôles du récepteur B<sub>1</sub> des kinines dans la réponse aux antihypertenseurs

##### *Réduction de la pression artérielle*

À la fin des 21 jours de traitement, les groupes ayant reçu un des antihypertenseur seul, provenant d'une des trois classes à l'étude, ont tous présenté une pression artérielle systolique significativement moindre que celle des SHR témoins (Figure 1). La baisse de pression obtenue avec soit l'amlodipine ( $p < 0,05$ ), soit le valsartan ( $p < 0,05$ ), n'était plus significative suite à l'ajout de l'antagoniste B<sub>1</sub> R-954 puisque ce dernier a permis de retrancher près de 30% de la baisse observée avec l'amlodipine et a complètement aboli l'effet du valsartan, alors que la réduction observée avec l'énalapril ( $p < 0,01$ ) n'a pas été atténuée par l'ajout du R-954. Le R-954 seul n'a eu aucun effet sur la pression artérielle.

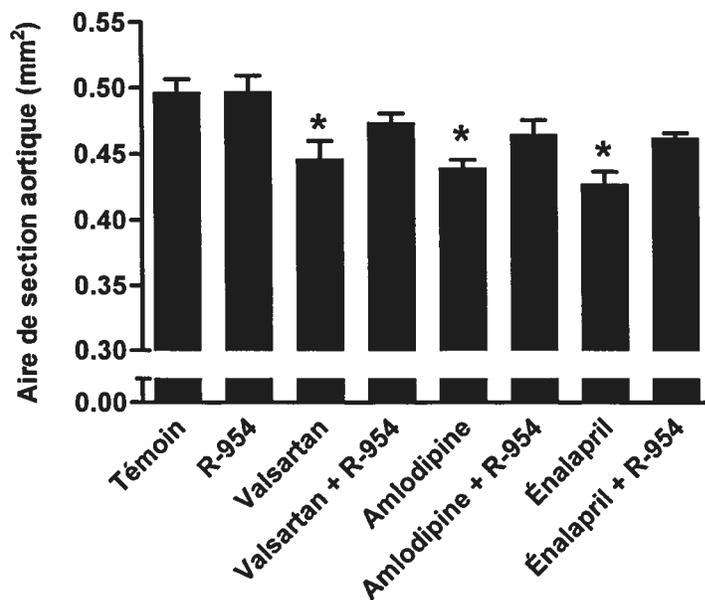


**Figure 1. Pression artérielle systolique suite à l'administration d'antihypertenseurs seuls ou en combinaison avec un antagoniste du RB<sub>1</sub>.**

Valeurs exprimées : moyenne  $\pm$  SEM. \*  $p < 0,05$  vs témoins.

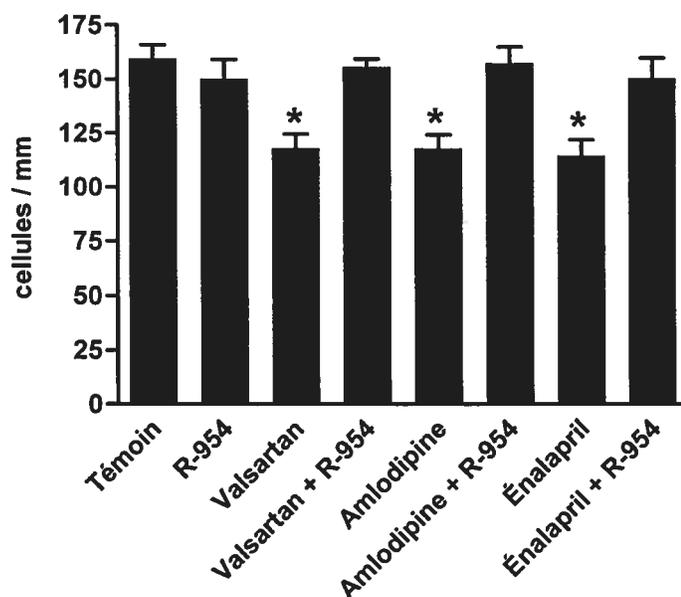
### *Régression du remodelage cardiovasculaire*

L'aire de section de l'aorte (CSA), un indice de l'hypertrophie du vaisseau, était plus petite dans les groupes ayant reçu seulement le valsartan ( $0,446 \pm 0,013 \text{ mm}^2$ ,  $p < 0,01$ ), l'amlodipine ( $0,439 \pm 0,006 \text{ mm}^2$ ,  $p < 0,01$ ) ou l'énalapril ( $0,427 \pm 0,009 \text{ mm}^2$ ,  $p < 0,01$ ) comparativement aux SHR témoins ( $0,497 \pm 0,010 \text{ mm}^2$ ) (Figure 2). L'ajout du R-954 a freiné la correction de l'hypertrophie vasculaire obtenue aussi bien avec le valsartan (de 53,5%) que l'amlodipine (de 43,3%) et que l'énalapril (de 50,0%), de façon à ce que la CSA ne soit plus significativement différente de celle du groupe témoin. L'hyperplasie aortique détectée chez le SHR à l'aide du disecteur tridimensionnel ( $160 \pm 6$  cellules / mm vs  $130 \pm 7$  chez le rat normotendu WKY,  $p < 0,05$ ) a été corrigée au même niveau par les trois antihypertenseurs, un effet qui a pu être complètement prévenu par l'ajout du R-954 sans égard à l'antihypertenseur étudié (Figure 3). Lors d'études précédentes, une telle réduction du nombre de CML aortiques dans ce même modèle a été attribuée à un processus apoptotique avec l'énalapril [(deBlois *et al.*, 1997; Tea *et al.*, 2000) et sections 3.1 et 3.2], l'amlodipine (section 3.3) et la valsartan (Tea *et al.*, 2000). Au niveau du remodelage cardiaque, les effets de l'énalapril sur l'HVG (réduction de  $21,1 \pm 1,5 \%$ ,  $p < 0,01$  vs témoins) et sur le contenu en ADN dans le ventricule gauche (baisse de  $35,2 \pm 11,0 \%$ ,  $p < 0,01$  vs témoins) n'ont pas été affectés par la co-administration du R-954 (Tableau 1). Les données cardiaques recueillies avec le valsartan et l'amlodipine demeurent préliminaires, mais, tout comme pour un iECA, elles semblent indiquer que le récepteur  $B_1$  ne participe pas à la régression du remodelage cardiaque initié par un antagoniste  $AT_1$  ou un BCC chez le SHR. Le R-954 administré seul n'a eu aucun effet sur tous ces paramètres.



**Figure 2.** Aire de section aortique suite à l'administration d'antihypertenseurs seuls ou en combinaison avec un antagoniste du RB<sub>1</sub>.

Valeurs exprimées : moyenne ± SEM. \* p<0,05 vs témoins.



**Figure 3.** Nombre de cellules dans l'aorte par unité de longueur suite à l'administration d'antihypertenseurs seuls ou en combinaison avec un antagoniste du RB<sub>1</sub>.

Valeurs exprimées : moyenne ± SEM. \* p<0,05 vs témoins.

	Traitement			
	Témoin (SHR)	Énalapril	R-954	Éna + R-954
Ratio poids du ventricule gauche / poids corporel (mg / g)	2.61±0.03	2.06±0.03*	2.56±0.04	2.01±0.02*
Poids du ventricule gauche (mg)	825±10	632±11*	805±15	633±10*
Contenu en ADN (µg / g de poids corporel)	4.92±0.28	3.19±0.35*	4.51±0.32	3.04±0.44*

**Tableau 1. Hypertrophie et contenu ventriculaire gauche en ADN suite au traitement de 21 jours à l'énalapril, au R-954 ou une combinaison des deux.**

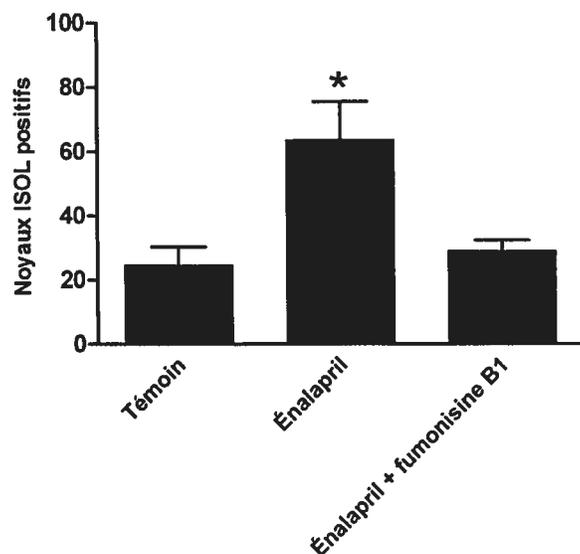
Valeurs exprimées: moyenne ± SEM. \*  $p < 0,05$  vs témoin.

### 3.5.4.2 Participation du céramide dans la réponse à l'énalapril

Afin de poursuivre l'étude des mécanismes impliqués lors de la réponse apoptotique des CML aortiques, nous avons bloqué la synthèse *de novo* du céramide (un médiateur bien défini de l'apoptose et récemment relié au récepteur B<sub>1</sub> (Kleine *et al.*, 2002)) lors du traitement des SHR avec l'énalapril. Les SHR ont été sacrifiés après 10 jours, un moment où l'apoptose est active mais la réduction de l'hyperplasie et de l'hypertrophie aortique n'a pas encore eu lieu (section 3.2), et les animaux ont reçu la fumonisine B<sub>1</sub> pendant les 4 derniers jours du traitement à l'énalapril

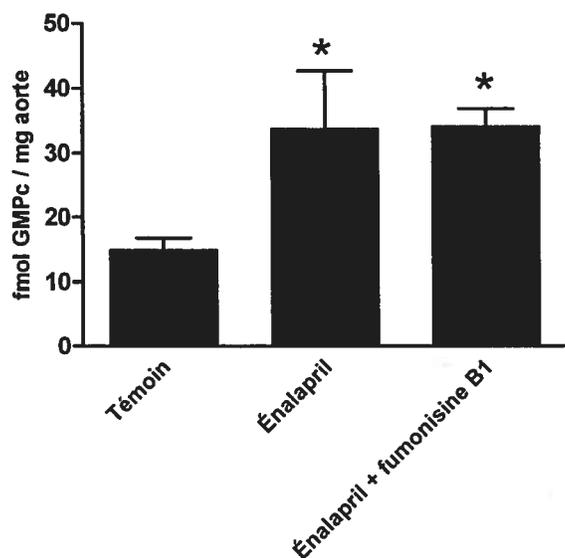
Au dixième jour du traitement, le nombre de noyaux ISOL positifs (apoptotiques) dans la média de l'aorte a été augmenté par l'énalapril (2,6 fois vs témoins,  $p < 0,01$ , tel que vu à la figure 4b de la section 3.2) et cette augmentation a été complètement prévenue par la co-administration de la fumonisine B<sub>1</sub> (Figure 4). En revanche, la hausse de GMPc aortique en réponse à l'énalapril (décrite à la section 3.2) n'a pu être empêchée par l'ajout de la fumonisine B<sub>1</sub> (Figure 5). Ces données suggérant que le céramide participe aux effets pro-apoptotiques de l'énalapril sur les CML aortiques soit en aval de la production de

GMPC, soit par un mécanisme indépendant du GMPC, demeurent toutefois préliminaires et devront être confirmées puisqu'elles n'incluent pas de groupe ayant reçu uniquement la fumonisine B<sub>1</sub>.



**Figure 4. Noyaux ISOL positifs dans l'aorte suite au traitement à l'énalapril, seul ou en combinaison avec la fumonisine B<sub>1</sub>.**

Tous les noyaux marqués ont été comptés sur une coupe transverse de l'aorte. Valeurs exprimées : moyenne ± SEM. \*  $p < 0,05$  vs témoins.



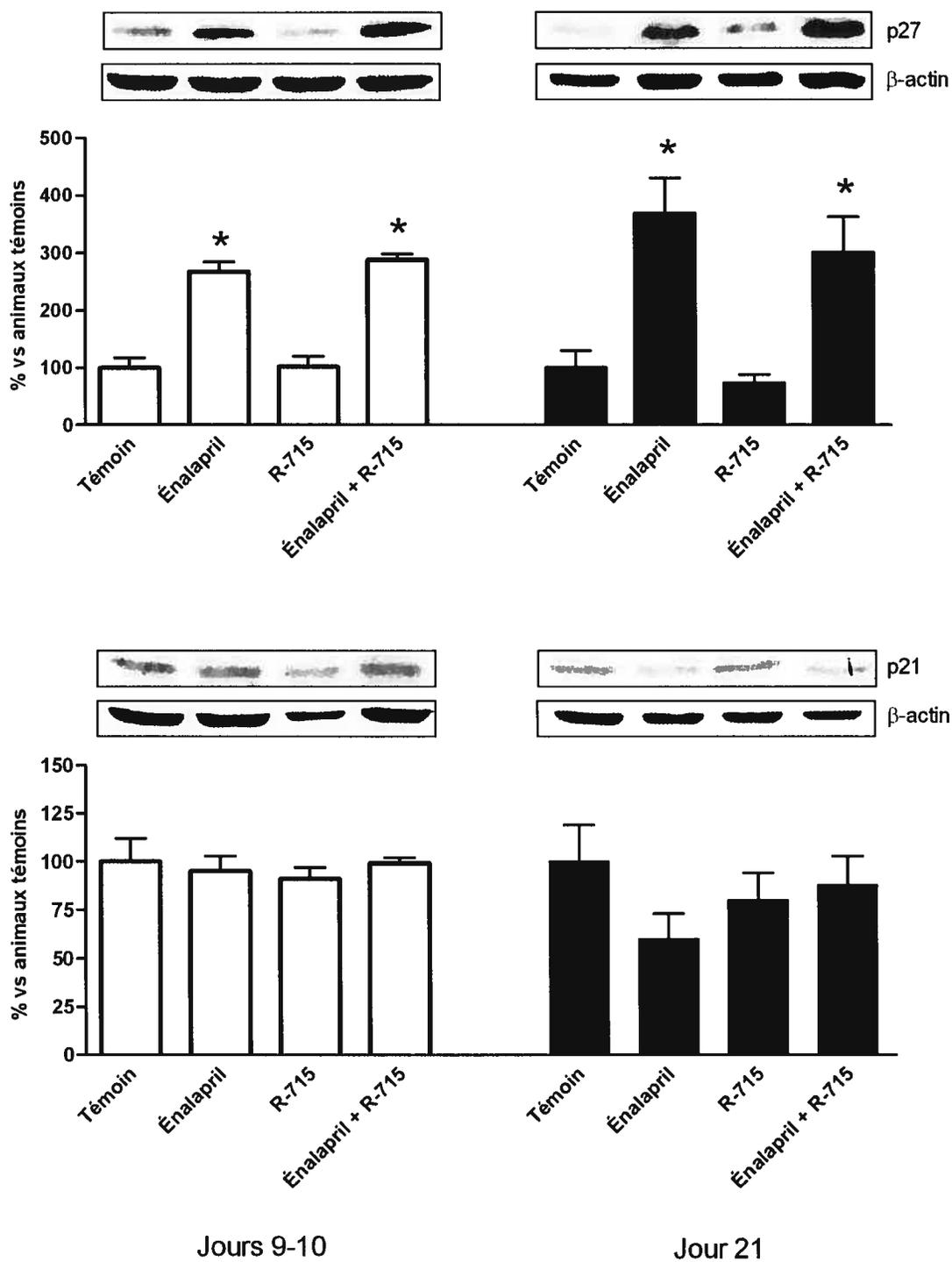
**Figure 5. Niveau de GMPC dans l'aorte suite au traitement à l'énalapril, seul ou en combinaison avec la fumonisine B<sub>1</sub>.**

Valeurs exprimées : moyenne ± SEM. \*  $p < 0,05$  vs témoins.

### 3.5.4.3 Autres résultats

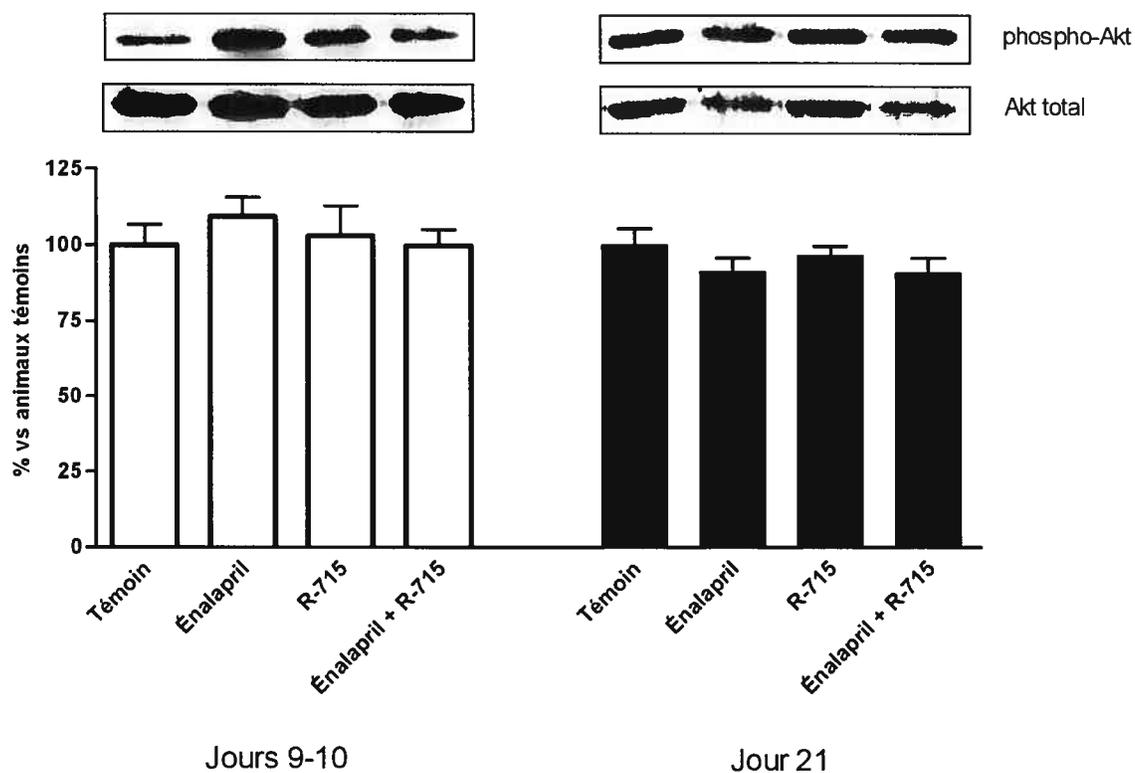
#### *Expression de Akt, p21<sup>Cip1/Waf1</sup> et p27<sup>Kip1</sup> lors du traitement à l'énalapril*

Le niveau d'expression aortique de p27<sup>Kip1</sup> dans l'aorte, un inhibiteur de kinases dépendantes des cyclines qui favorise l'arrêt de la prolifération cellulaire, a été augmenté de 2,7 fois aux jours 9-10 du traitement à l'énalapril ( $p < 0,01$  vs témoins) et de 3,7 fois après 21 jours ( $p < 0,01$  vs témoins). Cet effet n'a pu être prévenu par l'ajout de l'antagoniste B<sub>1</sub> R-715 (Figure 6). L'expression de p21<sup>Cip1/Waf1</sup> n'a pas été modulée par l'énalapril aux jours 9-10, mais a montré une tendance à la baisse après 21 jours, tendance qui était absente lors de la co-administration du R-715 (Figure 6). Le niveau de phosphorylation de Akt dans l'aorte n'a pas été affecté par l'énalapril au moment où des noyaux apoptotiques étaient détectés (jours 9-10) ni après 21 jours de traitement (Figure 7), en contraste avec la chute rapide de la phosphorylation de Akt tout juste avant le déclenchement de l'apoptose de CML en réponse à l'amlodipine (décrite à la section 3.3).



**Figure 6.** Niveau d'expression de p21<sup>Cip1/Waf1</sup> et p27<sup>Kip1</sup> suite au traitement à l'énalapril.

Valeurs exprimées : moyenne  $\pm$  SEM. \*  $p < 0,05$  vs témoins.



**Figure 7. Niveau d'expression de Akt suite au traitement à l'énalapril.**

Le graphique présente le ratio de Akt phosphorylé sur la forme totale de Akt. Valeurs exprimées : moyenne  $\pm$  SEM. \*  $p < 0,05$  vs témoins.

#### *Expression du récepteur B<sub>1</sub> des kinines lors du traitement à l'énalapril*

Suite à la découverte que l'énalapril augmente transitoirement le nombre de sites de liaisons pour le RB<sub>1</sub> dans l'aorte du SHR, nous avons vérifié si une réponse similaire s'observe dans le cœur et les reins (Figures 8 et 9). Les graphiques des moyennes obtenues dans l'aorte ont déjà été présentés à la section 3.1 et sont repris ici en couleurs. Au niveau rénal, l'énalapril a augmenté l'expression du RB<sub>1</sub> tant dans la médulla que dans le cortex après 8 à 11 jours de traitement à l'énalapril ( $p < 0,0001$  et  $p = 0,004$ , respectivement), sans pour autant influencer le nombre de sites de liaisons pour le RB<sub>2</sub>. Tout comme au niveau vasculaire, la hausse de sites de liaisons pour le RB<sub>1</sub> dans le rein avec l'énalapril s'est avérée transitoire puisque aucun changement n'a été détecté chez les SHR étudiés après quatre semaines de traitement. En revanche, dans le cœur du SHR, le niveau basal du RB<sub>1</sub> n'a pas été modulé par l'énalapril tandis que le nombre de sites de liaisons pour le RB<sub>2</sub> a été

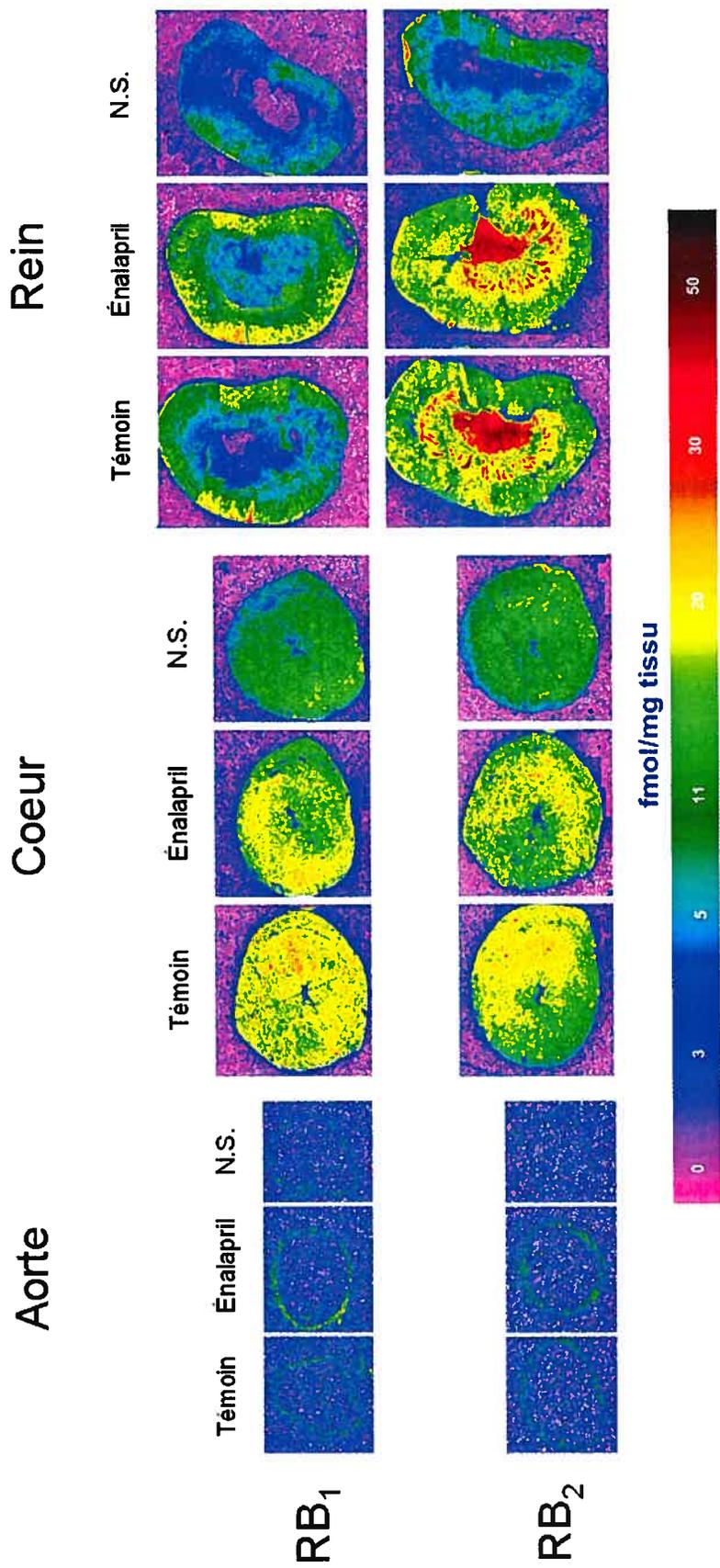
réduit sur les cœurs prélevés entre 8 et 11 jours de traitement ( $p=0,009$  vs témoins). À noter que les axes diffèrent d'un graphique à l'autre.

Par ailleurs, l'énalapril a produit une faible tendance vers la réduction du ratio du poids du rein sur le poids corporel du SHR après quatre semaines de traitement ( $p=0,09$  vs témoins), une tendance qui ne se répercute cependant aucunement sur le contenu rénal en ADN ( $p=0,67$  vs témoins) (Tableau 2). L'influence des antihypertenseurs sur la masse et l'apoptose rénale n'a donc pas été investiguée plus en profondeur dans la présente thèse.

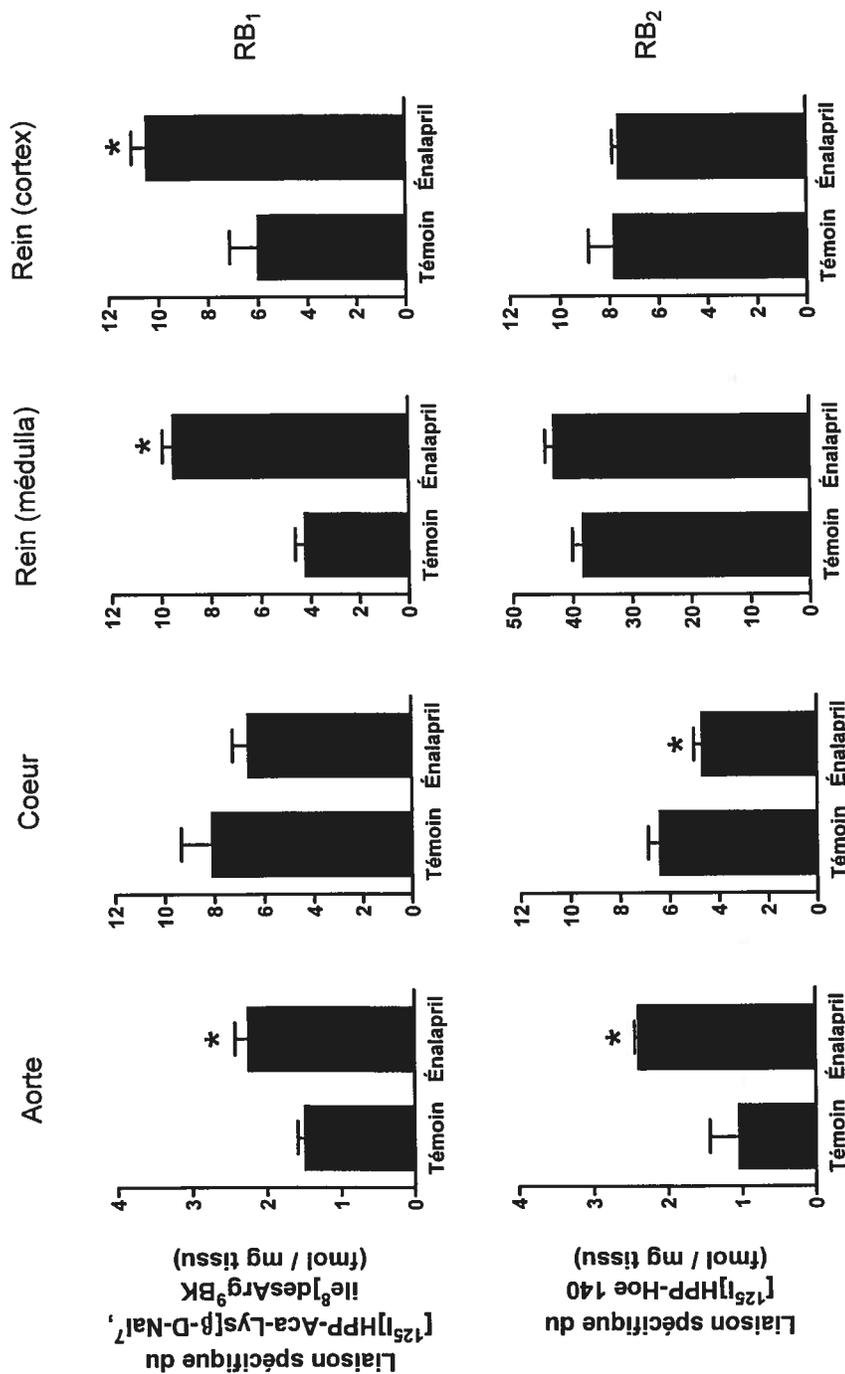
	Témoin (SHR)	Énalapril
<b>Poids corporel (g)</b>	325±9	324±5
<b>Ratio poids moyen des reins (g) / poids corporel (g)</b>	3,69±0,07	3,40±0,14
<b>Contenu en ADN (µg / g de poids corporel)</b>	8,99±0,61	8,61±0,61

**Tableau 2. Hypertrophie et contenu rénal en ADN lors du traitement à l'énalapril.**

Valeurs exprimées: moyenne ± SEM. n=6 par groupe.



**Figure 8. Sites de liaisons pour les récepteurs B<sub>1</sub> et B<sub>2</sub> des kinines chez le SHR suite au traitement à l'énalapril.**  
 N.S : non spécifique. Énalapril : SHR sacrifiés après un traitement allant de 8 à 11 jours.



**Figure 9. Quantification des sites de liaisons pour les récepteurs B<sub>1</sub> et B<sub>2</sub> des kinines chez le SHR suite au traitement à l'énalapril.**

Valeurs exprimées : moyenne ± SEM. \* p<0,05 vs témoins.

## **CHAPITRE 4 – Discussion générale**

Les travaux inclus dans cette thèse démontrent que l'apoptose transitoire de CML dans l'aorte de SHR en réponse à des antihypertenseurs provenant de trois classes différentes (iECA, antagoniste AT<sub>1</sub> et BCC) est initiée par des mécanismes convergeant au niveau du RB<sub>1</sub> des kinines, et que cette apoptose participe activement à la régression de l'hypertrophie vasculaire orchestrée par ces médicaments. En revanche, l'apoptose cardiaque en réponse à ces mêmes antihypertenseurs s'organise sans la participation du système des kinines. De plus, nous rapportons que la phase précoce de la régression de l'HVG obtenue avec l'amlodipine chez le SHR s'accompagne d'une élimination de fibroblastes interstitiels par apoptose, bien avant que la taille des cardiomyocytes ne soit réduite.

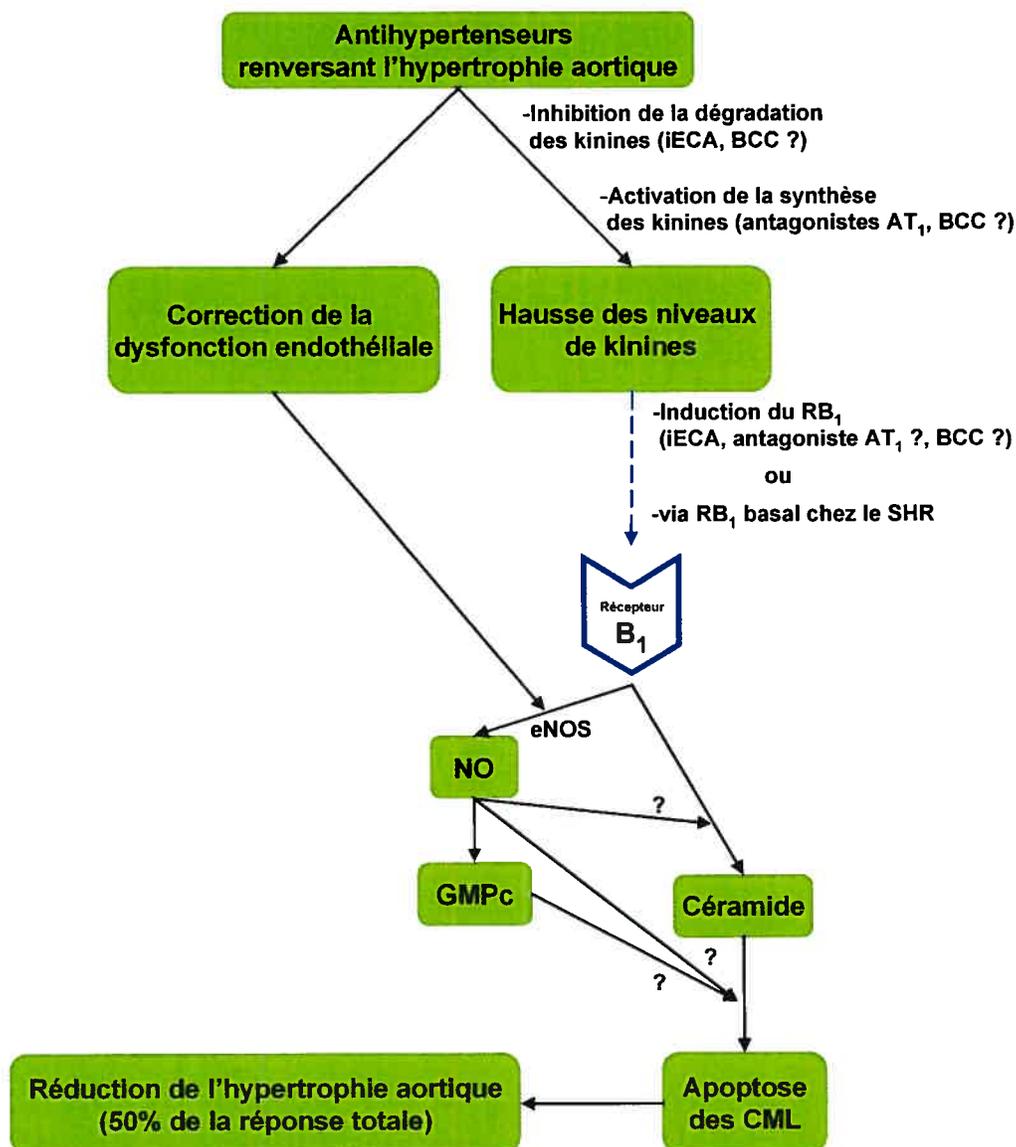
## **4.1 Implications mécanistiques et théoriques de la nature transitoire de l'apoptose cardiovasculaire en réponse aux antihypertenseurs**

La nature transitoire de l'apoptose des CML aortiques et des fibroblastes cardiaques en réponse aux antihypertenseurs soulève de nombreux points nécessitant un approfondissement. Nous discuterons d'abord des implications quant à l'initiation et à la fermeture de la fenêtre apoptotique vasculaire, avec une insistance particulière sur le RB<sub>1</sub> des kinines en tant que point de convergence des mécanismes initiateurs. Nous discuterons ensuite de la population cellulaire ciblée par les antihypertenseurs lors de l'apoptose aortique ainsi que des limitations de nos études et celles du modèle étudié, avant de clore avec une appréciation critique des questions soulevées par les résultats entourant l'apoptose cardiaque.

### **4.1.1 Initiation de l'apoptose aortique**

Les mécanismes initiateurs de l'apoptose aortique en réponse aux divers antihypertenseurs demeurent inconnus et spéculatifs, bien que les résultats de cette thèse laissent entrevoir certaines réponses. Ainsi, un délai allant de deux à plus de sept jours est observé avant l'apparition de noyaux apoptotiques dans la média de l'aorte, selon l'antihypertenseur employé. Nous suggérons que cette période est requise afin de sensibiliser les cellules ciblées à entrer en apoptose, ce qui pourrait s'effectuer en permettant au tissu de générer les médiateurs requis (NO, kinines, etc.). Par exemple, la correction de la dysfonction endothéliale dans l'aorte du SHR traité avec l'énalapril offre une meilleure biodisponibilité du NO, un médiateur connu de l'apoptose de CML lorsque ses niveaux augmentent considérablement (Pollman *et al.*, 1996), et l'accélération de cette correction avec du BH<sub>4</sub> permet de réduire le délai avant le déclenchement de l'apoptose par l'énalapril (Der Sarkissian *et al.*, 2004). Le délai pourrait aussi correspondre avec le temps requis pour l'induction du RB<sub>1</sub> des kinines, car l'apoptose de CML en réponse à l'énalapril coïncide temporellement avec l'augmentation de RB<sub>1</sub> aortiques fonctionnels. Étant donné que la stimulation du RB<sub>1</sub> accroît la production de NO (lorsque eNOS n'est plus découplée), il devient intéressant de postuler que ces deux composantes (correction de la

dysfonction endothéliale et induction du  $RB_1$ ) doivent survenir et agissent conjointement pour produire une apoptose subite de CML. Cette hypothèse est illustrée à la figure 9, et le rôle de la composante NO-dépendante pourrait être testée en co-administrant un inhibiteur de la synthèse de NO avec un iECA.



**Figure 9. Mécanismes généraux activés par les antihypertenseurs induisant l'apoptose de CML et renversant l'hypertrophie aortique chez le SHR.**

Diverses autres protéines pourraient être impliquées dans cette sensibilisation à l'apoptose, comme la protéine à motif doigt de zinc A20 induite en réponse à l'inflammation (rétro-inhibition visant à atténuer  $NF-\kappa B$ ) (Beyaert *et al.*, 2000). Bien qu'elle protège les cellules endothéliales (Liuwantara *et al.*, 2006) et les cellules  $\beta$  du

pancréas (Longo *et al.*, 2003) de l'apoptose, il a récemment été démontré que A20 induit l'apoptose de CML (Patel *et al.*, 2006). Elle sensibilise *in vitro* les CML à l'apoptose initiée par Fas et elle permet *in vivo* le renversement de l'hyperplasie néointimale via l'apoptose de CML dépendante du NO. Cette protéine inhibe aussi la prolifération de CML via une hausse de p21<sup>waf1</sup> et p27<sup>kip1</sup>, mais son expression chez le SHR ou tout autre modèle d'hypertension demeure inconnue. La sensibilisation des cellules à l'apoptose pourrait également impliquer une atténuation de signaux de survie cellulaire. Une réduction de l'activité Akt, premier événement moléculaire enregistré dans l'aorte suite au traitement à l'amlodipine, pourrait jouer un tel rôle. Bien que nous n'ayons pas observé une modification de la phosphorylation de Akt en réponse à l'énalapril, il demeure possible qu'une cinétique plus complète (animaux sacrifiés avant l'apparition de noyaux apoptotiques dans l'aorte) ait pu identifier une telle réponse. La réduction transitoire de l'activité Akt pourrait relier les antihypertenseurs, notamment l'amlodipine, à l'initiation de la voie extrinsèque de l'apoptose (caspase-8) comme nous l'avons observé, car l'inhibition de Akt est associée à une baisse de c-FLIP (Panka *et al.*, 2001; Skurk *et al.*, 2004) (un inhibiteur de caspase-8) et à une hausse de FasL (Suhara *et al.*, 2002) (activateur de la voie des récepteurs de mort) dépendante de JNK. Il serait possible de vérifier cette hypothèse en identifiant la phosphatase responsable de la réduction de l'activité Akt dans notre modèle [prévention de l'activation d'Akt par la phosphatase de lipides PTEN ou inactivation d'Akt par une phosphatase, PHLPP (Gao *et al.*, 2005) ou PP2A (Brazil *et al.*, 2004)] pour ensuite la neutraliser et déterminer si la réponse apoptotique aux antihypertenseurs serait alors retardée, voire bloquée. Autrement, un inhibiteur de la voie PI3K-Akt, comme la wortmannin ou le LY-294002, pourrait sensibiliser les CML de l'aorte de SHR à l'apoptose. Étant donné que les MAPKs étudiées dans l'aorte de SHR en réponse à l'amlodipine n'ont été modulées que suite à l'activation des caspases, nous ne pouvons pas considérer l'inhibition de la voie des MAPKs comme une étape initiatrice de l'apoptose dans notre modèle. D'autres facteurs de survie pourraient être atténués / dégradés précocement en réponse aux antihypertenseurs induisant l'apoptose de CML, telles que les protéines de la matrice extracellulaire ostéopontine et ténascine-C. Par exemple, la ténascine-C protège les CML de l'apoptose, et une réduction de son accumulation (par un inhibiteur d'élastases ou encore par un oligonucléotide antisens dirigé contre la ténascine-C) permet, *ex vivo*, de renverser l'hypertrophie d'artères pulmonaires de rat en association avec l'apoptose de CML (Cowan *et al.*, 2000b). Plus récemment, il a été suggéré que la

dégradation de la ténascine-C libère un fragment aux propriétés pro-apoptotiques sur des CML (Wallner *et al.*, 2004), ce qui en fait un candidat potentiel dans la recherche de mécanismes initiateurs de l'apoptose dans notre modèle. Par ailleurs, puisque les CML aortiques du SHR s'adaptent à un niveau de calcium intracellulaire élevé, le blocage soudain des canaux calciques voltage-dépendant pourrait déstabiliser profondément ces cellules et expliquer la rapidité notoire de l'apoptose aortique observée en réponse à l'amlodipine.

#### 4.1.2 Points de convergence mécanistique

La possibilité d'une convergence vers une cascade signalétique commune (pourcentage très similaire de cellules éliminées) suite à divers stimuli initiateurs (cinétique apoptotique différente) a été soulevée dès la première publication par notre groupe dévoilant la réponse apoptotique à des antihypertenseurs de classes différentes (deBlois *et al.*, 1997). Les travaux présents apportent de solides évidences concernant le rôle du RB<sub>1</sub> des kinines en tant que point de convergence, mais soulèvent par le fait même de nouveaux questionnements.

Premièrement, nous devons éclaircir de nombreux points entourant l'induction du RB<sub>1</sub>. Si le niveau basal d'expression du RB<sub>1</sub> détecté dans l'aorte de SHR témoins représente des récepteurs fonctionnels, l'induction du RB<sub>1</sub>, bien que temporellement corrélée avec la cinétique apoptotique, pourrait ne pas être requise pour l'initiation de la réponse apoptotique; elle pourrait plutôt représenter une réponse inflammatoire localisée suite au début d'une apoptose massive. Ainsi, nous émettons cette hypothèse globale sur la régulation du niveau d'expression du RB<sub>1</sub> par l'énalapril : Premièrement, le niveau basal de RB<sub>1</sub> dans l'aorte de SHR relèverait d'une réponse associée à une tension artérielle élevée. Deuxièmement, la réduction de cette tension artérielle par l'énalapril conduirait à la baisse d'expression de RB<sub>1</sub> fonctionnels, observée au jour 8. Troisièmement, suite à la mort de nombreuses cellules par apoptose (fragmentation de l'ADN aux jours 9-10), une réponse inflammatoire transitoire se déclencherait et serait accompagnée d'une hausse également transitoire de l'expression fonctionnelle de RB<sub>1</sub> dans le vaisseau. De cette façon, les antagonistes AT<sub>1</sub> et les BCC pourraient initier l'apoptose de CML aortique via le RB<sub>1</sub>, tel

que décrit dans cette thèse, sans devoir induire l'expression du récepteur. Si tel était le cas, la co-administration de l'inhibiteur général des caspases z-VAD-fmk avec ces antihypertenseurs empêcherait l'induction du RB<sub>1</sub> durant l'apoptose. Si, par contre, l'induction du RB<sub>1</sub> devait s'avérer essentielle pour la mise en place de la réponse apoptotique, il deviendrait alors particulièrement pertinent d'identifier les mécanismes impliqués. La signalisation intracellulaire récemment identifiée suite à la liaison d'un iECA sur l'ECA transmembranaire peut conduire à une hausse de l'expression de COX-2 (Fleming, 2006). Un mécanisme similaire pourrait être responsable de l'induction du RB<sub>1</sub> étant donné le patron similaire d'expression de ces deux protéines inductibles. Une autre possibilité fait intervenir deux composantes, soit les études montrant qu'un iECA peut resensibiliser et potentialiser le RB<sub>2</sub> (Marcic *et al.*, 1999) et celle rapportant que la stimulation prolongée de cellules (fibroblastes) avec la BK (aussi avec un agoniste B<sub>1</sub>) augmente l'expression du RB<sub>1</sub> (Phagoo *et al.*, 1999). Selon cette dernière possibilité, l'administration d'un antagoniste B<sub>1</sub> empêcherait l'induction du RB<sub>1</sub> précédant l'apoptose induite par un iECA. Une intervention visant à interférer avec le mécanisme d'induction du RB<sub>1</sub>, une fois qu'il sera identifié, pourra ensuite confirmer le rôle obligatoire ou accessoire de cette réponse quant à l'induction de l'apoptose. L'identification du type cellulaire exprimant le RB<sub>1</sub> (CML et/ou cellules endothéliales) pourra faciliter la caractérisation des mécanismes moléculaires recrutés en aval de la stimulation du RB<sub>1</sub>. Cette localisation pourra s'effectuer soit par microautoradiographie (Stumpf, 2005), par la méthode d'autoradiographie décrite dans cette thèse, mais appliquée aux aortes dénudées ou non de leur endothélium, ou encore en étudiant dans un bain à organe isolé la réponse fonctionnelle à un agoniste B<sub>1</sub> sur des aortes dénudées ou non de leur endothélium. La combinaison de ces méthodes a d'ailleurs permis d'identifier une hausse d'expression du RB<sub>1</sub> spécifiquement dans la couche musculaire d'artères pulmonaires et de l'aorte de porcs exposés au LPS ou atteints d'une maladie inflammatoire (Schremmer-Danninger *et al.*, 1996; Schremmer-Danninger *et al.*, 1998). Chez le SHR, Farias *et al.* (2004) ont montré que des anneaux aortiques avec endothélium s'hyperpolarisent en réponse à un agoniste B<sub>1</sub>, contrairement à ceux dénudés de l'endothélium. Il est possible qu'avant le traitement avec un iECA, le RB<sub>1</sub> se trouve sur l'endothélium de l'aorte du SHR, tandis que l'administration d'un iECA induit l'expression du RB<sub>1</sub> sur le muscle lisse aortique. Il demeure par contre difficile à ce stade d'identifier quelle population (endothéliale ou musculaire) exprime le RB<sub>1</sub> qui déclenche la réponse apoptotique, même si nous suggérons la participation de

eNOS en aval du  $RB_1$ , ce qui impliquerait le récepteur situé sur l'endothélium. Par exemple, l'expression de la forme neuronale de la NOS (nNOS) dans la média de l'aorte du SHR ouvre la possibilité que le NO favorisant la production de GMPc dans notre modèle soit d'origine musculaire et non endothéliale. La nature transitoire de la hausse d'expression du  $RB_1$  dans l'aorte et le rein du SHR en réponse à l'énalapril pourrait de plus réconcilier les conclusions opposées rapportées par divers groupes quant aux effets des iECA sur l'expression du  $RB_1$  (Nwator & Whalley, 1989; deBlois *et al.*, 1991; Marceau *et al.*, 1999; Marin-Castano *et al.*, 2002; Ongali *et al.*, 2003; Hirata *et al.*, 2003; Moreau *et al.*, 2005). En effet, certains soutiennent que les iECA peuvent induire l'expression du  $RB_1$ , alors que d'autres rapportent une absence d'effet des iECA à ce niveau. Or, nos données montrant que les iECA induisent plutôt une réponse transitoire quant à l'expression du  $RB_1$  est compatible avec ces deux positions et suggère que les conclusions d'études antérieures devraient être revisitées. Par contre, que se passe-t-il dans ces tissus pour que l'expression du  $RB_1$  revienne au niveau de base? L'induction du  $RB_1$  spécifiquement sur les cellules qui seront éventuellement éliminées par apoptose constitue une hypothèse invitante qui pourrait être testée par l'étude de la co-localisation des noyaux apoptotiques (méthode ISOL) et des  $RB_1$  (avec des anticorps commerciaux bien validés, ce qui n'est présentement pas le cas pour ceux que nous avons testés). En effet, selon R. Couture (communication personnelle), des anticorps disponibles commercialement dirigés contre le  $RB_1$  produisent, sur des tissus provenant de souris pour lesquelles le  $RB_1$  a été invalidé, un fort signal de liaison par immunohistochimie.

Deuxièmement, l'établissement d'un lien entre les divers antihypertenseurs que nous avons utilisés et la voie des kinines, bien qu'évident pour les iECA (inhibition de l'activité kininase II), se corse considérablement lorsque nous tentons de relier les antagonistes  $AT_1$  et particulièrement les BCC aux récepteurs des kinines. Ainsi, il sera essentiel de vérifier si ces antihypertenseurs induisent ou non la hausse d'expression du  $RB_1$  dans l'aorte comme nous l'avons montré pour l'énalapril et comme il a été rapporté dans le cœur avec un antagoniste  $AT_1$  (Tschöpe *et al.*, 2004). D'ailleurs, l'Ang II module à la hausse l'expression du  $RB_2$  des kinines, une action prévenue par les antagonistes  $AT_1$  (Tan *et al.*, 2004) et qui pourrait bien être compensée par une hausse de l'expression du  $RB_1$ . Pour les antagonistes  $AT_1$ , le lien possible avec les kinines a été évoqué dans

l'introduction de cette thèse et repose sur une production accrue de kinines suite à l'augmentation d'une activité kininogénase (encore mal définie) en aval de la stimulation du récepteur AT<sub>2</sub> (Tsutsumi *et al.*, 1999; Kurisu *et al.*, 2003). D'ailleurs, certaines actions des antagonistes AT<sub>1</sub>, incluant la cardioprotection lors d'un épisode d'ischémie/reperfusion et la prévention de la formation d'une néointima suite à dénudation endothéliale par un ballonnet (Barker *et al.*, 2006), semblent être relayées par les kinines (Jaloway *et al.*, 1998; Gohlke *et al.*, 1998; Zhu *et al.*, 1999; Tschöpe *et al.*, 2004). Un tel mécanisme serait en accord avec notre observation que l'apoptose aortique est relayée par le récepteur AT<sub>2</sub> lors de l'administration du valsartan chez le SHR (Tea *et al.*, 2000). Étant donné qu'il demeure encore aujourd'hui bien difficile de doser adéquatement les kinines sans que leurs niveaux ne soient altérés lors du prélèvement, il serait préférable de vérifier ce lien en mesurant directement l'activité kininogénase (au lieu de quantifier les niveaux de kinines) sur des extraits tissulaires ou encore dans le plasma suite à l'administration d'un antagoniste AT<sub>1</sub>. Par ailleurs, il serait pertinent de combiner un iECA ou un antagoniste AT<sub>1</sub> à un inhibiteur de la kininase I (enzyme convertissant les agonistes B<sub>2</sub> en agonistes B<sub>1</sub>, inhibée entre autres par le MGTA). En mesurant les niveaux sériques d'agonistes B<sub>1</sub> suite à l'administration de l'antihypertenseur seul ou combiné au MGTA, il serait possible de prouver directement que ces antihypertenseurs augmentent les concentrations d'agonistes B<sub>1</sub>. De plus, si l'apoptose de CML en réponse à l'énalapril devait s'observer même en présence du MGTA, l'hypothèse de la stimulation directe du RB<sub>1</sub> par les iECA (Ignjatovic *et al.*, 2002) devrait alors être considérée. En ce qui concerne les BCC, de multiples études suggèrent qu'ils permettent une relâche de NO suite à une activation de eNOS en aval du RB<sub>2</sub> des kinines (Gunther *et al.*, 1992; Dhein *et al.*, 1995; Zhang & Hintze, 1998; Ding & Vaziri, 1998; Loke *et al.*, 1999; Zhang *et al.*, 1999a; Zhang *et al.*, 1999b; Kitakaze *et al.*, 2000; Zhang *et al.*, 2000; Loke *et al.*, 2001; Zhang *et al.*, 2002; Xu *et al.*, 2002; Lenasi *et al.*, 2003; Asano *et al.*, 2003; Berkels *et al.*, 2004; Asanuma *et al.*, 2005). Toutefois, aucune donnée n'a encore été rapportée concernant le rôle possible du RB<sub>1</sub> à cet égard. La relâche vasculaire de NO a pu être observée en réponse à l'énantiomère R<sup>+</sup> de l'amlodipine qui est dénué d'action sur les canaux calciques (Zhang *et al.*, 2002) ainsi qu'à des doses sub-antihypertensives d'un BCC (Crespi *et al.*, 2002). Or, nous avons rapporté que, seule, la correction de la dysfonction endothéliale (avec le BH<sub>4</sub> et la L-arginine) demeure insuffisante pour initier la réponse apoptotique (Der Sarkissian *et al.*, 2004). Un effet supplémentaire de l'amlodipine afin d'induire l'apoptose pourrait donc être relié soit au fait

que l'apoptose relayée par les BCC dépende d'une synthèse d'ARN et de protéines *de novo* (Kondo *et al.*, 1995) (RB<sub>1</sub> des kinines?), soit à la proposition plus intrigante que l'amlodipine puisse inhiber l'activité de l'ECA au même titre que l'énalapril lorsque ajoutée *ex vivo* à forte dose à du plasma humain (Xu *et al.*, 2002). En fait, nous avons testé l'effet inhibiteur putatif de l'amlodipine sur l'activité de l'ECA chez le SHR. Nos résultats préliminaires ne nous permettent pas de conclure à l'inhibition de l'ECA par l'amlodipine à ce stade (inhibition de l'ECA plasmatique du SHR par l'amlodipine *in vivo* et *ex vivo* n'ayant pu être reproduite par la suite, données non montrées). Par ailleurs, nous ne pouvons exclure pour l'instant l'hypothèse que l'amlodipine puisse, d'une façon similaire à ce qui a été soulevé concernant les antagonistes AT<sub>1</sub>, activer les kininogénases par un mécanisme dépendant (Zhang *et al.*, 2001) ou non des récepteurs AT<sub>2</sub>.

Troisièmement, les mécanismes moléculaires reliant la stimulation du RB<sub>1</sub> des kinines à l'activation de la machinerie apoptotique demeurent spéculatifs, comme relevé à la section 3.2.5. Ceux-ci devront être explorés plus en profondeur. Un mécanisme candidat est la voie du céramide, un médiateur pro-apoptotique (Woodcock, 2006) qui peut être synthétisé *de novo* par la céramide synthase ou relâché à partir de sphingomyéline par la sphingomyélinase. La stimulation du RB<sub>1</sub> a récemment été reliée à l'augmentation de la production du céramide via la voie de la sphingomyélinase (Kleine *et al.*, 2002). De plus, nous avons présenté à la section 3.5 des données montrant que l'administration d'un inhibiteur de la céramide synthase *in vivo* prévient la fragmentation de l'ADN en réponse à l'énalapril. Des études supplémentaires réalisées avec d'autres inhibiteurs des deux voies possibles de formation du céramide s'avèrent cependant essentielles afin d'éclaircir ces données. En effet, la conclusion quant à la voie de production du céramide dans l'étude reliant le RB<sub>1</sub> à ce sphingolipide ne tient qu'à une réduction du niveau de sphingomyéline suite à l'ajout de BK (Kleine *et al.*, 2002), alors que notre étude a été réalisée avec la fumonisine B<sub>1</sub>, un inhibiteur de la céramide synthase dont la spécificité est loin de faire l'unanimité dans la communauté scientifique. Par ailleurs, *in vitro*, l'apoptose de cellules neuronales induite par le récepteur AT<sub>2</sub> (apoptose reliée au RB<sub>1</sub> dans notre modèle sur les CML) requiert la génération *de novo* de céramide (Lehtonen *et al.*, 1999; Gallinat *et al.*, 1999). Des effets *in vivo* du céramide ont été décrits récemment : apoptose de cellules alvéolaires conduisant à l'emphysème (Petrache *et al.*, 2005) et réduction de l'hyperplasie

néo-intimale suite à une angioplastie avec un ballonnet (Charles *et al.*, 2000). Les autres événements moléculaires associés aux kinines pouvant expliquer l'effet pro-apoptotique observé incluent la forte production de NO et l'atténuation de la phosphorylation de Akt (Li *et al.*, 2007), ayant également été rapportés en aval de AT<sub>2</sub> (Cui *et al.*, 2002; Hiyoshi *et al.*, 2005; Liu *et al.*, 2006). Par ailleurs, l'apoptose de CML déclenchée par le NO pourrait impliquer la voie de Fas (Fukuo *et al.*, 1996), par un mécanisme dépendant (Pollman *et al.*, 1996) ou non (Fukuo *et al.*, 1996; Nishio *et al.*, 1996; Wang *et al.*, 1999a) du GMPc. Ces différents mécanismes pourraient être reliés dans une hypothétique cascade apoptotique amorcée par le RB<sub>1</sub> puisque la participation du céramide à l'apoptose de CML initiée par le NO a été montrée récemment (Pilane & LaBelle, 2004) et que le céramide peut activer des phosphatases, notamment PP2A (Dobrowsky *et al.*, 1993; Ruvoilo, 2003) qui module négativement la protéine anti-apoptotique Akt. Cet effet du céramide sur Akt via PP2A (Schubert *et al.*, 2000; Salinas *et al.*, 2000) pourrait, suite à l'activation de la voie de Fas et comme mentionné précédemment, permettre l'activation de caspase-8 suite à une réduction de son inhibition par c-FLIP.

#### **4.1.3 Terminaison de l'apoptose aortique**

La terminaison de la fenêtre apoptotique pourrait s'expliquer par un ou plusieurs des changements observés suivant le pic de fragmentation de l'ADN. Tout d'abord, une atténuation de signaux pro-apoptotiques, telle que la réduction de l'activation de JNK, pourrait mettre un terme à l'élimination de CML aortiques. À l'inverse, la relâche de facteurs de survie et/ou anti-apoptotiques pourrait participer à la terminaison du processus apoptotique. Ainsi, la fermeture de la fenêtre apoptotique pourrait dépendre de l'acquisition d'une résistance à l'apoptose dans les cellules survivantes qui pourrait s'effectuer suite à la sécrétion d'un facteur de survie par les cellules apoptotiques. Dans cette optique, la protéolyse de protéoglycans péricellulaires suite à l'activation des caspases pourrait générer des fragments déclenchant une signalisation anti-apoptotique initiée par des intégrines situées à la surface des cellules environnantes, comme récemment observé avec le domaine V du perlécan libéré par des cellules endothéliales en apoptose et induisant, dans un système de co-culture, une résistance à l'apoptose dans les fibroblastes et/ou les CML (Raymond *et al.*, 2004; Laplante *et al.*, 2006). Par ailleurs, le retour de la phosphorylation

de Akt à son niveau basal suite à une inhibition transitoire coïncide avec la fin de l'activation des caspases. Il serait intéressant d'administrer un inhibiteur de la voie Akt conjointement avec un antihypertenseur (iECA, antagoniste AT<sub>1</sub> ou BCC) et de déterminer si la réponse apoptotique s'étale sur un plus long laps de temps. Une réponse apoptotique prolongée par un inhibiteur de la voie de Akt signifierait alors que cette avenue participe au processus de terminaison de l'apoptose. En revanche, une réponse apoptotique non prolongée soulèverait deux possibilités : 1) Akt ne détermine pas la fin de l'apoptose, ou 2) toutes les cellules susceptibles d'entrer en apoptose ont été éliminées. Cette hypothèse permet d'introduire le concept d'une sous-population particulière de CML qui serait ciblée par les antihypertenseurs renversant l'hypertrophie aortique, comme il sera discuté plus en détail à la section suivante.

#### 4.1.4 Population cellulaire aortique ciblée

Les considérations décrites ci-dessus (pourcentage similaire de cellules éliminées avec différentes classes de médicaments, mécanismes dépendant du RB<sub>1</sub>, courte fenêtre apoptotique, etc.) suggèrent la présence d'une sous-population de cellules susceptibles à l'apoptose dans l'aorte du SHR. La possibilité que les mêmes cellules puissent être éliminées par les différentes classes d'antihypertenseurs (iECA, antagoniste AT<sub>1</sub> et BCC) pourrait être testée chez le SHR en administrant tout d'abord suffisamment longtemps un agent de l'une des trois classes considérées afin d'obtenir une apoptose complète avant de changer la médication pour une autre classe et enfin terminer avec un agent de la troisième classe. L'absence d'apoptose massive lors des 2<sup>e</sup> et 3<sup>e</sup> traitements serait en accord avec l'hypothèse émise. Une telle absence d'apoptose massive a en effet été remarquée lors d'une deuxième administration de nifédipine chez le SHR suite à un premier traitement à la nifédipine ayant induit l'apoptose et suivi d'une période sans médicament (deBlois *et al.*, 2005). Cependant, la nature d'une telle sous-population demeure à présent inconnue. Bien qu'une population de cellules polyploïdes se trouve dans l'aorte du SHR et qu'elle disparaisse suite au traitement avec des inhibiteurs du SRA (Black *et al.*, 1989; Devlin *et al.*, 1995a; Devlin *et al.*, 1995b), elle ne représente un pourcentage important de cellules aortiques (>20%) qu'à un âge bien plus avancé que celui auquel les SHR ont été étudiés dans cette thèse (Owens & Reidy, 1985). Bref, la disparition possible de ces cellules avec

les antihypertenseurs administrés n'expliqueraient qu'une maigre portion de toutes les cellules éliminées et des hypothèses alternatives doivent être considérées. Étant donné que la plasticité remarquable des CML leur permet de changer rapidement de phénotype en réponse à divers stimuli et les rend susceptibles aux modifications environnementales contribuant au développement entre autres de l'athérosclérose, de la resténose post-angioplastie et de l'hypertension artérielle (Owens *et al.*, 2004), il est envisageable qu'une expansion des cellules susceptibles à l'apoptose survienne lors d'insultes répétées au vaisseau (pression intravasculaire accrue, hausse d'Ang II produisant de nombreux épisodes de croissance cellulaire, etc.). Les CML présentent une hétérogénéité phénotypique qui se traduit *in vivo* par un large spectre dont les extrémités sont définies par les phénotypes synthétique et contractile (Owens *et al.*, 2004). Ces sous-populations isolées à partir d'un même tissu (Li *et al.*, 2001) possèdent différentes sensibilités à l'apoptose, notamment celle initiée par Fas (Chan *et al.*, 2000), l'Ang II (Bascands *et al.*, 2001), le cisplatine (Orlandi *et al.*, 2001) et l'acide rétinoïque (Orlandi *et al.*, 2001). Cette sensibilité semble être déterminée par le niveau d'expression de protéines apoptotiques en aval des récepteurs de mort (ex : FADD, caspase-3 et FLIP) (Chan *et al.*, 2000), mais semble également être fonction de l'état prolifératif ou quiescent de la cellule (Bascands *et al.*, 2001) puisque des études réalisées sur des CML transfectées avec le facteur de transcription *c-myc* ont montré que la prolifération forcée augmente le risque de ces cellules d'entrer en apoptose (Bennett *et al.*, 1994). Cette caractéristique des cellules prolifératives, outre son implication possible dans la détermination de la population ciblée par l'apoptose, pourrait, en plus des mécanismes énoncés plus haut, contribuer à la fermeture de la fenêtre apoptotique puisque les antihypertenseurs étudiés atténuent la prolifération cellulaire dans l'aorte du SHR. L'implication des fibroblastes adventitiels dans la réponse apoptotique médiale demeure une possibilité, surtout depuis la reconnaissance de leur participation à divers processus incluant la formation de la néo-intima (Sartore *et al.*, 2001). Des fibroblastes adventitiels «*activés*» pourraient ainsi participer à la modification phénotypique de CML médiales et à moduler leur sensibilité à l'apoptose. La signature (identification) d'un jeu commun de gènes prédisposant à l'apoptose et enrichis dans les organes touchés pourrait être déterminée à l'aide d'études de profilage génique réalisées sur l'aorte de SHR témoins et après l'élimination de ces cellules par les antihypertenseurs. Autrement, l'apoptose observée dans l'aorte pourrait représenter un événement stochastique

et les cellules survivantes seraient alors celles qui auraient acquis une résistance à l'apoptose.

#### **4.1.5 Rôle de l'apoptose dans la régression de l'hypertrophie vasculaire**

La possibilité de prévenir le remodelage cardiovasculaire avec des bloqueurs du SRA et des BCC est connue depuis fort longtemps. Plus récemment, il a été démontré que le renversement de ce remodelage une fois qu'il est établi est également possible avec certains antihypertenseurs et même désirable, voire recherché en raison de la diminution de facteurs de risque associés à l'hypertrophie cardiovasculaire. Or, les mécanismes mis en jeu lors de l'initiation de cette régression demeurent débattus et les résultats de cette thèse apportent de précieux éclaircissements sur le sujet. Notre groupe a préalablement rapporté que les agents antihypertenseurs capables de renverser l'hypertrophie cardiovasculaire chez le SHR induisent également une délétion de CML aortiques et de fibroblastes cardiaques associée à une activation transitoire de la machinerie apoptotique. Cette élimination de l'hyperplasie cardiovasculaire pourrait expliquer la différence d'efficacité rapportée dans certaines études cliniques entre diverses classes d'antihypertenseurs. Une discussion concernant nos données cardiaques sera présentée à la section suivante (4.1.6).

Nos résultats présents soutiennent que peu importe la classe d'antihypertenseurs renversant l'hypertrophie aortique, environ la moitié de l'effet sur la masse du vaisseau peut être attribuée à la réponse apoptotique massive. Bien que répétés avec trois classes de médicaments et provenant d'études produites sur un nombre suffisant d'animaux et présentant une faible erreur standard, ces résultats détonnent par rapport aux études précédentes du laboratoire indiquant que l'apoptose est responsable de la totalité de la régression de l'hypertrophie aortique obtenue avec les antagonistes AT<sub>1</sub> (Tea *et al.*, 2000; Marchand *et al.*, 2003). Cependant, ces études ont été arrêtées plus rapidement que celles présentées ici (6 et 14 jours vs 21 et 28 jours), ce qui pourrait avoir empêché la mise en place de l'effet d'autres composantes sur le contrôle de masse aortique, telle que la réduction de la tension artérielle. L'élimination de près de 30% des cellules composant la média de l'aorte chez le SHR soulève des interrogations quant aux conséquences de cette apoptose massive, particulièrement en raison du fait que les anévrismes artériels se

caractérisent par une perte marquée de CML [réduction de plus de 70% de la densité cellulaire (Lopez-Candales *et al.*, 1997)] et qu'une telle apoptose peut provoquer une réponse inflammatoire (Schaub *et al.*, 2000; Bowen-Pope & Schaub, 2001) et/ou pro-coagulante (Littlewood & Bennett, 2003). Les conséquences d'une apoptose massive sur un vaisseau normal (sans plaques d'athérosclérose) ont récemment été éclaircies par les études du groupe de Bennett (Clarke *et al.*, 2006). Ils ont générés des souris transgéniques adultes exprimant le récepteur humain de la toxine de la diphtérie uniquement dans les CML des moyens et gros vaisseaux : l'administration de la toxine de la diphtérie à ces souris pendant 28 jours réduit, par apoptose, la densité de CML de 50 à 70% sans infiltration de cellules inflammatoires. De plus, les propriétés contractiles des vaisseaux suite à la perte de cellules n'ont pas été altérées (tension développée en réponse à divers agonistes), quoique lorsque la tension est calculée en fonction d'un nombre fixe de cellules, la hausse obtenue suite à l'apoptose massive suggère que les cellules survivantes s'adaptent et développent une plus grande réponse. Donc, la réponse apoptotique que nous observons pourrait bien se produire sans réponse inflammatoire ni réduction néfaste des propriétés contractiles : cette apoptose serait alors en tout point « thérapeutique ». Les auteurs concluent par contre que l'apoptose n'initie pas par elle-même le remodelage vasculaire (Clarke *et al.*, 2006) : cette conclusion doit toutefois être remise en question étant donné qu'aucune mesure d'aire de section ou de masse du vaisseau n'est présentée, les auteurs ne se basant que sur le fait que le ratio du nombre de cellules sur la circonférence de la lumière vasculaire demeure inchangé entre les souris ayant reçu la toxine pendant 28 jours et celles dont l'administration a été stoppée pendant 14 jours suite au protocole de 28 jours.

#### 4.1.5.1 Autres mécanismes

Étant donné que la moitié de la régression de l'hypertrophie aortique n'a pu être prévenue par un blocage complet de l'apoptose initiée par les antihypertenseurs en présence d'un antagoniste B<sub>1</sub>, il est clair que d'autres mécanismes participent à la régression de ce remodelage. Simplement, outre la réduction du nombre de CML dans la média de l'aorte du SHR, une réduction de la taille des CML médiales ainsi qu'une diminution de l'espace occupé par la matrice extracellulaire pourraient permettre une réduction de l'hypertrophie aortique. Des facteurs mécaniques, telle que la réduction des diverses forces (tension

pariétale, tension longitudinale, etc.) appliquées à la structure vasculaire, pourraient expliquer ces effets indépendants de l'apoptose sur le remodelage vasculaire.

En ce qui concerne l'effet de la pression sur le remodelage vasculaire, il est intéressant de noter que les agents antihypertenseurs utilisés abaissent la pression artérielle très rapidement et qu'une réduction, quoique non significative, de l'aire de section aortique s'observe invariablement bien avant la phase transitoire d'apoptose. Il n'y a donc qu'un pas à franchir avant d'émettre l'hypothèse que cette baisse rapide de l'hypertrophie du vaisseau, contribuant à l'effet anti-hypertrophique cumulatif observé après trois ou quatre semaines de traitement, soit causée par la chute de pression intra-vasculaire. Le fait que l'administration d'une faible dose d'un antagoniste  $AT_1$  (prévenant l'augmentation de la pression artérielle sans toutefois la réduire) ne produise aucune réduction ou tendance vers une réduction de la masse aortique chez le SHR supporte cette idée. D'une façon similaire, si nous démontrons que l'effet pro-apoptotique de l'amlodipine s'obtient également avec son énantiomère R+ dénué d'effet sur la pression artérielle, nous nous attendons à perdre 50% de l'effet anti-hypertrophique de l'amlodipine avec cet énantiomère, ce qui correspondrait à la portion dépendante de la chute de pression et qui ne peut être prévenue par la co-administration d'un antagoniste  $B_1$ . Les résultats concernant le rôle des kinines dans le contrôle de la tension artérielle soulèvent des interrogations justifiées. L'ajout d'un antagoniste  $B_1$  lors du traitement à l'énalapril n'a pas atténué l'effet antihypertenseur chronique de cet iECA chez le SHR, ce qui concorde avec notre compréhension actuelle des kinines. En effet, celles-ci participent plutôt à la chute de pression aiguë obtenue avec un iECA, soit dans les premières heures suite à l'administration de l'énalapril, et particulièrement via le  $RB_2$  qui se désensibilise rapidement. De plus, les kinines semblent plutôt impliquées dans le contrôle de la tension artérielle par les iECA dans les modèles rénovasculaires d'hypertension que dans les modèles génétiques (Bao *et al.*, 1992; Zhu *et al.*, 1995). Cependant, l'antagoniste  $B_1$  R-954 a complètement prévenu la baisse de pression obtenue avec l'antagoniste  $AT_1$  valsartan. Cet effet est surprenant par la totalité de l'effet antihypertenseur dépendant du  $RB_1$  et devra être confirmé par une lecture de la pression par télémetrie qui s'approche plus des conditions physiologiques (animaux non stressés par la manipulation, pas d'anesthésie influençant la réponse, etc.). Une possibilité découle toutefois de l'explication suivante. En présence du valsartan, les niveaux d'Ang II grimpent

(la boucle de rétro-inhibition en aval du récepteur  $AT_1$  n'étant plus activée), ce qui surstimule le récepteur  $AT_2$  et permet l'activation de kininogénases. Étant donné que les récepteurs  $AT_2$  ne se désensibilisent pas, une forte production de kinines pourrait participer à la baisse de pression via le  $RB_1$ , qui ne se désensibilise pas lui non plus. Par ailleurs, il est connu que la réduction du débit sanguin (Cho *et al.*, 1997) ou de la tension longitudinale (Jackson *et al.*, 2002) puisse induire l'apoptose vasculaire, et que celle-ci se produirait alors aléatoirement dans les CML des vaisseaux. Toutefois, les évidences actuelles dans notre modèle vont plutôt à l'encontre d'un rôle majeur de la baisse de pression artérielle dans la réponse apoptotique observée avec les antihypertenseurs. Brièvement, même s'il produit une réduction de pression équivalente aux autres antihypertenseurs étudiés chez le SHR, l'hydralazine, un vasodilatateur, ne parvient pas à initier une réponse apoptotique (deBlois *et al.*, 1997). De plus, lors d'études précédentes avec les antagonistes  $AT_1$  chez le SHR, la co-administration soit d'un antagoniste  $AT_2$  (Tea *et al.*, 2000), soit d'un inhibiteur de caspases (Marchand *et al.*, 2003), n'a nullement atténué l'effet antihypertenseur bien que la réponse apoptotique ait pu être prévenue complètement. De la même façon, les résultats de la présente thèse montrent que l'apoptose de CML en réponse à l'énalapril est prévenue entièrement par un antagoniste  $B_1$  sans que ce dernier affecte la pression artérielle. Bref, ces données expérimentales suggèrent fortement que l'apoptose lors de la phase précoce de la régression de l'hypertrophie cardiovasculaire peut être dissociée de la baisse de pression chez le SHR.

L'atténuation de la prolifération cellulaire dans l'aorte, décrite dans cette thèse en réponse à l'amlodipine et à l'énalapril et préalablement démontrée avec les antagonistes  $AT_1$  (deBlois *et al.*, 1997), peut aussi participer à la normalisation de l'hypertrophie vasculaire puisqu'elle contribue à rééquilibrer le ratio entre la prolifération et la mort cellulaire qui penche en faveur de la prolifération chez le SHR. Précédemment, notre groupe a rapporté que cette inhibition de la synthèse d'ADN peut être dissociée de la réponse apoptotique (deBlois *et al.*, 1997), mais il demeure possible que les cellules éliminées par apoptose soient justement celles qui présentaient une prolifération accélérée. Nos évidences actuelles, quoique indirectes, suggèrent que le  $RB_1$  des kinines, contrairement à son rôle dans l'apoptose de CML aortique chez le SHR, ne participe pas à l'inhibition de la prolifération observée lors du traitement à l'énalapril. La réduction de la

phosphorylation des MAPKs ainsi que la hausse de l'expression de p27<sup>Kip1</sup> obtenues avec l'énalapril n'ont pas été prévenues par l'ajout de l'antagoniste B<sub>1</sub> R-715.

#### 4.1.6 Apoptose cardiaque

Les résultats présentés dans cette thèse montrent que l'apoptose transitoire de fibroblastes cardiaques interstitiels déclenchée rapidement lors du traitement des SHR avec un BCC, l'amlodipine, correspond temporellement avec la régression de l'HVG, en accord avec ce qui avait été suggéré précédemment pour les iECA et les antagonistes AT<sub>1</sub> (Der Sarkissian *et al.*, 2003). Plus précisément, cette apoptose survient au moment où la réduction de l'HVG devient statistiquement significative et bien avant l'effet du traitement sur la taille des cardiomyocytes, suggérant que l'apoptose des fibroblastes cardiaques interstitiels en réponse à l'amlodipine contribue principalement à la phase précoce de la régression de l'HVG. Cette apoptose pourrait présenter une composante dépendante de la pression puisque nous observons un tel effet uniquement dans le ventricule gauche. Ainsi, un changement, comme par exemple l'expansion / apparition d'une sous-population cellulaire particulièrement sensible à l'apoptose, pourrait survenir en réponse à la surcharge pressive dans le ventricule gauche, et l'induction de l'apoptose sélectivement dans ces cellules permettrait la correction de cette altération. De plus, nous avons décelé une modulation spatiale de la réponse à l'amlodipine en ce sens que la région présentant originalement une perte de fibroblastes (sous-épicode) constitue la région où la taille des cardiomyocytes a été réduite en premier, et que parallèlement le sous-endocarde, ayant été le dernier site d'élimination de fibroblastes par apoptose, est celui qui a mis le plus de temps à produire une correction de la taille des cardiomyocytes. Cela nous suggère que l'apoptose des fibroblastes interstitiels serait à l'origine d'une réduction d'un signal de croissance produit par les fibroblastes (en raison de leur nombre abaissé) et destiné aux cardiomyocytes, par exemple le bFGF (Pellieux *et al.*, 2001; Manabe *et al.*, 2002). Cependant, ces interprétations ne se basent que sur des corrélations spatio-temporelles, et il est évident que ces points devront être testés directement d'une autre façon, soit par exemple en déterminant si le fait d'inhiber les caspases lors de la réponse cardiaque à l'amlodipine prévient à la fois la phase précoce de régression de l'HVG et la modulation à plus long terme de la masse des cardiomyocytes.

Cependant, les mécanismes moléculaires impliqués dans cette réponse apoptotique nous échappent encore. Contrairement aux mécanismes initiés dans l'aorte, les antagonistes  $AT_1$  n'induisent pas l'apoptose des fibroblastes cardiaques via le récepteur  $AT_2$  (Der Sarkissian, S *et al.*, données non publiées), et les effets cardiaques pro-apoptotiques des iECA, des antagonistes  $AT_1$  et des BCC n'impliquent pas le système des kinines. Notre hypothèse actuelle reliant simplement ces trois classes d'antihypertenseurs s'appuie donc sur une atténuation de signaux de survie, dépendants du calcium et/ou relayés par le récepteur  $AT_1$  de l'Ang II. Ces signaux sont multiples et incluent entre autres l'activité des MAPK ERK1/2 (Tran *et al.*, 2001b) et celle de la voie PI3K / Akt (Tian *et al.*, 2003). Une hypothèse générale envisage que la survie des fibroblastes cardiaques interstitiels soit contrôlée par un signal provenant des cardiomyocytes et permettrait de réconcilier le fait que l'amlodipine, bloquant les canaux calciques dépendant du voltage, avec une sélectivité pour les tissus vasculaires, induise à forte dose l'apoptose de cellules non excitables, les fibroblastes. En atténuant un tel signal (possibilités: ostéopontine, ET-1, TGF- $\beta$ , bFGF, etc.), les antihypertenseurs pourraient donc rendre permissive l'apoptose dans les fibroblastes.

En revanche, nous ne pouvons écarter la possibilité que l'amlodipine ait agité directement sur certains fibroblastes, et l'argumentation suivante soutient cette avenue. Les fibroblastes constituent normalement une population cellulaire non excitable n'exprimant donc pas les canaux  $Ca_v1.2$ , bien que certaines cellules non excitables, comme les ostéoblastes (Meszaros *et al.*, 1996; Nishiya & Sugimoto, 2001) et les cellules  $\beta$  du pancréas (Namkung *et al.*, 2001), expriment ces canaux fonctionnels. L'hétérogénéité de la population de fibroblastes ( $Thy-1^+$ ,  $Thy-1^-$ , myofibroblastes, etc.) permet de spéculer que certains sous-types puissent être ciblés par l'amlodipine. Par exemple, la récente identification de canaux  $Ca_v1.2$  sur les cellules hépatiques stellaires (similaires aux myofibroblastes) (Bataller *et al.*, 2001; Sancho-Bru *et al.*, 2005) suggère que l'influx calcique dans les myofibroblastes peut être inhibé par un BCC et que ces cellules sont donc particulièrement sensibles à l'apoptose initiée par l'amlodipine. Cette hypothèse pourrait aisément être vérifiée tout d'abord en isolant des fibroblastes cardiaques pour les mettre en culture afin de les laisser se différencier en myofibroblastes (phénomène accéléré en culture par l'ajout de TGF- $\beta$ ) et ensuite en ajoutant l'amlodipine au milieu de culture de façon à

déterminer si une réponse apoptotique s'observe (activation de caspases, fragmentation de l'ADN, etc). De plus, la co-localisation sur des coupes histologiques du marqueur classique des myofibroblastes, l' $\alpha$ -actine de muscle lisse, et de marqueurs de l'apoptose, tel que l'ADN fragmenté, constitue une approche pouvant identifier des myofibroblastes apoptotiques *in vivo*. Toutefois, basé sur l'expression de l' $\alpha$ -actine de muscle lisse dans des cellules cardiaques non vasculaires, nous n'avons décelé qu'une infime population de myofibroblastes dans le ventricule gauche des SHR témoins âgés de 11 semaines (Duguay, D *et al.*, données non publiées). Il appert par contre que le myofibroblaste représente l'extrémité d'un continuum de phénotypes de fibroblastes dits «*activés*». L'amlodipine pourrait donc cibler dans notre modèle des cellules identifiées par certains auteurs comme des «*proto-myofibroblastes*» ou encore des fibroblastes «*activés*», exprimant la chaîne lourde embryonnaire de myosine non musculaire (SMemb), apparaissant entre autres suite à l'application d'une surcharge pressive (Shiojima *et al.*, 1999; Rabkin *et al.*, 2001). Par ailleurs, des actions de l'amlodipine sur d'autres types cellulaires n'exprimant pas les canaux  $Ca_v1.2$ , telle que l'inhibition de PKC dans les cellules endothéliales et les monocytes (Hempel *et al.*, 1999; Yu *et al.*, 2003), pourraient être à la base de l'effet observé à forte dose sur les fibroblastes. À cet égard, Yu *et al.* (2003) ont montré que l'amlodipine (quoique à très forte dose, 10  $\mu$ M) réduit la majeure partie de la hausse de calcium intracellulaire en réponse au PMA (phorbol 12-myristate 13-acétate) dans la lignée monocyttaire THP-1 dépourvue de canaux  $Ca_v1.2$ . Ces auteurs ont attribué l'effet de l'amlodipine à une inhibition d'un SOC possédant une forte homologie avec les canaux calciques voltage-dépendant et qui pourrait également être sensible aux dihydropyridines (Willmott *et al.*, 1996). La déplétion du réticulum sarcoplasmique en calcium relayée par l' $IP_3$  en réponse à des agents mitogéniques ou à des facteurs de croissance résulte en l'activation subséquente de canaux SOC déclenchant l'entrée de calcium dans la cellule et dont l'identité n'est pas encore clairement démontrée, mais qui pourraient correspondre à certains canaux cationiques TRP (Parekh & Putney, Jr., 2005), dont TRPC7. Il a été proposé que l'entrée de calcium par ces canaux SOC soit impliquée dans la hausse de calcium cytosolique et nucléaire requis pour le contrôle de la contraction, de la prolifération cellulaire et de l'apoptose (Parekh & Putney, Jr., 2005).

Par ailleurs, il a été rapporté qu'une apoptose massive peut, malgré le caractère normalement «propre» de cette forme de mort cellulaire, déclencher une réponse inflammatoire (Schaub *et al.*, 2000; Bowen-Pope & Schaub, 2001). Dans les présentes études, nous avons remarqué une infiltration mineure de monocytes/macrophages dans le ventricule gauche qui fait suite temporellement au déclenchement de la machinerie apoptotique. Cependant, cette infiltration a été complètement résorbée à la fin de la période expérimentale et n'a nullement été associée à un œdème cardiaque puisque le pourcentage d'eau dans le ventricule gauche est demeuré le même avant et après le traitement de 28 jours à l'amlodipine (Duguay, D *et al.*, données non publiées). Nous ne pouvons par contre ignorer la possibilité qu'un œdème aigu puisse être apparu et corrigé lors du traitement, bien que ceci ne semble pas affecter la fonction ventriculaire (Fischer *et al.*, 2006), ou encore qu'un programme d'expression de gènes pro-inflammatoires puisse avoir été activé lors de l'apoptose massive (Schaub *et al.*, 2000) et que cet état persiste et soit néfaste lors de la prolongation du traitement à l'amlodipine.

## **4.2 Limitations du modèle utilisé et des études présentées**

Le modèle utilisé dans cette thèse, le SHR, malgré les avantages qu'il présente (développement à long terme de l'hypertension contrairement aux modèles aigus, remodelage structural très bien documenté, réponse bien caractérisée aux antihypertenseurs, rapidité de cette réponse, petite taille, etc.), possède des limitations dont nous devons être conscients. Ainsi, le SHR n'est qu'un modèle expérimental d'hypertension essentielle et les conclusions tirées de nos études ne doivent être extrapolées à l'hypertension essentielle humaine qu'avec une extrême précaution et préférentiellement suite à des études supplémentaires effectuées chez l'humain. Il est présentement impossible d'évaluer la correspondance entre nos résultats obtenus dans un modèle animal et les mécanismes orchestrés lors de la régression du remodelage cardiovasculaire chez l'humain hypertendu. Bien que des études présentant des données d'échocardiographie ou obtenues sur des petites artères de résistance disséquées lors de biopsies glutéales indiquent que les antihypertenseurs qui induisent l'apoptose dans notre modèle produisent une meilleure correction de la structure cardiovasculaire chez l'humain, il n'existe aucune preuve directe de la participation de l'apoptose à ces processus chez l'humain. Il faut également garder à

l'esprit que les causes génétiques complexes de l'hypertension chez le SHR demeurent vaguement comprises et qu'un défaut génétique particulier pourrait faire en sorte que les effets décrits dans cette thèse ne seraient observés que dans une sous-population d'humains diagnostiqués avec une hypertension essentielle. Face à ces considérations, il devient très pertinent d'initier des études chez le SHR visant à identifier un marqueur sérique relâché lors de la réponse apoptotique, donc de façon transitoire, qui pourrait par exemple être FasL soluble. Un tel marqueur, par sa détection éventuelle chez l'humain lors d'une étude cinétique suite à l'initiation de l'administration d'un antihypertenseur et suite à sa validation par des études histologiques, permettrait de mettre en évidence une réponse apoptotique similaire à celle observée chez le SHR. Des techniques non invasives visant à identifier et localiser une réponse apoptotique chez l'humain existent, principalement sous la forme d'une injection intraveineuse de (99m)Technicium couplé à l'annexine V reconnaissant les groupements PS exposés sur les cellules apoptotiques (Flotats & Carrio, 2003). Bien que cette méthode ait été employée pour confirmer la perte de cardiomyocytes par apoptose suite à l'infarctus du myocarde, il est difficilement envisageable de réaliser des études similaires en réponse aux antihypertenseurs chez l'humain, tout particulièrement en raison des questionnements entourant le délai nécessaire avant l'initiation de l'apoptose et l'étalement de cette réponse sur une période d'une durée inconnue.

Les études réalisées chez le SHR permettent donc de définir les mécanismes généraux impliqués dans la phase précoce de régression de l'hypertrophie cardiovasculaire. En revanche, l'étude de la régulation fine des processus impliqués dans l'apoptose représente un défi pour au moins trois raisons interreliées, soit la rapidité du processus apoptotique, la variabilité des cinétiques apoptotiques entre les médicaments de différentes classes et la variabilité de la cinétique apoptotique en réponse au même antihypertenseur d'une étude à l'autre. Ces contraintes pourraient être levées par le développement d'un modèle *ex vivo* (études sur des explants d'aorte recréant l'environnement *in vivo* sans l'effet de la pression), mais non par l'utilisation de CML aortiques de SHR *in vitro* puisqu'une forte proportion de CML sont perdues par apoptose lors de la mise en culture des CML par digestion enzymatique du tissu (Duguay, D *et al.*, données non publiées). En effet, lorsque les CML de l'aorte de SHR sont mises en culture par un protocole standard, nous obtenons une population cellulaire relativement homogène quant à la morphologie et à la croissance,

tandis que l'ajout d'un inhibiteur de caspases (z-VAD-fmk, 40  $\mu\text{m}$ ) lors de la digestion réduit significativement l'apoptose et mène à l'apparition d'une population morphologiquement hétérogène et possédant une cinétique de croissance différente. Cela suggère qu'une population sensible à l'apoptose (la même qui est éliminée par les antihypertenseurs?) est perdue lors de la mise en culture sans inhibiteur de caspases.

Afin de confirmer encore plus solidement certains résultats présentés dans cette thèse (rôles de la voie extrinsèque de l'apoptose, des kinines et du  $\text{RB}_1$  des kinines), des études supplémentaires doivent être suggérées. Tout d'abord, maintenant que des inhibiteurs spécifiques des différentes caspases existent et peuvent être administrés *in vivo*, il sera possible d'inhiber caspase-8 et de déterminer si nous prévenons ainsi à la fois l'activation des caspases effectrices en aval de celle initiatrice de la voie extrinsèque et la portion de la régression de l'hypertrophie vasculaire dépendante de l'apoptose. Ensuite, un rôle direct du  $\text{RB}_1$  dans l'apoptose aortique en réponse aux BCC et antagonistes  $\text{AT}_1$  pourra être établi en sacrifiant des SHR au moment où l'apoptose est en cours de façon à déterminer si la co-administration d'un antagoniste  $\text{B}_1$ , en plus de prévenir la chute du nombre de cellules, empêche l'activation des caspases et la fragmentation de l'ADN. De plus, l'administration d'un agoniste du  $\text{RB}_1$  pourrait produire un effet comparable aux antihypertenseurs étudiés quant au remodelage vasculaire dépendant de l'apoptose (à moins que l'induction du  $\text{RB}_1$  ne soit vraiment un élément critique), alors qu'un inhibiteur de la kallikréine (kininogénase), comme l'aprotinine ou la RKBP (*rat kallikrein-binding protein*), préviendrait la réponse apoptotique à un antagoniste  $\text{AT}_1$  si celle-ci nécessite bel et bien une hausse de la production des kinines. Pour la réponse apoptotique et anti-hypertrophique rapide observée avec l'amlodipine, certaines pistes méritent une investigation plus poussée. Ainsi, il serait intéressant de vérifier si l'apoptose vasculaire et/ou cardiaque initiée par l'amlodipine est relayée par le blocage de canaux calciques ou par un des autres mécanismes associés à ce BCC (décrits à la section 1.3.3.1) : l'administration de l'énantiomère  $\text{R}^+$  de l'amlodipine, dénué d'action sur les canaux calciques, apporterait une clarification à ce niveau. Cette hypothèse est émise puisque les doses requises pour renverser l'HVG chez le SHR sont au moins dix fois plus grandes que celles permettant un blocage efficace des canaux  $\text{Ca}_v$ . La cinétique rapide et bien caractérisée dans le muscle lisse aortique en réponse à l'amlodipine fait en sorte que ce

modèle permettrait d'identifier les mécanismes participant à l'apoptose déclenchée par cet antihypertenseur (activité de PI3K, activité de PKC et sa translocation nucléaire, relâche de NO dépendante du  $RB_1$ , niveau d'expression de c-FLIP, etc.).

### 4.3 Implications cliniques

Les agents antihypertenseurs réduisant / renversant l'hypertrophie cardiovasculaire semblent pouvoir réduire des facteurs de risques cardiovasculaires au-delà de ce qui est prévu par l'obtention d'une baisse de tension artérielle, tel que suggéré par des études cliniques comme LIFE (Dahlof *et al.*, 2002) , ASCOT (Dahlof *et al.*, 2005) , MOSES (Schrader *et al.*, 2005) et SCOPE (Lithell *et al.*, 2003). Cependant, il demeure prématuré d'extrapoler les résultats présentés dans cette thèse à la situation chez l'humain, bien que des effets structuraux bénéfiques similaires à ceux identifiés ici chez le SHR aient été rapportés chez les patients traités avec des inhibiteurs du SRA et des BCC. De plus, l'importance physiologique de l'apoptose impliquée dans la phase précoce de la régression de l'hypertrophie cardiovasculaire en réponse à des antihypertenseurs demeure inconnue. Au niveau cardiaque, nous postulons que la modulation temporelle de l'apoptose pourrait permettre une protection à long terme des organes cibles. Ainsi, lors de l'initiation du traitement avec un antihypertenseur (iECA, antagoniste  $AT_1$  ou BCC), l'élimination par apoptose des fibroblastes excédentaires (par rapport à la densité cellulaire observée dans un cœur de rat normotendu) pourrait prévenir l'éventuelle augmentation de la fibrose cardiaque, tout simplement en raison de la réduction du nombre de cellules produisant du collagène. Étant donné que la fibrose cardiaque participe profondément à la transition de l'état compensé de l'HVG vers l'insuffisance cardiaque, une telle atténuation du dépôt de matrice extracellulaire suite à l'élimination de fibroblastes par apoptose pourrait protéger le cœur à long terme. À l'opposé, des études tendent à démontrer que ces mêmes antihypertenseurs modulent à la baisse l'apoptose cardiaque lors d'un traitement prolongé, mais cette fois dans le compartiment myocytaire (Fortuno *et al.*, 2003). Cela permettrait d'atténuer la perte de cardiomyocytes qui participe activement à la transition vers l'insuffisance cardiaque. Un tel effet anti-apoptotique au niveau des cardiomyocytes a été attribué à un iECA chez le SHR (Diez *et al.*, 1997) et à un antagoniste  $AT_1$  chez des patients hypertendus (Gonzalez *et al.*, 2002). En ce qui concerne les BCC, Gonzalez *et al.*

(2002) ont rapporté, en étudiant des biopsies de l'endomyocarde du septum droit, qu'un traitement de douze mois à l'amlodipine n'atténue pas le nombre de cardiomyocytes apoptotiques chez l'humain hypertendu. Cependant, des problèmes méthodologiques viennent remettre en question cette conclusion et d'autres études devraient confirmer ou contredire cette dernière. Ainsi, ces auteurs n'ont évalué que le nombre de noyaux TUNEL-positifs présents au moment de la biopsie; une évaluation du nombre total de cellules dans l'organe, beaucoup plus représentative de l'impact du traitement prolongé sur la structure cardiaque, n'a pas été réalisée. Par ailleurs, le nombre de cardiomyocytes apoptotiques lors des biopsies initiales différait grandement entre les groupes (presque deux fois plus élevé dans le groupe losartan vs amlodipine avant le début du traitement), suggérant que les patients n'étaient pas au même stade de la pathologie ou différaient en terme d'âge (donnée non incluse dans cette publication) (Gonzalez *et al.*, 2002). Les mécanismes impliqués dans la préservation des cardiomyocytes par certains antihypertenseurs demeurent mal caractérisés. Ils semblent impliquer une modulation de l'expression des protéines pro- et anti-apoptotiques Bax et Bcl-2 (Gonzalez *et al.*, 2002) et pourraient faire intervenir une augmentation de l'expression cardiaque de la protéine anti-apoptotique ARC qui semble requise pour la cardioprotection contre le stress biomécanique et ischémique et dont l'expression est réduite chez des patients en insuffisance cardiaque (Donath *et al.*, 2006; Zhang & Herman, 2006).

En corrigeant le remodelage vasculaire structural, les antihypertenseurs appartenant à la classe des iECA, des antagonistes AT<sub>1</sub> ou des BCC peuvent réduire la rigidité artérielle. Cette rigidité, évaluée par la vitesse de l'onde de pouls et constituant le principal déterminant de la pression pulsée, augmente de façon indépendante le risque de morbidité et de mortalité cardiovasculaire (Laurent *et al.*, 2001). Entre autres, lorsque la rigidité des vaisseaux de conductance s'élève fortement, leur compliance s'altère tout autant (ex : artériosclérose ou athérosclérose) et les ondes de flot pulsé peuvent alors se répercuter dans le ventricule gauche et ainsi déclencher son remodelage. Une réduction de la rigidité artérielle, se traduisant par une augmentation de la compliance au niveau des grosses artères de conductance, constitue maintenant un objectif de la thérapie antihypertensive et une bonne façon d'évaluer son efficacité. Étant donné que la phase transitoire d'apoptose de CML participe à la correction du remodelage vasculaire, il est fort probable qu'elle

contribue, avec d'autres facteurs comme la réduction du ratio entre le contenu artériel en collagène par rapport à la quantité d'élastine, à la réduction de cette rigidité. Il serait approprié d'évaluer l'impact de l'apoptose et du remodelage vasculaire sur la compliance des gros vaisseaux en évaluant la pression pulsée par la mesure de la vitesse de l'onde de pouls. Une autre possibilité concernant l'apoptose et le remodelage vasculaire est qu'en participant à la réduction de la rigidité artérielle, ces composantes pourraient affecter la masse du ventricule gauche dans notre modèle (Roman *et al.*, 2000). En effet, une baisse de rigidité artérielle peut réduire la charge cardiaque, selon les mêmes principes à l'origine de l'hypothèse biomécanique présentée plus haut concernant le développement de l'HVG. Puisque nous observons l'apoptose dans l'aorte avant celle dans le cœur, il nous est permis de penser qu'un lien causal unit ces deux réponses. Cependant, bien que l'hypothèse biomécanique (relation causale entre rigidité artérielle et remodelage cardiaque hypertensif) puisse participer à l'initiation de l'HVG, elle ne semble pas pouvoir expliquer la régression de l'HVG obtenue avec divers antihypertenseurs chez le SHR. En effet, selon nos résultats, lorsque l'apoptose de CML aortiques en réponse à l'énalapril, participant directement à la régression de l'hypertrophie aortique, est prévenue complètement par un antagoniste du  $RB_1$  des kinines, la régression de l'HVG n'est nullement affectée.

En somme, un bref traitement antihypertenseur, renversant l'hypertrophie cardiovasculaire en partie via l'apoptose de CML et de fibroblastes cardiaques, pourrait protéger à long terme les organes cibles de la pathologie hypertensive. L'impact d'un tel traitement pourrait être testé chez le rat par exemple lors d'une insulte sévère (inhibition du NO ou infusion d'Ang II) survenant suite à une brève administration d'un iECA, d'un antagoniste  $AT_1$  ou d'un BCC suivie d'une période sans traitement. Ces études, qui sont présentement en cours dans le laboratoire, permettront de mettre en valeur le rôle possible de l'apoptose (et du renversement du remodelage pathologique associé) dans les effets bénéfiques à long terme des antihypertenseurs. Dans le même ordre d'idée, Baumann *et al.*, (2007) ont récemment rapporté que chez le SHR, un bref traitement avec le losartan (de 4 à 8 semaines d'âge) offre une cardioprotection à long terme (72 semaines d'âge), tandis que Sevilla *et al.* (2004) ont remarqué que la cardioprotection obtenue par un traitement de six mois à l'amlodipine chez le SHR est conservée trois mois après l'arrêt de la thérapie. Cependant, ces auteurs n'ont pas évalué l'impact des traitements sur le nombre de cellules,

le contenu en ADN, etc., de sorte que la participation de l'apoptose à cet effet prolongé demeure une question en suspens qui mérite une considération approfondie.

Les inhibiteurs du SRA comme les antagonistes AT<sub>1</sub> et les iECA produisent une hausse des niveaux de rénine étant donné qu'ils réduisent l'efficacité de la boucle de rétro-inhibition en aval du récepteur AT<sub>1</sub>. Jusqu'à tout récemment, le point de vue prédominant était que les effets de cette hausse de rénine étaient contrés plus loin dans la cascade du SRA en présence d'un antagoniste AT<sub>1</sub> ou d'un iECA. Permettant une alternative aux inhibiteurs classiques du SRA, l'inhibiteur de rénine aliskiren bloque l'action catalytique de la rénine sur la conversion de l'angiotensinogène en Ang I. Par ailleurs, l'ajout d'une faible dose d'aliskiren potentialise l'effet antihypertenseur d'un antagoniste AT<sub>1</sub> ou d'un iECA chez le SHR (Wood *et al.*, 2005), ce qui suggère que la rénine possède d'autres propriétés, potentiellement via le récepteur de la rénine / prorénine récemment cloné (Nguyen *et al.*, 2002). Cependant, cette étude chez le SHR doit être interprétée avec précaution puisque l'aliskiren est un inhibiteur de la rénine humaine [IC<sub>50</sub> de 0,6 nmol/L chez l'humain vs 80 nmol/L chez le rat (Wood *et al.*, 2003)] et a donc dû être employé à de fortes doses (allant jusqu'à 100 mg/kg/jour). Une étude chez le rat double transgénique (rénine et angiotensinogène humains) confirme les effets antihypertenseurs et cardio et rénoprotecteurs de l'aliskiren (Pilz *et al.*, 2005). En ce qui concerne le récepteur de la rénine / prorénine, nous savons maintenant qu'il permet l'activation non protéolytique de la prorénine et qu'il initie ainsi une signalisation intra-cellulaire pro-fibrotique (Ichihara *et al.*, 2006). Cela pourrait contrer certains effets bénéfiques à long terme des inhibiteurs du SRA et expliquer pourquoi, malgré le fait que ces traitements préviennent / renversent l'hypertrophie cardiovasculaire, ils ne font que retarder la (ré)apparition des dommages aux organes cibles. Bien que l'aliskiren puisse bloquer plus efficacement le SRA (inhibition complète de la formation d'Ang II), il se pourrait que certaines actions bénéfiques des antagonistes AT<sub>1</sub> et des iECA ne soient pas imitées par cet inhibiteur de rénine, notamment en ce qui concerne le renversement du remodelage cardiovasculaire pathologique dépendant de l'apoptose relayée par les kinines. Ainsi, la combinaison d'un antagoniste AT<sub>1</sub> ou d'un iECA avec un éventuel antagoniste non compétitif du récepteur de la rénine / prorénine semble pour l'instant offrir une possibilité fort intéressante quant au traitement des maladies cardiovasculaires.

La réponse apoptotique dépendante du  $RB_1$  des kinines que nous avons décrite lors d'un traitement avec un iECA, un antagoniste  $AT_1$  ou un BCC pourrait être appliquée à d'autres situations pathologiques où se produit l'accumulation néfaste d'une population de CML ou de fibroblastes sensibles à l'apoptose. Ces situations incluent entre autres les cicatrices cutanées hypertrophiques, l'hypertension pulmonaire et de nombreuses formes de fibrose (post-opératoire, hépatique, cardiaque, etc.). D'ailleurs, notre groupe a rapporté que des inhibiteurs du SRA et des BCC renversent, via un processus apoptotique, la néo-intima établie suite à une lésion vasculaire (Lemay *et al.*, 2000; Lemay *et al.*, 2001). Il serait intéressant de déterminer si l'apoptose dans ce modèle de lésion vasculaire est également relayée par le  $RB_1$  étant donné qu'il a été rapporté que l'angioplastie avec un ballonnet augmente l'ARNm du  $RB_1$  (Agata *et al.*, 2000; Barker *et al.*, 2006) et que ce récepteur participe à la prévention de la formation de la néointima par la kallikréine (Agata *et al.*, 2000) ou par le valsartan (Barker *et al.*, 2006). À l'opposé, l'apoptose de CML dépendante du  $RB_1$  serait nuisible chez les patients dont les vaisseaux montrent des plaques d'athérosclérose (Geng & Libby, 1995; Clarke *et al.*, 2006).

À titre spéculatif, nos résultats soulèvent des interrogations quant à l'efficacité et à l'innocuité d'antagonistes  $B_1$  présentement en développement par plusieurs compagnies pharmaceutiques dans le but de traiter des complications associées au diabète. En effet, chez le rat diabétique de type II (modèle développé par une diète riche en glucose), le  $RB_1$  produit des effets délétères suite à son induction dans plusieurs tissus (neuronaux et vasculaires) (El Midaoui *et al.*, 2005; Campos *et al.*, 2005) : il participe aux atteintes neuropathiques (hyperalgésie et allodynie) et hémodynamiques (hypertension) (Gabra *et al.*, 2003; Couture & Girolami, 2004). Le  $RB_1$  semble donc jouer un rôle thérapeutique ou délétère dépendant du contexte. Cependant, la co-morbidité de plus en plus fréquente de l'hypertension artérielle et du diabète de type II, combinée au fait que les atteintes vasculaires sont fréquentes chez les diabétiques et que les trois classes d'antihypertenseurs mentionnés peuvent ralentir la progression de ces atteintes (athérosclérose et artériosclérose) dans le diabète, compliquent la situation. Ainsi, il est impératif que des études supplémentaires déterminent si l'administration d'un antagoniste  $B_1$  chez le sujet diabétique ou souffrant de douleurs chroniques empêche certains effets bénéfiques entre

autres des iECA de se produire. À l'opposé, il demeure possible que le  $RB_1$  participe directement aux atteintes vasculaires chez le sujet diabétique et qu'un antagoniste  $B_1$ , contrairement à ce que nous avons observé chez le rat hypertendu non diabétique, puisse permettre le renversement du remodelage pathologique.

## 4.4 Conclusion

La caractérisation des voies moléculaires de l'apoptose *in vivo* initiée par des antihypertenseurs de trois classes distinctes (iECA, antagoniste AT<sub>1</sub> et BCC), abaissant la tension artérielle par trois mécanismes différents, révèle, en ce qui concerne les CML aortiques, une convergence au niveau du RB<sub>1</sub> des kinines chez le SHR. De plus, cette apoptose vasculaire est à l'origine de la moitié de la régression de l'hypertrophie vasculaire orchestrée par ces médicaments. Dans le cœur, bien que la réponse apoptotique conduisant à l'élimination de fibroblastes interstitiels n'implique pas le système des kinines, cette apoptose est temporellement corrélée avec la phase précoce de la régression de l'HVG. Cette apoptose thérapeutique participe donc au renversement de l'hyperplasie cardiovasculaire pathologique. Un tel axe de recherche (élimination désirée de cellules en excès) est en fait maintenant grandement considéré dans le développement de thérapies novatrices visant à combattre entre autres l'hypertension pulmonaire, l'obésité, la fibrose (post-opératoire, hépatique, cardiaque, etc.) et les cicatrices cutanées hypertrophiques.

Advenant que ces réponses apoptotiques, observées rapidement suite à l'instauration du traitement antihypertenseur dans un modèle expérimental, se manifestent également chez l'humain hypertendu, elles pourraient contribuer aux effets bénéfiques à long terme de ces traitements. Ainsi, comparativement aux thérapies conventionnelles, par exemple les diurétiques, ne possédant pas d'effet anti-prolifératif ou pro-apoptotique, l'utilisation des BCC et des inhibiteurs du SRA pourrait optimiser le traitement de l'hypertension artérielle en effaçant plus efficacement les dommages structuraux rencontrés dans les organes cibles de la pathologie. En ce faisant, les réponses apoptotiques décrites dans cette thèse pourraient en partie contribuer à l'atténuation de facteurs de risque cardiovasculaire et ainsi jouer un rôle primordial dans les effets bénéfiques des antihypertenseurs offrant, selon de récentes études cliniques, un meilleur pronostic concernant la morbidité et la mortalité cardiovasculaires.

## Références

- ABD ALLA,S., LOTHER,H., ABD EL-TAWAB,A.M. & QUITTERER,U. (2001a). The angiotensin II AT2 receptor is an AT1 receptor antagonist. *J Biol. Chem.*, **276**, 39721-39726.
- ABD ALLA,S., LOTHER,H., EL,M.A. & QUITTERER,U. (2001b). Increased AT(1) receptor heterodimers in preeclampsia mediate enhanced angiotensin II responsiveness. *Nat. Med.*, **7**, 1003-1009.
- ADAMS,J.W., SAKATA,Y., DAVIS,M.G., SAH,V.P., WANG,Y., LIGGETT,S.B., CHIEN,K.R., BROWN,J.H. & DORN,G.W. (1998). Enhanced Galphaq signaling: a common pathway mediates cardiac hypertrophy and apoptotic heart failure. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **95**, 10140-10145.
- AGABITI-ROSEI,E. (1997). Decrease of left ventricular mass is a clinically valuable intermediate end-point of antihypertensive treatment. *Blood Press Suppl*, **2**, 13-15.
- AGATA,J., MIAO,R.Q., YAYAMA,K., CHAO,L. & CHAO,J. (2000). Bradykinin B(1) receptor mediates inhibition of neointima formation in rat artery after balloon angioplasty. *Hypertension*, **36**, 364-370.
- AGELL,N., BACHS,O., ROCAMORA,N. & VILLALONGA,P. (2002). Modulation of the Ras/Raf/MEK/ERK pathway by Ca(2+), and calmodulin. *Cell Signal.*, **14**, 649-654.
- AGUILA,M.B., PINHEIRO,A.R. & MANDARIM-DE-LACERDA,C.A. (2005). Spontaneously hypertensive rats left ventricular cardiomyocyte loss attenuation through different edible oils long-term intake. *Int. J Cardiol.*, **100**, 461-466.
- AIZAWA,T., ISHIZAKA,N., KUROKAWA,K., NAGAI,R., NAKAJIMA,H., TAGUCHI,J. & OHNO,M. (2001). Different effects of angiotensin II and catecholamine on renal cell apoptosis and proliferation in rats. *Kidney Int.*, **59**, 645-653.
- AKASU,M., URATA,H., KINOSHITA,A., SASAGURI,M., IDEISHI,M. & ARAKAWA,K. (1998). Differences in tissue angiotensin II-forming pathways by species and organs in vitro. *Hypertension*, **32**, 514-520.
- AKISHITA,M., IWAI,M., WU,L., ZHANG,L., OUCHI,Y., DZAU,V.J. & HORIUCHI,M. (2000). Inhibitory effect of angiotensin II type 2 receptor on coronary arterial remodeling after aortic banding in mice. *Circulation*, **102**, 1684-1689.
- AKISHITA,M., YAMADA,H., DZAU,V.J. & HORIUCHI,M. (1999). Increased vasoconstrictor response of the mouse lacking angiotensin II type 2 receptor. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **261**, 345-349.
- AL-FAKHRI,N., CHAVAKIS,T., SCHMIDT-WOLL,T., HUANG,B., CHERIAN,S.M., BOBRYSHV,Y.V., LORD,R.S., KATZ,N. & PREISSNER,K.T. (2003). Induction of apoptosis in vascular cells by plasminogen activator inhibitor-1 and high molecular weight kininogen correlates with their anti-adhesive properties. *Biol. Chem.*, **384**, 423-435.

ALLHAT OFFICERS AND COORDINATORS FOR THE ALLHAT COLLABORATIVE RESEARCH GROUP. (2002). Major outcomes in high-risk hypertensive patients randomized to angiotensin-converting enzyme inhibitor or calcium channel blocker vs diuretic: The Antihypertensive and Lipid-Lowering Treatment to Prevent Heart Attack Trial (ALLHAT). *JAMA*, **288**, 2981-2997.

ANDERSON,K.R., SUTTON,M.G. & LIE,J.T. (1979). Histopathological types of cardiac fibrosis in myocardial disease. *J Pathol*, **128**, 79-85.

ANVERSA,P. (2000). Myocyte death in the pathological heart. *Circ. Res.*, **86**, 121-124.

ANVERSA,P., OLIVETTI,G., LERI,A., LIU,Y. & KAJSTURA,J. (1997). Myocyte cell death and ventricular remodeling. *Curr. Opin. Nephrol. Hypertens.*, **6**, 169-176.

ANVERSA,P., RICCI,R. & OLIVETTI,G. (1986). Quantitative structural analysis of the myocardium during physiologic growth and induced cardiac hypertrophy: a review. *J Am Coll Cardiol*, **7**, 1140-1149.

ANVERSA,P., ZHANG,X., LI,P. & CAPASSO,J.M. (1992). Chronic coronary artery constriction leads to moderate myocyte loss and left ventricular dysfunction and failure in rats. *J. Clin. Invest*, **89**, 618-629.

ARAUJO,R.C., KETTRITZ,R., FICHTNER,I., PAIVA,A.C., PESQUERO,J.B. & BADER,M. (2001). Altered neutrophil homeostasis in kinin B1 receptor-deficient mice. *Biol. Chem.*, **382**, 91-95.

ARNAUDEAU,S., REZ-LEPRETRE,N. & MIRONNEAU,J. (1996). Activation of calcium sparks by angiotensin II in vascular myocytes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **222**, 809-815.

ASAKURA,M., KITAKAZE,M., TAKASHIMA,S., LIAO,Y., ISHIKURA,F., YOSHINAKA,T., OHMOTO,H., NODE,K., YOSHINO,K., ISHIGURO,H., ASANUMA,H., SANADA,S., MATSUMURA,Y., TAKEDA,H., BEPPU,S., TADA,M., HORI,M. & HIGASHIYAMA,S. (2002). Cardiac hypertrophy is inhibited by antagonism of ADAM12 processing of HB-EGF: metalloproteinase inhibitors as a new therapy. *Nat. Med.*, **8**, 35-40.

ASANO,Y., KIM,J., OGAI,A., TAKASHIMA,S., SHINTANI,Y., MINAMINO,T., KITAMURA,S., TOMOIKE,H., HORI,M. & KITAKAZE,M. (2003). A calcium channel blocker activates both ecto-5'(-)-nucleotidase and NO synthase in HUVEC. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **311**, 625-628.

ASANUMA,H., MINAMINO,T., SANADA,S., OGITA,H., KIM,J., FUJITA,M., HIRATA,A., TSUKAMOTO,O., OGAI,A., NODE,K., HORI,M., TOMOIKE,H. & KITAKAZE,M. (2005). A calcium channel blocker amlodipine increases coronary blood flow via both adenosine- and NO-dependent mechanisms in ischemic hearts. *J Mol. Cell Cardiol.*, **39**, 605-614.

ASMAR,R.G., BENETOS,A., CHAOUICHE-TEYARA,K., RAVEAU-LANDON,C.M. & SAFAR,M.E. (1993). Comparison of effects of felodipine versus hydrochlorothiazide on arterial diameter and pulse-wave velocity in essential hypertension. *Am. J Cardiol.*, **72**, 794-798.

ASTORRI,E., BOLOGNESI,R., COLLA,B., CHIZZOLA,A. & VISIOLI,O. (1977). Left ventricular hypertrophy: a cytometric study on 42 human hearts. *J Mol. Cell Cardiol.*, **9**, 763-775.

AZIZI,M., BOUTOUYRIE,P., BISSERY,A., AGHARAZII,M., VERBEKE,F., STERN,N., BURARIVIERE,A., LAURENT,S., HENC-GELAS,F. & JEUNEMAITRE,X. (2005). Arterial and renal consequences of partial genetic deficiency in tissue kallikrein activity in humans. *J Clin. Invest.*, **115**, 780-787.

AZIZI,M., ROUSSEAU,A., EZAN,E., GUYENE,T.T., MICHELET,S., GROGNET,J.M., LENFANT,M., CORVOL,P. & MENARD,J. (1996). Acute angiotensin-converting enzyme inhibition increases the plasma level of the natural stem cell regulator N-acetyl-seryl-aspartyl-lysyl-proline. *J Clin. Invest.*, **97**, 839-844.

AZUMA,J., SAWAMURA,A., HARADA,H., AWATA,N., KISHIMOTO,S. & SPERELAKIS,N. (1987). Mechanism of direct cardiostimulating actions of hydralazine. *Eur. J Pharmacol.*, **135**, 137-144.

BABIUK,C., MARCEAU,F., ST-PIERRE,S. & REGOLI,D. (1982). Kininases and vascular responses to kinins. *Eur. J Pharmacol.*, **78**, 167-174.

BADDELEY,A. (2001). Is stereology 'unbiased'? *Trends Neurosci.*, **24**, 375-376.

BALAKUMARAN,A., CAMPBELL,G.A. & MOSLEN,M.T. (1996). Calcium channel blockers induce thymic apoptosis in vivo in rats. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **139**, 122-127.

BAO,G., GOHLKE,P. & UNGER,T. (1992). Role of bradykinin in chronic antihypertensive actions of ramipril in different hypertension models. *J. Cardiovasc. Pharmacol.*, **20 Suppl 9**, S96-S99.

BAO,G., QADRI,F., STAUSS,B., STAUSS,H., GOHLKE,P. & UNGER,T. (1991). HOE 140, a new highly potent and long-acting bradykinin antagonist in conscious rats. *Eur. J. Pharmacol.*, **200**, 179-182.

BARKER,T.A., MASSETT,M.P., KORSHUNOV,V.A., MOHAN,A.M., KENNEDY,A.J. & BERK,B.C. (2006). Angiotensin II type 2 receptor expression after vascular injury: differing effects of angiotensin-converting enzyme inhibition and angiotensin receptor blockade. *Hypertension*, **48**, 942-949.

BARKI-HARRINGTON,L., BOOKOUT,A.L., WANG,G., LAMB,M.E., LEEB-LUNDBERG,L.M. & DAAKA,Y. (2003). Requirement for direct cross-talk between B1 and B2 kinin receptors for the proliferation of androgen-insensitive prostate cancer PC3 cells. *Biochem. J.*, **371**, 581-587.

BARRETT,T.B., SAMPSON,P., OWENS,G.K., SCHWARTZ,S.M. & BENDITT,E.P. (1983). Polyploid nuclei in human artery wall smooth muscle cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **80**, 882-885.

BASCANDS,J.L., GIROLAMI,J.P., TROLY,M., ESCARGUEIL-BLANC,I., NAZZAL,D., SALVAYRE,R. & BLAES,N. (2001). Angiotensin II induces phenotype-dependent apoptosis in vascular smooth muscle cells. *Hypertension*, **38**, 1294-1299.

BASCANDS,J.L., PECHER,C., ROUAUD,S., EMOND,C., TACK,J.L., BASTIE,M.J., BURCH,R., REGOLI,D. & GIROLAMI,J.P. (1993). Evidence for existence of two distinct bradykinin receptors on rat mesangial cells. *Am. J Physiol*, **264**, F548-F556.

BATALLER,R., GASULL,X., GINES,P., HELLEMANS,K., GORBIG,M.N., NICOLAS,J.M., SANCHO-BRU,P., DE LAS,H.D., GUAL,A., GEERTS,A., ARROYO,V. & RODES,J. (2001). In vitro and in vivo activation of rat hepatic stellate cells results in de novo expression of L-type voltage-operated calcium channels. *Hepatology*, **33**, 956-962.

BATENBURG,W.W., GARRELD,S,I.M., BERNASCONI,C.C., JUILLERAT-JEANNERET,L., VAN KATS,J.P., SAXENA,P.R. & DANSER,A.H. (2004). Angiotensin II type 2 receptor-mediated vasodilation in human coronary microarteries. *Circulation*, **109**, 2296-2301.

BAUMANN,M., JANSSEN,B.J., HERMANS,J.J., PEUTZ-KOOTSTRA,C., WITZKE,O., SMITS,J.F. & STRUIJKER BOUDIER,H.A. (2007). Transient AT1 receptor-inhibition in prehypertensive spontaneously hypertensive rats results in maintained cardiac protection until advanced age. *J Hypertens.*, **25**, 207-215.

BAYER,I.M., ADAMSON,S.L. & LANGILLE,B.L. (1999). Atrophic remodeling of the artery-cuffed artery. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, **19**, 1499-1505.

BEERE,H.M. (2004). "The stress of dying": the role of heat shock proteins in the regulation of apoptosis. *J Cell Sci.*, **117**, 2641-2651.

BEHR,T.M., NERURKAR,S.S., NELSON,A.H., COATNEY,R.W., WOODS,T.N., SULPIZIO,A., CHANDRA,S., BROOKS,D.P., KUMAR,S., LEE,J.C., OHLSTEIN,E.H., ANGERMANN,C.E., ADAMS,J.L., SISKO,J., SACKNER-BERNSTEIN,J.D. & WILLETTE,R.N. (2001). Hypertensive end-organ damage and premature mortality are p38 mitogen-activated protein kinase-dependent in a rat model of cardiac hypertrophy and dysfunction. *Circulation*, **104**, 1292-1298.

BEIERWALTES,W.H., PRADA,J. & CARRETERO,O.A. (1985). Kinin stimulation of renin release in isolated rat glomeruli. *Am. J Physiol*, **248**, F757-F761.

BENES,F.M. & LANGE,N. (2001). Two-dimensional versus three-dimensional cell counting: a practical perspective. *Trends Neurosci.*, **24**, 11-17.

BENNETT,M.R., EVAN,G.I. & NEWBY,A.C. (1994). Deregulated expression of the c-myc oncogene abolishes inhibition of proliferation of rat vascular smooth muscle cells by serum reduction, interferon-gamma, heparin, and cyclic nucleotide analogues and induces apoptosis. *Circ Res*, **74**, 525-536.

BERGAYA,S., HILGERS,R.H., MENETON,P., DONG,Y., BLOCH-FAURE,M., INAGAMI,T., HENC-GELAS,F., LEVY,B.I. & BOULANGER,C.M. (2004). Flow-dependent dilation mediated by endogenous kinins requires angiotensin AT2 receptors. *Circ. Res.*, **94**, 1623-1629.

BERKELS,R., TAUBERT,D., BARTELS,H., BREITENBACH,T., KLAUS,W. & ROESEN,R. (2004). Amlodipine increases endothelial nitric oxide by dual mechanisms. *Pharmacology*, **70**, 39-45.

- BERKENBOOM,G., LANGER,I., CARPENTIER,Y., GROSFILS,K. & FONTAINE,J. (1997). Ramipril prevents endothelial dysfunction induced by oxidized low-density lipoproteins: a bradykinin-dependent mechanism. *Hypertension*, **30**, 371-376.
- BERRIDGE,M.J., BOOTMAN,M.D. & RODERICK,H.L. (2003). Calcium signalling: dynamics, homeostasis and remodelling. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **4**, 517-529.
- BERRY,C., TOUYZ,R., DOMINCZAK,A.F., WEBB,R.C. & JOHNS,D.G. (2001). Angiotensin receptors: signaling, vascular pathophysiology, and interactions with ceramide. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, **281**, H2337-H2365.
- BERS,D.M. (2002). Cardiac excitation-contraction coupling. *Nature*, **415**, 198-205.
- BEVAN,R.D., VAN,M.E. & BEVAN,J.A. (1976). Hyperplasia of vascular smooth muscle in experimental hypertension in the rabbit. *Circ. Res.*, **38**, 58-62.
- BEYAERT,R., HEYNINCK,K. & VAN,H.S. (2000). A20 and A20-binding proteins as cellular inhibitors of nuclear factor-kappa B-dependent gene expression and apoptosis. *Biochem. Pharmacol.*, **60**, 1143-1151.
- BHASKARAN,M., REDDY,K., RADHAKRISHANAN,N., FRANKI,N., DING,G. & SINGHAL,P.C. (2003). Angiotensin II induces apoptosis in renal proximal tubular cells. *Am. J Physiol Renal Physiol*, **284**, F955-F965.
- BHOOLA,K.D., FIGUEROA,C.D. & WORTHY,K. (1992). Bioregulation of kinins: kallikreins, kininogens, and kininases. *Pharmacol. Rev.*, **44**, 1-80.
- BLACK,F.M., PACKER,S.E., PARKER,T.G., MICHAEL,L.H., ROBERTS,R., SCHWARTZ,R.J. & SCHNEIDER,M.D. (1991). The vascular smooth muscle alpha-actin gene is reactivated during cardiac hypertrophy provoked by load. *J. Clin. Invest*, **88**, 1581-1588.
- BLACK,M.J., ADAMS,M.A., BOBIK,A., CAMPBELL,J.H. & CAMPBELL,G.R. (1989). Effect of enalapril on aortic smooth muscle cell polyploidy in the spontaneously hypertensive rat. *J Hypertens.*, **7**, 997-1003.
- BLEDSE,G., CRICKMAN,S., MAO,J., XIA,C.F., MURAKAMI,H., CHAO,L. & CHAO,J. (2006). Kallikrein/kinin protects against gentamicin-induced nephrotoxicity by inhibition of inflammation and apoptosis. *Nephrol. Dial. Transplant.*, **21**, 624-633.
- BOATRRIGHT,K.M., RENATUS,M., SCOTT,F.L., SPERANDIO,S., SHIN,H., PEDERSEN,I.M., RICCI,J.E., EDRIS,W.A., SUTHERLIN,D.P., GREEN,D.R. & SALVESEN,G.S. (2003). A unified model for apical caspase activation. *Mol. Cell*, **11**, 529-541.
- BOEHM,M. & NABEL,E.G. (2003). The cell cycle and cardiovascular diseases. *Prog. Cell Cycle Res.*, **5**, 19-30.

BOELS,K. & SCHALLER,H.C. (2003). Identification and characterisation of GPR100 as a novel human G-protein-coupled bradykinin receptor. *Br. J Pharmacol.*, **140**, 932-938.

BOOTMAN,M.D., BERRIDGE,M.J. & RODERICK,H.L. (2002). Calcium signalling: more messengers, more channels, more complexity. *Curr. Biol.*, **12**, R563-R565.

BOOZ,G.W. & BAKER,K.M. (1996). Role of type 1 and type 2 angiotensin receptors in angiotensin II-induced cardiomyocyte hypertrophy. *Hypertension*, **28**, 635-640.

BOOZ,G.W., DOSTAL,D.E. & BAKER,K.M. (1999). Paracrine actions of cardiac fibroblasts on cardiomyocytes: implications for the cardiac renin-angiotensin system. *Am. J Cardiol.*, **83**, 44H-47H.

BORLAK,J. & THUM,T. (2003). Hallmarks of ion channel gene expression in end-stage heart failure. *FASEB J*, **17**, 1592-1608.

BOTTARI,S.P., KING,I.N., REICHLIN,S., DAHLSTROEM,I., LYDON,N. & DE,G.M. (1992). The angiotensin AT2 receptor stimulates protein tyrosine phosphatase activity and mediates inhibition of particulate guanylate cyclase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **183**, 206-211.

BOUCHARD,J.F., CHOUINARD,J. & LAMONTAGNE,D. (1998). Role of kinins in the endothelial protective effect of ischaemic preconditioning. *Br. J Pharmacol.*, **123**, 413-420.

BOWEN-POPE,D.F. & SCHAUB,F.J. (2001). Apoptosis of smooth muscle cells is not silent: Fas/FADD initiates a program of inflammatory gene expression. *Trends Cardiovasc. Med.*, **11**, 42-45.

BRASSARD,P., AMIRI,F., THIBAUT,G. & SCHIFFRIN,E.L. (2006). Role of angiotensin type-1 and angiotensin type-2 receptors in the expression of vascular integrins in angiotensin II-infused rats. *Hypertension*, **47**, 122-127.

BRAZIL,D.P., YANG,Z.Z. & HEMMINGS,B.A. (2004). Advances in protein kinase B signalling: AKTion on multiple fronts. *Trends Biochem. Sci.*, **29**, 233-242.

BROKER,L.E., KRUYT,F.A. & GIACCONE,G. (2005). Cell death independent of caspases: a review. *Clin. Cancer Res.*, **11**, 3155-3162.

BURGES,R.A., GARDINER,D.G., GWILT,M., HIGGINS,A.J., BLACKBURN,K.J., CAMPBELL,S.F., CROSS,P.E. & STUBBS,J.K. (1987). Calcium channel blocking properties of amlodipine in vascular smooth muscle and cardiac muscle in vitro: evidence for voltage modulation of vascular dihydropyridine receptors. *J Cardiovasc. Pharmacol.*, **9**, 110-119.

BUTT,S.K., DAWSON,L.G. & HALL,J.M. (1995). Bradykinin B1 receptors in the rabbit urinary bladder: induction of responses, smooth muscle contraction, and phosphatidylinositol hydrolysis. *Br. J Pharmacol.*, **114**, 612-617.

CACHOFEIRO,V., SAKAKIBARA,T. & NASJLETTI,A. (1992). Kinins, nitric oxide, and the hypotensive effect of captopril and ramiprilat in hypertension. *Hypertension*, **19**, 138-145.

CAMPBELL,D.J., KLADIS,A., BRISCOE,T.A. & ZHUO,J. (1999). Type 2 bradykinin-receptor antagonism does not modify kinin or angiotensin peptide levels. *Hypertension*, **33**, 1233-1236.

CAMPBELL,D.J., KRUM,H. & ESLER,M.D. (2005). Losartan increases bradykinin levels in hypertensive humans. *Circulation*, **111**, 315-320.

CAMPBELL,S.E., JANICKI,J.S. & WEBER,K.T. (1995). Temporal differences in fibroblast proliferation and phenotype expression in response to chronic administration of angiotensin II or aldosterone. *J. Mol. Cell Cardiol.*, **27**, 1545-1560.

CAMPOS,M.M., ONGALL,B., DE SOUZA,B.H., SCHANSTRA,J.P., GIROLAMI,J.P., CHABOT,J.G. & COUTURE,R. (2005). Expression and distribution of kinin B1 receptor in the rat brain and alterations induced by diabetes in the model of streptozotocin. *Synapse*, **57**, 29-37.

CAREY,R.M. (2005). Cardiovascular and renal regulation by the angiotensin type 2 receptor: the AT2 receptor comes of age. *Hypertension*, **45**, 840-844.

CAREY,R.M. & SIRAGY,H.M. (2003). Newly recognized components of the renin-angiotensin system: potential roles in cardiovascular and renal regulation. *Endocr. Rev.*, **24**, 261-271.

CARRETERO,O.A. (2005). Vascular remodeling and the kallikrein-kinin system. *J Clin. Invest*, **115**, 588-591.

CASTOLDI,G., DI GIOIA,C.R., PIERUZZI,F., D'ORLANDO,C., VAN DE GREEF,W.M., BUSCA,G., SPERTI,G. & STELLA,A. (2003). ANG II increases TIMP-1 expression in rat aortic smooth muscle cells in vivo. *Am. J Physiol Heart Circ. Physiol*, **284**, H635-H643.

CATTERALL,W.A., PEREZ-REYES,E., SNUTCH,T.P. & STRIESSNIG,J. (2005). International Union of Pharmacology. XLVIII. Nomenclature and structure-function relationships of voltage-gated calcium channels. *Pharmacol. Rev.*, **57**, 411-425.

CELLIER,E., MAGE,M., DUCHENE,J., PECHER,C., COUTURE,R., BASCANDS,J.L. & GIROLAMI,J.P. (2003). Bradykinin reduces growth factor-induced glomerular ERK1/2 phosphorylation. *Am. J Physiol Renal Physiol*, **284**, F282-F292.

CEREGHETTI,G.M. & SCORRANO,L. (2006). The many shapes of mitochondrial death. *Oncogene*, **25**, 4717-4724.

CERVENKA,L., MALY,J., KARASOVA,L., SIMOVA,M., VITKO,S., HELLEROVA,S., HELLER,J. & EL-DAHR,S.S. (2001). Angiotensin II-induced hypertension in bradykinin B2 receptor knockout mice. *Hypertension*, **37**, 967-973.

CHALFANT,C.E., RATHMAN,K., PINKERMAN,R.L., WOOD,R.E., OBEID,L.M., OGRETMEN,B. & HANNUN,Y.A. (2002). De novo ceramide regulates the alternative splicing of caspase 9 and Bcl-x in A549 lung adenocarcinoma cells. Dependence on protein phosphatase-1. *J Biol. Chem.*, **277**, 12587-12595.

CHAN,S.W., HEGYI,L., SCOTT,S., CARY,N.R., WEISSBERG,P.L. & BENNETT,M.R. (2000). Sensitivity to Fas-mediated apoptosis is determined below receptor level in human vascular smooth muscle cells. *Circ Res*, **86**, 1038-1046.

CHAO,J. & CHAO,L. (2005). Kallikrein-kinin in stroke, cardiovascular and renal disease. *Exp. Physiol*, **90**, 291-298.

CHAO,T.S., BYRON,K.L., LEE,K.M., VILLEREAL,M. & ROSNER,M.R. (1992). Activation of MAP kinases by calcium-dependent and calcium-independent pathways. Stimulation by thapsigargin and epidermal growth factor. *J Biol. Chem.*, **267**, 19876-19883.

CHAPLEAU,M.W., HAJDUCZOK,G. & ABOUD,F.M. (1988). Mechanisms of resetting of arterial baroreceptors: an overview. *Am. J Med. Sci.*, **295**, 327-334.

CHARLES,R., SANDIRASEGARANE,L., YUN,J., BOURBON,N., WILSON,R., ROTHSTEIN,R.P., LEVISON,S.W. & KESTER,M. (2000). Ceramide-coated balloon catheters limit neointimal hyperplasia after stretch injury in carotid arteries. *Circ Res*, **87**, 282-288.

CHEN,J., KUEI,C., SUTTON,S.W., BONAVENTURE,P., NEPOMUCENO,D., ERISTE,E., SILLARD,R., LOVENBERG,T.W. & LIU,C. (2005). Pharmacological characterization of relaxin-3/INSL7 receptors GPCR135 and GPCR142 from different mammalian species. *J Pharmacol. Exp. Ther.*, **312**, 83-95.

CHEN,L., HAUGHT,W.H., YANG,B., SALDEEN,T.G., PARATHASARATHY,S. & MEHTA,J.L. (1997). Preservation of endogenous antioxidant activity and inhibition of lipid peroxidation as common mechanisms of antiatherosclerotic effects of vitamin E, lovastatin and amlodipine. *J Am. Coll. Cardiol.*, **30**, 569-575.

CHILLON,J.M. & BAUMBACH,G.L. (1999). Effects of an angiotensin-converting enzyme inhibitor and a beta-blocker on cerebral arterioles in rats. *Hypertension*, **33**, 856-861.

CHO,A., MITCHELL,L., KOOPMANS,D. & LANGILLE,B.L. (1997). Effects of changes in blood flow rate on cell death and cell proliferation in carotid arteries of immature rabbits. *Circ. Res.*, **81**, 328-337.

CHOI,J., CHIANG,A., TAULIER,N., GROS,R., PIRANI,A. & HUSAIN,M. (2006). A calmodulin-binding site on cyclin E mediates Ca<sup>2+</sup>-sensitive G1/s transitions in vascular smooth muscle cells. *Circ. Res.*, **98**, 1273-1281.

CHOU,T.C., LI,C.Y., YEN,M.H. & DING,Y.A. (1999). Antiplatelet effect of amlodipine: a possible mechanism through a nitric oxide-mediated process. *Biochem. Pharmacol.*, **58**, 1657-1663.

CHRISTOPHER,J., VELARDE,V. & JAFFA,A.A. (2001). Induction of B(1)-kinin receptors in vascular smooth muscle cells: cellular mechanisms of map kinase activation. *Hypertension*, **38**, 602-605.

CHUNG,S., GUMIENNY,T.L., HENGARTNER,M.O. & DRISCOLL,M. (2000). A common set of engulfment genes mediates removal of both apoptotic and necrotic cell corpses in *C. elegans*. *Nat. Cell Biol.*, **2**, 931-937.

CLARKE,M.C., FIGG,N., MAGUIRE,J.J., DAVENPORT,A.P., GODDARD,M., LITTLEWOOD,T.D. & BENNETT,M.R. (2006). Apoptosis of vascular smooth muscle cells induces features of plaque vulnerability in atherosclerosis. *Nat. Med.*, **12**, 1075-1080.

CLERK,A., GILLESPIE-BROWN,J., FULLER,S.J. & SUGDEN,P.H. (1996). Stimulation of phosphatidylinositol hydrolysis, protein kinase C translocation, and mitogen-activated protein kinase activity by bradykinin in rat ventricular myocytes: dissociation from the hypertrophic response. *Biochem. J.*, **317** ( Pt 1), 109-118.

COHUET,G. & STRUIJKER-BOUDIER,H. (2006). Mechanisms of target organ damage caused by hypertension: therapeutic potential. *Pharmacol. Ther.*, **111**, 81-98.

COLLINS,A.R., SCHNEE,J., WANG,W., KIM,S., FISHBEIN,M.C., BRUEMMER,D., LAW,R.E., NICHOLAS,S., ROSS,R.S. & HSUEH,W.A. (2004). Osteopontin modulates angiotensin II-induced fibrosis in the intact murine heart. *J Am. Coll. Cardiol.*, **43**, 1698-1705.

COLOMBO,F., NOEL,J., MAYERS,P., MERCIER,I. & CALDERONE,A. (2001). beta-Adrenergic stimulation of rat cardiac fibroblasts promotes protein synthesis via the activation of phosphatidylinositol 3-kinase. *J. Mol. Cell Cardiol.*, **33**, 1091-1106.

COMMUNAL,C., SINGH,K., PIMENTEL,D.R. & COLUCCI,W.S. (1998). Norepinephrine stimulates apoptosis in adult rat ventricular myocytes by activation of the beta-adrenergic pathway. *Circulation*, **98**, 1329-1334.

CORSINI,A., BONFATTI,M., QUARATO,P., ACCOMAZZO,M.R., RAITERI,M., SARTANI,A., TESTA,R., NICOSIA,S., PAOLETTI,R. & FUMAGALLI,R. (1996). Effect of the new calcium antagonist lercanidipine and its enantiomers on the migration and proliferation of arterial myocytes. *J Cardiovasc. Pharmacol.*, **28**, 687-694.

COUNIS,M.F. & TORRIGLIA,A. (2006). Acid DNases and their interest among apoptotic endonucleases. *Biochimie*, **88**, 1851-1858.

COUTURE,R. & GIROLAMI,J.P. (2004). Putative roles of kinin receptors in the therapeutic effects of angiotensin 1-converting enzyme inhibitors in diabetes mellitus. *Eur. J Pharmacol*, **500**, 467-485.

COUTURE,R., HARRISSON,M., VIANNA,R.M. & CLOUTIER,F. (2001). Kinin receptors in pain and inflammation. *Eur. J Pharmacol.*, **429**, 161-176.

COWAN,K.N., HEILBUT,A., HUMPL,T., LAM,C., ITO,S. & RABINOVITCH,M. (2000a). Complete reversal of fatal pulmonary hypertension in rats by a serine elastase inhibitor. *Nat. Med.*, **6**, 698-702.

COWAN,K.N., JONES,P.L. & RABINOVITCH,M. (2000b). Elastase and matrix metalloproteinase inhibitors induce regression, and tenascin-C antisense prevents progression, of vascular disease. *J. Clin. Invest.*, **105**, 21-34.

COWLING,V. & DOWNWARD,J. (2002). Caspase-6 is the direct activator of caspase-8 in the cytochrome c-induced apoptosis pathway: absolute requirement for removal of caspase-6 prodomain. *Cell Death. Differ.*, **9**, 1046-1056.

COX,R.H. & RUSCH,N.J. (2002). New expression profiles of voltage-gated ion channels in arteries exposed to high blood pressure. *Microcirculation.*, **9**, 243-257.

CRESPI,F., VECCHIATO,E., LAZZARINI,C., ANDREOLI,M. & GAVIRAGHI,G. (2002). Evidence that lacidipine at nonsustained antihypertensive doses activates nitrogen monoxide system in the endothelium of salt-loaded Dahl-S rats. *J Cardiovasc. Pharmacol.*, **39**, 471-477.

CRIBBS,L.L. (2006). T-type Ca<sup>2+</sup> channels in vascular smooth muscle: multiple functions. *Cell Calcium*, **40**, 221-230.

CUBEDDU,L.X. (1988). New alpha 1-adrenergic receptor antagonists for the treatment of hypertension: role of vascular alpha receptors in the control of peripheral resistance. *Am. Heart J*, **116**, 133-162.

CUI,T.X., NAKAGAMI,H., NAHMIA,S., SHIUCHI,T., TAKEDA-MATSUBARA,Y., LI,J.M., WU,L., IWAI,M. & HORIUCHI,M. (2002). Angiotensin II subtype 2 receptor activation inhibits insulin-induced phosphoinositide 3-kinase and Akt and induces apoptosis in PC12W cells. *Mol. Endocrinol.*, **16**, 2113-2123.

CURTIN,J.F. & COTTER,T.G. (2003). Live and let die: regulatory mechanisms in Fas-mediated apoptosis. *Cell Signal.*, **15**, 983-992.

CUSHMAN,D.W., CHEUNG,H.S., SABO,E.F. & ONDETTI,M.A. (1977). Design of potent competitive inhibitors of angiotensin-converting enzyme. Carboxyalkanoyl and mercaptoalkanoyl amino acids. *Biochemistry (Mosc)*, **16**, 5484-5491.

D'AMORE,A., BLACK,M.J. & THOMAS,W.G. (2005). The angiotensin II type 2 receptor causes constitutive growth of cardiomyocytes and does not antagonize angiotensin II type 1 receptor-mediated hypertrophy. *Hypertension*, **46**, 1347-1354.

D'ANGELO,G., ELMARAKBY,A.A., POLLOCK,D.M. & STEPP,D.W. (2005). Fructose feeding increases insulin resistance but not blood pressure in Sprague-Dawley rats. *Hypertension*, **46**, 806-811.

D'ORLEANS-JUSTE,P., DE,N.G. & VANE,J.R. (1989). Kinins act on B1 or B2 receptors to release conjointly endothelium-derived relaxing factor and prostacyclin from bovine aortic endothelial cells. *Br. J Pharmacol.*, **96**, 920-926.

DAHLOF,B., DEVEREUX,R.B., KJELDSSEN,S.E., JULIUS,S., BEEVERS,G., DE,F.U., FYHRQUIST,F., IBSEN,H., KRISTIANSSON,K., LEDERBALLE-PEDERSEN,O., LINDHOLM,L.H., NIEMINEN,M.S., OMVIK,P., OPARIL,S. & WEDEL,H. (2002). Cardiovascular morbidity and mortality in the Losartan Intervention For Endpoint reduction in hypertension study (LIFE): a randomised trial against atenolol. *Lancet*, **359**, 995-1003.

DAHLOF,B. & HANSSON,L. (1993). The influence of antihypertensive therapy on the structural arteriolar changes in essential hypertension: different effects of enalapril and hydrochlorothiazide. *J Intern. Med.*, **234**, 271-279.

DAHLOF,B., SEVER,P.S., POULTER,N.R., WEDEL,H., BEEVERS,D.G., CAULFIELD,M., COLLINS,R., KJELDSSEN,S.E., KRISTINSSON,A., MCINNES,G.T., MEHLSSEN,J., NIEMINEN,M., O'BRIEN,E. & OSTERGREN,J. (2005). Prevention of cardiovascular events with an antihypertensive regimen of amlodipine adding perindopril as required versus atenolol adding bendroflumethiazide as required, in the Anglo-Scandinavian Cardiac Outcomes Trial-Blood Pressure Lowering Arm (ASCOT-BPLA): a multicentre randomised controlled trial. *Lancet*, **366**, 895-906.

DAYOUB,H., ACHAN,V., ADIMOOLAM,S., JACOBI,J., STUEHLINGER,M.C., WANG,B.Y., TSAO,P.S., KIMOTO,M., VALLANCE,P., PATTERSON,A.J. & COOKE,J.P. (2003). Dimethylarginine dimethylaminohydrolase regulates nitric oxide synthesis: genetic and physiological evidence. *Circulation*, **108**, 3042-3047.

DE ALMEIDA,C.J. & LINDEN,R. (2005). Phagocytosis of apoptotic cells: a matter of balance. *Cell Mol. Life Sci.*, **62**, 1532-1546.

DE CHAMPLAIN,J. (1977). The sympathetic system in hypertension. *Clin. Endocrinol. Metab*, **6**, 633-655.

DE GASPARO,M., CATT,K.J., INAGAMI,T., WRIGHT,J.W. & UNGER,T. (2000). International union of pharmacology. XXIII. The angiotensin II receptors. *Pharmacol. Rev.*, **52**, 415-472.

DE LANNOY,L.M., SCHUIJT,M.P., SAXENA,P.R., SCHALEKAMP,M.A. & DANSER,A.H. (2001). Angiotensin converting enzyme is the main contributor to angiotensin I-II conversion in the interstitium of the isolated perfused rat heart. *J Hypertens.*, **19**, 959-965.

DE MEY,J.G., DAEMEN,M.J., BOONEN,H.C., BOSMAN,F.T., DIJKSTRA,E.H., FAZZI,G.E., JANSSEN,G.M., SCHIFFERS,P.M., STRUYKER-BOUDIER,H.A. & VRIJDAG,M.J. (1991). In vivo DNA synthesis is not uniformly increased in arterial smooth muscle of young spontaneously hypertensive rats. *J Hypertens*, **9**, 695-701.

DEBLOIS,D., BOUTHILLIER,J. & MARCEAU,F. (1991). Pulse exposure to protein synthesis inhibitors enhances vascular responses to des-Arg<sup>9</sup>-bradykinin: possible role of interleukin-1. *Br. J. Pharmacol.*, **103**, 1057-1066.

DEBLOIS,D., ORLOV,S.N. & HAMET,P. (2001). Apoptosis in cardiovascular remodeling--effect of medication. *Cardiovasc Drugs Ther*, **15**, 539-545.

DEBLOIS,D., TEA,B.S., BEAUDRY,D. & HAMET,P. (2005). Regulation of therapeutic apoptosis: a potential target in controlling hypertensive organ damage. *Can. J Physiol Pharmacol*, **83**, 29-41.

DEBLOIS,D., TEA,B.S., THAN,V.D., TREMBLAY,J. & HAMET,P. (1997). Smooth muscle apoptosis during vascular regression in spontaneously hypertensive rats. *Hypertension*, **29**, 340-349.

DER SARKISSIAN,S., MARCHAND,E.L., DUGUAY,D. & DEBLOIS,D. (2004). Synergistic interaction between enalapril, L-arginine and tetrahydrobiopterin in smooth muscle cell apoptosis and aortic remodeling induction in SHR. *Br. J Pharmacol*, **142**, 912-918.

DER SARKISSIAN,S., MARCHAND,E.L., DUGUAY,D., HAMET,P. & DEBLOIS,D. (2003). Reversal of interstitial fibroblast hyperplasia via apoptosis in hypertensive rat heart with valsartan or enalapril. *Cardiovasc. Res.*, **57**, 775-783.

DESMOULIERE,A., REDARD,M., DARBY,I. & GABBIANI,G. (1995). Apoptosis mediates the decrease in cellularity during the transition between granulation tissue and scar. *Am. J. Pathol.*, **146**, 56-66.

DEVERAUX,Q.L. & REED,J.C. (1999). IAP family proteins--suppressors of apoptosis. *Genes Dev.*, **13**, 239-252.

DEVEREUX,R.B., DAHLOF,B., GERDTS,E., BOMAN,K., NIEMINEN,M.S., PAPADEMETRIOU,V., ROKKEDAL,J., HARRIS,K.E., EDELMAN,J.M. & WACHTELL,K. (2004a). Regression of hypertensive left ventricular hypertrophy by losartan compared with atenolol: the Losartan Intervention for Endpoint Reduction in Hypertension (LIFE) trial. *Circulation*, **110**, 1456-1462.

DEVEREUX,R.B., WACHTELL,K., GERDTS,E., BOMAN,K., NIEMINEN,M.S., PAPADEMETRIOU,V., ROKKEDAL,J., HARRIS,K., AURUP,P. & DAHLOF,B. (2004b). Prognostic significance of left ventricular mass change during treatment of hypertension. *JAMA*, **292**, 2350-2356.

DEVLIN,A.M., DAVIDSON,A.O., GORDON,J.F., CAMPBELL,A.M., MORTON,J.J., REID,J.L. & DOMINICZAK,A.F. (1995a). Vascular smooth muscle polyploidy in genetic hypertension: the role of angiotensin II. *J. Hum. Hypertens.*, **9**, 497-500.

DEVLIN,A.M., GORDON,J.F., DAVIDSON,A.O., CLARK,J.S., HAMILTON,C.A., MORTON,J.J., CAMPBELL,A.M., REID,J.L. & DOMINICZAK,A.F. (1995b). The effects of perindopril on vascular smooth muscle polyploidy in stroke-prone spontaneously hypertensive rats. *J. Hypertens.*, **13**, 211-218.

DHEIN,S., ZHAO,Y., SIMSEK,S., SALAMEH,A. & KLAUS,W. (1995). Actions of 1,4-dihydropyridines in isolated mesenteric vascular beds. *J Cardiovasc. Pharmacol.*, **26**, 784-791.

DIAMOND,J.A. & PHILLIPS,R.A. (2005). Hypertensive heart disease. *Hypertens. Res.*, **28**, 191-202.

DIDENKO,V.V., BOUDREAUX,D.J. & BASKIN,D.S. (1999). Substantial background reduction in ligase-based apoptosis detection using newly designed hairpin oligonucleotide probes. *Biotechniques*, **27**, 1130-1132.

DIDENKO,V.V. & HORNSBY,P.J. (1996). Presence of double-strand breaks with single-base 3' overhangs in cells undergoing apoptosis but not necrosis. *J. Cell Biol.*, **135**, 1369-1376.

DIDENKO,V.V., TUNSTEAD,J.R. & HORNSBY,P.J. (1998). Biotin-labeled hairpin oligonucleotides: probes to detect double-strand breaks in DNA in apoptotic cells. *Am. J. Pathol.*, **152**, 897-902.

DIEP,Q.N., EL MABROUK,M., YUE,P. & SCHIFFRIN,E.L. (2002). Effect of AT(1) receptor blockade on cardiac apoptosis in angiotensin II-induced hypertension. *Am. J. Physiol Heart Circ. Physiol*, **282**, H1635-H1641.

DIEP,Q.N., LI,J.S. & SCHIFFRIN,E.L. (1999). In vivo study of AT(1) and AT(2) angiotensin receptors in apoptosis in rat blood vessels. *Hypertension*, **34**, 617-624.

DIEZ,J., PANIZO,A., HERNANDEZ,M., VEGA,F., SOLA,I., FORTUNO,M.A. & PARDO,J. (1997). Cardiomyocyte apoptosis and cardiac angiotensin-converting enzyme in spontaneously hypertensive rats. *Hypertension*, **30**, 1029-1034.

DIEZ,J., QUEREJETA,R., LOPEZ,B., GONZALEZ,A., LARMAN,M. & MARTINEZ UBAGO,J.L. (2002). Losartan-dependent regression of myocardial fibrosis is associated with reduction of left ventricular chamber stiffness in hypertensive patients. *Circulation*, **105**, 2512-2517.

DING,G., REDDY,K., KAPASI,A.A., FRANKI,N., GIBBONS,N., KASINATH,B.S. & SINGHAL,P.C. (2002). Angiotensin II induces apoptosis in rat glomerular epithelial cells. *Am. J Physiol Renal Physiol*, **283**, F173-F180.

DING,Y. & VAZIRI,N.D. (1998). Calcium channel blockade enhances nitric oxide synthase expression by cultured endothelial cells. *Hypertension*, **32**, 718-723.

DIXON,B.S. & DENNIS,M.J. (1997). Regulation of mitogenesis by kinins in arterial smooth muscle cells. *Am. J Physiol*, **273**, C7-20.

DIXON,B.S., EVANOFF,D., FANG,W.B. & DENNIS,M.J. (2002). Bradykinin B1 receptor blocks PDGF-induced mitogenesis by prolonging ERK activation and increasing p27Kip1. *Am. J Physiol Cell Physiol*, **283**, C193-C203.

DOBROWSKY,R.T., KAMIBAYASHI,C., MUMBY,M.C. & HANNUN,Y.A. (1993). Ceramide activates heterotrimeric protein phosphatase 2A. *J Biol. Chem.*, **268**, 15523-15530.

DOI,Y., HINKO,A., FRANCO-SAENZ,R. & MULROW,P.J. (1983). Reexamination of the effect of urinary kallikrein on renin release: evidence that kallikrein does not release renin but protects renin from destruction. *Endocrinology*, **113**, 114-118.

DONATH,S., LI,P., WILLENBOCKEL,C., AL-SAAD,N., GROSS,V., WILLNOW,T., BADER,M., MARTIN,U., BAUERSACHS,J., WOLLERT,K.C., DIETZ,R. & VON,H.R. (2006). Apoptosis repressor with caspase recruitment domain is required for cardioprotection in response to biomechanical and ischemic stress. *Circulation*, **113**, 1203-1212.

DONOGHUE,M., HSIEH,F., BARONAS,E., GODBOUT,K., GOSSELIN,M., STAGLIANO,N., DONOVAN,M., WOOLF,B., ROBISON,K., JEYASEELAN,R., BREITBART,R.E. & ACTON,S. (2000). A novel angiotensin-converting enzyme-related carboxypeptidase (ACE2) converts angiotensin I to angiotensin 1-9. *Circ. Res.*, **87**, E1-E9.

DRAPEAU,G., DEBLOIS,D. & MARCEAU,F. (1991). Hypotensive effects of Lys-des-Arg9-bradykinin and metabolically protected agonists of B1 receptors for kinins. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **259**, 997-1003.

DRUMMOND,G.R. & COCKS,T.M. (1995). Endothelium-dependent relaxations mediated by inducible B1 and constitutive B2 kinin receptors in the bovine isolated coronary artery. *Br. J Pharmacol.*, **116**, 2473-2481.

DUCHENE,J., CHAUHAN,S.D., LOPEZ,F., PECHER,C., ESTEVE,J.P., GIROLAMI,J.P., BASCANDS,J.L. & SCHANSTRA,J.P. (2005). Direct protein-protein interaction between PLCgamma1 and the bradykinin B2 receptor--importance of growth conditions. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **326**, 894-900.

DUCHENE,J., SCHANSTRA,J.P., PECHER,C., PIZARD,A., SUSINI,C., ESTEVE,J.P., BASCANDS,J.L. & GIROLAMI,J.P. (2002). A novel protein-protein interaction between a G protein-coupled receptor and the phosphatase SHP-2 is involved in bradykinin-induced inhibition of cell proliferation. *J Biol. Chem.*, **277**, 40375-40383.

DUKA,A., DUKA,I., GAO,G., SHENOUDA,S., GAVRAS,I. & GAVRAS,H. (2006). Role of bradykinin B1 and B2 receptors in normal blood pressure regulation. *Am. J Physiol Endocrinol. Metab*, **291**, E268-E274.

DURVASULA,R.V., PETERMANN,A.T., HIROMURA,K., BLONSKI,M., PIPPIN,J., MUNDEL,P., PICHLER,R., GRIFFIN,S., COUSER,W.G. & SHANKLAND,S.J. (2004). Activation of a local tissue angiotensin system in podocytes by mechanical strain. *Kidney Int.*, **65**, 30-39.

ECCLESTON-JOYNER,C.A. & GRAY,S.D. (1988). Arterial hypertrophy in the fetal and neonatal spontaneously hypertensive rat. *Hypertension*, **12**, 513-518.

EGUCHI,S., NAMAGUCHI,K., IWASAKI,H., MATSUMOTO,T., YAMAKAWA,T., UTSUNOMIYA,H., MOTLEY,E.D., KAWAKATSU,H., OWADA,KM., HIRATA,Y., MARUMO,F. & INAGAMI,T. (1998). Calcium-dependent epidermal growth factor receptor transactivation mediates the angiotensin II-induced mitogen-activated protein kinase activation in vascular smooth muscle cells. *J Biol Chem*, **273**, 8890-8896.

EL MIDAOU, A., ONGALI, B., PETCU, M., RODI, D., DE, C. J., NEUGEBAUER, W. & COUTURE, R. (2005). Increases of spinal kinin receptor binding sites in two rat models of insulin resistance. *Peptides*, **26**, 1323-1330.

ELBAZ, N., BEDECS, K., MASSON, M., SUTREN, M., STROSBURG, A. D. & NAHMIAS, C. (2000). Functional trans-inactivation of insulin receptor kinase by growth-inhibitory angiotensin II AT2 receptor. *Mol. Endocrinol.*, **14**, 795-804.

ELLIS, H. M. & HORVITZ, H. R. (1986). Genetic control of programmed cell death in the nematode *C. elegans*. *Cell*, **44**, 817-829.

EMANUELI, C., BONARIA, S. M., FIGUEROA, C., CHAO, J., CHAO, L., GASPA, L., CAPOGROSSI, M. C. & MADEDDU, P. (2000). Participation of kinins in the captopril-induced inhibition of intimal hyperplasia caused by interruption of carotid blood flow in the mouse. *Br. J Pharmacol.*, **130**, 1076-1082.

EMANUELI, C., BONARIA, S. M., STACCA, T., PINTUS, G., KIRCHMAIR, R., ISNER, J. M., PINNA, A., GASPA, L., REGOLI, D., CAYLA, C., PESQUERO, J. B., BADER, M. & MADEDDU, P. (2002). Targeting kinin B(1) receptor for therapeutic neovascularization. *Circulation*, **105**, 360-366.

EMANUELI, C., CHAO, J., REGOLI, D., CHAO, L., NI, A. & MADEDDU, P. (1999a). The bradykinin B1 receptor and the central regulation of blood pressure in spontaneously hypertensive rats. *Br. J Pharmacol.*, **126**, 1769-1776.

EMANUELI, C., MAESTRI, R., CORRADI, D., MARCHIONE, R., MINASIA, A., TOZZI, M. G., SALIS, M. B., STRAINO, S., CAPOGROSSI, M. C., OLIVETTI, G. & MADEDDU, P. (1999b). Dilated and failing cardiomyopathy in bradykinin B(2) receptor knockout mice. *Circulation*, **100**, 2359-2365.

ENARI, M., SAKAHIRA, H., YOKOYAMA, H., OKAWA, K., IWAMATSU, A. & NAGATA, S. (1998). A caspase-activated DNase that degrades DNA during apoptosis, and its inhibitor ICAD. *Nature*, **391**, 43-50.

ESCARGUEIL-BLANC, I., MEILHAC, O., PIERAGGI, M. T., ARNAL, J. F., SALVAYRE, R. & NEGRE-SALVAYRE, A. (1997). Oxidized LDLs induce massive apoptosis of cultured human endothelial cells through a calcium-dependent pathway. Prevention by aurintricarboxylic acid. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, **17**, 331-339.

FADOK, V. A., VOELKER, D. R., CAMPBELL, P. A., COHEN, J. J., BRATTON, D. L. & HENSON, P. M. (1992). Exposure of phosphatidylserine on the surface of apoptotic lymphocytes triggers specific recognition and removal by macrophages. *J Immunol.*, **148**, 2207-2216.

FAN, G., JIANG, Y. P., LU, Z., MARTIN, D. W., KELLY, D. J., ZUCKERMAN, J. M., BALLOU, L. M., COHEN, I. S. & LIN, R. Z. (2005a). A transgenic mouse model of heart failure using inducible Galpha q. *J Biol. Chem.*, **280**, 40337-40346.

FAN,T.J., HAN,L.H., CONG,R.S. & LIANG,J. (2005b). Caspase family proteases and apoptosis. *Acta Biochim. Biophys. Sin. (Shanghai)*, **37**, 719-727.

FARHY,R.D., CARRETERO,O.A., HO,K.L. & SCICLI,A.G. (1993). Role of kinins and nitric oxide in the effects of angiotensin converting enzyme inhibitors on neointima formation. *Circ. Res.*, **72**, 1202-1210.

FARIAS,N.C., FERES,T., PAIVA,A.C. & PAIVA,T.B. (2004). Lys-[Leu8,des-Arg9]-bradykinin blocks lipopolysaccharide-induced SHR aorta hyperpolarization by inhibition of Ca(++)- and ATP-dependent K<sup>+</sup> channels. *Eur. J Pharmacol.*, **498**, 163-169.

FAUSSNER,A., PROUD,D., TOWNS,M. & BATHON,J.M. (1998). Influence of the cytosolic carboxyl termini of human B1 and B2 kinin receptors on receptor sequestration, ligand internalization, and signal transduction. *J Biol. Chem.*, **273**, 2617-2623.

FERNANDES,L., CERAVOLO,G.S., FORTES,Z.B., TOSTES,R., SANTOS,R.A., SANTOS,J.A., MORI,M.A., PESQUERO,J.B. & DE CARVALHO,M.H. (2006). Modulation of kinin B1 receptor expression by endogenous angiotensin II in hypertensive rats. *Regul. Pept.*, **136**, 92-97.

FIEDLER,B., LOHMANN,S.M., SMOLENSKI,A., LINNEMULLER,S., PIESKE,B., SCHRODER,F., MOLKENTIN,J.D., DREXLER,H. & WOLLERT,K.C. (2002). Inhibition of calcineurin-NFAT hypertrophy signaling by cGMP-dependent protein kinase type I in cardiac myocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **99**, 11363-11368.

FIGUEROA,C.D., MARCHANT,A., NOVOA,U., FORSTERMANN,U., JARNAGIN,K., SCHOLKENS,B. & MULLER-ESTERL,W. (2001). Differential Distribution of Bradykinin B(2) Receptors in the Rat and Human Cardiovascular System. *Hypertension*, **37**, 110-120.

FINCKENBERG,P., INKINEN,K., AHONEN,J., MERASTO,S., LOUHELAINEN,M., VAPAATALO,H., MULLER,D., GANTEN,D., LUFT,F. & MERVAALA,E. (2003). Angiotensin II induces connective tissue growth factor gene expression via calcineurin-dependent pathways. *Am. J Pathol.*, **163**, 355-366.

FISCHER,U.M., COX,C.S., JR., STEWART,R.H., LAINE,G.A. & ALLEN,S.J. (2006). Impact of acute myocardial edema on left ventricular function. *J Invest Surg.*, **19**, 31-38.

FISH,R.D., SPERTI,G., COLUCCI,W.S. & CLAPHAM,D.E. (1988). Phorbol ester increases the dihydropyridine-sensitive calcium conductance in a vascular smooth muscle cell line. *Circ. Res.*, **62**, 1049-1054.

FITZPATRICK,A.L., DALING,J.R., FURBERG,C.D., KRONMAL,R.A. & WEISSFELD,J.L. (1997). Use of calcium channel blockers and breast carcinoma risk in postmenopausal women. *Cancer*, **80**, 1438-1447.

FLEMING,I. (2006). Signaling by the angiotensin-converting enzyme. *Circ. Res.*, **98**, 887-896.

FLOTATS,A. & CARRIO,I. (2003). Non-invasive in vivo imaging of myocardial apoptosis and necrosis. *Eur. J Nucl. Med. Mol. Imaging*, **30**, 615-630.

FOLKOW,B. (1990). "Structural factor" in primary and secondary hypertension. *Hypertension*, **16**, 89-101.

FORMIGLI,L., CONTI,A. & LIPPI,D. (2004). "Falling leaves": a survey of the history of apoptosis. *Minerva Med.*, **95**, 159-164.

FORTIN,J.P., GOBEIL,F., JR., ADAM,A., REGOLI,D. & MARCEAU,F. (2003). Do angiotensin-converting enzyme inhibitors directly stimulate the kinin B1 receptor? *Am. J Physiol Heart Circ. Physiol*, **285**, H277-H282.

FORTUNO,M.A., GONZALEZ,A., RAVASSA,S., LOPEZ,B. & DIEZ,J. (2003). Clinical implications of apoptosis in hypertensive heart disease. *Am. J. Physiol Heart Circ. Physiol*, **284**, H1495-H1506.

FORTUNO,M.A., RAVASSA,S., ETAYO,J.C. & DIEZ,J. (1998). Overexpression of Bax protein and enhanced apoptosis in the left ventricle of spontaneously hypertensive rats: effects of AT1 blockade with losartan. *Hypertension*, **32**, 280-286.

FRENZEL,H., SCHWARTZKOPFF,B., RETTIG,B. & VOGELSHANG,H. (1987). Morphologic criteria of progression and regression of cardiac hypertrophy. *J Cardiovasc Pharmacol*, **10 Suppl 6**, S20-S28.

FRESLON,J.L. & GIUDICELLI,J.F. (1983). Compared myocardial and vascular effects of captopril and dihydralazine during hypertension development in spontaneously hypertensive rats. *Br J Pharmacol*, **80**, 533-543.

FRIES,K.M., BLIEDEN,T., LOONEY,R.J., SEMPOWSKI,G.D., SILVERA,M.R., WILLIS,R.A. & PHIPPS,R.P. (1994). Evidence of fibroblast heterogeneity and the role of fibroblast subpopulations in fibrosis. *Clin. Immunol. Immunopathol.*, **72**, 283-292.

FUKUO,K., HATA,S., SUHARA,T., NAKAHASHI,T., SHINTO,Y., TSUJIMOTO,Y., MORIMOTO,S. & OGIHARA,T. (1996). Nitric oxide induces upregulation of Fas and apoptosis in vascular smooth muscle. *Hypertension*, **27**, 823-826.

GABRA,B.H., COUTURE,R. & SIROIS,P. (2003). [Functional duality of kinin receptors in pathophysiology]. *Med. Sci. (Paris)*, **19**, 1101-1110.

GAINER,J.V., MORROW,J.D., LOVELAND,A., KING,D.J. & BROWN,N.J. (1998). Effect of bradykinin-receptor blockade on the response to angiotensin-converting-enzyme inhibitor in normotensive and hypertensive subjects. *N. Engl. J. Med.*, **339**, 1285-1292.

GALLINAT,S., BUSCHE,S., SCHUTZE,S., KRONKE,M. & UNGER,T. (1999). AT2 receptor stimulation induces generation of ceramides in PC12W cells. *FEBS Lett*, **443**, 75-79.

GAO,T., FURNARI,F. & NEWTON,A.C. (2005). PHLPP: a phosphatase that directly dephosphorylates Akt, promotes apoptosis, and suppresses tumor growth. *Mol. Cell*, **18**, 13-24.

GAVRIELI,Y., SHERMAN,Y. & BEN SASSON,S.A. (1992). Identification of programmed cell death in situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation. *J. Cell Biol.*, **119**, 493-501.

GEISTERFER,A.A., PEACH,M.J. & OWENS,G.K. (1988). Angiotensin II induces hypertrophy, not hyperplasia, of cultured rat aortic smooth muscle cells. *Circ. Res.*, **62**, 749-756.

GELLER,R.G., MARGOLIUS,H.S., PISANO,J.J. & KEISER,H.R. (1975). Urinary kallikrein excretion in spontaneously hypertensive rats. *Circ. Res.*, **36**, 103-106.

GENG,Y.J. & LIBBY,P. (1995). Evidence for apoptosis in advanced human atheroma. Colocalization with interleukin-1 beta-converting enzyme. *Am. J Pathol.*, **147**, 251-266.

GEUNA,S. (2005). The revolution of counting "tops": two decades of the disector principle in morphological research. *Microsc Res. Tech.*, **66**, 270-274.

GIASSON,E. & MELOCHE,S. (1995). Role of p70 S6 protein kinase in angiotensin II-induced protein synthesis in vascular smooth muscle cells. *J Biol. Chem.*, **270**, 5225-5231.

GIBBONS,G.H., PRATT,R.E. & DZAU,V.J. (1992). Vascular smooth muscle cell hypertrophy vs. hyperplasia. Autocrine transforming growth factor-beta 1 expression determines growth response to angiotensin II. *J Clin. Invest*, **90**, 456-461.

GIFFORD,R.W., JR. (1980). Three decades of antihypertensive therapy. *Clin. Pharmacol. Ther.*, **28**, 1-5.

GOBE,G., BROWNING,J., HOWARD,T., HOGG,N., WINTERFORD,C. & CROSS,R. (1997). Apoptosis occurs in endothelial cells during hypertension-induced microvascular rarefaction. *J. Struct. Biol.*, **118**, 63-72.

GOHLKE,P., KUWER,I., BARTENBACH,S., SCHNELL,A. & UNGER,T. (1994). Effect of low-dose treatment with perindopril on cardiac function in stroke-prone spontaneously hypertensive rats: role of bradykinin. *J Cardiovasc. Pharmacol.*, **24**, 462-469.

GOHLKE,P., KUWER,I., SCHNELL,A., AMANN,K., MALL,G. & UNGER,T. (1997). Blockade of bradykinin B2 receptors prevents the increase in capillary density induced by chronic angiotensin-converting enzyme inhibitor treatment in stroke-prone spontaneously hypertensive rats. *Hypertension*, **29**, 478-482.

GOHLKE,P., LINZ,W., SCHOLKENS,B., VAN,E.P., MARTORANA,P. & UNGER,T. (1996). Vascular and cardiac protection by ramipril in spontaneously hypertensive rats: prevention versus regression study. *Br. J Clin. Pract. Suppl*, **84**, 1-10.

GOHLKE,P., PEES,C. & UNGER,T. (1998). AT2 receptor stimulation increases aortic cyclic GMP in SHRSP by a kinin-dependent mechanism. *Hypertension*, **31**, 349-355.

GOLSER,R., GORREN,A.C., LEBER,A., ANDREW,P., HABISCH,H.J., WERNER,E.R., SCHMIDT,K., VENEMA,R.C. & MAYER,B. (2000). Interaction of endothelial and neuronal nitric-oxide synthases with the bradykinin B2 receptor. Binding of an inhibitory peptide to the oxygenase domain blocks uncoupled NADPH oxidation. *J Biol. Chem.*, **275**, 5291-5296.

GONZALEZ,A., LOPEZ,B., RAVASSA,S., QUEREJETA,R., LARMAN,M., DIEZ,J. & FORTUNO,M.A. (2002). Stimulation of cardiac apoptosis in essential hypertension: potential role of angiotensin II. *Hypertension*, **39**, 75-80.

GOSSE,P. (2005). Left ventricular hypertrophy as a predictor of cardiovascular risk. *J Hypertens. Suppl*, **23**, S27-S33.

GOTTDIENER,J.S., REDA,D.J., MASSIE,B.M., MATERSON,B.J., WILLIAMS,D.W. & ANDERSON,R.J. (1997). Effect of single-drug therapy on reduction of left ventricular mass in mild to moderate hypertension: comparison of six antihypertensive agents. The Department of Veterans Affairs Cooperative Study Group on Antihypertensive Agents. *Circulation*, **95**, 2007-2014.

GRADMAN,A.H. & ALFAYOUMI,F. (2006). From left ventricular hypertrophy to congestive heart failure: management of hypertensive heart disease. *Prog. Cardiovasc. Dis.*, **48**, 326-341.

GRASL-KRAUPP,B., RUTTKAY-NEDECKY,B., KOUDELKA,H., BUKOWSKA,K., BURSCH,W. & SCHULTE-HERMANN,R. (1995). In situ detection of fragmented DNA (TUNEL assay) fails to discriminate among apoptosis, necrosis, and autolytic cell death: a cautionary note. *Hepatology*, **21**, 1465-1468.

GRAY,M.O., LONG,C.S., KALINYAK,J.E., LI,H.T. & KARLINER,J.S. (1998). Angiotensin II stimulates cardiac myocyte hypertrophy via paracrine release of TGF-beta 1 and endothelin-1 from fibroblasts. *Cardiovasc. Res.*, **40**, 352-363.

GRAY,S.D. (1984). Spontaneous hypertension in the neonatal rat. A review. *Clin Exp Hypertens A*, **6**, 755-781.

GREEN,D.R. & KROEMER,G. (2004). The pathophysiology of mitochondrial cell death. *Science*, **305**, 626-629.

GREEN,D.R. & KROEMER,G. (2005). Pharmacological manipulation of cell death: clinical applications in sight? *J Clin. Invest.*, **115**, 2610-2617.

GREENE,E.L., VELARDE,V. & JAFFA,A.A. (2000). Role of reactive oxygen species in bradykinin-induced mitogen-activated protein kinase and c-fos induction in vascular cells. *Hypertension*, **35**, 942-947.

GRIFFIN,S.A., BROWN,W.C., MACPHERSON,F., MCGRATH,J.C., WILSON,V.G., KORSGAARD,N., MULVANY,M.J. & LEVER,A.F. (1991). Angiotensin II causes vascular hypertrophy in part by a non-pressor mechanism. *Hypertension*, **17**, 626-635.

GROHOLM,T., FINCKENBERG,P., PALOJOKI,E., SARASTE,A., BACKLUND,T., ERIKSSON,A., LAINE,M., MERVAALA,E. & TIKKANEN,I. (2004). Cardioprotective effects of vasopeptidase inhibition vs. angiotensin type 1-receptor blockade in spontaneously hypertensive rats on a high salt diet. *Hypertens. Res.*, **27**, 609-618.

GROSS,A., YIN,X.M., WANG,K., WEI,M.C., JOCKEL,J., MILLIMAN,C., ERDJUMENT-BROMAGE,H., TEMPST,P. & KORSMEYER,S.J. (1999). Caspase cleaved BID targets mitochondria and is required for cytochrome c release, while BCL-XL prevents this release but not tumor necrosis factor-R1/Fas death. *J Biol. Chem.*, **274**, 1156-1163.

GUERRA,S., LERIA,A., WANG,X., FINATO,N., DI,L.C., BELTRAMI,C.A., KAJSTURA,J. & ANVERSA,P. (1999). Myocyte death in the failing human heart is gender dependent. *Circ. Res.*, **85**, 856-866.

GUNDERSEN,H.J. (1977). Notes on the estimation of the numerical density of arbitrary profiles: the edge effect. *J Microsc.*, **111**, 219-227.

GUNTHER,J., DHEIN,S., ROSEN,R., KLAUS,W. & FRICKE,U. (1992). Nitric oxide (EDRF) enhances the vasorelaxing effect of nitrendipine in various isolated arteries. *Basic Res. Cardiol.*, **87**, 452-460.

HAGIWARA,M., MURAKAMI,H., URA,N., AGATA,J., YOSHIDA,H., HIGASHIURA,K. & SHIMAMOTO,K. (2004). Renal protective role of bradykinin B1 receptor in stroke-prone spontaneously hypertensive rats. *Hypertens. Res.*, **27**, 399-408.

HAGOOD,J.S., PRABHAKARAN,P., KUMBLA,P., SALAZAR,L., MACEWEN,M.W., BARKER,T.H., ORTIZ,L.A., SCHOEB,T., SIEGAL,G.P., ALEXANDER,C.B., PARDO,A. & SELMAN,M. (2005). Loss of fibroblast Thy-1 expression correlates with lung fibrogenesis. *Am. J Pathol.*, **167**, 365-379.

HAJNOCZKY,G., DAVIES,E. & MADESH,M. (2003). Calcium signaling and apoptosis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **304**, 445-454.

HALE,T., DUGUAY,D. & DEBLOIS,D. (2006). Apoptosis: molecular mechanisms in hypertension. In *Molecular mechanisms in hypertension*. ed. Re RN, DiPetteDJ, Schiffrin EL & Sowers JR. pp. 275-290. Abingdon: Taylor & Francis.

HAMET,P., DEBLOIS,D., DAM,T.V., RICHARD,L., TEIGER,E., TEA,B.S., ORLOV,S.N. & TREMBLAY,J. (1996). Apoptosis and vascular wall remodeling in hypertension. *Can. J. Physiol Pharmacol.*, **74**, 850-861.

HAMET,P., HADRAVA,V., KRUPPA,U. & TREMBLAY,J. (1991). Transforming growth factor beta 1 expression and effect in aortic smooth muscle cells from spontaneously hypertensive rats. *Hypertension*, **17**, 896-901.

HAMET,P., RICHARD,L., DAM,T.V., TEIGER,E., ORLOV,S.N., GABOURY,L., GOSSARD,F. & TREMBLAY,J. (1995). Apoptosis in target organs of hypertension. *Hypertension*, **26**, 642-648.

HAMET,P., THORIN-TRESCASES,N., MOREAU,P., DUMAS,P., TEA,B.S., DEBLOIS,D., KREN,V., PRAVENEC,M., KUNES,J., SUN,Y. & TREMBLAY,J. (2001). Workshop: excess growth and apoptosis: is hypertension a case of accelerated aging of cardiovascular cells? *Hypertension*, **37**, 760-766.

HANNUN,Y.A. & LINARDIC,C.M. (1993). Sphingolipid breakdown products: anti-proliferative and tumor-suppressor lipids. *Biochim. Biophys. Acta*, **1154**, 223-236.

HANNUN,Y.A. & OBEID,L.M. (1995). Ceramide: an intracellular signal for apoptosis. *Trends Biochem. Sci.*, **20**, 73-77.

HANSEN,J.L., SERVANT,G., BARANSKI,T.J., FUJITA,T., IIRI,T. & SHEIKH,S.P. (2000). Functional reconstitution of the angiotensin II type 2 receptor and G(i) activation. *Circ. Res.*, **87**, 753-759.

HARDER,D.R., SMEDA,J. & LOMBARD,J. (1985). Enhanced myogenic depolarization in hypertensive cerebral arterial muscle. *Circ. Res.*, **57**, 319-322.

HARTMAN,J.C., WALL,T.M., HULLINGER,T.G. & SHEBUSKI,R.J. (1993). Reduction of myocardial infarct size in rabbits by ramiprilat: reversal by the bradykinin antagonist HOE 140. *J Cardiovasc. Pharmacol.*, **21**, 996-1003.

HAYASHI,K., OZAWA,Y., FUJIWARA,K., WAKINO,S., KUMAGAI,H. & SARUTA,T. (2003). Role of actions of calcium antagonists on efferent arterioles--with special references to glomerular hypertension. *Am. J Nephrol.*, **23**, 229-244.

HE,J. & WHELTON,P.K. (1997). Epidemiology and prevention of hypertension. *Med. Clin. North Am.*, **81**, 1077-1097.

HEGERTY,A.M., AALKJAER,C., BUND,S.J., KORSGAARD,N. & MULVANY,M.J. (1993). Small artery structure in hypertension. Dual processes of remodeling and growth. *Hypertension*, **21**, 391-397.

HEIDER,J.G., WEINSTEIN,D.B., PICKENS,C.E., LAN,S. & SU,C.M. (1987). Anti-atherogenic activity of the calcium channel blocker isradipine (PN-200-110): a novel effect on matrix synthesis independent of calcium channel blockade. *Transplant. Proc.*, **19**, 96-101.

HEIN,L., BARSH,G.S., PRATT,R.E., DZAU,V.J. & KOBILKA,B.K. (1995). Behavioural and cardiovascular effects of disrupting the angiotensin II type-2 receptor in mice. *Nature*, **377**, 744-747.

HEIN,L., MEINEL,L., PRATT,R.E., DZAU,V.J. & KOBILKA,B.K. (1997). Intracellular trafficking of angiotensin II and its AT1 and AT2 receptors: Evidence for selective sorting of receptor and ligand. *Mol Endocrinol*, **11**, 1266-1277.

HEINEKE,J. & MOLKENTIN,J.D. (2006). Regulation of cardiac hypertrophy by intracellular signalling pathways. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **7**, 589-600.

HEINRICH,M., WICKEL,M., WINOTO-MORBACH,S., SCHNEIDER-BRACHERT,W., WEBER,T., BRUNNER,J., SAFTIG,P., PETERS,C., KRONKE,M. & SCHUTZE,S. (2000). Ceramide as an activator lipid of cathepsin D. *Adv. Exp. Med. Biol.*, **477**, 305-315.

HEMMING,M.L. & SELKOE,D.J. (2005). Amyloid beta-protein is degraded by cellular angiotensin-converting enzyme (ACE) and elevated by an ACE inhibitor. *J Biol. Chem.*, **280**, 37644-37650.

HEMPEL,A., LINDSCHAU,C., MAASCH,C., MAHN,M., BYCHKOV,R., NOLL,T., LUFT,F.C. & HALLER,H. (1999). Calcium antagonists ameliorate ischemia-induced endothelial cell permeability by inhibiting protein kinase C. *Circulation*, **99**, 2523-2529.

HENGARTNER,M.O. & HORVITZ,H.R. (1994). C. elegans cell survival gene ced-9 encodes a functional homolog of the mammalian proto-oncogene bcl-2. *Cell*, **76**, 665-676.

HENRION,D., KUBIS,N. & LEVY,B.I. (2001). Physiological and pathophysiological functions of the AT(2) subtype receptor of angiotensin II: from large arteries to the microcirculation. *Hypertension*, **38**, 1150-1157.

HEREMBERG,T., ZHU,D.L. & MARCHE,P. (1995). Mechanism of action of the inhibitory effect of nifedipine on the growth of cultured aortic cells from spontaneously hypertensive and normotensive rats. *Br. J. Pharmacol.*, **114**, 1703-1709.

HERNANDEZ-HERNANDEZ,R., RMAS-PADILLA,M.C., VELASCO,M., CARVAJAL,A.R., RMAS DE HERNANDEZ,M.J., GUERRERO-PAJUELO,J. & PACHECO,B. (1999). Effects of amlodipine and enalapril on platelet function in patients with mild to moderate hypertension. *Int. J Clin. Pharmacol. Ther.*, **37**, 323-331.

HEUSCH,G., ROSE,J. & EHRING,T. (1997). Cardioprotection by ACE inhibitors in myocardial ischaemia/reperfusion. The importance of bradykinin. *Drugs*, **54 Suppl 5**, 31-41.

HIRATA,R., NABE,T. & KOHNO,S. (2003). Augmentation of spontaneous cough by enalapril through up-regulation of bradykinin B1 receptors in guinea pigs. *Eur. J Pharmacol.*, **474**, 255-260.

HIXON,M.L., MURO-CACHO,C., WAGNER,M.W., OBEJERO-PAZ,C., MILLIE,E., FUJIO,Y., KUREISHI,Y., HASSOLD,T., WALSH,K. & GUALBERTO,A. (2000a). Akt1/PKB upregulation leads to vascular smooth muscle cell hypertrophy and polyploidization. *J Clin. Invest.*, **106**, 1011-1020.

HIXON,M.L., OBEJERO-PAZ,C., MURO-CACHO,C., WAGNER,M.W., MILLIE,E., NAGY,J., HASSOLD,T.J. & GUALBERTO,A. (2000b). Cks1 mediates vascular smooth muscle cell polyploidization. *J. Biol. Chem.*, **275**, 40434-40442.

HIYOSHI,H., YAYAMA,K., TAKANO,M. & OKAMOTO,H. (2005). Angiotensin type 2 receptor-mediated phosphorylation of eNOS in the aortas of mice with 2-kidney, 1-clip hypertension. *Hypertension*, **45**, 967-973.

HORIUCHI,M., AKISHITA,M. & DZAU,V.J. (1998). Molecular and cellular mechanism of angiotensin II-mediated apoptosis. *Endocr Res*, **24**, 307-314.

HORIUCHI,M., AKISHITA,M. & DZAU,V.J. (1999). Recent progress in angiotensin II type 2 receptor research in the cardiovascular system. *Hypertension*, **33**, 613-621.

HORIUCHI,M., HAYASHIDA,W., KAMBE,T., YAMADA,T. & DZAU,V.J. (1997). Angiotensin type 2 receptor dephosphorylates Bcl-2 by activating mitogen-activated protein kinase phosphatase-1 and induces apoptosis. *J Biol Chem*, **272**, 19022-19026.

ICHIHARA,A., KANESHIRO,Y., TAKEMITSU,T., SAKODA,M., SUZUKI,F., NAKAGAWA,T., NISHIYAMA,A., INAGAMI,T. & HAYASHI,M. (2006). Nonproteolytic activation of prorenin contributes to development of cardiac fibrosis in genetic hypertension. *Hypertension*, **47**, 894-900.

IGNJATOVIC,T., TAN,F., BROVKOVYCH,V., SKIDGEL,R.A. & ERDOS,E.G. (2002). Novel mode of action of angiotensin I converting enzyme inhibitors: direct activation of bradykinin B1 receptor. *J. Biol. Chem.*, **277**, 16847-16852.

INADA,H., ONO,H., MINAMI,J., ISHIMITSU,T. & MATSUOKA,H. (2002). Nipradilol prevents L-NAME-exacerbated nephrosclerosis with decreasing of caspase-3 expression in SHR. *Hypertens. Res.*, **25**, 433-440.

INTENGAN,H.D. & SCHIFFRIN,E.L. (2000). Structure and mechanical properties of resistance arteries in hypertension: role of adhesion molecules and extracellular matrix determinants. *Hypertension*, **36**, 312-318.

INTENGAN,H.D. & SCHIFFRIN,E.L. (2001). Vascular remodeling in hypertension: roles of apoptosis, inflammation, and fibrosis. *Hypertension*, **38**, 581-587.

IREDALE,J.P. (2001). Hepatic stellate cell behavior during resolution of liver injury. *Semin. Liver Dis.*, **21**, 427-436.

ISRAEL,A., CIERCO,M. & SOSA,B. (2000). Angiotensin AT(2) receptors mediate vasodepressor response to footshock in rats. Role of kinins, nitric oxide and prostaglandins. *Eur. J Pharmacol.*, **394**, 103-108.

ITOH,H., MUKOYAMA,M., PRATT,R.E., GIBBONS,G.H. & DZAU,V.J. (1993). Multiple autocrine growth factors modulate vascular smooth muscle cell growth response to angiotensin II. *J Clin Invest*, **91**, 2268-2274.

IWAI-KANAIE, E., HASEGAWA, K., ARAKI, M., KAKITA, T., MORIMOTO, T. & SASAYAMA, S. (1999). alpha- and beta-adrenergic pathways differentially regulate cell type-specific apoptosis in rat cardiac myocytes. *Circulation*, **100**, 305-311.

IZZARD, A.S., BUND, S.J. & HEAGERTY, A.M. (1996). Increased wall-lumen ratio of mesenteric vessels from the spontaneously hypertensive rat is not associated with increased contractility under isobaric conditions. *Hypertension*, **28**, 604-608.

JACKSON, C.L. & SCHWARTZ, S.M. (1992). Pharmacology of smooth muscle cell replication. *Hypertension*, **20**, 713-736.

JACKSON, T.R., BLAIR, L.A., MARSHALL, J., GOEDERT, M. & HANLEY, M.R. (1988). The mas oncogene encodes an angiotensin receptor. *Nature*, **335**, 437-440.

JACKSON, Z.S., DAJNOWIEC, D., GOTLIEB, A.I. & LANGILLE, B.L. (2005). Partial off-loading of longitudinal tension induces arterial tortuosity. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, **25**, 957-962.

JACKSON, Z.S., GOTLIEB, A.I. & LANGILLE, B.L. (2002). Wall tissue remodeling regulates longitudinal tension in arteries. *Circ. Res.*, **90**, 918-925.

JALOWY, A., SCHULZ, R., DORGE, H., BEHREND, M. & HEUSCH, G. (1998). Infarct size reduction by AT1-receptor blockade through a signal cascade of AT2-receptor activation, bradykinin and prostaglandins in pigs. *J Am. Coll. Cardiol.*, **32**, 1787-1796.

JEFFERS, J.R., PARGANAS, E., LEE, Y., YANG, C., WANG, J., BRENNAN, J., MACLEAN, K.H., HAN, J., CHITTENDEN, T., IHLE, J.N., MCKINNON, P.J., CLEVELAND, J.L. & ZAMBETTI, G.P. (2003). Puma is an essential mediator of p53-dependent and -independent apoptotic pathways. *Cancer Cell*, **4**, 321-328.

JESPERSEN, L.T., NYBORG, N.C., PEDERSEN, O.L., MIKKELSEN, E.O. & MULVANY, M.J. (1985). Cardiac mass and peripheral vascular structure in hydralazine-treated spontaneously hypertensive rats. *Hypertension*, **7**, 734-741.

JILMA, B., LI-SAW-HEE, F.L., WAGNER, O.F., BEEVERS, D.G. & LIP, G.Y. (2002). Effects of enalapril and losartan on circulating adhesion molecules and monocyte chemoattractant protein-1. *Clin. Sci. (Lond)*, **103**, 131-136.

JOFFRES, M.R., HAMET, P., MACLEAN, D.R. & ET AL. (2001). Distribution of blood pressure and hypertension in Canada and the United States. *Am J Hypertens*, **14**, 1099-1105.

JOHNS, D.G., OSBORN, H. & WEBB, R.C. (1997). Ceramide: a novel cell signaling mechanism for vasodilation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **237**, 95-97.

JONES, L.R., SUZUKI, Y.J., WANG, W., KOBAYASHI, Y.M., RAMESH, V., FRANZINI-ARMSTRONG, C., CLEEMANN, L. & MORAD, M. (1998). Regulation of Ca<sup>2+</sup> signaling in transgenic mouse cardiac myocytes overexpressing caldesmon. *J Clin. Invest.*, **101**, 1385-1393.

JONES,M.J. & MURRAY,A.W. (1995). Evidence that ceramide selectively inhibits protein kinase C-alpha translocation and modulates bradykinin activation of phospholipase D. *J Biol. Chem.*, **270**, 5007-5013.

JUNTTI-BERGGREN,L., LARSSON,O., RORSMAN,P., AMMALA,C., BOKVIST,K., WAHLANDER,K., NICOTERA,P., DYPBUKT,J., ORRENIUS,S., HALLBERG,A. & . (1993). Increased activity of L-type Ca<sup>2+</sup> channels exposed to serum from patients with type I diabetes. *Science*, **261**, 86-90.

JURUKOVA,Z., HADJISKY,P., RENAI,S., & SCEBAT,L. (1976). Aortic smooth muscle cells reaction in rat spontaneous hypertension. *Pathol. Eur.*, **11**, 105-115.

KAHL,C.R. & MEANS,A.R. (2003). Regulation of cell cycle progression by calcium/calmodulin-dependent pathways. *Endocr. Rev.*, **24**, 719-736.

KAJSTURA,J., CIGOLA,E., MALHOTRA,A., LI,P., CHENG,W., MEGGS,L.G. & ANVERSA,P. (1997). Angiotensin II induces apoptosis of adult ventricular myocytes in vitro. *J Mol Cell Cardiol*, **29**, 859-870.

KAJSTURA,J., MANSUKHANI,M., CHENG,W., REISS,K., KRAJEWSKI,S., REED,J.C., QUAINI,F., SONNENBLICK,E.H. & ANVERSA,P. (1995). Programmed cell death and expression of the protooncogene bcl-2 in myocytes during postnatal maturation of the heart. *Exp. Cell Res.*, **219**, 110-121.

KAMIYA,A. & TOGAWA,T. (1980). Adaptive regulation of wall shear stress to flow change in the canine carotid artery. *Am. J Physiol*, **239**, H14-H21.

KANG,D.S., RYBERG,K., MORGELIN,M. & LEEB-LUNDBERG,L.M. (2004). Spontaneous formation of a proteolytic B1 and B2 bradykinin receptor complex with enhanced signaling capacity. *J Biol. Chem.*, **279**, 22102-22107.

KANO,H., TAKEMURA,G., MISAO,J., HAYAKAWA,Y., AOYAMA,T., NISHIGAKI,K., NODA,T., FUJIWARA,T., FUKUDA,K., MINATOGUCHI,S. & FUJIWARA,H. (1999). Significance of myocytes with positive DNA in situ nick end-labeling (TUNEL) in hearts with dilated cardiomyopathy: not apoptosis but DNA repair. *Circulation*, **99**, 2757-2764.

KATADA,J. & MAJIMA,M. (2002). AT(2) receptor-dependent vasodilation is mediated by activation of vascular kinin generation under flow conditions. *Br. J Pharmacol.*, **136**, 484-491.

KATUSIC,Z.S. (2001). Vascular endothelial dysfunction: does tetrahydrobiopterin play a role? *Am. J. Physiol Heart Circ. Physiol*, **281**, H981-H986.

KEARNEY,P.M., WHELTON,M., REYNOLDS,K., MUNTNER,P., WHELTON,P.K. & HE,J. (2005). Global burden of hypertension: analysis of worldwide data. *Lancet*, **365**, 217-223.

KEMPF,T. & WOLLERT,K.C. (2004). Nitric oxide and the enigma of cardiac hypertrophy. *Bioessays*, **26**, 608-615.

KERR,J.F., WYLLIE,A.H. & CURRIE,A.R. (1972). Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer*, **26**, 239-257.

KIEFER,F.N., NEYSARI,S., HUMAR,R., LI,W., MUNK,V.C. & BATTEGAY,E.J. (2003). Hypertension and angiogenesis. *Curr. Pharm. Des*, **9**, 1733-1744.

KIM,S. & IWAO,H. (1999). Activation of mitogen-activated protein kinases in cardiovascular hypertrophy and remodeling. *Jpn J Pharmacol*, **80**, 97-102.

KIM,S., MURAKAMI,T., IZUMI,Y., YANO,M., MIURA,K., YAMANAKA,S. & IWAO,H. (1997). Extracellular signal-regulated kinase and c-Jun NH2-terminal kinase activities are continuously and differentially increased in aorta of hypertensive rats. *Biochem Biophys Res Commun*, **236**, 199-204.

KIM,S., OHTA,K., HAMAGUCHI,A., MIURA,K., YUKIMURA,T. & IWAO,H. (1995). Suppression of vascular transforming growth factor-beta1 and extracellular matrix gene expressions by cilazapril and nifedipine in hypertensive rats. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol Suppl*, **22**, S355-S356.

KIM,S., ZHAN,Y., IZUMI,Y. & IWAO,H. (2000). Cardiovascular effects of combination of perindopril, candesartan, and amlodipine in hypertensive rats. *Hypertension*, **35**, 769-774.

KINTSURASHVILI,E., DUKA,I., GAVRAS,I., JOHNS,C., FARMAKIOTIS,D. & GAVRAS,H. (2001). Effects of ANG II on bradykinin receptor gene expression in cardiomyocytes and vascular smooth muscle cells. *Am. J Physiol Heart Circ. Physiol*, **281**, H1778-H1783.

KITAKAZE,M., ASANUMA,H., TAKASHIMA,S., MINAMINO,T., UEDA,Y., SAKATA,Y., ASAKURA,M., SANADA,S., KUZUYA,T. & HORI,M. (2000). Nifedipine-induced coronary vasodilation in ischemic hearts is attributable to bradykinin- and NO-dependent mechanisms in dogs. *Circulation*, **101**, 311-317.

KLEIN,L., O'CONNOR,C.M., GATTIS,W.A., ZAMPINO,M., DE,L.L., VITARELLI,A., FEDELE,F. & GHEORGHIADE,M. (2003). Pharmacologic therapy for patients with chronic heart failure and reduced systolic function: review of trials and practical considerations. *Am. J Cardiol.*, **91**, 18F-40F.

KLEINE,L., LIU,G., LEBLANC,N. & HEBERT,R.L. (2002). Bradykinin stimulates ceramide production by activating specific BK-B(1) receptor in rat small artery. *Am. J Physiol Heart Circ. Physiol*, **282**, H175-H183.

KLETT,C.P., PALMER,A.A., DIRIG,D.M., GALLAGHER,A.M., RIOSECCO-CAMACHO,N. & PRINTZ,M.P. (1995). Evidence for differences in cultured left ventricular fibroblast populations isolated from spontaneously hypertensive and Wistar-Kyoto rats. *J. Hypertens.*, **13**, 1421-1431.

KLINGBEIL,A.U., SCHNEIDER,M., MARTUS,P., MESSERLI,F.H. & SCHMIEDER,R.E. (2003). A meta-analysis of the effects of treatment on left ventricular mass in essential hypertension. *Am. J Med.*, **115**, 41-46.

KLONOWSKI-STUMPE,H., FISCHER,R., REINEHR,R., LUTHEN,R. & HAUSSINGER,D. (2002). Apoptosis in activated rat pancreatic stellate cells. *Am. J. Physiol Gastrointest. Liver Physiol*, **283**, G819-G826.

KLUCK,R.M., MCDUGALL,C.A., HARMON,B.V. & HALLIDAY,J.W. (1994). Calcium chelators induce apoptosis--evidence that raised intracellular ionised calcium is not essential for apoptosis. *Biochim. Biophys. Acta*, **1223**, 247-254.

KOCKX,M.M., MUHRING,J., KNAAPEN,M.W. & DE MEYER,G.R. (1998). RNA synthesis and splicing interferes with DNA in situ end labeling techniques used to detect apoptosis. *Am J Pathol*, **152**, 885-888.

KOHLSTEDT,K., BUSSE,R. & FLEMING,I. (2005). Signaling via the angiotensin-converting enzyme enhances the expression of cyclooxygenase-2 in endothelial cells. *Hypertension*, **45**, 126-132.

KOIKE,G., HORIUCHI,M., YAMADA,T., SZPIRER,C., JACOB,H.J. & DZAU,V.J. (1994). Human type 2 angiotensin II receptor gene: cloned, mapped to the X chromosome, and its mRNA is expressed in the human lung. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **203**, 1842-1850.

KOIKE,G., WINER,E.S., HORIUCHI,M., BROWN,D.M., SZPIRER,C., DZAU,V.J. & JACOB,H.J. (1995). Cloning, characterization, and genetic mapping of the rat type 2 angiotensin II receptor gene. *Hypertension*, **26**, 998-1002.

KOLONIN,M.G., SAHA,P.K., CHAN,L., PASQUALINI,R. & ARAP,W. (2004). Reversal of obesity by targeted ablation of adipose tissue. *Nat. Med.*, **10**, 625-632.

KONDO,S., YIN,D., MORIMURA,T. & TAKEUCHI,J. (1995). Combination therapy with cisplatin and nifedipine inducing apoptosis in multidrug-resistant human glioblastoma cells. *J Neurosurg.*, **82**, 469-474.

KOSEKI,T., INOHARA,N., CHEN,S. & NUNEZ,G. (1998). ARC, an inhibitor of apoptosis expressed in skeletal muscle and heart that interacts selectively with caspases. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **95**, 5156-5160.

KOSTENIS,E., MILLIGAN,G., CHRISTOPOULOS,A., SANCHEZ-FERRER,C.F., HERINGER-WALTHER,S., SEXTON,P.M., GEMBARDT,F., KELLETT,E., MARTINI,L., VANDERHEYDEN,P., SCHULTHEISS,H.P. & WALTHER,T. (2005). G-protein-coupled receptor Mas is a physiological antagonist of the angiotensin II type 1 receptor. *Circulation*, **111**, 1806-1813.

KOTHAKOTA,S., AZUMA,T., REINHARD,C., KLIPPEL,A., TANG,J., CHU,K., MCGARRY,T.J., KIRSCHNER,M.W., KOTHS,K., KWIATKOWSKI,D.J. & WILLIAMS,L.T. (1997). Caspase-3-generated fragment of gelsolin: effector of morphological change in apoptosis. *Science*, **278**, 294-298.

KURISU,S., OZONO,R., OSHIMA,T., KAMBE,M., ISHIDA,T., SUGINO,H., MATSUURA,H., CHAYAMA,K., TERANISHI,Y., IBA,O., AMANO,K. & MATSUBARA,H. (2003). Cardiac angiotensin II type 2 receptor activates the kinin/NO system and inhibits fibrosis. *Hypertension*, **41**, 99-107.

KUSUHARA,M., TAKAHASHI,E., PETERSON,T.E., ABE,J., ISHIDA,M., HAN,J., ULEVITCH,R. & BERK,B.C. (1998). p38 Kinase is a negative regulator of angiotensin II signal transduction in vascular smooth muscle cells: effects on Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchange and ERK1/2. *Circ Res*, **83**, 824-831.

KYRIAKIS,J.M., APP,H., ZHANG,X.F., BANERJEE,P., BRAUTIGAN,D.L., RAPP,U.R. & AVRUCH,J. (1992). Raf-1 activates MAP kinase-kinase. *Nature*, **358**, 417-421.

LACOURCIERE,Y., BELIVEAU,R., CONTER,H.S., BURGESS,E.D., LEPAGE,S., PESANT,Y., SPENCE,J.D., ASMAR,R., CARRIERE,S. & PLANTE,G.E. (2004). Effects of perindopril on elastic and structural properties of large arteries in essential hypertension. *Can. J Cardiol.*, **20**, 795-799.

LAGNEUX,C., JOYEUX,M., BRICCA,G., DEMENGE,P. & RIBUOT,C. (2000). Hypertension in transgenic (mREN2)27 rats is not associated with the presence of B1 receptors. *Fundam. Clin. Pharmacol.*, **14**, 119-123.

LAI,Y.M., FUKUDA,N., SU,J.Z., SUZUKI,R., IKEDA,Y., TAKAGI,H., TAHIRA,Y. & KANMATSUSE,K. (2002). Novel mechanisms of the antiproliferative effects of amlodipine in vascular smooth muscle cells from spontaneously hypertensive rats. *Hypertens. Res.*, **25**, 109-115.

LAMONTAGNE,D., NAKHOSTINE,N., COUTURE,R. & NADEAU,R. (1996). Mechanisms of kinin B1-receptor-induced hypotension in the anesthetized dog. *J Cardiovasc. Pharmacol.*, **28**, 645-650.

LANE,A., JOHNSON,D.W., PAT,B., WINTERFORD,C., ENDRE,Z., WEI,M. & GOBE,G.C. (2002). Interacting roles of myofibroblasts, apoptosis and fibrogenic growth factors in the pathogenesis of renal tubulo-interstitial fibrosis. *Growth Factors*, **20**, 109-119.

LANGER,S.Z., CAVERO,I. & MASSINGHAM,R. (1980). Recent developments in noradrenergic neurotransmission and its relevance to the mechanism of action of certain antihypertensive agents. *Hypertension*, **2**, 372-382.

LAPLANTE,P., RAYMOND,M.A., LABELLE,A., ABE,J., IOZZO,R.V. & HEBERT,M.J. (2006). Perlecan proteolysis induces an alpha2beta1 integrin- and Src family kinase-dependent anti-apoptotic pathway in fibroblasts in the absence of focal adhesion kinase activation. *J Biol. Chem.*, **281**, 30383-30392.

LARRIVEE,J.F., BACHVAROV,D.R., HOULE,F., LANDRY,J., HUOT,J. & MARCEAU,F. (1998). Role of the mitogen-activated protein kinases in the expression of the kinin B1 receptors induced by tissue injury. *J Immunol.*, **160**, 1419-1426.

LAURENT,G.J. (1987). Dynamic state of collagen: pathways of collagen degradation in vivo and their possible role in regulation of collagen mass. *Am. J Physiol*, **252**, C1-C9.

LAURENT,S., BOUTOUYRIE,P., ASMAR,R., GAUTIER,I., LALOUX,B., GUIZE,L., DUCIMETIERE,P. & BENETOS,A. (2001). Aortic stiffness is an independent predictor of all-cause and cardiovascular mortality in hypertensive patients. *Hypertension*, **37**, 1236-1241.

LAVIADES,C., VARO,N., FERNANDEZ,J., MAYOR,G., GIL,M.J., MONREAL,I. & DIEZ,J. (1998). Abnormalities of the extracellular degradation of collagen type I in essential hypertension. *Circulation*, **98**, 535-540.

LAZEBNIK,Y.A., KAUFMANN,S.H., DESNOYERS,S., POIRIER,G.G. & EARNSHAW,W.C. (1994). Cleavage of poly(ADP-ribose) polymerase by a proteinase with properties like ICE. *Nature*, **371**, 346-347.

LEE,H.C. (1997). Mechanisms of calcium signaling by cyclic ADP-ribose and NAADP. *Physiol Rev.*, **77**, 1133-1164.

LEE,R.M. (1987). Structural alterations of blood vessels in hypertensive rats. *Can J Physiol Pharmacol*, **65**, 1528-1535.

LEEB-LUNDBERG,L.M., MARCEAU,F., MULLER-ESTERL,W., PETTIBONE,D.J. & ZURAW,B.L. (2005). International union of pharmacology. XLV. Classification of the kinin receptor family: from molecular mechanisms to pathophysiological consequences. *Pharmacol. Rev.*, **57**, 27-77.

LEFKOWITZ,R.J. & SHENOY,S.K. (2005). Transduction of receptor signals by beta-arrestins. *Science*, **308**, 512-517.

LEHMANN,H.U., HOCHREIN,H., WITT,E. & MIES,H.W. (1983). Hemodynamic effects of calcium antagonists. Review. *Hypertension*, **5**, II66-II73.

LEHTONEN,J.Y., HORIUCHI,M., DAVIET,L., AKISHITA,M. & DZAU,V.J. (1999). Activation of the de novo biosynthesis of sphingolipids mediates angiotensin II type 2 receptor-induced apoptosis. *J Biol Chem*, **274**, 16901-16906.

LEIST,M. & JÄÄTTELÄ,M. (2001). Four deaths and a funeral: from caspases to alternative mechanisms. *Mol Cell Biology*, **2**, 589-598.

LEIST,M., SINGLE,B., CASTOLDI,A.F., KUHNLE,S. & NICOTERA,P. (1997). Intracellular adenosine triphosphate (ATP) concentration: a switch in the decision between apoptosis and necrosis. *J Exp Med*, **185**, 1481-1486.

LEMAY,J., HAMET,P. & DEBLOIS,D. (2000). Losartan-induced apoptosis as a novel mechanism for the prevention of vascular lesion formation after injury. *J Renin. Angiotensin. Aldosterone. Syst.*, **1**, 46-50.

LEMAY,J., TEA,B.S., HAMET,P. & DEBLOIS,D. (2001). Regression of neointimal lesions in the carotid artery of nifedipine-treated SHR and WKY rats: possible role of apoptosis. *J. Vasc. Res.*, **38**, 462-470.

LENASI,H., KOHLSTEDT,K., FICHTLSCHERER,B., MULSCH,A., BUSSE,R. & FLEMING,I. (2003). Amlodipine activates the endothelial nitric oxide synthase by altering phosphorylation on Ser1177 and Thr495. *Cardiovasc. Res.*, **59**, 844-853.

LERI,A., CLAUDIO,P.P., LI,Q., WANG,X., REISS,K., WANG,S., MALHOTRA,A., KAJSTURA,J. & ANVERSA,P. (1998). Stretch-mediated release of angiotensin II induces myocyte apoptosis by activating p53 that enhances the local renin-angiotensin system and decreases the Bcl-2-to-Bax protein ratio in the cell. *J. Clin. Invest.*, **101**, 1326-1342.

LERMAN,L.O., CHADE,A.R., SICA,V. & NAPOLI,C. (2005). Animal models of hypertension: an overview. *J Lab Clin. Med.*, **146**, 160-173.

LESAUSKAITE,V., EPISTOLATO,M.C., IVANOVIENE,L. & TANGANELLI,P. (2004). Apoptosis of cardiomyocytes in explanted and transplanted hearts. Comparison of results from in situ TUNEL, ISEL, and ISOL reactions. *Am. J. Clin. Pathol.*, **121**, 108-116.

LESZCZYNSKI,D., ZHAO,Y., LUOKKAMAKI,M. & FOEGH,M.L. (1994). Apoptosis of vascular smooth muscle cells. Protein kinase C and oncoprotein Bcl-2 are involved in regulation of apoptosis in non-transformed rat vascular smooth muscle cells. *Am. J Pathol.*, **145**, 1265-1270.

LEVY,B.I., BENESSIANO,J., HENRION,D., CAPUTO,L., HEYMES,C., DURIEZ,M., POITEVIN,P. & SAMUEL,J.L. (1996). Chronic blockade of AT2-subtype receptors prevents the effect of angiotensin II on the rat vascular structure. *J Clin. Invest.*, **98**, 418-425.

LEVY,B.I., DURIEZ,M., PHILLIPE,M., POITEVIN,P. & MICHEL,J.B. (1994). Effect of chronic dihydropyridine (isradipine) on the large arterial walls of spontaneously hypertensive rats. *Circulation*, **90**, 3024-3033.

LEWINGTON,S., CLARKE,R., QIZILBASH,N., PETO,R. & COLLINS,R. (2002). Age-specific relevance of usual blood pressure to vascular mortality: a meta-analysis of individual data for one million adults in 61 prospective studies. *Lancet*, **360**, 1903-1913.

LI,H.J., YIN,H., YAO,Y.Y., SHEN,B., BADER,M., CHAO,L. & CHAO,J. (2007). Tissue kallikrein protects against pressure overload-induced cardiac hypertrophy through kinin B2 receptor and glycogen synthase kinase-3beta activation. *Cardiovasc. Res.*, **73**, 130-142.

LI,L.H., WINE,R.N., MILLER,D.S., REECE,J.M., SMITH,M. & CHAPIN,R.E. (1997a). Protection against methoxyacetic-acid-induced spermatocyte apoptosis with calcium channel blockers in cultured rat seminiferous tubules: possible mechanisms. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **144**, 105-119.

LI,S., FAN,Y.S., CHOW,L.H., VAN DEN,D.C., VAN,D., V, SIMS,S.M. & PICKERING,J.G. (2001). Innate diversity of adult human arterial smooth muscle cells: cloning of distinct subtypes from the internal thoracic artery. *Circ. Res.*, **89**, 517-525.

LI,X., RUAN,G.R., LU,W.L., HONG,H.Y., LIANG,G.W., ZHANG,Y.T., LIU,Y., LONG,C., MA,X., YUAN,L., WANG,J.C., ZHANG,X. & ZHANG,Q. (2006). A novel stealth liposomal topotecan with

amlodipine: apoptotic effect is associated with deletion of intracellular  $Ca^{2+}$  by amlodipine thus leading to an enhanced antitumor activity in leukemia. *J. Control Release*, **112**, 186-198.

LI,X.C. & WIDDOP,R.E. (2004). AT<sub>2</sub> receptor-mediated vasodilatation is unmasked by AT<sub>1</sub> receptor blockade in conscious SHR. *Br. J Pharmacol.*, **142**, 821-830.

LI,Z., BING,O.H., LONG,X., ROBINSON,K.G. & LAKATTA,E.G. (1997b). Increased cardiomyocyte apoptosis during the transition to heart failure in the spontaneously hypertensive rat. *Am. J Physiol*, **272**, H2313-H2319.

LIN,A. (2003). Activation of the JNK signaling pathway: breaking the brake on apoptosis. *Bioessays*, **25**, 17-24.

LINSEMAN,D.A., BENJAMIN,C.W. & JONES,D.A. (1995). Convergence of angiotensin II and platelet-derived growth factor receptor signaling cascades in vascular smooth muscle cells. *J Biol Chem*, **270**, 12563-12568.

LINZ,W., HEITSCH,H., SCHOLKENS,B.A. & WIEMER,G. (2000). Long-term angiotensin II type 1 receptor blockade with fonsartan doubles lifespan of hypertensive rats. *Hypertension*, **35**, 908-913.

LINZ,W., JESSEN,T., BECKER,R.H., SCHOLKENS,B.A. & WIEMER,G. (1997). Long-term ACE inhibition doubles lifespan of hypertensive rats. *Circulation*, **96**, 3164-3172.

LINZ,W. & SCHOLKENS,B.A. (1992). A specific B<sub>2</sub>-bradykinin receptor antagonist HOE 140 abolishes the antihypertrophic effect of ramipril. *Br. J Pharmacol*, **105**, 771-772.

LINZ,W., WIEMER,G., GOHLKE,P., UNGER,T. & SCHOLKENS,B.A. (1995). Contribution of kinins to the cardiovascular actions of angiotensin-converting enzyme inhibitors. *Pharmacol. Rev.*, **47**, 25-49.

LITHELL,H., HANSSON,L., SKOOG,I., ELMFELDT,D., HOFMAN,A., OLOFSSON,B., TRENKWALDER,P. & ZANCHETTI,A. (2003). The Study on Cognition and Prognosis in the Elderly (SCOPE): principal results of a randomized double-blind intervention trial. *J Hypertens.*, **21**, 875-886.

LITTLEWOOD,T.D. & BENNETT,M.R. (2003). Apoptotic cell death in atherosclerosis. *Curr. Opin. Lipidol.*, **14**, 469-475.

LIU,H.R., GAO,F., TAO,L., YAN,W.L., GAO,E., CHRISTOPHER,T.A., LOPEZ,B.L., HU,A. & MA,X.L. (2004). Antiapoptotic mechanisms of benidipine in the ischemic/reperfused heart. *Br. J Pharmacol.*, **142**, 627-634.

LIU,H.W., CHENG,B., YU,W.L., SUN,R.X., ZENG,D., WANG,J., LIAO,Y.X. & FU,X.B. (2006). Angiotensin II regulates phosphoinositide 3 kinase/Akt cascade via a negative crosstalk between AT<sub>1</sub> and AT<sub>2</sub> receptors in skin fibroblasts of human hypertrophic scars. *Life Sci.*, **79**, 475-483.

LIU,J.J., PENG,L., BRADLEY,C.J., ZULLI,A., SHEN,J. & BUXTON,B.F. (2000). Increased apoptosis in the heart of genetic hypertension, associated with increased fibroblasts. *Cardiovasc. Res.*, **45**, 729-735.

LIU,Y.H., YANG,X.P., SHAROV,V.G., NASS,O., SABBAH,H.N., PETERSON,E. & CARRETERO,O.A. (1997). Effects of angiotensin-converting enzyme inhibitors and angiotensin II type 1 receptor antagonists in rats with heart failure. Role of kinins and angiotensin II type 2 receptors. *J. Clin. Invest.*, **99**, 1926-1935.

LIUWANTARA,D., ELLIOT,M., SMITH,M.W., YAM,A.O., WALTERS,S.N., MARINO,E., MCSHEA,A. & GREY,S.T. (2006). Nuclear factor-kappaB regulates beta-cell death: a critical role for A20 in beta-cell protection. *Diabetes*, **55**, 2491-2501.

LODHA,S., DANI,D., MEHTA,R., BHASKARAN,M., REDDY,K., DING,G. & SINGHAL,P.C. (2002). Angiotensin II-induced mesangial cell apoptosis: role of oxidative stress. *Mol. Med.*, **8**, 830-840.

LOKE,K.E., CURRAN,C.M., MESSINA,E.J., LAYCOCK,S.K., SHESELY,E.G., CARRETERO,O.A. & HINTZE,T.H. (1999). Role of nitric oxide in the control of cardiac oxygen consumption in B(2)-kinin receptor knockout mice. *Hypertension*, **34**, 563-567.

LOKE,K.E., MESSINA,E.J., SHESELY,E.G., KALEY,G. & HINTZE,T.H. (2001). Potential role of eNOS in the therapeutic control of myocardial oxygen consumption by ACE inhibitors and amlodipine. *Cardiovasc. Res.*, **49**, 86-93.

LONG,C.S., HENRICH,C.J. & SIMPSON,P.C. (1991). A growth factor for cardiac myocytes is produced by cardiac nonmyocytes. *Cell Regul.*, **2**, 1081-1095.

LONGO,C.R., ARVELO,M.B., PATEL,V.I., DANIEL,S., MAHIOU,J., GREY,S.T. & FERRAN,C. (2003). A20 protects from CD40-CD40 ligand-mediated endothelial cell activation and apoptosis. *Circulation*, **108**, 1113-1118.

LONN,E.M., YUSUF,S., JHA,P., MONTAGUE,T.J., TEO,K.K., BENEDICT,C.R. & PITT,B. (1994). Emerging role of angiotensin-converting enzyme inhibitors in cardiac and vascular protection. *Circulation*, **90**, 2056-2069.

LOPEZ,J.J., LORELL,B.H., INGELFINGER,J.R., WEINBERG,E.O., SCHUNKERT,H., DIAMANT,D. & TANG,S.S. (1994). Distribution and function of cardiac angiotensin AT1- and AT2-receptor subtypes in hypertrophied rat hearts. *Am J Physiol*, **267**, H844-H852.

LOPEZ-CANDALES,A., HOLMES,D.R., LIAO,S., SCOTT,M.J., WICKLINE,S.A. & THOMPSON,R.W. (1997). Decreased vascular smooth muscle cell density in medial degeneration of human abdominal aortic aneurysms. *Am. J Pathol.*, **150**, 993-1007.

MACREZ-LEPRETRE,N., MOREL,J.L. & MIRONNEAU,J. (1996). Angiotensin II-mediated activation of L-type calcium channels involves phosphatidylinositol hydrolysis-independent activation of protein kinase C in rat portal vein myocytes. *J Pharmacol. Exp. Ther.*, **278**, 468-475.

MAHMUD,A. & FEELY,J. (2004). Arterial stiffness and the renin-angiotensin-aldosterone system. *J Renin. Angiotensin. Aldosterone. Syst.*, **5**, 102-108.

MAJNO,G., GABBIANI,G., HIRSCHL,B.J., RYAN,G.B. & STATKOV,P.R. (1971). Contraction of granulation tissue in vitro: similarity to smooth muscle. *Science*, **173**, 548-550.

MANABE,I., SHINDO,T. & NAGAI,R. (2002). Gene expression in fibroblasts and fibrosis: involvement in cardiac hypertrophy. *Circ. Res.*, **91**, 1103-1113.

MANDARIM-DE-LACERDA,C.A. (2003). Stereological tools in biomedical research. *An. Acad. Bras. Cienc.*, **75**, 469-486.

MANSO,A.M., ENCABO,A., FERRER,M., BALFAGON,G., SALAICES,M. & MARIN,J. (1999). Changes of cardiac calcium homeostasis in spontaneously hypertensive rats. *J. Auton. Pharmacol.*, **19**, 123-130.

MARCEAU,F., HESS,J.F. & BACHVAROV,D.R. (1998). The B1 receptors for kinins. *Pharmacol. Rev.*, **50**, 357-386.

MARCEAU,F., LARRIVEE,J.F., BOUTHILLIER,J., BACHVAROVA,M., HOULE,S. & BACHVAROV,D.R. (1999). Effect of endogenous kinins, prostanoids, and NO on kinin B1 and B2 receptor expression in the rabbit. *Am. J Physiol*, **277**, R1568-R1578.

MARCHAND,E.L., DER,S.S., HAMET,P. & DEBLOIS,D. (2003). Caspase-dependent cell death mediates the early phase of aortic hypertrophy regression in losartan-treated spontaneously hypertensive rats. *Circ. Res.*, **92**, 777-784.

MARCIC,B., DEDDISH,P.A., JACKMAN,H.L. & ERDOS,E.G. (1999). Enhancement of bradykinin and resensitization of its B2 receptor. *Hypertension*, **33**, 835-843.

MARCIC,B., DEDDISH,P.A., SKIDGEL,R.A., ERDOS,E.G., MINSHALL,R.D. & TAN,F. (2000). Replacement of the transmembrane anchor in angiotensin I-converting enzyme (ACE) with a glycosylphosphatidylinositol tail affects activation of the B2 bradykinin receptor by ACE inhibitors. *J Biol. Chem.*, **275**, 16110-16118.

MARIN-CASTANO,M.E., SCHANSTRA,J.P., NEAU,E., PRADDAUDE,F., PECHER,C., ADER,J.L., GIROLAMI,J.P. & BASCANDS,J.L. (2002). Induction of functional bradykinin b(1)-receptors in normotensive rats and mice under chronic Angiotensin-converting enzyme inhibitor treatment. *Circulation*, **105**, 627-632.

MARTORANA,P.A., KETTENBACH,B., BREIPOHL,G., LINZ,W. & SCHOLKENS,B.A. (1990). Reduction of infarct size by local angiotensin-converting enzyme inhibition is abolished by a bradykinin antagonist. *Eur. J Pharmacol.*, **182**, 395-396.

MASON,R.P. (1999). Calcium channel blockers, apoptosis and cancer: is there a biologic relationship? *J Am. Coll. Cardiol.*, **34**, 1857-1866.

MASON,R.P., CAMPBELL,S.F., WANG,S.D. & HERBETTE,L.G. (1989). Comparison of location and binding for the positively charged 1,4-dihydropyridine calcium channel antagonist amlodipine with unchanged drugs of this class in cardiac membranes. *Mol. Pharmacol.*, **36**, 634-640.

MASON,R.P., LEEDS,P.R., JACOB,R.F., HOUGH,C.J., ZHANG,K.G., MASON,P.E. & CHUANG,D.M. (1999a). Inhibition of excessive neuronal apoptosis by the calcium antagonist amlodipine and antioxidants in cerebellar granule cells. *J Neurochem.*, **72**, 1448-1456.

MASON,R.P., MARCHE,P. & HINTZE,T.H. (2003). Novel vascular biology of third-generation L-type calcium channel antagonists: ancillary actions of amlodipine. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, **23**, 2155-2163.

MASON,R.P., TRUMBORE,M.W. & MASON,P.E. (2000). [Membrane biophysical interaction of amlodipine and antioxidant properties]. *Drugs*, **59 Spec No 2**, 9-16.

MASON,R.P., WALTER,M.F., TRUMBORE,M.W., OLMSTEAD,E.G., JR. & MASON,P.E. (1999b). Membrane antioxidant effects of the charged dihydropyridine calcium antagonist amlodipine. *J Mol. Cell Cardiol.*, **31**, 275-281.

MATSUMOTO,N., MANABE,H., OCHIAI,J., FUJITA,N., TAKAGI,T., UEMURA,M., NAITO,Y., YOSHIDA,N., OKA,S. & YOSHIKAWA,T. (2003). An AT1-receptor antagonist and an angiotensin-converting enzyme inhibitor protect against hypoxia-induced apoptosis in human aortic endothelial cells through upregulation of endothelial cell nitric oxide synthase activity. *Shock*, **19**, 547-552.

MAYET,J. & HUGHES,A. (2003). Cardiac and vascular pathophysiology in hypertension. *Heart*, **89**, 1104-1109.

MCEACHERN,A.E., SHELTON,E.R., BHAKTA,S., OBERNOLTE,R., BACH,C., ZUPPAN,P., FUJISAKI,J., ALDRICH,R.W. & JARNAGIN,K. (1991). Expression cloning of a rat B2 bradykinin receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **88**, 7724-7728.

MCLEAN,P.G., PERRETTI,M. & AHLUWALIA,A. (1999). Inducible expression of the kinin B1 receptor in the endotoxemic heart: mechanisms of des-Arg9bradykinin-induced coronary vasodilation. *Br. J Pharmacol.*, **128**, 275-282.

MCLEAN,P.G., PERRETTI,M. & AHLUWALIA,A. (2000). Kinin B(1) receptors and the cardiovascular system: regulation of expression and function. *Cardiovasc. Res.*, **48**, 194-210.

MCMURTRY,M.S., ARCHER,S.L., ALTIERI,D.C., BONNET,S., HAROMY,A., HARRY,G., BONNET,S., PUTTAGUNTA,L. & MICHELAKIS,E.D. (2005). Gene therapy targeting survivin selectively induces pulmonary vascular apoptosis and reverses pulmonary arterial hypertension. *J Clin. Invest*, **115**, 1479-1491.

MEINI,S., BELLUCCI,F., CUCCHI,P., GIULIANI,S., QUARTARA,L., GIOLITTI,A., ZAPPITELLI,S., ROTONDARO,L., BOELS,K. & MAGGI,C.A. (2004). Bradykinin B2 and GPR100 receptors: a paradigm for receptor signal transduction pharmacology. *Br. J Pharmacol.*, **143**, 938-941.

- MELLSTROM,B. & NARANJO,J.R. (2001). Mechanisms of Ca(2+)-dependent transcription. *Curr. Opin. Neurobiol.*, **11**, 312-319.
- MENKE,J.G., BORKOWSKI,J.A., BIERILO,K.K., MACNEIL,T., DERRICK,A.W., SCHNECK,K.A., RANSOM,R.W., STRADER,C.D., LINEMEYER,D.L. & HESS,J.F. (1994). Expression cloning of a human B1 bradykinin receptor. *J Biol. Chem.*, **269**, 21583-21586.
- MESSERLI,F.H. (1995). This day 50 years ago. *N. Engl. J Med.*, **332**, 1038-1039.
- MESZAROS,J.G., KARIN,N.J. & FARACH-CARSON,M.C. (1996). Voltage-sensitive calcium channels in osteoblasts: mediators of plasma membrane signalling events. *Connect. Tissue Res.*, **35**, 107-111.
- MICHEAU,O., THOME,M., SCHNEIDER,P., HOLLER,N., TSCHOPP,J., NICHOLSON,D.W., BRIAND,C. & GRUTTER,M.G. (2002). The long form of FLIP is an activator of caspase-8 at the Fas death-inducing signaling complex. *J Biol. Chem.*, **277**, 45162-45171.
- MILLER,E.R., JR., ERLINGER,T.P., YOUNG,D.R., PROKOPOWICZ,G.P. & APPEL,L.J. (1999). Lifestyle Changes That Reduce Blood Pressure: Implementation in Clinical Practice. *J Clin. Hypertens. (Greenwich. )*, **1**, 191-198.
- MINSHALL,R.D., NAKAMURA,F., BECKER,R.P. & RABITO,S.F. (1995). Characterization of bradykinin B2 receptors in adult myocardium and neonatal rat cardiomyocytes. *Circ. Res.*, **76**, 773-780.
- MOELLER,I., LEW,R.A., MENDELSON,F.A., SMITH,A.I., BRENNAN,M.E., TETAZ,T.J. & CHAI,S.Y. (1997). The globin fragment LVV-hemorphin-7 is an endogenous ligand for the AT4 receptor in the brain. *J Neurochem.*, **68**, 2530-2537.
- MOLKENTIN,J.D. (2004). Calcineurin-NFAT signaling regulates the cardiac hypertrophic response in coordination with the MAPKs. *Cardiovasc. Res.*, **63**, 467-475.
- MOLKENTIN,J.D., LU,J.R., ANTOS,C.L., MARKHAM,B., RICHARDSON,J., ROBBINS,J., GRANT,S.R. & OLSON,E.N. (1998). A calcineurin-dependent transcriptional pathway for cardiac hypertrophy. *Cell*, **93**, 215-228.
- MONIWA,N., AGATA,J., HAGIWARA,M., URA,N. & SHIMAMOTO,K. (2006). The role of bradykinin B1 receptor on cardiac remodeling in stroke-prone spontaneously hypertensive rats (SHR-SP). *Biol. Chem.*, **387**, 203-209.
- MOOSMANG,S., SCHULLA,V., WELLING,A., FEIL,R., FEIL,S., WEGENER,J.W., HOFMANN,F. & KLUGBAUER,N. (2003). Dominant role of smooth muscle L-type calcium channel Cav1.2 for blood pressure regulation. *EMBO J*, **22**, 6027-6034.

MORBIDELLI,L., PARENTI,A., GIOVANNELLI,L., GRANGER,H.J., LEDDA,F. & ZICHE,M. (1998). B1 receptor involvement in the effect of bradykinin on venular endothelial cell proliferation and potentiation of FGF-2 effects. *Br. J Pharmacol.*, **124**, 1286-1292.

MOREAU,M.E., DUBREUIL,P., MOLINARO,G., CHAGNON,M., MULLER-ESTERL,W., LEPAGE,Y., MARCEAU,F. & ADAM,A. (2005). Expression of metallopeptidases and kinin receptors in swine oropharyngeal tissues: effects of angiotensin I-converting enzyme inhibition and inflammation. *J Pharmacol. Exp. Ther.*, **315**, 1065-1074.

MOREAU,P., TEA,B.S., DAM,T.V. & HAMET,P. (1997). Altered balance between cell replication and apoptosis in hearts and kidneys of newborn SHR. *Hypertension*, **30**, 720-724.

MORRIS,S.D. & YELLON,D.M. (1997). Angiotensin-converting enzyme inhibitors potentiate preconditioning through bradykinin B2 receptor activation in human heart. *J. Am. Coll. Cardiol.*, **29**, 1599-1606.

MUIESAN,M.L., SALVETTI,M., MONTEDURO,C., BONZI,B., PAINI,A., VIOLA,S., POISA,P., RIZZONI,D., CASTELLANO,M. & GABITI-ROSEI,E. (2004). Left ventricular concentric geometry during treatment adversely affects cardiovascular prognosis in hypertensive patients. *Hypertension*, **43**, 731-738.

MUKAWA,H., TOKI,Y., MIYAZAKI,Y., MATSUI,H., OKUMURA,K. & ITO,T. (2003). Angiotensin II type 2 receptor blockade partially negates antihypertrophic effects of type 1 receptor blockade on pressure-overload rat cardiac hypertrophy. *Hypertens. Res.*, **26**, 89-95.

MULVANY,M.J. (1992). The development and regression of vascular hypertrophy. *J Cardiovasc Pharmacol*, **19 Suppl 2**, S22-S27.

MULVANY,M.J., BAANDRUP,U. & GUNDERSEN,H.J. (1985). Evidence for hyperplasia in mesenteric resistance vessels of spontaneously hypertensive rats using a three-dimensional disector. *Circ. Res.*, **57**, 794-800.

MULVANY,M.J., BAUMBACH,G.L., AALKJAER,C., HEAGERTY,A.M., KORSGAARD,N., SCHIFFRIN,E.L. & HEISTAD,D.D. (1996). Vascular remodeling. *Hypertension*, **28**, 505-506.

MUNARON,L., ANTONIOTTI,S. & LOVISOLO,D. (2004). Intracellular calcium signals and control of cell proliferation: how many mechanisms? *J Cell Mol. Med.*, **8**, 161-168.

MURAKAMI,H., YAYAMA,K., MIAO,R.Q., WANG,C., CHAO,L. & CHAO,J. (1999). Kallikrein gene delivery inhibits vascular smooth muscle cell growth and neointima formation in the rat artery after balloon angioplasty. *Hypertension*, **34**, 164-170.

MURPHY,T.J., ALEXANDER,R.W., GRIENDLING,K.K., RUNGE,M.S. & BERNSTEIN,K.E. (1991). Isolation of a cDNA encoding the vascular type-1 angiotensin II receptor. *Nature*, **351**, 233-236.

MYLLYHARJU,J. & KIVIRIKKO,K.I. (2001). Collagens and collagen-related diseases. *Ann. Med.*, **33**, 7-21.

NADAL-GINARD,B., KAJSTURA,J., LERI,A. & ANVERSA,P. (2003). Myocyte death, growth, and regeneration in cardiac hypertrophy and failure. *Circ. Res.*, **92**, 139-150.

NAGA PRASAD,S.V., NIENABER,J. & ROCKMAN,H.A. (2001). Beta-adrenergic axis and heart disease. *Trends Genet.*, **17**, S44-S49.

NAMKUNG,Y., SKRYPNYK,N., JEONG,M.J., LEE,T., LEE,M.S., KIM,H.L., CHIN,H., SUH,P.G., KIM,S.S. & SHIN,H.S. (2001). Requirement for the L-type Ca(2+) channel alpha(1D) subunit in postnatal pancreatic beta cell generation. *J Clin. Invest*, **108**, 1015-1022.

NEATON,J.D., GRIMM,R.H., JR., PRINEAS,R.J., STAMLER,J., GRANDITS,G.A., ELMER,P.J., CUTLER,J.A., FLACK,J.M., SCHOENBERGER,J.A., MCDONALD,R. & . (1993). Treatment of Mild Hypertension Study. Final results. Treatment of Mild Hypertension Study Research Group. *JAMA*, **270**, 713-724.

NEMER,M., LI-YOUCHEF,N., WANG,H., ARIES,A. & PARADIS,P. (2006). Mechanisms of angiotensin II-dependent progression to heart failure. *Novartis. Found. Symp.*, **274**, 58-68.

NEUGEBAUER,W., BLAIS,P.A., HALLE,S., FILTEAU,C., REGOLID. & GOBEIL,F., JR. (2002). Kinin B1 receptor antagonists with multi-enzymatic resistance properties. *Can. J Physiol Pharmacol.*, **80**, 287-292.

NEVEU,D., NARGEOT,J. & RICHARD,S. (1993). Two high-voltage-activated, dihydropyridine-sensitive Ca<sup>2+</sup> channel currents with distinct electrophysiological and pharmacological properties in cultured rat aortic myocytes. *Pflugers Arch.*, **424**, 45-53.

NGUYEN,G., DELARUE,F., BURCKLE,C., BOUZHIR,L., GILLER,T. & SRAER,J.D. (2002). Pivotal role of the renin/prorenin receptor in angiotensin II production and cellular responses to renin. *J Clin. Invest*, **109**, 1417-1427.

NHAN,T.Q., LILES,W.C. & SCHWARTZ,S.M. (2006). Physiological functions of caspases beyond cell death. *Am. J Pathol.*, **169**, 729-737.

NI,A., CHAO,L. & CHAO,J. (1998). Transcription factor nuclear factor kappaB regulates the inducible expression of the human B1 receptor gene in inflammation. *J Biol. Chem.*, **273**, 2784-2791.

NICHOLSON,D.W., ALIA,A., THORNBERRY,N.A., VAILLANCOURT,J.P., DING,C.K., GALLANT,M., GAREAU,Y., GRIFFIN,P.R., LABELLE,M., LAZEBNIK,Y.A. & . (1995). Identification and inhibition of the ICE/CED-3 protease necessary for mammalian apoptosis. *Nature*, **376**, 37-43.

NICOLETTI,A., HEUDES,D., MANDET,C., HINGLAIS,N., BARIETY,J. & MICHEL,J.B. (1996). Inflammatory cells and myocardial fibrosis: spatial and temporal distribution in renovascular hypertensive rats. *Cardiovasc. Res.*, **32**, 1096-1107.

- NICOTERA,P. & ORRENIUS,S. (1998). The role of calcium in apoptosis. *Cell Calcium*, **23**, 173-180.
- NICOTERA,P., ZHIVOTOVSKY,B. & ORRENIUS,S. (1994). Nuclear calcium transport and the role of calcium in apoptosis. *Cell Calcium*, **16**, 279-288.
- NISHIMURA,T., VASZAR,L.T., FAUL,J.L., ZHAO,G., BERRY,G.J., SHI,L., QIU,D., BENSON,G., PEARL,R.G. & KAO,P.N. (2003). Simvastatin rescues rats from fatal pulmonary hypertension by inducing apoptosis of neointimal smooth muscle cells. *Circulation*, **108**, 1640-1645.
- NISHIO,E., FUKUSHIMA,K., SHIOZAKI,M. & WATANABE,Y. (1996). Nitric oxide donor SNAP induces apoptosis in smooth muscle cells through cGMP-independent mechanism. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **221**, 163-168.
- NISHIYA,Y. & SUGIMOTO,S. (2001). Effects of various antihypertensive drugs on the function of osteoblast. *Biol. Pharm. Bull.*, **24**, 628-633.
- NORLANDER,M., ABRAHAMSSON,T., AKERBLOM,B. & THALEN,P. (1995). Vascular versus myocardial selectivity of dihydropyridine calcium antagonists as studied in vivo and in vitro. *Pharmacol. Toxicol.*, **76**, 56-62.
- NOUET,S. & NAHMIAS,C. (2000). Signal transduction from the angiotensin II AT2 receptor. *Trends Endocrinol. Metab*, **11**, 1-6.
- NUSS,H.B. & HOUSER,S.R. (1993). T-type Ca<sup>2+</sup> current is expressed in hypertrophied adult feline left ventricular myocytes. *Circ. Res.*, **73**, 777-782.
- NUTT,L.K., PATAER,A., PAHLER,J., FANG,B., ROTH,J., MCCONKEY,D.J. & SWISHER,S.G. (2002). Bax and Bak promote apoptosis by modulating endoplasmic reticular and mitochondrial Ca<sup>2+</sup> stores. *J Biol. Chem.*, **277**, 9219-9225.
- NWATOR,I.A. & WHALLEY,E.T. (1989). Angiotensin converting enzyme inhibitors and expression of des-Arg<sup>9</sup>-BK (kinin B1) receptors in vivo. *Eur. J Pharmacol.*, **160**, 125-132.
- O'LEARY,R., PONNAMBALAM,S. & WOOD,E.J. (2003). Pioglitazone-induced myofibroblast cell death: implications for cutaneous scarring. *Br. J. Dermatol.*, **149**, 665-667.
- OKAMOTO,K. & AOKI,K. (1963). Development of a strain of spontaneously hypertensive rats. *Jpn. Circ. J.*, **27**, 282-293.
- OLIVER,J.J., MELVILLE,V.P. & WEBB,D.J. (2006). Effect of regular phosphodiesterase type 5 inhibition in hypertension. *Hypertension*, **48**, 622-627.

OLIVETTI,G., ANVERSA,P. & LOUD,A.V. (1980). Morphometric study of early postnatal development in the left and right ventricular myocardium of the rat. II. Tissue composition, capillary growth, and sarcoplasmic alterations. *Circ Res*, **46**, 503-512.

OLIVETTI,G., CAPASSO,J.M., SONNENBLICK,E.H. & ANVERSA,P. (1990). Side-to-side slippage of myocytes participates in ventricular wall remodeling acutely after myocardial infarction in rats. *Circ Res*, **67**, 23-34.

OLIVETTI,G., MELISSARI,M., MARCHETTI,G. & ANVERSA,P. (1982). Quantitative structural changes of the rat thoracic aorta in early spontaneous hypertension. Tissue composition, and hypertrophy and hyperplasia of smooth muscle cells. *Circ. Res.*, **51**, 19-26.

OLLERENSHAW,J.D., HEAGERTY,A.M., WEST,K.P. & SWALES,J.D. (1988). The effects of coarctation hypertension upon vascular inositol phospholipid hydrolysis in Wistar rats. *J Hypertens.*, **6**, 733-738.

ONGALI,B., BUCK,H.S., CLOUTIER,F., LEGAULT,F., REGOLI,D., LAMBERT,C., THIBAUT,G. & COUTURE,R. (2003). Chronic effects of angiotensin-converting enzyme inhibition on kinin receptor binding sites in the rat spinal cord. *Am. J Physiol Heart Circ. Physiol*, **284**, H1949-H1958.

ONO,H., SAITOH,M., ONO,Y., ISHIMITU,T. & MATSUOKA,H. (2004). Imidapril improves L-NAME-exacerbated nephrosclerosis with TGF-beta 1 inhibition in spontaneously hypertensive rats. *J Hypertens.*, **22**, 1389-1395.

ONO,Y., ONO,H. & FROHLICH,E.D. (1996). Hydrochlorothiazide exacerbates nitric oxide-blockade nephrosclerosis with glomerular hypertension in spontaneously hypertensive rats. *J Hypertens.*, **14**, 823-828.

OPARIL,S., ZAMAN,M.A. & CALHOUN,D.A. (2003). Pathogenesis of hypertension. *Ann. Intern. Med.*, **139**, 761-776.

OPIE,L.H., YUSUF,S. & KUBLER,W. (2000). Current status of safety and efficacy of calcium channel blockers in cardiovascular diseases: a critical analysis based on 100 studies. *Prog. Cardiovasc. Dis.*, **43**, 171-196.

ORLANDI,A., FRANCESCONI,A., COCCHIA,D., CORSINI,A. & SPAGNOLI,L.G. (2001). Phenotypic heterogeneity influences apoptotic susceptibility to retinoic acid and cis-platinum of rat arterial smooth muscle cells in vitro: Implications for the evolution of experimental intimal thickening. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, **21**, 1118-1123.

ORTH,S.R., NOBILING,R., BONISCH,S. & RITZ,E. (1996). Inhibitory effect of calcium channel blockers on human mesangial cell growth: evidence for actions independent of L-type Ca<sup>2+</sup> channels. *Kidney Int.*, **49**, 868-879.

OTSUKA,S., SUGANO,M., MAKINO,N., SAWADA,S., HATA,T. & NIHO,Y. (1998). Interaction of mRNAs for angiotensin II type 1 and type 2 receptors to vascular remodeling in spontaneously hypertensive rats. *Hypertension*, **32**, 467-472.

OWEN,N.E. & VILLERREAL,M.L. (1983). Lys-bradykinin stimulates Na<sup>+</sup> influx and DNA synthesis in cultured human fibroblasts. *Cell*, **32**, 979-985.

OWENS,G.K. (1987). Influence of blood pressure on development of aortic medial smooth muscle hypertrophy in spontaneously hypertensive rats. *Hypertension*, **9**, 178-187.

OWENS,G.K. (1989). Control of hypertrophic versus hyperplastic growth of vascular smooth muscle cells. *Am J Physiol*, **257**, H1755-H1765.

OWENS,G.K., KUMAR,M.S. & WAMHOFF,B.R. (2004). Molecular regulation of vascular smooth muscle cell differentiation in development and disease. *Physiol Rev.*, **84**, 767-801.

OWENS,G.K. & REIDY,M.A. (1985). Hyperplastic growth response of vascular smooth muscle cells following induction of acute hypertension in rats by aortic coarctation. *Circ. Res.*, **57**, 695-705.

OWENS,G.K. & SCHWARTZ,S.M. (1983). Vascular smooth muscle cell hypertrophy and hyperploidy in the Goldblatt hypertensive rat. *Circ Res*, **53**, 491-501.

PALAMARAS,I. & KYRIAKIS,K. (2005). Calcium antagonists in dermatology: a review of the evidence and research-based studies. *Dermatol. Online. J*, **11**, 8.

PAN,G., NI,J., WEI,Y.F., YU,G., GENTZ,R. & DIXIT,V.M. (1997). An antagonist decoy receptor and a death domain-containing receptor for TRAIL. *Science*, **277**, 815-818.

PANKA,D.J., MANO,T., SUHARA,T., WALSH,K. & MIER,J.W. (2001). Phosphatidylinositol 3-kinase/Akt activity regulates c-FLIP expression in tumor cells. *J. Biol. Chem.*, **276**, 6893-6896.

PANZA,J.A., QUYYUMI,A.A., BRUSH,J.E., JR. & EPSTEIN,S.E. (1990). Abnormal endothelium-dependent vascular relaxation in patients with essential hypertension. *N. Engl. J Med.*, **323**, 22-27.

PARAVICINI,T.M. & TOUYZ,R.M. (2006). Redox signaling in hypertension. *Cardiovasc. Res.*, **71**, 247-258.

PAREKH,A.B. & PUTNEY,J.W., JR. (2005). Store-operated calcium channels. *Physiol Rev.*, **85**, 757-810.

PARK,J.B. & SCHIFFRIN,E.L. (2001). Small artery remodeling is the most prevalent (earliest?) form of target organ damage in mild essential hypertension. *J Hypertens.*, **19**, 921-930.

PARK,S.M., SCHICKEL,R. & PETER,M.E. (2005). Nonapoptotic functions of FADD-binding death receptors and their signaling molecules. *Curr. Opin. Cell Biol.*, **17**, 610-616.

PARKER,S.B., DOBRIAN,A.D., WADE,S.S. & PREWITT,R.L. (2000). AT(1) receptor inhibition does not reduce arterial wall hypertrophy or PDGF-A expression in renal hypertension. *Am. J Physiol Heart Circ. Physiol*, **278**, H613-H622.

PARONE,P.A., JAMES,D. & MARTINO,J.C. (2002). Mitochondria: regulating the inevitable. *Biochimie*, **84**, 105-111.

PASSIER,R., ZENG,H., FREY,N., NAYA,F.J., NICOL,R.L., MCKINSEY,T.A., OVERBEEK,P., RICHARDSON,J.A., GRANT,S.R. & OLSON,E.N. (2000). CaM kinase signaling induces cardiac hypertrophy and activates the MEF2 transcription factor in vivo. *J Clin. Invest*, **105**, 1395-1406.

PATEL,V.I., DANIEL,S., LONGO,C.R., SHRIKHANDE,G.V., SCALI,S.T., CZISMADIA,E., GROFT,C.M., SHUKRI,T., MOTLEY-DORE,C., RAMSEY,H.E., FISHER,M.D., GREY,S.T., ARVELO,M.B. & FERRAN,C. (2006). A20, a modulator of smooth muscle cell proliferation and apoptosis, prevents and induces regression of neointimal hyperplasia. *FASEB J*, **20**, 1418-1430.

PAUL,M., POYAN,M.A. & KREUTZ,R. (2006). Physiology of local renin-angiotensin systems. *Physiol Rev.*, **86**, 747-803.

PAULETTO,P., SARZANI,R., RAPPELLI,A., CHIAVEGATO,A., PESSINA,A.C. & SARTORE,S. (1994). Differentiation and growth of vascular smooth muscle cells in experimental hypertension. *Am. J. Hypertens.*, **7**, 661-674.

PELLIEUX,C., FOLETTI,A., PEDUTO,G., AUBERT,J.F., NUSSBERGER,J., BEERMANN,F., BRUNNER,H.R. & PEDRAZZINI,T. (2001). Dilated cardiomyopathy and impaired cardiac hypertrophic response to angiotensin II in mice lacking FGF-2. *J. Clin. Invest*, **108**, 1843-1851.

PELLIEUX,C., SAUTHIER,T., AUBERT,J.F., BRUNNER,H.R. & PEDRAZZINI,T. (2000). Angiotensin II-induced cardiac hypertrophy is associated with different mitogen-activated protein kinase activation in normotensive and hypertensive mice. *J Hypertens.*, **18**, 1307-1317.

PENG,H., CARRETERO,O.A., VULJAJ,N., LIAO,T.D., MOTIVALA,A., PETERSON,E.L. & RHALEB,N.E. (2005). Angiotensin-converting enzyme inhibitors: a new mechanism of action. *Circulation*, **112**, 2436-2445.

PENG,L., BRADLEY,C.J., ZULLI,A. & LIU,J.J. (1999). The relationship between apoptosis and spontaneous hypertension. *Chin Med. J. (Engl. )*, **112**, 562-568.

PEREZ-REYES,E. (2003). Molecular physiology of low-voltage-activated t-type calcium channels. *Physiol Rev.*, **83**, 117-161.

PESIC,A., MADDEN,J.A., PESIC,M. & RUSCH,N.J. (2004). High blood pressure upregulates arterial L-type Ca<sup>2+</sup> channels: is membrane depolarization the signal? *Circ. Res.*, **94**, e97-104.

PESQUERO,J.B., ARAUJO,R.C., HEPPENSTALL,P.A., STUCKY,C.L., SILVA,J.A., JR., WALTHER,T., OLIVEIRA,S.M., PESQUERO,J.L., PAIVA,A.C., CALIXTO,J.B., LEWIN,G.R. &

BADER,M. (2000). Hypoalgesia and altered inflammatory responses in mice lacking kinin B1 receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **97**, 8140-8145.

PESSANH,M.G. & MANDARIM-DE-LACERDA,C.A. (2000). Myofibroblast accumulation in healing rat myocardium due to long-term low-dosage nitric oxide synthesis inhibition. *Exp. Toxicol. Pathol.*, **52**, 192-194.

PETRACHE,I., NATARAJAN,V., ZHEN,L., MEDLER,T.R., RICHTER,A.T., CHO,C., HUBBARD,W.C., BERDYSHEV,E.V. & TUDER,R.M. (2005). Ceramide upregulation causes pulmonary cell apoptosis and emphysema-like disease in mice. *Nat. Med.*, **11**, 491-498.

PFEFFER,M.A. & PFEFFER,J.M. (1983). Blood pressure and left ventricular dysfunction in the spontaneously hypertensive rat. *Fed. Proc.*, **42**, 2698-2702.

PFEILSCHIFTER,J., OCHSNER,M., WHITEBREAD,S. & DE,G.M. (1989). Down-regulation of protein kinase C potentiates angiotensin II-stimulated polyphosphoinositide hydrolysis in vascular smooth-muscle cells. *Biochem. J.*, **262**, 285-291.

PHAGOO,S.B., POOLE,S. & LEEB-LUNDBERG,L.M. (1999). Autoregulation of bradykinin receptors: agonists in the presence of interleukin-1beta shift the repertoire of receptor subtypes from B2 to B1 in human lung fibroblasts. *Mol. Pharmacol.*, **56**, 325-333.

PHILLIPS,J.E. & PRESTON,M.R. (2003). Inhibition of oxidized LDL aggregation with the calcium channel blocker amlodipine: role of electrostatic interactions. *Atherosclerosis*, **168**, 239-244.

PHIPPS,R.P., BORRELLO,M.A. & BLIEDEN,T.M. (1997). Fibroblast heterogeneity in the periodontium and other tissues. *J Periodontal Res.*, **32**, 159-165.

PILANE,C.M. & LABELLE,E.F. (2004). NO induced apoptosis of vascular smooth muscle cells accompanied by ceramide increase. *J Cell Physiol*, **199**, 310-315.

PILZ,B., SHAGDARSUREN,E., WELLNER,M., FIEBELER,A., DECHEND,R., GRATZE,P., MEINERS,S., FELDMAN,D.L., WEBB,R.L., GARRELD,S.I.M., JAN DANSER,A.H., LUFT,F.C. & MULLER,D.N. (2005). Aliskiren, a human renin inhibitor, ameliorates cardiac and renal damage in double-transgenic rats. *Hypertension*, **46**, 569-576.

PINTON,P. & RIZZUTO,R. (2006). Bcl-2 and Ca<sup>2+</sup> homeostasis in the endoplasmic reticulum. *Cell Death. Differ.*, **13**, 1409-1418.

PITT,B., ZANNAD,F., REMME,W.J., CODY,R., CASTAIGNE,A., PEREZ,A., PALENSKY,J. & WITTES,J. (1999). The effect of spironolactone on morbidity and mortality in patients with severe heart failure. Randomized Aldactone Evaluation Study Investigators. *N. Engl. J. Med.*, **341**, 709-717.

PITTI,R.M., MARSTERS,S.A., LAWRENCE,D.A., ROY,M., KISCHKEL,F.C., DOWD,P., HUANG,A., DONAHUE,C.J., SHERWOOD,S.W., BALDWIN,D.T., GODOWSKI,P.J., WOOD,W.I.,

GURNEY,A.L., HILLAN,K.J., COHEN,R.L., GODDARD,A.D., BOTSTEIN,D. & ASHKENAZI,A. (1998). Genomic amplification of a decoy receptor for Fas ligand in lung and colon cancer. *Nature*, **396**, 699-703.

POLLMAN,M.J., HALL,J.L., MANN,M.J., ZHANG,L. & GIBBONS,G.H. (1998). Inhibition of neointimal cell bcl-x expression induces apoptosis and regression of vascular disease. *Nat. Med.*, **4**, 222-227.

POLLMAN,M.J., YAMADA,T., HORIUCHI,M. & GIBBONS,G.H. (1996). Vasoactive substances regulate vascular smooth muscle cell apoptosis. Countervailing influences of nitric oxide and angiotensin II. *Circ Res*, **79**, 748-756.

POLYAKOVA,V., HEIN,S., KOSTIN,S., ZIEGELHOEFFER,T. & SCHAPER,J. (2004). Matrix metalloproteinases and their tissue inhibitors in pressure-overloaded human myocardium during heart failure progression. *J Am. Coll. Cardiol.*, **44**, 1609-1618.

POWELL,D.W., MIFFLIN,R.C., VALENTICH,J.D., CROWE,S.E., SAADA,J.I. & WEST,A.B. (1999). Myofibroblasts. I. Paracrine cells important in health and disease. *Am J Physiol*, **277**, C1-C9.

PRAVENEC,M., KREN,V., KUNES,J., SCICLI,A.G., CARRETERO,O.A., SIMONET,L. & KURTZ,T.W. (1991). Cosegregation of blood pressure with a kallikrein gene family polymorphism. *Hypertension*, **17**, 242-246.

PROUD,C.G. (2004). Ras, PI3-kinase and mTOR signaling in cardiac hypertrophy. *Cardiovasc. Res.*, **63**, 403-413.

PRUNEAU,D., LUCCARINI,J.M., ROBERT,C. & BELICHARD,P. (1994). Induction of kinin B1 receptor-dependent vasoconstriction following balloon catheter injury to the rabbit carotid artery. *Br. J Pharmacol.*, **111**, 1029-1034.

QADRI,F., HAUSER,W., JOHREN,O. & DOMINIAK,P. (2002). Kinin B1 and B2 receptor mRNA expression in the hypothalamus of spontaneously hypertensive rats. *Can. J Physiol Pharmacol.*, **80**, 258-263.

RABKIN,E., AIKAWA,M., STONE,J.R., FUKUMOTO,Y., LIBBY,P. & SCHOEN,F.J. (2001). Activated interstitial myofibroblasts express catabolic enzymes and mediate matrix remodeling in myxomatous heart valves. *Circulation*, **104**, 2525-2532.

RAKUSAN,K., HRDINA,P.W., TUREK,Z., LAKATTA,E.G., SPURGEON,H.A. & WOLFORD,G.D. (1984). Cell size and capillary supply of the hypertensive rat heart: quantitative study. *Basic Res. Cardiol.*, **79**, 389-395.

RAVASSA,S., FORTUNO,M.A., GONZALEZ,A., LOPEZ,B., ZALBA,G., FORTUNO,A. & DIEZ,J. (2000). Mechanisms of increased susceptibility to angiotensin II-induced apoptosis in ventricular cardiomyocytes of spontaneously hypertensive rats. *Hypertension*, **36**, 1065-1071.

RAYMOND,M.A., DESORMEAUX,A., LAPLANTE,P., VIGNEAULT,N., FILEP,J.G., LANDRY,K., PSHEZHETSKY,A.V. & HEBERT,M.J. (2004). Apoptosis of endothelial cells triggers a caspase-dependent anti-apoptotic paracrine loop active on VSMC. *FASEB J*, **18**, 705-707.

RE,R.N. (2003). Implications of intracrine hormone action for physiology and medicine. *Am. J Physiol Heart Circ. Physiol*, **284**, H751-H757.

REDON,J. (2005). Antihypertensive treatment: should it be titrated to blood pressure reduction or to target organ damage regression? *Curr. Opin. Nephrol. Hypertens.*, **14**, 448-452.

REED,J.C. (2006). Proapoptotic multidomain Bcl-2/Bax-family proteins: mechanisms, physiological roles, and therapeutic opportunities. *Cell Death. Differ.*, **13**, 1378-1386.

REGOLI,D., BARABE,J. & PARK,W.K. (1977). Receptors for bradykinin in rabbit aortae. *Can. J Physiol Pharmacol.*, **55**, 855-867.

REILLY,D.F., GORDON,D. & SCHWARTZ,S.M. (1988). Determination and comparison of the aortic polyploid smooth muscle content of human hypertensive subjects and normotensive controls. *Acta Physiol Scand. Suppl*, **571**, 181-188.

REUDELHUBER,T.L. (2005). The continuing saga of the AT2 receptor: a case of the good, the bad, and the innocuous. *Hypertension*, **46**, 1261-1262.

RHALEB,N.E., YANG,X.P., SCICLI,A.G. & CARRETERO,O.A. (1994). Role of kinins and nitric oxide in the antihypertrophic effect of ramipril. *Hypertension*, **23**, 865-868.

RICHARD,V., JOANNIDES,R., HENRY,J.P., MULDER,P., MACE,B., GUEZ,D., SCHIAVI,P. & THUILLETZ,C. (1996). Fixed-dose combination of perindopril with indapamide in spontaneously hypertensive rats: haemodynamic, biological and structural effects. *J Hypertens.*, **14**, 1447-1454.

RITCHIE,R.H., MARSH,J.D., LANCASTER,W.D., DIGLIO,C.A. & SCHIEBINGER,R.J. (1998). Bradykinin blocks angiotensin II-induced hypertrophy in the presence of endothelial cells. *Hypertension*, **31**, 39-44.

RIZZONI,D., PORTERI,E., BOARI,G.E., DE,C.C., SLEIMAN,I., MUIESAN,M.L., CASTELLANO,M., MICLINI,M. & GABITI-ROSEI,E. (2003). Prognostic significance of small-artery structure in hypertension. *Circulation*, **108**, 2230-2235.

RIZZONI,D., PORTERI,E., DE,C.C., SLEIMAN,I., RODELLA,L., REZZANI,R., PAIARDI,S., BIANCHI,R., RUGGERI,G., BOARI,G.E., MUIESAN,M.L., SALVETTI,M., ZANI,F., MICLINI,M. & ROSEI,E.A. (2005). Effect of treatment with candesartan or enalapril on subcutaneous small artery structure in hypertensive patients with noninsulin-dependent diabetes mellitus. *Hypertension*, **45**, 659-665.

RIZZONI,D., PORTERI,E., GUEFI,D., PICCOLI,A., CASTELLANO,M., PASINI,G., MUIESAN,M.L., MULVANY,M.J. & ROSEI,E.A. (2000a). Cellular hypertrophy in subcutaneous small arteries of patients with renovascular hypertension. *Hypertension*, **35**, 931-935.

RIZZONI,D., RODELLA,L., PORTERI,E., REZZANI,R., GUELFID., PICCOLI,A., CASTELLANO,M., MUIESAN,M.L., BIANCHI,R. & ROSEI,E.A. (2000b). Time course of apoptosis in small resistance arteries of spontaneously hypertensive rats. *J Hypertens.*, **18**, 885-891.

ROMAN,M.J., GANAU,A., SABA,P.S., PINI,R., PICKERING,T.G. & DEVEREUX,R.B. (2000). Impact of arterial stiffening on left ventricular structure. *Hypertension*, **36**, 489-494.

ROSENKRANZ,A.C., HOOD,S.G., WOODS,R.L., DUSTING,G.J. & RITCHIE,R.H. (2002). Acute antihypertrophic actions of bradykinin in the rat heart: importance of cyclic GMP. *Hypertension*, **40**, 498-503.

ROSS,R.S. & BORG,T.K. (2001). Integrins and the myocardium. *Circ. Res.*, **88**, 1112-1119.

ROTH,M., EICKELBERG,O., KOHLER,E., ERNE,P. & BLOCK,L.H. (1996). Ca<sup>2+</sup> channel blockers modulate metabolism of collagens within the extracellular matrix. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **93**, 5478-5482.

ROULEAU,J.L., KAPUKU,G., PELLETIER,S., GOSSELIN,H., ADAM,A., GAGNON,C., LAMBERT,C. & MELOCHE,S. (2001). Cardioprotective effects of ramipril and losartan in right ventricular pressure overload in the rabbit: importance of kinins and influence on angiotensin II type 1 receptor signaling pathway. *Circulation*, **104**, 939-944.

ROUSSEAU,A., MICHAUD,A., CHAUVET,M.T., LENFANT,M. & CORVOL,P. (1995). The hemoregulatory peptide N-acetyl-Ser-Asp-Lys-Pro is a natural and specific substrate of the N-terminal active site of human angiotensin-converting enzyme. *J Biol. Chem.*, **270**, 3656-3661.

ROVIEZZO,F., BUCCI,M., DELISLE,C., BRANCALEONE,V., DI,L.A., MAYO,I.P., FIORUCCI,S., FONTANA,A., GRATTON,J.P. & CIRINO,G. (2006). Essential requirement for sphingosine kinase activity in eNOS-dependent NO release and vasorelaxation. *FASEB J*, **20**, 340-342.

RUVOLO,P.P. (2003). Intracellular signal transduction pathways activated by ceramide and its metabolites. *Pharmacol. Res.*, **47**, 383-392.

SABBAH,H.N., SHAROV,V.G., GUPTA,R.C., TODOR,A., SINGH,V. & GOLDSTEIN,S. (2000). Chronic therapy with metoprolol attenuates cardiomyocyte apoptosis in dogs with heart failure. *J Am. Coll. Cardiol.*, **36**, 1698-1705.

SABRI,A., LEVY,B.I., POITEVIN,P., CAPUTO,L., FAGGIN,E., MAROTTE,F., RAPPAPORT,L. & SAMUEL,J.L. (1997). Differential roles of AT1 and AT2 receptor subtypes in vascular trophic and phenotypic changes in response to stimulation with angiotensin II. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, **17**, 257-264.

SADOSHIMA,J. & IZUMO,S. (1993). Molecular characterization of angiotensin II--induced hypertrophy of cardiac myocytes and hyperplasia of cardiac fibroblasts. Critical role of the AT1 receptor subtype. *Circ. Res.*, **73**, 413-423.

SADOSHIMA,J., XU,Y., SLAYTER,H.S. & IZUMO,S. (1993). Autocrine release of angiotensin II mediates stretch-induced hypertrophy of cardiac myocytes in vitro. *Cell*, **75**, 977-984.

SAFAR,M.E. & LAURENT,S. (1993). Behaviour of conduit arteries in hypertension. *Clin Exp Hypertens*, **15**, 1033-1045.

SALINAS,M., LOPEZ-VALDALISO,R., MARTIN,D., ALVAREZ,A. & CUADRADO,A. (2000). Inhibition of PKB/Akt1 by C2-ceramide involves activation of ceramide-activated protein phosphatase in PC12 cells. *Mol. Cell Neurosci.*, **15**, 156-169.

SANCHO-BRU,P., BATALLER,R., GASULL,X., COLMENERO,J., KHURDAYAN,V., GUAL,A., NICOLAS,J.M., ARROYO,V. & GINES,P. (2005). Genomic and functional characterization of stellate cells isolated from human cirrhotic livers. *J Hepatol.*, **43**, 272-282.

SANDERS,Y.Y., KUMBLA,P. & HAGOOD,J.S. (2007). Enhanced myofibroblastic differentiation and survival in thy-1(-) lung fibroblasts. *Am. J Respir. Cell Mol. Biol.*, **36**, 226-235.

SANNA,B., BUENO,O.F., DAI,Y.S., WILKINS,B.J. & MOLKENTIN,J.D. (2005). Direct and indirect interactions between calcineurin-NFAT and MEK1-extracellular signal-regulated kinase 1/2 signaling pathways regulate cardiac gene expression and cellular growth. *Mol. Cell Biol.*, **25**, 865-878.

SANTOS,R.A., SIMOES E SILVA AC, MARIC,C., SILVA,D.M., MACHADO,R.P., DE,B., I, HERINGER-WALTHER,S., PINHEIRO,S.V., LOPES,M.T., BADER,M., MENDES,E.P., LEMOS,V.S., CAMPAGNOLE-SANTOS,M.J., SCHULTHEISS,H.P., SPETH,R. & WALTHER,T. (2003). Angiotensin-(1-7) is an endogenous ligand for the G protein-coupled receptor Mas. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **100**, 8258-8263.

SARTORE,S., CHIAVEGATO,A., FAGGIN,E., FRANCH,R., PUATO,M., AUSONIS, & PAULETTO,P. (2001). Contribution of adventitial fibroblasts to neointima formation and vascular remodeling: from innocent bystander to active participant. *Circ. Res.*, **89**, 1111-1121.

SASAKI,K., YAMANO,Y., BARDHAN,S., IWAI,N., MURRAY,J.J., HASEGAWA,M., MATSUDA,Y. & INAGAMI,T. (1991). Cloning and expression of a complementary DNA encoding a bovine adrenal angiotensin II type-1 receptor. *Nature*, **351**, 230-233.

SAWARD,L. & ZAHRADKA,P. (1997). Angiotensin II activates phosphatidylinositol 3-kinase in vascular smooth muscle cells. *Circ Res*, **81**, 249-257.

SCHACHTER,M. (1991). Drug-induced modification of vascular structure: effects of antihypertensive drugs. *Am Heart J*, **122**, 316-323.

SCHAFER,Z.T. & KORNBLUTH,S. (2006). The apoptosome: physiological, developmental, and pathological modes of regulation. *Dev. Cell*, **10**, 549-561.

SCHAUB,F.J., HAN,D.K., LILES,W.C., ADAMS,L.D., COATS,S.A., RAMACHANDRAN,R.K., SEIFERT,R.A., SCHWARTZ,S.M. & BOWEN-POPE,D.F. (2000). Fas/FADD-mediated activation of a specific program of inflammatory gene expression in vascular smooth muscle cells. *Nat. Med.*, **6**, 790-796.

SCHAUB,M.C., HEFTI,M.A. & ZAUGG,M. (2006). Integration of calcium with the signaling network in cardiac myocytes. *J Mol. Cell Cardiol.*, **41**, 183-214.

SCHELLINGS,M.W., BAUMANN,M., VAN LEEUWEN,R.E., DUISTERS,R.F., JANSSEN,S.H., SCHROEN,B., PEUTZ-KOOTSTRA,C.J., HEYMANS,S. & PINTO,Y.M. (2006). Imatinib attenuates end-organ damage in hypertensive homozygous TGR(mRen2)27 rats. *Hypertension*, **47**, 467-474.

SCHEUER,J. (1999). Catecholamines in cardiac hypertrophy. *Am. J Cardiol.*, **83**, 70H-74H.

SCHIFFRIN,E.L. & DENG,L.Y. (1996). Structure and function of resistance arteries of hypertensive patients treated with a beta-blocker or a calcium channel antagonist. *J Hypertens.*, **14**, 1247-1255.

SCHIFFRIN,E.L., DENG,L.Y. & LAROCHELLE,P. (1993). Morphology of resistance arteries and comparison of effects of vasoconstrictors in mild essential hypertensive patients. *Clin. Invest Med.*, **16**, 177-186.

SCHIFFRIN,E.L., DENG,L.Y. & LAROCHELLE,P. (1995). Progressive improvement in the structure of resistance arteries of hypertensive patients after 2 years of treatment with an angiotensin I-converting enzyme inhibitor. Comparison with effects of a beta-blocker. *Am. J Hypertens.*, **8**, 229-236.

SCHIFFRIN,E.L., PARK,J.B., INTENGAN,H.D. & TOUYZ,R.M. (2000). Correction of arterial structure and endothelial dysfunction in human essential hypertension by the angiotensin receptor antagonist losartan. *Circulation*, **101**, 1653-1659.

SCHIFFRIN,E.L., PU,Q. & PARK,J.B. (2002). Effect of amlodipine compared to atenolol on small arteries of previously untreated essential hypertensive patients. *Am. J Hypertens.*, **15**, 105-110.

SCHRADER,J., LUDERS,S., KULSCHEWSKI,A., HAMMERSEN,F., PLATE,K., BERGER,J., ZIDEK,W., DOMINIAK,P. & DIENER,H.C. (2005). Morbidity and Mortality After Stroke, Eprosartan Compared with Nitrendipine for Secondary Prevention: principal results of a prospective randomized controlled study (MOSES). *Stroke*, **36**, 1218-1226.

SCHREMMER-DANNINGER,E., OFFNER,A., SIEBECK,M., HEINZ-ERIAN,P., GAIS,P. & ROSCHER,A.A. (1996). Autoradiographic visualization of B1 bradykinin receptors in porcine vascular tissues in the presence or absence of inflammation. *Immunopharmacology*, **33**, 95-100.

SCHREMMER-DANNINGER,E., OFFNER,A., SIEBECK,M. & ROSCHER,A.A. (1998). B1 bradykinin receptors and carboxypeptidase M are both upregulated in the aorta of pigs after LPS infusion. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **243**, 246-252.

SCHUBERT,K.M., SCHEID,M.P. & DURONIO,V. (2000). Ceramide inhibits protein kinase B/Akt by promoting dephosphorylation of serine 473. *J Biol. Chem.*, **275**, 13330-13335.

SCHWARTZ,S.M. (1984). Smooth muscle proliferation in hypertension. State-of-the-art lecture. *Hypertension*, **6**, 156-161.

SCHWINGER,R.H., MUNCH,G., BOLCK,B., KARCZEWSKI,P., KRAUSE,E.G. & ERDMANN,E. (1999). Reduced Ca<sup>2+</sup>-sensitivity of SERCA 2a in failing human myocardium due to reduced serin-16 phospholamban phosphorylation. *J Mol. Cell Cardiol.*, **31**, 479-491.

SCOTT-BURDEN,T., RESINK,T.J., HAHN,A.W. & VANHOUTTE,P.M. (1991). Induction of endothelin secretion by angiotensin II: effects on growth and synthetic activity of vascular smooth muscle cells. *J Cardiovasc. Pharmacol.*, **17 Suppl 7**, S96-100.

SEKI,T., YOKOSHIKI,H., SUNAGAWA,M., NAKAMURA,M. & SPERELAKIS,N. (1999). Angiotensin II stimulation of Ca<sup>2+</sup>-channel current in vascular smooth muscle cells is inhibited by lavendustin-A and LY-294002. *Pflugers Arch.*, **437**, 317-323.

SELMAN,M., KING,T.E. & PARDO,A. (2001). Idiopathic pulmonary fibrosis: prevailing and evolving hypotheses about its pathogenesis and implications for therapy. *Ann. Intern. Med.*, **134**, 136-151.

SEN,S., TARAZI,R.C., KHAIRALLAH,P.A. & BUMPUS,F.M. (1974). Cardiac hypertrophy in spontaneously hypertensive rats. *Circ. Res.*, **35**, 775-781.

SENBONMATSU,T., ICHIHARA,S., PRICE E JR, GAFFNEY,F.A. & INAGAMI,T. (2000). Evidence for angiotensin II type 2 receptor-mediated cardiac myocyte enlargement during in vivo pressure overload. *J Clin. Invest.*, **106**, R25-R29.

SERNE,E.H., GANS,R.O., TER MAATEN,J.C., TANGELDER,G.J., DONKER,A.J. & STEHOUWER,C.D. (2001). Impaired skin capillary recruitment in essential hypertension is caused by both functional and structural capillary rarefaction. *Hypertension*, **38**, 238-242.

SERVANT,MJ., GIASSON,E. & MELOCHE,S. (1996). Inhibition of growth factor-induced protein synthesis by a selective MEK inhibitor in aortic smooth muscle cells. *J Biol Chem*, **271**, 16047-16052.

SEVILLA,M.A., VOCES,F., CARRON,R., GUERRERO,E.I., ARDANAZ,N., SAN ROMAN,L., AREVALO,M.A. & MONTERO,M.J. (2004). Amlodipine decreases fibrosis and cardiac hypertrophy in spontaneously hypertensive rats: persistent effects after withdrawal. *Life Sci.*, **75**, 881-891.

SEYEDI,N., XU,X., NASJLETTI,A. & HINTZE,T.H. (1995). Coronary kinin generation mediates nitric oxide release after angiotensin receptor stimulation. *Hypertension*, **26**, 164-170.

SHARGORODSKY,M., LEIBOVITZ,E., LUBIMOV,L., GAVISH,D. & ZIMLICHMAN,R. (2002). Prolonged treatment with the AT1 receptor blocker, valsartan, increases small and large artery compliance in uncomplicated essential hypertension. *Am. J Hypertens.*, **15**, 1087-1091.

SHARIFI,A.M. & SCHIFFRIN,E.L. (1997). Apoptosis in aorta of deoxycorticosterone acetate-salt hypertensive rats: effect of endothelin receptor antagonism. *J Hypertens.*, **15**, 1441-1448.

SHARIFI,A.M. & SCHIFFRIN,E.L. (1998). Apoptosis in vasculature of spontaneously hypertensive rats: effect of an angiotensin converting enzyme inhibitor and a calcium channel antagonist. *Am. J. Hypertens.*, **11**, 1108-1116.

SHEN,B. & EL-DAHR,S.S. (2006). Cross-talk of the renin-angiotensin and kallikrein-kinin systems. *Biol. Chem.*, **387**, 145-150.

SHIOJIMA,I., AIKAWA,M., SUZUKI,J., YAZAKI,Y. & NAGAI,R. (1999). Embryonic smooth muscle myosin heavy chain SMemb is expressed in pressure-overloaded cardiac fibroblasts. *Jpn. Heart J.*, **40**, 803-818.

SHIUCHI,T., CUI,T.X., WU,L., NAKAGAMI,H., TAKEDA-MATSUBARA,Y., IWAI,M. & HORIUCHI,M. (2002). ACE Inhibitor Improves Insulin Resistance in Diabetic Mouse Via Bradykinin and NO. *Hypertension*, **40**, 329-334.

SHORT,A.D., BIAN,J., GHOSH,T.K., WALDRON,R.T., RYBAK,S.L. & GILL,D.L. (1993). Intracellular Ca<sup>2+</sup> pool content is linked to control of cell growth. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **90**, 4986-4990.

SHUKLA,S., ROBEY,R.W., BATES,S.E. & AMBUDKAR,S.V. (2006). The calcium channel blockers, 1,4-dihydropyridines, are substrates of the multidrug resistance-linked ABC drug transporter, ABCG2. *Biochemistry (Mosc.)*, **45**, 8940-8951.

SIEBECK,M., WHALLEY,E.T., HOFFMANN,H., WEIPERT,J. & FRITZ,H. (1989). The hypotensive response to des-Arg<sup>9</sup>-bradykinin increases during E. coli septicemia in the pig. *Adv. Exp. Med. Biol.*, **247B**, 389-393.

SIEGEL,R.M. (2006). Caspases at the crossroads of immune-cell life and death. *Nat. Rev. Immunol.*, **6**, 308-317.

SIHM,I., SCHROEDER,A.P., AALKJAER,C., MULVANY,M.J., THYGESEN,K. & LEDERBALLE,O. (1998). Effect of antihypertensive treatment on cardiac and subcutaneous artery structure: a comparison between calcium channel blocker and thiazide-based regimens. *Am. J Hypertens.*, **11**, 263-271.

SILVER,M.A., PICK,R., BRILLA,C.G., JALIL,J.E., JANICKI,J.S. & WEBER,K.T. (1990). Reactive and reparative fibrillar collagen remodelling in the hypertrophied rat left ventricle: two experimental models of myocardial fibrosis. *Cardiovasc. Res.*, **24**, 741-747.

SILVESTRE,J.S., TAMARAT,R., SENBONMATSU,T., ICCHIKI,T., EBRAHIMIAN,T., IGLARZ,M., BESNARD,S., DURIEZ,M., INAGAMI,T. & LEVY,B.I. (2002). Antiangiogenic effect of angiotensin II type 2 receptor in ischemia-induced angiogenesis in mice hindlimb. *Circ. Res.*, **90**, 1072-1079.

SIRAGY,H.M. & CAREY,R.M. (1997). The subtype 2 (AT2) angiotensin receptor mediates renal production of nitric oxide in conscious rats. *J Clin. Invest.*, **100**, 264-269.

SISKIND,L.J., KOLESNICK,R.N. & COLOMBINI,M. (2002). Ceramide channels increase the permeability of the mitochondrial outer membrane to small proteins. *J Biol. Chem.*, **277**, 26796-26803.

SKURK,C., MAATZ,H., KIM,H.S., YANG,J., ABID,M.R., AIRD,W.C. & WALSH,K. (2004). The Akt-regulated forkhead transcription factor FOXO3a controls endothelial cell viability through modulation of the caspase-8 inhibitor FLIP. *J. Biol. Chem.*, **279**, 1513-1525.

SOLTIS,E.E. (1993). Alterations in vascular structure and function after short-term losartan treatment in spontaneously hypertensive rats. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **266**, 642-646.

SONG,L.S., GUIA,A., MUTH,J.N., RUBIO,M., WANG,S.Q., XIAO,R.P., JOSEPHSON,I.R., LAKATTA,E.G., SCHWARTZ,A. & CHENG,H. (2002). Ca(2+) signaling in cardiac myocytes overexpressing the alpha(1) subunit of L-type Ca(2+) channel. *Circ. Res.*, **90**, 174-181.

SONKUSARE,S., PALADE,P.T., MARSH,J.D., TELEMAQUE,S., PESIC,A. & RUSCH,N.J. (2006). Vascular calcium channels and high blood pressure: pathophysiology and therapeutic implications. *Vascul. Pharmacol.*, **44**, 131-142.

SOSA-CANACHE,B., CIERCO,M., GUTIERREZ,C.I. & ISRAEL,A. (2000). Role of bradykinins and nitric oxide in the AT2 receptor-mediated hypotension. *J Hum. Hypertens.*, **14 Suppl 1**, S40-S46.

SOTO,K., GOMEZ-GARRE,D., LARGO,R., GALLEGO-DELGADO,J., TEJERA,N., CATALAN,M.P., ORTIZ,A., PLAZA,J.J., ALONSO,C. & EGIDO,J. (2004). Tight blood pressure control decreases apoptosis during renal damage. *Kidney Int.*, **65**, 811-822.

SPRICK,M.R., RIESER,E., STAHL,H., GROSSE-WILDE,A., WEIGAND,M.A. & WALCZAK,H. (2002). Caspase-10 is recruited to and activated at the native TRAIL and CD95 death-inducing signalling complexes in a FADD-dependent manner but can not functionally substitute caspase-8. *EMBO J*, **21**, 4520-4530.

SQUIRE,I.B., O'KANE,K.P., ANDERSON,N. & REID,J.L. (2000). Bradykinin B(2) receptor antagonism attenuates blood pressure response to acute angiotensin-converting enzyme inhibition in normal men. *Hypertension*, **36**, 132-136.

STEAD,S., WERSTIUK,E.S. & LEE,R.M. (2000). Nifedipine induces apoptosis in cultured vascular smooth muscle cells from spontaneously hypertensive rats. *Life Sci.*, **67**, 895-906.

STEPIEN,O., GOGUSEV,J., ZHU,D.L., IOUZALEN,L., HEREMBERT,T., DRUEKE,T.B. & MARCHE,P. (1998). Amlodipine inhibition of serum-, thrombin-, or fibroblast growth factor-induced vascular smooth-muscle cell proliferation. *J. Cardiovasc. Pharmacol.*, **31**, 786-793.

STEPIEN,O., IOUZALEN,L., HEREMBERT,T., ZHU,D.L. & MARCHE,P. (1997). Amlodipine and vascular hypertrophy. *Int. J. Cardiol.*, **62 Suppl 2**, S79-S84.

STERIO,D.C. (1984). The unbiased estimation of number and sizes of arbitrary particles using the disector. *J. Microsc.*, **134**, 127-136.

STEWART,J.M. (2003). Bradykinin antagonists as anti-cancer agents. *Curr. Pharm. Des.*, **9**, 2036-2042.

STRIESSNIG,J., ZERNIG,G. & GLOSSMANN,H. (1985). Ca<sup>2+</sup> antagonist receptor sites on human red blood cell membranes. *Eur. J Pharmacol.*, **108**, 329-330.

STUMPF,W.E. (2005). Drug localization and targeting with receptor microscopic autoradiography. *J Pharmacol. Toxicol. Methods*, **51**, 25-40.

SUEMATSU,M., SUZUKI,H., DELANO,F.A. & SCHMID-SCHONBEIN,G.W. (2002). The inflammatory aspect of the microcirculation in hypertension: oxidative stress, leukocytes/endothelial interaction, apoptosis. *Microcirculation.*, **9**, 259-276.

SUHARA,T., KIM,H.S., KIRSHENBAUM,L.A. & WALSH,K. (2002). Suppression of Akt signaling induces Fas ligand expression: involvement of caspase and Jun kinase activation in Akt-mediated Fas ligand regulation. *Mol. Cell Biol.*, **22**, 680-691.

SUN,D. & MCCRAE,K.R. (2006). Endothelial-cell apoptosis induced by cleaved high-molecular-weight kininogen (HKa) is matrix dependent and requires the generation of reactive oxygen species. *Blood*, **107**, 4714-4720.

TAKIMOTO,E., CHAMPION,H.C., LI,M., BELARDI,D., REN,S., RODRIGUEZ,E.R., BEDJA,D., GABRIELSON,K.L., WANG,Y. & KASS,D.A. (2005). Chronic inhibition of cyclic GMP phosphodiesterase 5A prevents and reverses cardiac hypertrophy. *Nat. Med.*, **11**, 214-222.

TAN,Y., HUTCHISON,F.N. & JAFFA,A.A. (2004). Mechanisms of angiotensin II-induced expression of B2 kinin receptors. *Am. J Physiol Heart Circ. Physiol*, **286**, H926-H932.

TARASEVICIENE-STEWART,L., SCERBAVICIUS,R., STEWART,J.M., GERA,L., DEMURA,Y., COOL,C., KASPER,M. & VOELKEL,N.F. (2005). Treatment of severe pulmonary hypertension: a bradykinin receptor 2 agonist B9972 causes reduction of pulmonary artery pressure and right ventricular hypertrophy. *Peptides*, **26**, 1292-1300.

TEA,B.S., DAM,T.V., MOREAU,P., HAMET,P. & DEBLOIS,D. (1999). Apoptosis during regression of cardiac hypertrophy in spontaneously hypertensive rats. Temporal regulation and spatial heterogeneity. *Hypertension*, **34**, 229-235.

TEA,B.S., DER,S.S., TOUYZ,R.M., HAMET,P. & DEBLOIS,D. (2000). Proapoptotic and growth-inhibitory role of angiotensin II type 2 receptor in vascular smooth muscle cells of spontaneously hypertensive rats in vivo. *Hypertension*, **35**, 1069-1073.

TEIGER,E., THAN,V.D., RICHARD,L., WISNEWSKY,C., TEA,B.S., GABOURY,L., TREMBLAY,J., SCHWARTZ,K. & HAMET,P. (1996). Apoptosis in pressure overload-induced heart hypertrophy in the rat. *J. Clin. Invest.*, **97**, 2891-2897.

THOMAS,W.G., THEKKUMKARA,T.J. & BAKER,K.M. (1996). Molecular mechanisms of angiotensin II (AT<sub>1A</sub>) receptor endocytosis. *Clin Exp Pharmacol Physiol Suppl*, **3**, S74-S80.

THORIN-TRESCASES,N., DEBLOIS,D. & HAMET,P. (2001). Evidence of an altered in vivo vascular cell turnover in spontaneously hypertensive rats and its modulation by long-term antihypertensive treatment. *J. Cardiovasc. Pharmacol.*, **38**, 764-774.

THYBO,N.K., STEPHENS,N., COOPER,A., AALKJAER,C., HEAGERTY,A.M. & MULVANY,M.J. (1995). Effect of antihypertensive treatment on small arteries of patients with previously untreated essential hypertension. *Hypertension*, **25**, 474-481.

TIAN,B., LIU,J., BITTERMAN,P. & BACHE,R.J. (2003). Angiotensin II modulates nitric oxide-induced cardiac fibroblast apoptosis by activation of AKT/PKB. *Am. J Physiol Heart Circ. Physiol*, **285**, H1105-H1112.

TOMASEK,J.J., GABBIANI,G., HINZ,B., CHAPONNIER,C. & BROWN,R.A. (2002). Myofibroblasts and mechano-regulation of connective tissue remodelling. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **3**, 349-363.

TOUYZ,R.M. (2003a). Reactive oxygen species in vascular biology: role in arterial hypertension. *Expert. Rev. Cardiovasc. Ther.*, **1**, 91-106.

TOUYZ,R.M. (2003b). Recent advances in intracellular signalling in hypertension. *Curr Opin Nephrol Hypertens*, **12**, 165-174.

TOUYZ,R.M., DENG,L.Y., HE,G., WU,X.H. & SCHIFFRIN,E.L. (1999). Angiotensin II stimulates DNA and protein synthesis in vascular smooth muscle cells from human arteries: role of extracellular signal-regulated kinases. *J Hypertens*, **17**, 907-916.

TOUYZ,R.M., HE,G., EL,M.M. & SCHIFFRIN,E.L. (2001). p38 Map kinase regulates vascular smooth muscle cell collagen synthesis by angiotensin II in SHR but not in WKY. *Hypertension*, **37**, 574-580.

TOUYZ,R.M., YAO,G. & SCHIFFRIN,E.L. (2003). c-Src induces phosphorylation and translocation of p47phox: role in superoxide generation by angiotensin II in human vascular smooth muscle cells. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, **23**, 981-987.

TRAN,S.E., HOLMSTROM,T.H., AHONEN,M., KAHARI,V.M. & ERIKSSON,J.E. (2001a). MAPK/ERK overrides the apoptotic signaling from Fas, TNF, and TRAIL receptors. *J Biol. Chem.*, **276**, 16484-16490.

TRAN,S.E., HOLMSTROM,T.H., AHONEN,M., KAHARI,V.M. & ERIKSSON,J.E. (2001b). MAPK/ERK overrides the apoptotic signaling from Fas, TNF, and TRAIL receptors. *J Biol. Chem.*, **276**, 16484-16490.

TRUMP,B.F. & BEREZESKY,I.K. (1995). Calcium-mediated cell injury and cell death. *FASEB J.*, **9**, 219-228.

TSCHOPE,C., GOHLKE,P., ZHU,Y.Z., LINZ,W., SCHOLKENS,B. & UNGER,T. (1997). Antihypertensive and cardioprotective effects after angiotensin-converting enzyme inhibition: role of kinins. *J. Card Fail.*, **3**, 133-148.

TSCHOPE,C., SPILLMANN,F., ALTMANN,C., KOCH,M., WESTERMANN,D., DHAYAT,N., DHAYAT,S., BASCANDS,J.L., GERA,L., HOFFMANN,S., SCHULTHEISS,H.P. & WALTHER,T. (2004). The bradykinin B1 receptor contributes to the cardioprotective effects of AT1 blockade after experimental myocardial infarction. *Cardiovasc. Res.*, **61**, 559-569.

TSOPORIS,J., FIELDS,N., LEE,R.M. & LEENEN,F.H. (1993). Effects of the arterial vasodilator minoxidil on cardiovascular structure and sympathetic activity in spontaneously hypertensive rats. *J Hypertens*, **11**, 1337-1345.

TSUTSUMI,Y., MATSUBARA,H., MASAKI,H., KURIHARA,H., MURASAWA,S., TAKAI,S., MIYAZAKI,M., NOZAWA,Y., OZONO,R., NAKAGAWA,K., MIWA,T., KAWADA,N., MORI,Y., SHIBASAKI,Y., TANAKA,Y., FUJIYAMA,S., KOYAMA,Y., FUJIYAMA,A., TAKAHASHI,H. & IWASAKA,T. (1999). Angiotensin II type 2 receptor overexpression activates the vascular kinin system and causes vasodilation. *J. Clin. Invest.*, **104**, 925-935.

TULENKO,T.N., BROWN,J., LAURY-KLEINTOP,L., KHAN,M., WALTER,M.F. & MASON,R.P. (1999). Atheroprotection with amlodipine: cells to lesions and the PREVENT trial. Prospective Randomized Evaluation of the Vascular Effects of Norvasc Trial. *J Cardiovasc. Pharmacol.*, **33 Suppl 2**, S17-S22.

TURNER,A.J., TIPNIS,S.R., GUY,J.L., RICE,G. & HOOPER,N.M. (2002). ACEH/ACE2 is a novel mammalian metalloproteinase and a homologue of angiotensin-converting enzyme insensitive to ACE inhibitors. *Can. J Physiol Pharmacol.*, **80**, 346-353.

UENO,H., TAKATA,M., OH-HASHI,S., TOMODA,F., YASUMOTO,K. & INOUE,H. (1995). Time course of regression of vascular structural changes and its relation to cytosolic free calcium in hypertensives after nilvadipine treatment. *J Hum. Hypertens.*, **9**, 735-739.

URATA,H., KINOSHITA,A., MISONO,K.S., BUMPUS,F.M. & HUSAIN,A. (1990). Identification of a highly specific chymase as the major angiotensin II-forming enzyme in the human heart. *J Biol. Chem.*, **265**, 22348-22357.

URBANEK,K., QUAINI,F., TASCIA,G., TORELLA,D., CASTALDO,C., NADAL-GINARD,B., LERI,A., KAJSTURA,J., QUAINI,E. & ANVERSA,P. (2003). Intense myocyte formation from cardiac stem cells in human cardiac hypertrophy. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **100**, 10440-10445.

VANBAVEL,E. & MULVANY,M.J. (2006). Integrins in hypertensive remodeling. *Hypertension*, **47**, 147-148.

VANHOUTTE,P.M. (1989). Endothelium and control of vascular function. State of the Art lecture. *Hypertension*, **13**, 658-667.

VEGA,F., PANIZO,A., PARDO-MINDAN,J. & DIEZ,J. (1999). Susceptibility to apoptosis measured by MYC, BCL-2, and BAX expression in arterioles and capillaries of adult spontaneously hypertensive rats. *Am. J Hypertens.*, **12**, 815-820.

VELARDE,V., ULLIAN,M.E., MORINELLI,T.A., MAYFIELD,R.K. & JAFFA,A.A. (1999). Mechanisms of MAPK activation by bradykinin in vascular smooth muscle cells. *Am. J. Physiol*, **277**, C253-C261.

VERDECCHIA,P., CARINI,G., CIRCO,A., DOVELLINI,E., GIOVANNINI,E., LOMBARDO,M., SOLINAS,P., GORINI,M. & MAGGIONI,A.P. (2001). Left ventricular mass and cardiovascular morbidity in essential hypertension: the MAVI study. *J Am. Coll. Cardiol.*, **38**, 1829-1835.

VON,B.C. (2002). Counting particles in tissue sections: choices of methods and importance of calibration to minimize biases. *Histol. Histopathol.*, **17**, 639-648.

WAEBER,B., AUBERT,J.-F., VAVREK,R., STEWART,J.M., NUSSBERGER,J. & BRUNNER,H.R. (1986). Role of bradykinin in blood pressure regulation of conscious spontaneously hypertensive rats. *J. Hypertens.*, **4**, S597-S598.

WALKER,N.P., TALANIAN,R.V., BRADY,K.D., DANG,L.C., BUMP,N.J., FERENZ,C.R., FRANKLIN,S., GHAYUR,T., HACKETT,M.C., HAMMILL,L.D. & . (1994). Crystal structure of the cysteine protease interleukin-1 beta-converting enzyme: a (p20/p10)<sub>2</sub> homodimer. *Cell*, **78**, 343-352.

WALLNER,K., LI,C., SHAH,P.K., WU,K.J., SCHWARTZ,S.M. & SHARIFI,B.G. (2004). EGF-Like domain of tenascin-C is proapoptotic for cultured smooth muscle cells. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, **24**, 1416-1421.

WALTER,S.V. & HAMET,P. (1986). Enhanced DNA synthesis in heart and kidney of newborn spontaneously hypertensive rats. *Hypertension*, **8**, 520-525.

WALTHER,T., SIEMS,W.E., HAUKE,D., SPILLMANN,F., DENDORFER,A., KRAUSE,W., SCHULTHEISS,H.P. & TSCHOPE,C. (2002). AT1 receptor blockade increases cardiac bradykinin via neutral endopeptidase after induction of myocardial infarction in rats. *FASEB J*, **16**, 1237-1241.

WAMHOFF,B.R., BOWLES,D.K., MCDONALD,O.G., SINHA,S., SOMLYO,A.P., SOMLYO,A.V. & OWENS,G.K. (2004). L-type voltage-gated Ca<sup>2+</sup> channels modulate expression of smooth muscle differentiation marker genes via a rho kinase/myocardin/SRF-dependent mechanism. *Circ. Res.*, **95**, 406-414.

WAMHOFF,B.R., BOWLES,D.K. & OWENS,G.K. (2006). Excitation-transcription coupling in arterial smooth muscle. *Circ. Res.*, **98**, 868-878.

WANG,B.Y., HO,H.K., LIN,P.S., SCHWARZACHER,S.P., POLLMAN,M.J., GIBBONS,G.H., TSAO,P.S. & COOKE,J.P. (1999a). Regression of atherosclerosis: role of nitric oxide and apoptosis. *Circulation*, **99**, 1236-1241.

WANG,H.G., PATHAN,N., ETHELL,I.M., KRAJEWSKI,S., YAMAGUCHI,Y., SHIBASAKI,F., MCKEON,F., BOBO,T., FRANKE,T.F. & REED,J.C. (1999b). Ca<sup>2+</sup>-induced apoptosis through calcineurin dephosphorylation of BAD. *Science*, **284**, 339-343.

WANG,Y., HUANG,S., SAH,V.P., ROSS,J., JR., BROWN,J.H., HAN,J. & CHIEN,K.R. (1998). Cardiac muscle cell hypertrophy and apoptosis induced by distinct members of the p38 mitogen-activated protein kinase family. *J Biol. Chem.*, **273**, 2161-2168.

WARSHAW,D.M., ROOT,D.T. & HALPERN,W. (1980). Effects of antihypertensive drug therapy on the morphology and mechanics of resistance arteries from spontaneously hypertensive rats. *Blood Vessels*, **17**, 257-270.

WEBER,K.T. (1997). Extracellular matrix remodeling in heart failure: a role for de novo angiotensin II generation. *Circulation*, **96**, 4065-4082.

WEBER,K.T. & BRILLA,C.G. (1991). Pathological hypertrophy and cardiac interstitium. Fibrosis and renin-angiotensin-aldosterone system. *Circulation*, **83**, 1849-1865.

WEBER,K.T., SUN,Y. & KATWA,L.C. (1997). Myofibroblasts and local angiotensin II in rat cardiac tissue repair. *Int. J Biochem. Cell Biol.*, **29**, 31-42.

WEBER,K.T., SUN,Y., TYAGI,S.C. & CLEUTJENS,J.P. (1994). Collagen network of the myocardium: function, structural remodeling and regulatory mechanisms. *J Mol. Cell Cardiol.*, **26**, 279-292.

WEI,C.C., TIAN,B., PERRY,G., MENG,Q.C., CHEN,Y.F., OPARIL,S. & DELL'ITALIA,L.J. (2002). Differential ANG II generation in plasma and tissue of mice with decreased expression of the ACE gene. *Am. J Physiol Heart Circ. Physiol*, **282**, H2254-H2258.

WELLING,A., LUDWIG,A., ZIMMER,S., KLUGBAUER,N., FLOCKERZI,V. & HOFMANN,F. (1997). Alternatively spliced IS6 segments of the alpha 1C gene determine the tissue-specific dihydropyridine sensitivity of cardiac and vascular smooth muscle L-type Ca<sup>2+</sup> channels. *Circ. Res.*, **81**, 526-532.

WETTSCHURECK,N., RUTTEN,H., ZYWIETZ,A., GEHRING,D., WILKIE,T.M., CHEN,J., CHIEN,K.R. & OFFERMANN,S. (2001). Absence of pressure overload induced myocardial hypertrophy after conditional inactivation of Galphaq/Galphan1 in cardiomyocytes. *Nat. Med.*, **7**, 1236-1240.

WHITFIELD,J.F. (1992). Calcium signals and cancer. *Crit Rev. Oncog.*, **3**, 55-90.

WIENER,J., LOUD,A.V., GIACOMELLI,F. & ANVERSA,P. (1977). Morphometric analysis of hypertension-induced hypertrophy of rat thoracic aorta. *Am. J Pathol.*, **88**, 619-633.

WILDE,D.W., FURSPAN,P.B. & SZOIK,J.F. (1994). Calcium current in smooth muscle cells from normotensive and genetically hypertensive rats. *Hypertension*, **24**, 739-746.

WILLIAMS,B. (1998). Mechanical influences on vascular smooth muscle cell function. *J Hypertens.*, **16**, 1921-1929.

WILLMOTT,N.J., CHOUDHURY,Q. & FLOWER,R.J. (1996). Functional importance of the dihydropyridine-sensitive, yet voltage-insensitive store-operated Ca<sup>2+</sup> influx of U937 cells. *FEBS Lett.*, **394**, 159-164.

WOLF,G., CHEN,S. & ZIYADEH,F.N. (2005). From the periphery of the glomerular capillary wall toward the center of disease: podocyte injury comes of age in diabetic nephropathy. *Diabetes*, **54**, 1626-1634.

WOLINSKY,H. (1971). Effects of hypertension and its reversal on the thoracic aorta of male and female rats. Morphological and chemical studies. *Circ. Res.*, **28**, 622-637.

WOOD,J.M., MAIBAUM,J., RAHUEL,J., GRUTTER,M.G., COHEN,N.C., RASETTI,V., RUGER,H., GOSCHKE,R., STUTZ,S., FUHRER,W., SCHILLING,W., RIGOLLIER,P., YAMAGUCHI,Y., CUMIN,F., BAUM,H.P., SCHNELL,C.R., HEROLD,P., MAH,R., JENSEN,C., O'BRIEN,E., STANTON,A. & BEDIGIAN,M.P. (2003). Structure-based design of aliskiren, a novel orally effective renin inhibitor. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **308**, 698-705.

WOOD,J.M., SCHNELL,C.R., CUMIN,F., MENARD,J. & WEBB,R.L. (2005). Aliskiren, a novel, orally effective renin inhibitor, lowers blood pressure in marmosets and spontaneously hypertensive rats. *J Hypertens.*, **23**, 417-426.

WOODCOCK,J. (2006). Sphingosine and ceramide signalling in apoptosis. *IUBMB. Life*, **58**, 462-466.

WU,Y., DZHURA,I., COLBRAN,R.J. & ANDERSON,M.E. (2001). Calmodulin kinase and a calmodulin-binding 'IQ' domain facilitate L-type Ca<sup>2+</sup> current in rabbit ventricular myocytes by a common mechanism. *J Physiol*, **535**, 679-687.

WYLLIE,A.H. (1980). Glucocorticoid-induced thymocyte apoptosis is associated with endogenous endonuclease activation. *Nature*, **384**, 555-556.

XIA,C.F., YIN,H., YAO,Y.Y., BORLONGAN,C.V., CHAO,L. & CHAO,J. (2006). Kallikrein protects against ischemic stroke by inhibiting apoptosis and inflammation and promoting angiogenesis and neurogenesis. *Hum. Gene Ther.*, **17**, 206-219.

XU,B., XIAO-HONG,L., LIN,G., QUEEN,L. & FERRO,A. (2002). Amlodipine, but not verapamil or nifedipine, dilates rabbit femoral artery largely through a nitric oxide- and kinin-dependent mechanism. *Br. J Pharmacol*, **136**, 375-382.

YAMANAKA,S., TATSUMI,T., SHIRAISHI,J., MANO,A., KEIRA,N., MATOBA,S., ASAYAMA,J., FUSHIKI,S., FLISS,H. & NAKAGAWA,M. (2003). Amlodipine inhibits doxorubicin-induced apoptosis in neonatal rat cardiac myocytes. *J Am. Coll. Cardiol.*, **41**, 870-878.

YAMORI,Y., MORI,C., NISHIO,T., OOSHIMA,A., HORIE,R., OHTAKA,M., SOEDA,T., SAITO,M., ABE,K., NARA,Y., NAKAO,Y. & KIHARA,M. (1979). Cardiac hypertrophy in early hypertension. *Am J Cardiol*, **44**, 964-969.

YANAGISAWA,M., KURIHARA,H., KIMURA,S., TOMOBE,Y., KOBAYASHI,M., MITSUI,Y., YAZAKI,Y., GOTO,K. & MASAKI,T. (1988). A novel potent vasoconstrictor peptide produced by vascular endothelial cells. *Nature*, **332**, 411-415.

YANG,C.M., CHIEN,C.S., MA,Y.H., HSIAO,L.D., LIN,C.H. & WU,C. (2003). Bradykinin B2 receptor-mediated proliferation via activation of the Ras/Raf/MEK/MAPK pathway in rat vascular smooth muscle cells. *J Biomed. Sci.*, **10**, 208-218.

YANG,C.P., MELLADO,W. & HORWITZ,S.B. (1988). Azidopine photoaffinity labeling of multidrug resistance-associated glycoproteins. *Biochem. Pharmacol.*, **37**, 1417-1421.

YIN,H., CHAO,L. & CHAO,J. (2005a). Kallikrein/kinin protects against myocardial apoptosis after ischemia/reperfusion via Akt-glycogen synthase kinase-3 and Akt-Bad.14-3-3 signaling pathways. *J Biol. Chem.*, **280**, 8022-8030.

YIN,X., POLIDANO,E., FAVERDIN,C. & MARCHE,P. (2005b). Role of L-type calcium channel blocking in epidermal growth factor receptor-independent activation of extracellular signal regulated kinase 1/2. *J. Hypertens.*, **23**, 337-350.

YING,W.Z., WANG,P.X. & SANDERS,P.W. (2000). Induction of apoptosis during development of hypertensive nephrosclerosis. *Kidney Int.*, **58**, 2007-2017.

YOSIPIV,I.V., DIPP,S. & EL-DAHR,S.S. (2001). Targeted disruption of the bradykinin B(2) receptor gene in mice alters the ontogeny of the renin-angiotensin system. *Am. J Physiol Renal Physiol*, **281**, F795-F801.

YU,T., MORITA,I., SHIMOKADO,K., IWAI,T. & YOSHIDA,M. (2003). Amlodipine modulates THP-1 cell adhesion to vascular endothelium via inhibition of protein kinase C signal transduction. *Hypertension*, **42**, 329-334.

ZERNIG,G. (1990). Widening potential for Ca<sup>2+</sup> antagonists: non-L-type Ca<sup>2+</sup> channel interaction. *Trends Pharmacol. Sci.*, **11**, 38-44.

ZHAI,P., GALEOTTI,J., LIU,J., HOLLE,E., YU,X., WAGNER,T. & SADOSHIMA,J. (2006). An angiotensin II type 1 receptor mutant lacking epidermal growth factor receptor transactivation does not induce angiotensin II-mediated cardiac hypertrophy. *Circ. Res.*, **99**, 528-536.

ZHANG,X. & HINTZE,T.H. (1998). Amlodipine releases nitric oxide from canine coronary microvessels: an unexpected mechanism of action of a calcium channel-blocking agent. *Circulation*, **97**, 576-580.

ZHANG,X., KICHUK,M.R., MITAL,S., OZ,M., MICHLER,R., NASJLETTI,A., KALEY,G. & HINTZE,T.H. (1999a). Amlodipine promotes kinin-mediated nitric oxide production in coronary microvessels of failing human hearts. *Am. J Cardiol.*, **84**, 27L-33L.

ZHANG,X., RECCHIA,F.A., BERNSTEIN,R., XU,X., NASJLETTI,A. & HINTZE,T.H. (1999b). Kinin-mediated coronary nitric oxide production contributes to the therapeutic action of angiotensin-converting enzyme and neutral endopeptidase inhibitors and amlodipine in the treatment in heart failure. *J Pharmacol Exp Ther*, **288**, 742-751.

ZHANG,X., XU,X., NASJLETTI,A. & HINTZE,T.H. (2000). Amlodipine enhances NO production induced by an ACE inhibitor through a kinin-mediated mechanism in canine coronary microvessels. *J Cardiovasc. Pharmacol*, **35**, 195-202.

ZHANG,X.P., LOKE,K.E., MITAL,S., CHAHWALA,S. & HINTZE,T.H. (2002). Paradoxical release of nitric oxide by an L-type calcium channel antagonist, the R<sup>+</sup> enantiomer of amlodipine. *J Cardiovasc. Pharmacol.*, **39**, 208-214.

ZHANG,X.P., MITAL,S. & HINTZE,T.H. (2001). Angiotensin AT<sub>2</sub> and AT<sub>4</sub> receptor blockade prevents amlodipine and its R<sup>+</sup> enantiomer stimulated endothelial nitric oxide production. *Circulation*, **104** (suppl II), II-33. Abstract.

ZHANG,Y., YAO,B., DELIKAT,S., BAYOUMY,S., LIN,X.H., BASU,S., MCGINLEY,M., CHAN-HUI,P.Y., LICHENSTEIN,H. & KOLESNICK,R. (1997). Kinase suppressor of Ras is ceramide-activated protein kinase. *Cell*, **89**, 63-72.

ZHANG,Y.Q. & HERMAN,B. (2006). ARC protects rat cardiomyocytes against oxidative stress through inhibition of caspase-2 mediated mitochondrial pathway. *J Cell Biochem.*, **99**, 575-588.

ZHAO,W., UEHARA,Y., CHU,G., SONG,Q., QIAN,J., YOUNG,K. & KRANIAS,E.G. (2004). Threonine-17 phosphorylation of phospholamban: a key determinant of frequency-dependent increase of cardiac contractility. *J Mol. Cell Cardiol.*, **37**, 607-612.

ZHOU,X., ONO,H., ONO,Y. & FROHLICH,E.D. (2002). N- and L-type calcium channel antagonist improves glomerular dynamics, reverses severe nephrosclerosis, and inhibits apoptosis and proliferation in an L-NAME/SHR model. *J Hypertens.*, **20**, 993-1000.

ZHOU,X., PRADO,G.N., TAYLOR,L., YANG,X. & POLGAR,P. (2000). Regulation of inducible bradykinin B1 receptor gene expression through absence of internalization and resensitization. *J Cell Biochem.*, **78**, 351-362.

ZHU,D.L., HEREMBERT,T., CARUELLE,D., CARUELLE,J.P. & MARCHE,P. (1994). Involvement of calcium channels in fibroblast growth factor-induced activation of arterial cells in spontaneously hypertensive rats. *J Cardiovasc Pharmacol*, **23**, 395-400.

ZHU,P., ZAUGG,C.E., HORNSTEIN,P.S., ALLEGRINI,P.R. & BUSER,P.T. (1999). Bradykinin-dependent cardioprotective effects of losartan against ischemia and reperfusion in rat hearts. *J. Cardiovasc. Pharmacol.*, **33**, 785-790.

ZHU,Y.C., STAUSS,H.M., BAO,G., GOHLKE,P., ZHU,Y.Z., REDLICH,T. & UNGER,T. (1995). Role of bradykinin in the antihypertensive and cardioprotective actions of converting enzyme inhibitors. *Can. J Physiol Pharmacol.*, **73**, 827-831.

ZIESCHE,R., PETKOV,V., LAMBERS,C., ERNE,P. & BLOCK,L.H. (2004). The calcium channel blocker amlodipine exerts its anti-proliferative action via p21(Waf1/Cip1) gene activation. *FASEB J*, **18**, 1516-1523.

ZOU,H., HENZEL,W.J., LIU,X., LUTSCHG,A. & WANG,X. (1997). Apaf-1, a human protein homologous to *C. elegans* CED-4, participates in cytochrome c-dependent activation of caspase-3. *Cell*, **90**, 405-413.

ZOU,Y., AKAZAWA,H., QIN,Y., SANO,M., TAKANO,H., MINAMINO,T., MAKITA,N., IWANAGA,K., ZHU,W., KUDOH,S., TOKO,H., TAMURA,K., KIHARA,M., NAGAI,T., FUKAMIZU,A., UMEMURA,S., IIRI,T., FUJITA,T. & KOMURO,I. (2004). Mechanical stress activates angiotensin II type 1 receptor without the involvement of angiotensin II. *Nat. Cell Biol.*, **6**, 499-506.

ZOU,Y., YAMAZAKI,T., NAKAGAWA,K., YAMADA,H., IRIGUCHI,N., TOKO,H., TAKANO,H., AKAZAWA,H., NAGAI,R. & KOMURO,I. (2002). Continuous blockade of L-type Ca<sup>2+</sup> channels suppresses activation of calcineurin and development of cardiac hypertrophy in spontaneously hypertensive rats. *Hypertens. Res.*, **25**, 117-124.

ZWADLO,C. & BORLAK,J. (2005). Disease-associated changes in the expression of ion channels, ion receptors, ion exchangers and Ca<sup>2+</sup>-handling proteins in heart hypertrophy. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **207**, 244-256.

## **Annexe**

### **Chapitre extrait d'un livre:**

Hale T.M., Duguay D. & deBlois D.

Apoptosis: molecular mechanisms in hypertension. In: Re RN, DiPette DJ, Schiffrin EL, Sowers JR (eds). Molecular mechanisms in hypertension.

Abingdon: Taylor & Francis, 2006; pp 275-290.

## 31

# Apoptosis: molecular mechanisms in hypertension

Taben M Hale, David Duguay and Denis deBlois

## INTRODUCTION

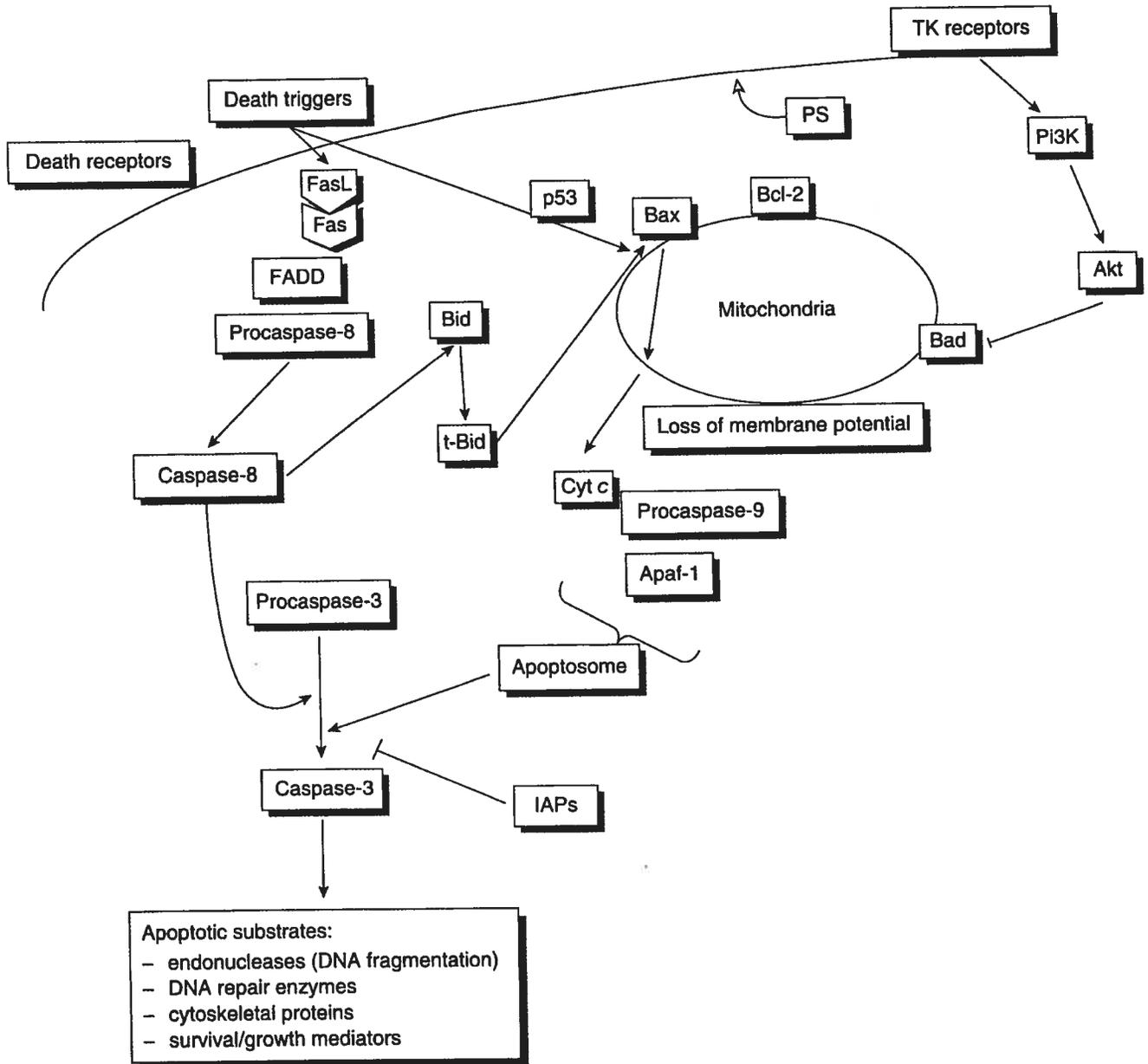
Apoptosis is a highly regulated form of cell death that acts as the essential counterpart of cell proliferation.<sup>1</sup> Initially described in the context of organ morphogenesis in the invertebrate nematode and mammalian embryo, apoptosis is often referred to as 'programmed cell death'. For instance, an increase in programmed cell death of cardiomyocytes in the right ventricle has been implicated in normal assymetrical postnatal morphogenesis of the cardiac chambers.<sup>2</sup> The identification over the last 15 years of the key genes mediating apoptotic cell death in mammals has set the stage for a remarkable increase in studies implicating apoptosis in cardiovascular diseases. As discussed below, these include conditions where apoptosis is increased relative to cell replication, such as in cardiomyocyte loss during progression to heart failure, arterial atrophy leading to aneurysm, and capillary rarefaction in hypertension. In contrast, decreased apoptosis relative to cell replication can lead to tissue hyperplasia, as in arterial remodeling in hypertension and atherosclerosis. Finally, enhanced cell turnover due to an increase in both apoptosis and cell proliferation has been proposed as a mechanism leading to premature endothelial cell senescence.

## PATHWAYS OF APOPTOSIS

Apoptosis is regulated by a complex interplay of environmental cues that are not specific for apoptosis but are shared with common major signaling pathways for cell growth and differentiation. These include, for instance, cytokines (e.g. Fas, tumor necrosis factor (TNF), interleukin (IL)-6), growth factors (e.g. platelet-derived growth factor (PDGF), insulin-like growth factor

(IGF)-1), endocrine mediators (angiotensin (Ang) II, endothelin), reactive oxygen species (ROS, e.g. superoxide, hydrogen peroxide) and specific ( $\alpha_v\beta_3, \beta_1$ ) integrin engagement with extracellular matrix components.<sup>3,4</sup> Several of these cues promote cell growth by increasing cell survival via the activation of protein kinase pathways such as with PDGF or IGF-1 receptor, ERK-1/2, phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K)/Akt pathway or focal adhesion kinase-1 (FAK-1) pathways. The regulation of apoptosis shows a high degree of cell specificity. For instance, AT<sub>1</sub> receptors for Ang II stimulate replication in vascular smooth muscle cells (SMCs) and cardiac fibroblasts, and enhance apoptosis in cardiomyocytes and macrovascular endothelial cells.<sup>5</sup> In addition to target cell type, the effects on cell growth versus apoptosis are also dependent on the type and amount of inducer, e.g. with low versus high levels of ROS having opposite effects.<sup>6</sup>

In contrast to necrotic death – where cells typically swell and show random DNA cleavage and lytic disintegration of cytoplasmic and nuclear membranes, eventually triggering inflammation – apoptotic cells show a characteristic well-ordained sequence of morphological changes.<sup>1,7</sup> These include chromatin condensation and margination in sharply delineated masses at the nuclear envelope, cytoplasmic condensation and rigidification, cell volume shrinkage, as well as budding of nuclear and plasma membranes to produce apoptotic bodies containing closely packed, well-preserved organelles. Figure 31.1 summarizes key intracellular pathways of apoptosis. A specific feature of apoptosis is the activation of calcium-dependent cysteine proteases present as zymogen in all cell types: the caspases.<sup>8</sup> Over the recent 15 years, the identification of the key genes regulating apoptosis in mammalian cells has generated investigative tools and spurred a wealth of studies that have greatly increased our understanding of the role



**Figure 31.1** Pathways involved in death receptor or mitochondrial-mediated apoptosis. Death receptor (e.g. Fas) stimulation, causes recruitment of fas associated death domain (FADD) and, activation of caspase-8, which then activates the executioner caspases (e.g. caspase-3), responsible for typical apoptotic morphological changes. Activation of the pro-apoptotic factor, Bid (via caspase-8), results in translocation of Bax to the mitochondrial membrane and release of cytochrome c (Cyt c), which then associates with apoptotic protease activating factor-1 (APAF-1) and caspase-9 causing activation of caspase-3. The mitochondrial pathway of apoptosis can be stimulated directly by certain death triggers (e.g. oxidative stress) leading to an upset in the balance between pro-apoptotic (e.g. Bax, Bad) and anti-apoptotic (e.g. Bcl-2) mitochondrial factors, and subsequent Cyt c release. Stimulation of tyrosine kinase (TK) receptors may inhibit apoptosis via phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) and Akt activation. Finally, inhibitors of apoptosis proteins (IAPs) can prevent caspase-3 activation. PS, phosphatidyl serine

of apoptosis in cardiovascular disorders. In addition to morphology, apoptosis is now defined biochemically as 'caspase-dependent cell death'<sup>9</sup> (other types of 'programmed cell death' exist but are much less prevalent<sup>10</sup>).

To date, the caspase family includes 14 members mainly involved in apoptosis initiation (e.g. caspase-8 and -9), execution (e.g. caspase-3) or in cytokine maturation (e.g. caspase-1, also called interleukin-1

converting enzyme). Caspases are activated by homo- or hetero-dimerization followed by limited proteolysis and generation of the active enzyme. Apoptosis can be triggered either by activation of the death receptor superfamily, such as Fas/CD95 or TNF receptor, or by the loss of mitochondrial membrane potential leading to the release of caspase activating factors. The death receptor pathway involves clustering of activated death receptor and the formation of a death-inducing signaling complex (DISC) at the intracellular domain of the receptors. The DISC includes the adaptor molecule Fas-associated death domain (FADD), which recruits several procaspase-8 molecules. Proximity facilitates the mutual cleavage of procaspase-8 molecules, ultimately releasing active caspase-8 into the cytoplasm. The mitochondrial pathway of apoptosis can be triggered by multiple signals including oxidative stress, calcium overload or pro-apoptotic members of the Bcl-2 family of apoptosis regulatory proteins. Loss of mitochondrial membrane potential leads to the release of cytochrome c. Cytochrome c forms a multimeric complex called the apoptosome, which includes the adaptor molecule Apaf-1, ATP, and procaspase-9.

The death receptor and mitochondrial pathways converge toward the activation of cytoplasmic caspases, among which caspase-3 is the prototypical member, to execute the apoptotic program. The two pathways are also linked and regulated by pro-apoptotic (Bax, Bid) and anti-apoptotic (Bcl-2, Bcl-X<sub>L</sub>) members of the Bcl-2 protein family. The balance between anti- and pro-apoptotic Bcl-2 family members is critical to determine if a cell undergoes apoptosis.<sup>11</sup> For instance, the mitochondrial pathway can be activated via caspase-8 cleavage of cytoplasmic Bid. Following a death signal, Bid and/or Bax can associate with the mitochondria to induce membrane depolarization and formation of the apoptosome complex.<sup>12,13</sup> In contrast, up-regulated expression of Bcl-2 inhibits apoptosis in most models. Caspases further facilitate apoptosis by degrading a wide array of target proteins including DNA repair enzymes such as poly(ADP-ribose) polymerase (PARP), cytoskeletal proteins such as actin and gelsolin and important survival/growth mediators such as Bcl-2 and ERK kinase kinase 1. Thus, the death receptor and mitochondrial pathways are not mutually exclusive and show coordinate activation in most cells. Depending on the condition, the mitochondrial pathway may trigger or act as an amplifier of the apoptotic process. The proteolytic activity of caspases results in the activation of specific endonucleases that cut genomic DNA between nucleosomes to generate fragments of approximately 180 base pairs, a hallmark of apoptosis showing up as a DNA ladder following agarose gel electrophoresis.

Finally, the control of intracellular K<sup>+</sup> ion appears to play an important role in apoptosis regulation.<sup>14-16</sup> Enhanced K<sup>+</sup> efflux is an essential mediator of not only early apoptotic shrinkage but also downstream caspase activation and DNA fragmentation.<sup>17</sup>

## APOPTOSIS IN HYPERTENSION

The initial observation implicating apoptosis in hypertension came from studies in spontaneously hypertensive rats (SHRs), a model of genetically determined hypertension showing aortic, cardiac, and renal hyperplasia, as well as accelerated loss of neuronal cells. Using *in situ* radioactive labeling of internucleosomal DNA fragmentation Hamet et al.<sup>18</sup> reported that apoptosis is enhanced in target organs (aortic SMCs, heart, kidney and brain) of hypertension in young adult rats and mice as compared with normotensive controls. Further studies showed that neonatal cardiac hyperplasia in SHRs is associated with increased DNA replication and reduced apoptosis within 24 hours of birth.<sup>19,20</sup> Moreover, radioactive labeling of genomic DNA in utero revealed a 50% decrease in the half-life of DNA in the kidney, heart and thoracic aorta in pre-hypertensive SHRs as compared with Wistar-Kyoto (WKY) rats, suggesting increased cell turnover in this model of hypertension.<sup>21,22</sup> The Ang II pathway has been implicated in these differences in cell turnover.<sup>21,23</sup> As shown in Table 31.1,<sup>24-63</sup> current evidence indicates that apoptosis is differentially regulated in a wide variety of tissues (cardiovascular and non-cardiovascular) in SHRs relative to normotensive WKY rats. Most, although not all, of these differences remain after blood pressure reduction or when cells are cultured *in vitro*. Together these data implicate both hemodynamic and non-hemodynamic (genetic, humoral) components in apoptosis regulation in SHRs. It is important to note however, that SMCs and cardiomyocytes cultured from SHRs show enhanced susceptibility to apoptosis induction in response to serum withdrawal or stimulation of the cyclic AMP pathway.<sup>18,42,64-70</sup> Alterations in apoptosis regulation are not specific to the SHR model, since aortic SMCs from DOCA-salt rats also show increased DNA laddering, caspase-3 activation and Bax to Bcl-2 protein ratio.<sup>31</sup> Paradoxically, Ang II infusion in rats enhanced SMC apoptosis with caspase-3 activation and increased Bax to Bcl-2 protein ratio.<sup>71</sup> Other studies showed that Ang II infusion induces SMC DNA replication.<sup>72</sup> Consistent with this, previous studies in *c-myc* transfected SMCs suggested that proliferating cells are at higher risk of undergoing apoptosis.<sup>73</sup>

Table 31.1 Differential apoptosis in spontaneously hypertensive rats (SHRs) relative to normotensive rats

<i>Organ/cell type</i>	<i>Change in SHRs vs normotensive rats</i>	<i>Detection method</i>	<i>Comment/suggested role</i>	<i>References</i>
<b>Vascular</b>				
Endothelial cells	↑	Ethidium bromide staining, caspase-3 expression	Capillary rarefaction, prevented by adrenalectomy	24–27
	↓ (mesenteric vessels)	TUNEL and DNA laddering	1–2-week-old SHR, role in increasing media-to-lumen ratio	28
	No difference (aorta)	TUNEL and morphology	4–12-week-old SHR	29
SMCs	↑ (mesenteric vessels)	TUNEL and morphology	4–12-week-old SHR, role in maintenance of eutrophic remodeling	29
	↓ (intra-myocardial arteries)	Bax and Bcl-2 protein expression	36-week-old SHR Normalization by ACE inhibitor Role in hypertrophic remodeling	30
	↑ (aorta)	DNA fragmentation, TUNEL, caspase-3, increased Bax to Bcl-2 protein ratio, reduced cell number	Young adult SHR Induction with ACE inhibitor, ARB, CCB and ET <sub>A</sub> endothelin receptor blockade	31,32 33–36
Adventitial fibroblasts	↓ (mesenteric vessels)	TUNEL and DNA laddering	1–2-week-old SHR, role in increasing adventitial mass	28
<b>Cardiac</b>				
Whole heart	↓	DNA fragmentation, TUNEL, morphology	1–2-week-old SHR Establishment of hypertrophy/hyperplasia	20
Whole heart	↑		4–24-week-old SHR	18, 37, 38
Cardiomyocytes	↑	TUNEL, annexin V binding, caspase-3 cleavage, increased Bax to Bcl-2 protein ratio	Transition from compensated hypertrophy to heart failure Prevented By ACE inhibitors, ARB, CCB and vasopeptidase inhibitors	39 40–42 43
Fibroblasts	↑	TUNEL, DNA fragmentation, caspase-3 cleavage, increased Bax to Bcl-2 protein ratio	Transient induction with ACE inhibitor, ARB, CCB Reversal of fibroblast hyperplasia	44, 45
<b>Renal</b>				
Kidney	↓		1–2-week-old SHR Establishment of hypertrophy/hyperplasia	20
	↑		4–24-week-old SHRs In the inner cortex and medulla	18
Mesangial cells	↑	TUNEL, propidium iodide staining, increased Bax to Bcl-2 protein ratio	In response to serum deprivation in cultured cells	46

Table 31.1 (Continued)

Organ/cell type	Change in SHRs vs normotensive rats	Detection method	Comment/suggested role	References
Glomerular cells	↑	Caspase-3 expression	Prevented by omapatrilat Bradykinin was implicated	47
Tubular epithelial and interstitial cells	↑	TUNEL, increased Bax to Bcl-X <sub>L</sub> protein ratio	SHR with 5/6 renal mass reduction, attenuated by renin-angiotensin system inhibitors	48
<b>Brain</b>				
Brain	↑		In the cortex, striatum, hippocampus and thalamus	18
	↑ (frontal and occipital cortex)	TUNEL	24-week-old SHR	49
	↑ (CA <sub>1</sub> and dentate gyrus in hippocampus)	TUNEL	In 24-week-old SHR Linked to a decrease in white and gray matter volume	50
Neurons	↑ (retinal ganglionic neurons and photoreceptors)	TUNEL	Attenuated by blood pressure lowering No change in other retinal cells populations	51
<b>Other</b>				
Hepatocytes	↓	TUNEL	Following CCL <sub>4</sub> in vivo Suggested as an anti-apoptotic effect of the sympathetic nervous system that promotes liver fibrosis	52
Intestinal cells	↑ (cells of the jejunal crypt)	Morphology	Increased sensibility to radiation Prevented by reserpine (sympathetic dysfunction)	53
Osteocytes	↑	Morphology and TUNEL	During development of femoral head osteonecrosis	54
Prostate cells	↑ (prostate epithelium or no change)	TUNEL, caspase-3 and -8 expression	SHR is a prostatic hyperplasia model Proliferation is more increased than apoptosis	55–58
<b>Immune system</b>				
Lymphocytes	↑ (thymus)		8-week-old SHR	59
Thymocytes	↑	TUNEL, propidium iodide staining, DNA fragmentation	Decrease in number of CD8+ cells in thymus and peripheral T cells DNA fragmentation in thymus prevented by adrenalectomy	60–63

TUNEL, terminal transferase dUTP, nick and labeling; ACE, angiotensin converting enzyme; ARB, AT<sub>1</sub> receptor blocker for angiotensin II; CCB, calcium channel blocker.

Increased telomerase activity has been implicated in vascular SMC (VSMC) growth.<sup>74,75</sup> Telomerase activity is enhanced in aortic VSMCs from SHR between the age of 2 and 12 weeks,<sup>70</sup> a period of active vascular remodeling. Disruption of telomerase activity in normotensive VSMCs induces cell growth arrest.<sup>74</sup> In contrast, it induces apoptosis in SHR VSMCs, a response that can be prevented by overexpression of p53.<sup>70</sup> Thus, not only do SHR VSMCs express increased telomerase activity, but they appear to be more dependent on it for their survival, compared with VSMCs isolated from normotensive animals. The *in vivo* significance of these observations remains unclear, although 'premature cell senescence' can result from enhanced activation of growth pathways,<sup>76</sup> as seen in hypertensive cells.<sup>77</sup> Increased pulse pressure in hypertension is associated with reduced telomere length, suggestive of accelerated cardiovascular aging.<sup>78,79</sup> Telomerase activity is increasingly being implicated in cell growth and inhibition of apoptosis.<sup>80</sup> In SHR the increase in both growth and apoptosis in SMCs may contribute to the increased cell turnover.<sup>21</sup> As an alternate mechanism, it should be noted that oxidative stress has also been demonstrated to shorten telomere length.

### SMC apoptosis in hypertension

Vascular remodeling can occur as a normal adaptive response to long-term changes in arterial pressure or blood flow, a pathologic result of vessel injury, progression of vascular disease, or as a result of pharmacological intervention. For example, in hypertension vessels undergo structural changes that result in an increase in vascular mass characterized by increases in cell number (hyperplasia), cell size (cellular hypertrophy), or both. Whether these changes occur prior to or as a result of elevation in blood pressure is a widely debated issue. Regardless, evidence has accumulated to show that dysregulation of the balance between VSMC growth and death is critical in the development of vascular hypertrophy. Several proteins known to be involved in cell growth and death have been shown to be expressed at different levels when comparing arteries from normotensive and hypertensive rats. These altered expression levels can suggest the mechanism by which the past growth occurred (e.g.  $\uparrow$  mitogen-activated protein kinase (MAPK)),<sup>81</sup> or counter-regulatory mechanisms that may control further proliferation (e.g.  $\uparrow$  peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR)).<sup>82</sup>

While the mechanisms involved in structural modification of vessels have not been fully elucidated,

apoptosis has been shown to play a role with impact varying with disease, drug treatment, and vessel type. VSMC apoptosis in resistance arteries has been shown to occur *in vivo* during development of hypertension<sup>29</sup> and as a result of changes in blood flow.<sup>83</sup> For example, apoptosis was significantly increased in mesenteric small resistance arteries of SHR vs WKY rats after 8 and 12 weeks of age, a time when blood pressure is rising, media to lumen ratio is increased, and hypertension is being established.<sup>29</sup> Vascular remodeling due to long-term changes in blood flow has been demonstrated experimentally in carotid and mesenteric arteries. In the studies with mesenteric arteries, ligation of one artery results in reduction of flow downstream, and a redirection of blood to an adjacent artery thereby exposing it to a sudden increase in flow. Apoptosis has been shown to be evident in both low flow and high flow arteries during the respective reduction and increase in medial size.<sup>83</sup> Similar studies in the carotid arteries demonstrate increases in apoptosis resulting from significant decreases in blood flow.<sup>84</sup>

Changes in wall stress and stretch have been shown to modulate cell survival both *in vivo* and *in vitro*. While the mechanisms mediating these changes have not been fully elucidated, integrin signaling,<sup>85</sup> ROSs,<sup>86</sup> nitric oxide (NO),<sup>86</sup> and stimulation of AT<sub>2</sub> and ET<sub>B</sub> receptors<sup>86,87</sup> have been proposed to be involved. The stimuli for vascular remodeling are equally diverse. Vessels must maintain the ability to change their structure in order to maintain perfusion to vital organs as well as minimize large variations in wall stress. Indeed, increases in wall stress and circumferential stretch of VSMCs can stimulate vascular remodeling, although the mechanisms have not been fully elucidated. Proposed mechanisms have involved changes in integrin signaling and receptor populations. Stretch-induced signaling through  $\beta_1$  integrin has been demonstrated to increase activation of p38 MAPK to directly phosphorylate p53.<sup>85</sup> Further studies revealed that stretch could directly trigger the TNF receptor pathway, even in the absence of ligand. Stretch of VSMCs led to increased association of TNF receptor 1 with TRAF-2, resulting in sustained JNK and p38 activation and apoptosis.<sup>88</sup> In addition, endothelin has also been proposed to play a role in stretch-induced apoptosis.<sup>87</sup> Endothelin-1 (ET-1), acting on ET<sub>A</sub> receptor is a potent vasoconstrictor and mitogen for VSMCs.<sup>89</sup> In contrast, stimulation of ET<sub>B</sub> receptors on VSMCs has been shown to promote relaxation and apoptosis.<sup>87</sup> Stretch causes endothelial cells to increase production of ET-1, and smooth muscle cells to shift their receptor population from

predominantly  $ET_A$  to  $ET_B$ . This results in direct stimulation of the  $ET_B$  receptor, resulting in VSMC apoptosis.<sup>87</sup> This effect has further been shown in an *ex vivo* model, where perfusion pressure was increased in isolated rat carotid arteries. As with increased stretch in cultured cells, increases in perfusion pressure resulted in significant  $ET_B$ -mediated apoptosis of VSMCs.<sup>90</sup>

Ang II also plays an important role in both physiological and pathophysiological vascular remodeling. Like ET-1, Ang II is a potent vasoconstrictor and mitogen. These primary effects are mediated through the  $AT_1$  receptor located on the SMC.<sup>91</sup> Stimulation of the  $AT_2$  receptor, however, leads to SMC relaxation, growth inhibition and apoptosis.<sup>36,91</sup> In addition, experimental studies using  $AT_1$  receptor blockers (ARBs) in hypertensive rats have demonstrated  $AT_2$  receptor-mediated apoptosis.<sup>36</sup> While blockade of  $AT_2$  receptors under normal conditions does not impact on VSMC survival, during  $AT_1$  antagonism there is a marked increase in apoptosis. It is therefore suggested that blocking the  $AT_1$  receptor allows for unopposed stimulation of  $AT_2$  receptors by Ang II. While the exact signaling pathway remains unknown, the down-regulation of Bax and sequential activation of caspases-3 and -9 have been shown.<sup>35</sup> Furthermore, caspase inhibition using the pan-caspase inhibitor Z-VAD resulted in a marked attenuation of the regression of vascular hypertrophy and SMC apoptosis, suggesting that apoptosis is an obligatory step in losartan ( $AT_1$  antagonist)-induced vascular remodeling.<sup>35</sup>

One of the mechanisms by which Ang II stimulates VSMC growth is via generation of ROS. It, along with other factors involved in cellular growth/death responses, including (but not limited to) TNF, PDGF, Ox-LDL, high glucose, and vascular endothelial growth factor (VEGF) generate ROS such as  $H_2O_2$ , superoxide and peroxynitrite.<sup>6</sup> ROS are increased in arteries of SHR vs WKY rats,<sup>92</sup> as well as in atherosclerotic lesions.<sup>6</sup> Downstream mediators are also diverse with targets that include ERK, SAPK, NF $\kappa$ B, caspases, and Akt kinase. While it was long understood that ROS were involved in vascular pathologies, recent evidence has suggested that these species may also play a role in normal vascular physiology. In fact, there is now a growing understanding that ROS can participate in growth, survival and death responses in VSMCs. The ultimate effect is highly context-dependent, with the species and amount of oxidant produced, and the local milieu playing critical roles.<sup>6</sup>

In addition to Ang II antagonists, other antihypertensive agents, including angiotensin converting enzyme (ACE) inhibitors and calcium channel blockers, have

also been shown to induce apoptosis in SHR aortic SMCs.<sup>33</sup> While the exact mechanisms involved in this process have not been fully elucidated, it has been determined that in each case, there is a 30% reduction in cell number. Importantly, treatment with the vasodilator hydralazine does not result in aortic SMC apoptosis or regression of hypertrophy, despite similar reduction in blood pressure.<sup>33</sup> More recently the cholesterol-lowering drugs that inhibit the enzyme HMG coA-reductase, commonly known as 'statins', have also been shown to induce apoptosis in hypertensive arteries.<sup>93,94</sup> The current state of knowledge suggests that this apoptosis occurs via the mitochondrial pathway. During exposure to statins, in the VSMC there is a decrease in Bcl-2 levels, no change in Bax, and caspase-9 activation.<sup>93</sup> Further, these agents have been shown to sensitize human cultured SMCs to FAS and cytokine-induced apoptosis.<sup>94</sup> Therefore, not only are these agents able to induce apoptosis directly, but they also cause the cells to be more susceptible to cell death. Whether these findings can be replicated *in vivo* is the focus of ongoing experiments.

Recently, the PPARs have been shown to also play a role in vascular remodeling. Much of the early work on this receptor system focused on metabolism, diabetes, and atherosclerosis. The findings that came from the atherosclerosis work led to the investigation of these receptors in other vascular growth disorders, including hypertension. PPAR $\alpha$  and PPAR $\gamma$  have both been shown to have a significantly higher expression in aorta and mesenteric arteries of adult SHRs relative to age-matched WKY rats.<sup>82</sup> Given that stimulation of these receptors on VSMCs induces apoptosis, the current hypothesis is that this increased expression may serve as a counter-regulatory mechanism to limit the hyperplasia seen in hypertensive vessels. PPAR $\gamma$ -induced apoptosis appears to occur in part, through transforming growth factor (TGF)- $\beta$ 1-mediated nuclear recruitment of phosphorylated SMAD-2,<sup>95</sup> while PPAR $\alpha$  mediates this effect, in part through a p38 MAPK pathway and through alterations of the mitochondrial membrane potential leading to cytochrome c release.<sup>96</sup>

While VSMC turnover is a rare event in fully developed arteries, it remains an option for at least some cells. Traditionally evidence of apoptosis has been considered an area of concern and associated with vascular disease and pathology. However, we have since learned that this is an important mechanism by which vessels can adapt their structure to maintain appropriate perfusion. Furthermore, apoptosis has also been shown to play a role in the secondary benefits associated with certain pharmacotherapies.

The role of apoptosis in the different modes of (hypertrophic, eutrophic, atrophic) arterial remodeling in hypertension remains unclear. SMC apoptosis has been implicated in the development of saccular cerebral aneurysm both in rodent models<sup>97</sup> and in humans, where it is associated with activation of the c-JNK/c-Jun pathway,<sup>98</sup> vessel rupture and stroke.<sup>99</sup> In human essential hypertension, SMC hyperplasia is observed in large arteries, whereas small resistance vessels are mainly characterized by inward eutrophic remodeling.<sup>29,86,100</sup> Remodeling of resistance arteries with antihypertensive drug treatment involves outward remodeling and decrease in the wall to lumen ratio. Because apoptosis induction by therapeutic drugs appears to occur selectively in large rather than small arteries, its role is probably more important in controlling vascular compliance and atherosclerotic progression than in systemic blood pressure regulation.

### ***Therapeutic apoptosis in pulmonary hypertension***

As the first study showing that neointimal hyperplasia could be reversible by apoptosis induction, Pollman et al. showed that antisense oligonucleotides targeting the anti-apoptotic gene *bcl-x<sub>L</sub>* resulted in vascular lesion regression by inducing SMC apoptosis in rabbit carotid arteries with an established intimal lesion several weeks after balloon injury.<sup>101</sup> SMCs found in the intima are phenotypically distinct from medial SMCs in terms of extracellular matrix production and proliferation.<sup>102</sup> The sensitivity to basal or drug-induced apoptosis is enhanced in intimal SMC in vitro<sup>103</sup> and in vivo,<sup>104</sup> a feature that is associated with the up-regulation of apoptotic genes.<sup>101,105-109</sup> The field of pulmonary hypertension has been among the most active in documenting the potential therapeutic role of apoptosis induction to control intimal hyperplasia. The monocrotaline-injected rat is a well-characterized model of pulmonary hypertension showing a marked increase in pulmonary artery pressure (due to endothelial injury, intimal hyperplasia and stenosis of peripheral pulmonary vessels), right ventricular hypertrophy and ultimately death within weeks. Candidate approaches currently being evaluated and showing the ability to induce intimal SMC apoptosis in pulmonary hypertension include phosphodiesterase 5 inhibition (e.g. with sildenafil),<sup>110</sup> statins,<sup>68,111</sup> Rho-kinase inhibition,<sup>112</sup> and elastase inhibition.<sup>113</sup> In the latter study, complete reversal of fatal pulmonary hypertension was attained with a serine elastase inhibitor acting via a decrease in tenascin and other matrix components

interacting with the  $\alpha_v\beta_3$  integrin pathway. Additional candidate pathways for intimal SMC apoptosis induction in pulmonary hypertension include inactivation of survivin<sup>114</sup> and activation of the bone morphogenetic protein type II receptor/smad-1 pathway.<sup>115</sup> It remains unclear whether endothelin antagonists, a current therapy of pulmonary hypertension, induce SMC apoptosis to regress SMC hyperplasia in pulmonary arteries.<sup>116</sup>

### **Apoptosis in vascular endothelial cells**

Capillary formation by angiogenesis is an important determinant of the balance between tissue perfusion and ischemia. Capillary rarefaction is commonly observed in hypertensive organs, suggesting reduced endothelial cell survival.<sup>117</sup> Enhanced endothelial apoptosis contributing to capillary rarefaction has been reported in SHR, glucocorticoid-mediated hypertension in rats, renal hypertension in rats, and peripheral skeletal muscle (after experimental heart failure) in rabbits.<sup>24,59,118,119</sup>

Current evidence suggests that endothelial apoptosis is regulated differently in capillaries versus larger vessels. Notably, AT<sub>1</sub> receptors for Ang II inhibit caspase-3 activation and apoptosis in microvascular endothelial cells deprived of serum in vitro or in a murine model of retinal vascular regression.<sup>120</sup> AT<sub>1</sub> receptor-mediated survival is attributed to the stimulation of the PI3K/Akt pathway, epidermal growth factor receptor transactivation and up-regulation of survivin but not activation of ERK1/2 or ROS. In mouse models of angiogenesis induced by peripheral artery ligation, AT<sub>1</sub> receptors stimulate angiogenesis via the VEGF/endothelial nitric oxide synthase (eNOS) pathway whereas AT<sub>2</sub> receptors suppress angiogenesis by inducing endothelial apoptosis.<sup>121,122</sup> Interestingly, aldosterone stimulates angiogenesis in part via the inhibition of AT<sub>2</sub> receptor expression.<sup>123</sup> In contrast, stimulation of macrovascular endothelial cells with Ang II induces apoptosis via the activation of AT<sub>1</sub> and AT<sub>2</sub> receptors, the MAP kinase phosphatase-3-dependent dephosphorylation of ERK1/2, leading to the degradation of Bcl-2.<sup>124,125</sup> Inducers of endothelial apoptosis also include ROS, in part due to Ang II stimulation of NADPH oxidase in hypertension.<sup>126</sup> It should be emphasized, however, that ROS can increase endothelial cell survival at low doses.<sup>6</sup> Notably, exposure to low concentrations of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> provides protection via induction of the intracellular redox regulator thioredoxin-1.<sup>127</sup> A similar dose-dependent regulation of apoptosis has also been described for statins in angiogenesis.<sup>128</sup> Cytokines such as TNF are also important regulators of endothelial

inflammation and apoptosis.<sup>129,130</sup> Notably, TNF was implicated in the pro-apoptotic effect of serum from heart failure patients in cultured human endothelial cells.<sup>131</sup>

Ang II-induced endothelial cell apoptosis is attenuated by NO.<sup>125</sup> Inhibitors of endothelial apoptosis also include laminar fluid shear stress, endothelin ET<sub>B</sub> receptors acting via the ERK1/2 pathway,<sup>132,133</sup> NF- $\kappa$ B<sup>134</sup> and NO-induced telomerase activation.<sup>135</sup> Thus, therapies likely to reduce endothelial apoptosis in hypertension include drugs with the potential to reduce vascular inflammation and increase NO bioavailability, such as inhibitors of the renin-angiotensin system (RAS) and calcium channel blockers. The inhibition of endothelial apoptosis may impact favorably on vascular hyperplasia, as suggested by the observation that endothelial cells undergoing apoptosis release a paracrine anti-apoptotic factor for SMCs, acting via ERK1/2 phosphorylation, decreased expression of p53 and increased expression of the anti-apoptotic factor Bcl-x<sub>L</sub> in SMCs.<sup>135</sup> This factor was identified as the C-terminal fragment of perlecan domain V.<sup>135</sup>

### Apoptosis in the heart

The heart is a complex organ where terminally differentiated cardiomyocytes contribute to >70% of organ mass but only about 30% of cell number. In addition to neurons, the non-cardiomyocyte population includes proliferation-competent cells such as fibroblasts (mainly), vascular cells, and immune cells. The population dynamics for these cell types is regulated in a cell type-specific manner developmentally, during disease and therapy. Following the postnatal period of proliferation, cardiomyocyte or cardiac neuron numbers do not change significantly unless cell loss occurs. A large body of experimental and clinical evidence accumulated over the last 10 years indicates that apoptosis contributes to cardiac damage via the loss of cardiomyocytes or neurons leading to heart failure and cardiac conduction system disorders.<sup>136-139</sup> Some<sup>64</sup> but not all<sup>40,41</sup> studies have documented cardiomyocyte apoptosis in young hypertensive SHR, an increase that is concomitant with the development of fibroblast hyperplasia.<sup>64</sup> All studies, however, concur in finding an increased cardiac susceptibility to apoptosis as evidenced by an increase Bax to Bcl-2 protein ratio that is not associated with changes in p53 expression levels.<sup>41</sup> The compensated left ventricle of 30-week-old SHR shows increased cardiomyocyte apoptosis,<sup>39,40</sup> a feature that is reduced by prophylactic treatment with ACE inhibitors or ARBs over 14 weeks.<sup>39-41</sup> In this case, apoptosis inhibition

correlates with ventricular ACE inhibition but not blood pressure reduction.<sup>40</sup> Consistent with this, Ang II stimulates apoptosis in cultured cardiomyocytes via AT<sub>1</sub> receptor activation.<sup>42,140,141</sup> Some<sup>42</sup> but not all<sup>140</sup> studies show a pro-apoptotic effect of Ang II AT<sub>2</sub> receptors in cultured cardiomyocytes. When cardiomyocytes from SHR and normotensive WKY rats are compared in culture, the apoptotic effect of Ang II is greater in SHR than WKY cells.<sup>42</sup> Moreover, cardiomyocytes from SHR but not WKY rats show AT<sub>2</sub> receptor-mediated apoptosis *in vitro*.<sup>42</sup> Treatment with a vasopeptidase inhibitor mimicked the protective effect of an AT<sub>1</sub> blocker against remodeling and cardiomyocyte apoptosis in SHR fed a high salt diet.<sup>142</sup> In long-term studies, the lifespan of stroke-prone SHR is normalized from 15-18 months to 30 months, either by early-onset treatment (in 1-month-old rats) or late-onset treatment (in 15-month-old rats) with an ACE inhibitor.<sup>143,144</sup>

Non-genetic models of hypertension clearly demonstrate that increased mechanical load induces cardiomyocyte apoptosis. Cardiac pressure overload following aortic coarctation induces a rapid increase in cardiomyocyte apoptosis preceding the development of left ventricular hypertrophy. Under pressure overload, AT<sub>1</sub> receptors recruit the p53 pathway to increase cardiomyocyte apoptosis.<sup>140</sup> In turn, p53 activates the RAS and Ang II production in cardiomyocytes, leading to AT<sub>1</sub>-dependent apoptosis.<sup>141</sup> The results of the Randomized Aldactone Evaluation Study (RALES) trial have generated renewed interest in aldosterone and its specific contribution to cardiovascular diseases.<sup>145</sup> Aldosterone stimulates cardiomyocyte apoptosis both *in vivo* and in cultured cells to a similar extent as Ang II.<sup>146</sup> The occurrence of clinical data underlining the therapeutic potential of aldosterone antagonists, before an established pathophysiological explanation was available, is reminiscent of the rise of ACE inhibitors and beta-blockers in heart failure treatment. Indeed the control of heart failure with beta-blockers is also associated with the inhibition of cardiomyocyte apoptosis.<sup>147</sup> Consistent with this, beta-adrenergic receptor activation enhances apoptosis in cultured cardiomyocytes, via the cAMP/protein kinase A pathway.<sup>148</sup> Overall the inhibition of cardiomyocyte apoptosis now represents one of the principal reasons for improved clinical outlook in heart failure with these inhibitors. ROS are a class of mediators for which experimental evidence awaits confirmation from direct therapeutic intervention in the clinic.<sup>149</sup> In a dog model of dilated cardiomyopathy induced by ventricular pacing, apoptosis of cardiomyocytes, fibroblasts, and endothelial cells precedes and correlates over time with ventricular decompensation, suggesting that oxidative

stress and levels of anti-oxidant defenses may be critical for the regulation of apoptosis in the overloaded heart.<sup>150</sup>

Since cardiomyocytes undergoing hypertrophy are at greater risk of undergoing apoptosis, a key question is to unravel the mechanisms involved in determining the ultimate fate of these cells. Pro-apoptotic pathways include apoptosis signal-regulating kinase-1 and TGF kinase-1, upstream of p38 and JNK MAP kinases.<sup>151,152</sup> Two different isoforms of the MAP kinase p38 show different effects in response to mechanical stress, with p38 $\alpha$  promoting p53 activation, Bax expression and activation of the mitochondrial pathway of apoptosis, while p38 $\beta$  promotes hypertrophy.<sup>153</sup> Also, JNK kinase activation alone results in hypertrophy whereas co-activation of JNK and p38 MAP kinases triggers apoptosis. Another pathway of heart failure involves TNF- $\alpha$ .<sup>154</sup> These pro-apoptotic pathways are counterbalanced by the Raf-1 kinase pathway,<sup>155</sup> as well as ligands of the gp130 receptor, including IL-6 and leukemia inhibitor factor, which recruit the JAK/STAT signaling pathway to increase expression of embryonic genes and pro-survival factors (see elsewhere for review<sup>156</sup>). Evidence of apoptosis in the human hypertensive heart remains scarce. A small study showed an increased number of TUNEL-positive cardiomyocytes and non-cardiomyocytes in right septal endomyocardial biopsies obtained from 28 hypertensive patients.<sup>69</sup> At 12 months post-randomization for treatment, losartan reduced the number of TUNEL-positive cardiomyocytes and non-cardiomyocytes while no effect was detected for amlodipine.

The suggestion that increased cardiomyocyte apoptosis participates in the etiology of heart failure<sup>138</sup> probably contributed to the negative view of apoptosis prevalent in the field of cardiovascular diseases. However, the up-regulation of apoptosis in certain cardiovascular cells may contribute to the beneficial action of antihypertensive drugs on cardiovascular structure.<sup>31-33,36,45,157</sup> As an explanation for this apparent discrepancy, the same stimulus, e.g. Ang II acting via AT<sub>1</sub> receptors, can stimulate proliferation in fibroblasts and promote apoptosis in cardiomyocytes.<sup>158-160</sup> Consistent with this pattern of response, fibroblasts undergo apoptosis in SHR treated with ACE inhibition or AT<sub>1</sub> receptor blockade.<sup>44</sup> In contrast, blood pressure reduction with hydralazine does not induce cardiac apoptosis.<sup>45</sup> It is proposed that inhibitors of the RAS in SHR increase apoptosis transiently and selectively in cardiac fibroblasts early during drug treatment, while they prevent the progressive deletion of cardiomyocytes during long-term therapy. Another

example of cell-specific regulation of apoptosis is beta-adrenergic signaling, which stimulates apoptosis in cardiomyocytes (via the cAMP pathway)<sup>148,161,162</sup> and proliferation in cardiac fibroblasts (via the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway).<sup>163,164</sup> As in vascular cells, ROS induce either apoptosis or hypertrophy in cardiac cells in a dose-dependent manner.<sup>165,166</sup> The enhanced apoptosis in all cardiac cells seen in human hypertensive subjects<sup>69</sup> or animal models of heart failure,<sup>150</sup> and its attenuation by therapy, may involve the modulation of cardiac inflammation and oxidative stress. In summary, the regulation of cardiac apoptosis during disease development and therapy is regulated in a time-dependent and cell-specific manner. Whether induction of fibroblast apoptosis is relevant to anti-fibrotic effects of therapeutic drugs remains to be determined.

### Apoptosis in the kidney

Hypertension is the second most frequent cause of end-stage renal disease (ESRD), surpassed only by diabetes. It is also a consequence of ESRD, further increasing the rate of renal function loss. Hypertensive nephropathy is characterized by glomerular sclerosis, interstitial fibrosis and tubular atrophy, leading to progressive nephron loss. Apoptosis is increased in the kidney glomerular and tubular compartments in various settings of experimental hypertension,<sup>48,167-170</sup> as is susceptibility to apoptosis in cells from those compartments when compared with a normotensive control.<sup>46-48</sup> Renal apoptosis can be beneficial through deletion of excess resident cells and leukocytes near inflammation sites, but can also contribute to the pathology indirectly by eliminating already injured cells or directly by depletion of glomerular and tubular cells.<sup>170,171</sup> A reduced rate of interstitial cell apoptosis (fibroblasts) may promote renal fibrosis, while increased apoptosis in glomerular capillary endothelial cells may lead to microvascular rarefaction.

In humans, apoptosis is observed in the glomeruli of patients with various pathologic conditions,<sup>172-174</sup> including glomerular sclerosis,<sup>174</sup> and in tubulointerstitial cells of diabetic kidney.<sup>175</sup> Data on the regulation of renal apoptosis in hypertensive patients are very scarce. Reduced kidney weight and tubular atrophy observed in hypertensive nephropathy, as well as apoptosis in similar nephropathies and experimental models, suggest a role for apoptosis in the progression towards ESRD in hypertensive patients. Ang II-mediated generation of ROS and increased expression of TGF- $\beta$ , via both AT<sub>1</sub> and AT<sub>2</sub>, followed

by p38MAPK activation and binding of Fas ligand to Fas, appear to be major pathways of renal apoptosis induction. Damage to the visceral glomerular epithelial cell layer (podocytes) is implicated in numerous renal diseases progressing to ESRD:<sup>176</sup> podocytes represent the last barrier before denudation of the glomerular basal membrane, they have a critical role in maintaining the structure and function of the glomerular filter and their injury is associated with proteinuria.<sup>177</sup> Podocytopenia, due to both detachment and apoptosis followed by a lack of proliferation, is observed in nephropathies associated with glomerular hypertension and contributes to development of glomerulosclerosis.<sup>177</sup> Proteinuria can then promote the secretion of cytokines (e.g. TGF- $\beta$ ), thus contributing to progression of the disease by stimulation of fibrosis and apoptosis in the tubulo-interstitium.<sup>178</sup> Apoptosis is also observed in mesangial cells,<sup>179-181</sup> where accumulation of a matrix of altered quality (e.g. collagen I and fibronectin found in sclerotic glomeruli, as opposed to collagen IV and laminin in normal glomeruli) could reduce their survival.<sup>182,183</sup> Finally, apoptosis is observed in glomerular endothelial cells, playing a role in glomerulosclerosis progression<sup>184,185</sup> and also in the tubulo-interstitium compartment, after the development of fibrosis, and contributing to tubular atrophy.<sup>186,187</sup>

Antihypertensive agents prevent renal apoptosis (podocytes, mesangial and tubular cells) in experimental models of hypertension,<sup>48,180,186,188-191</sup> slowing the progression of renal disease. Interestingly, with the same reduction of blood pressure, hydralazine only partially prevents tubulo-interstitial apoptosis following Ang II infusion, while the AT<sub>1</sub> antagonist losartan prevents it completely.<sup>192</sup> Renal apoptosis prevention by RAS inhibitors can thus be partially dissociated from their blood pressure-lowering action,<sup>193</sup> an effect that could be related to the reduction of renal apoptosis following activation of the kallikrein-kinin system<sup>194</sup> or to the reduction of TGF- $\beta$  activity.<sup>167</sup> By inhibiting glomerular apoptosis, calcium channel blockers and beta-blockers prevent glomerular injuries in a rat model of severe hypertensive nephrosclerosis,<sup>180,195-197</sup> whereas the pathology was exacerbated by a diuretic.<sup>198</sup> However, new therapies are needed as ESRD continues to increase in the hypertensive population. It is proposed that a targeted inhibition of renal apoptosis, mainly in podocytes, could further reduce progression to ESRD. Activation of IGF-1,<sup>199</sup> nephrin (via VEGF),<sup>200</sup> and the heme oxygenase system,<sup>186,192</sup> as well as inhibition of TGF- $\beta$ -mediated deleterious renal effects with tranilast<sup>166</sup> represent interesting novel strategies.

## CONCLUSION

In summary, apoptosis is a prevalent determinant of cell fate in all target organs of hypertension. Although in many conditions the clinical relevance of apoptosis remains to be established, experimental evidence supporting a causal pathophysiological role is growing, particularly in the progression to heart failure. However, apoptosis, like cell replication, is neither good nor bad but rather context-dependent. Because it is a gene-regulated rather than a chaotic mode of cell death, apoptosis is intrinsically amenable to therapeutic intervention: it may be up- or down-regulated during therapy depending on the cell type. As an important corollary, the development of cardiovascular hyperplasia, with its negative impact on morbidity and mortality, can no longer be considered as an irreversible process. These considerations form the basis for the suggestion that apoptosis will become a major therapeutic target in the near future.

## ACKNOWLEDGMENTS

The work was supported in part by a grant from the Canadian Institutes of Health Research (CIHR-45452). D. Duguay holds a Canada Graduate Scholarship-CIHR doctoral Award T.M. Hale holds a CHS-CIHR post-doctoral fellowship.

## REFERENCES

1. Majno G, Joris I. Apoptosis, oncosis and necrosis. An overview of cell death. *Am J Pathol* 1995; 146: 3-15.
2. Kajstura J, Mansukhani M, Cheng W et al. Programmed cell death and expression of the protooncogene bcl-2 in myocytes during postnatal maturation of the heart. *Exp Cell Res* 1995; 219: 110-21.
3. Green DR, Kroemer G. The pathophysiology of mitochondrial cell death. *Science* 2004; 305: 626-9.
4. Johnson GL, Lapadat R. Mitogen-activated protein kinase pathways mediated by ERK, JNK, and p38 protein kinases. *Science* 2002; 298: 1911-12.
5. deBlois D, Orlov SN, Hamet P. Apoptosis in cardiovascular remodeling - effect of medication. *Cardiovasc Drugs Ther* 2001; 15: 539-45.
6. Irani K. Oxidant signaling in vascular cell growth, death, and survival: a review of the roles of reactive oxygen species in smooth muscle and endothelial cell mitogenic and apoptotic signaling. *Circ Res* 2000; 87: 179-83.
7. Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer* 1972; 26: 239-57.
8. Hengartner MO. The biochemistry of apoptosis. *Nature* 2000; 407: 770-6.

9. Schwartz SM. Cell death and the caspase cascade. *Circulation* 1998; 97: 227-9.
10. Kitanaka C, Kuchino Y. Caspase-independent programmed cell death with necrotic morphology. *Cell Death Differ* 1999; 6: 508-15.
11. Mallat Z, Tedgui A. Apoptosis in the vasculature: mechanisms and functional importance. *Br J Pharmacol* 2000; 130: 947-62.
12. Silke J, Vaux DL. Cell death: shadow boxing. *Curr Biol* 1998; 8: R528-R531.
13. Wolter KG, Hsu YT, Smith CL et al. Movement of Bax from the cytosol to mitochondria during apoptosis. *J Cell Biol* 1997; 139: 1281-92.
14. Taurin S, Seyrantepe V, Orlov SN et al. Proteome analysis and functional expression identify mortalin as an antiapoptotic gene induced by elevation of  $[Na^+]_i/[K^+]_i$  ratio in cultured vascular smooth muscle cells. *Circ Res* 2002; 91: 915-22.
15. Orlov SN, Pchejetski D, Taurin S et al. Apoptosis in serum-deprived vascular smooth muscle cells: evidence for cell volume-independent mechanism. *Apoptosis* 2004; 9: 55-66.
16. Orlov SN, Thorin-Trescases N, Pchejetski D et al.  $Na^+/K^+$  pump and endothelial cell survival:  $[Na^+]_i/[K^+]_i$ -independent necrosis triggered by ouabain, and protection against apoptosis mediated by elevation of  $[Na^+]_i$ . *Pflugers Arch* 2004; 448: 335-45.
17. Remillard CV, Yuan JX. Activation of  $K^+$  channels: an essential pathway in programmed cell death. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2004; 286: L49-L67.
18. Hamet P, Richard L, Dam TV et al. Apoptosis in target organs of hypertension. *Hypertension* 1995; 26: 642-8.
19. Walter SV, Hamet P. Enhanced DNA synthesis in heart and kidney of newborn spontaneously hypertensive rats. *Hypertension* 1986; 8: 520-5.
20. Moreau P, Tea BS, Dam TV et al. Altered balance between cell replication and apoptosis in hearts and kidneys of newborn SHR. *Hypertension* 1997; 30: 720-4.
21. Thorin-Trescases N, deBlois D, Hamet P. Evidence of an altered in vivo vascular cell turnover in spontaneously hypertensive rats and its modulation by long-term antihypertensive treatment. *J Cardiovasc Pharmacol* 2001; 38: 764-74.
22. Hamet P, Thorin-Trescases N, Moreau P et al. Workshop: excess growth and apoptosis: is hypertension a case of accelerated aging of cardiovascular cells? *Hypertension* 2001; 37: 760-6.
23. Choi JH, Yoo KH, Cheon HW et al. Angiotensin converting enzyme inhibition decreases cell turnover in the neonatal rat heart. *Pediatr Res* 2002; 52: 325-32.
24. Gobe G, Browning J, Howard T et al. Apoptosis occurs in endothelial cells during hypertension-induced microvascular rarefaction. *J Struct Biol* 1997; 118: 63-72.
25. Greene AS. Life and death in the microcirculation: a role for angiotensin II. *Microcirculation* 1998; 5: 101-7.
26. Lim HH, DeLano FA, Schmid-Schonbein GW. Life and death cell labeling in the microcirculation of the spontaneously hypertensive rat. *J Vasc Res* 2001; 38: 228-36.
27. Wu CH, Chi JC, Jerng JS et al. Transendothelial macromolecular transport in the aorta of spontaneously hypertensive rats. *Hypertension* 1990; 16: 154-61.
28. Dickhout JG, Lee RM. Apoptosis in the muscular arteries from young spontaneously hypertensive rats. *J Hypertens* 1999; 17: 1413-19.
29. Rizzoni D, Rodella L, Porteri E et al. Time course of apoptosis in small resistance arteries of spontaneously hypertensive rats. *J Hypertens* 2000; 18: 885-91.
30. Diez J, Panizo A, Hernandez M et al. Is the regulation of apoptosis altered in smooth muscle cells of adult spontaneously hypertensive rats? *Hypertension* 1997; 29: 776-80.
31. Sharifi AM, Schiffrin EL. Apoptosis in aorta of deoxycorticosterone acetate-salt hypertensive rats: effect of endothelin receptor antagonism. *J Hypertens* 1997; 15: 1441-8.
32. Sharifi AM, Schiffrin EL. Apoptosis in vasculature of spontaneously hypertensive rats: effect of an angiotensin converting enzyme inhibitor and a calcium channel antagonist. *Am J Hypertens* 1998; 11: 1108-16.
33. deBlois D, Tea BS, Dam TV et al. Smooth muscle cell apoptosis during vascular regression in spontaneously hypertensive rats. *Hypertension* 1997; 29 (1pt1): 340-9.
34. Duguay D, Sarkissian SD, Kouz R et al. Kinin B2 receptor is not involved in enalapril-induced apoptosis and regression of hypertrophy in spontaneously hypertensive rat aorta: possible role of B1 receptor. *Br J Pharmacol* 2004; 141: 728-36.
35. Marchand EL, Der SS, Hamet P et al. Caspase-dependent cell death mediates the early phase of aortic hypertrophy regression in losartan-treated spontaneously hypertensive rats. *Circ Res* 2003; 92: 777-84.
36. Tea BS, Der Sarkissian S, Touyz RM et al. Proapoptotic and growth-inhibitory role of angiotensin II type 2 receptor in vascular smooth muscle cells of spontaneously hypertensive rats in vivo. *Hypertension* 2000; 35: 1069-73.
37. Li W, Sun N, Liu W et al. Influence of Valsartan on myocardial apoptosis in spontaneously hypertensive rats. *Chin Med J (Engl)* 2002; 115: 364-6.
38. Peng L, Bradeley C, Liu J. [Investigation of inhibitory effect of ramipril on apoptosis in spontaneously hypertensive rats.] *Hua Xi Yi Ke Da Xue Xue Bao* 1999; 30: 40-3 (in Chinese).
39. Li Z, Bing OH, Long X et al. Increased cardiomyocyte apoptosis during the transition to heart failure in the spontaneously hypertensive rat. *Am J Physiol* 1997; 272: H2313-H2319.
40. Diez J, Panizo A, Hernandez M et al. Cardiomyocyte apoptosis and cardiac angiotensin-converting enzyme in spontaneously hypertensive rats. *Hypertension* 1997; 30: 1029-34.
41. Fortuno MA, Ravassa S, Etayo JC et al. Overexpression of Bax protein and enhanced apoptosis in the left ventricle of spontaneously hypertensive rats: effects of AT1 blockade with losartan. *Hypertension* 1998; 32: 280-6.
42. Ravassa S, Fortuno MA, Gonzalez A et al. Mechanisms of increased susceptibility to angiotensin II-induced apoptosis in ventricular cardiomyocytes of spontaneously hypertensive rats. *Hypertension* 2000; 36: 1065-71.
43. Yu G, Liang X, Xie X et al. Diverse effects of chronic treatment with losartan, foscipril, and amlodipine on apoptosis, angiotensin II in the left ventricle of hypertensive rats. *Int J Cardiol* 2001; 81: 123-9.
44. Der Sarkissian S, Marchand EL, Duguay D et al. Reversal of interstitial fibroblast hyperplasia via apoptosis in hypertensive rat heart with valsartan or enalapril. *Cardiovasc Res* 2003; 57: 775-83.
45. Tea BS, Dam TV, Moreau P et al. Apoptosis during regression of cardiac hypertrophy in spontaneously hypertensive rats: temporal regulation and spatial heterogeneity. *Hypertension* 1999; 34: 229-35.
46. Rodriguez-Lopez AM, Flores O, Martinez-Salgado C et al. Increased apoptosis susceptibility in mesangial cells from spontaneously hypertensive rats. *Microvasc Res* 2000; 59: 80-7.
47. Zhou X, Ono H, Ono Y et al. Renoprotective effects of omapatrilat are mediated partially by bradykinin. *Am J Nephrol* 2003; 23: 214-21.
48. Soto K, Gomez-Garre D, Largo R et al. Tight blood pressure control decreases apoptosis during renal damage. *Kidney Int* 2004; 65: 811-22.
49. Mignini F, Vitaoli L, Sabbatini M et al. The cerebral cortex of spontaneously hypertensive rats: a quantitative microanatomical study. *Clin Exp Hypertens* 2004; 26: 287-303.

50. Sabbatini M, Strocchi P, Vitaioli L et al. The hippocampus in spontaneously hypertensive rats: a quantitative microanatomical study. *Neuroscience* 2000; 100: 251–8.
51. Sabbatini M, Strocchi P, Vitaioli L et al. Changes of retinal neurons and glial fibrillary acid protein immunoreactive astrocytes in spontaneously hypertensive rats. *J Hypertens* 2001; 19: 1861–9.
52. Hamasaki K, Nakashima M, Naito S et al. The sympathetic nervous system promotes carbon tetrachloride-induced liver cirrhosis in rats by suppressing apoptosis and enhancing the growth kinetics of regenerating hepatocytes. *J Gastroenterol* 2001; 36: 111–20.
53. Matsuu M, Shichijo K, Nakamura Y et al. The role of the sympathetic nervous system in radiation-induced apoptosis in jejunal crypt cells of spontaneously hypertensive rats. *J Radiat Res (Tokyo)* 2000; 41: 55–65.
54. Shibahara M, Nishida K, Asahara H et al. Increased osteocyte apoptosis during the development of femoral head osteonecrosis in spontaneously hypertensive rats. *Acta Med Okayama* 2000; 54: 67–74.
55. Lujan M, Ferruelo A, Paez A et al. Prostate apoptosis after doxazosin treatment in the spontaneous hypertensive rat model. *BJU Int* 2004; 93: 410–14.
56. Matityahou A, Rosenzweig N, Golomb E. Rapid proliferation of prostatic epithelial cells in spontaneously hypertensive rats: a model of spontaneous hypertension and prostate hyperplasia. *J Androl* 2003; 24: 263–9.
57. Yamashita M, Zhang X, Shiraishi T et al. Determination of percent area density of epithelial and stromal components in development of prostatic hyperplasia in spontaneously hypertensive rats. *Urology* 2003; 61: 484–9.
58. Zhang X, Na Y, Guo Y. Biologic feature of prostatic hyperplasia developed in spontaneously hypertensive rats. *Urology* 2004; 63: 983–8.
59. Suematsu M, Suzuki H, DeLano FA et al. The inflammatory aspect of the microcirculation in hypertension: oxidative stress, leukocytes/endothelial interaction, apoptosis. *Microcirculation* 2002; 9: 259–76.
60. Fannon LD, Braylan RC, Phillips MI. Alterations of lymphocyte populations during development in the spontaneously hypertensive rat. *J Hypertens* 1992; 10: 629–34.
61. Takeichi N, Suzuki K, Okayasu T et al. Immunological depression in spontaneously hypertensive rats. *Clin Exp Immunol* 1980; 40: 120–6.
62. Suzuki H, DeLano FA, Jamshidi N et al. Enhanced DNA fragmentation in the thymus of spontaneously hypertensive rats. *Am J Physiol* 1999; 276: H2135–H2140.
63. Zhao XS, Tian DZ, Ding YJ et al. Effect of cathepsin B on thymocyte apoptosis in spontaneously hypertensive rats. *Acta Pharmacol Sin* 2001; 22: 26–31.
64. Liu JJ, Peng L, Bradley CJ et al. Increased apoptosis in the heart of genetic hypertension, associated with increased fibroblasts. *Cardiovasc Res* 2000; 45: 729–35.
65. Klett CP, Palmer A, Gallagher AM et al. Differences in cultured cardiac fibroblast populations isolated from SHR and WKY rats. *Clin Exp Pharmacol Physiol Suppl* 1995; 22: S265–S267.
66. Touyz RM, Fareh J, Thibault G et al. Intracellular Ca<sup>2+</sup> modulation by angiotensin II and endothelin-1 in cardiomyocytes and fibroblasts from hypertrophied hearts of spontaneously hypertensive rats. *Hypertension* 1996; 28: 797–805.
67. Ragolia L, Palaia T, Paric E et al. Prostaglandin D<sub>2</sub> synthase inhibits the exaggerated growth phenotype of spontaneously hypertensive rat vascular smooth muscle cells. *J Biol Chem* 2003; 278: 22175–81.
68. Fouty BW, Rodman DM. Mevastatin can cause G1 arrest and induce apoptosis in pulmonary artery smooth muscle cells through a p27Kip1-independent pathway. *Circ Res* 2003; 92: 501–9.
69. Gonzalez A, Lopez B, Ravassa S et al. Stimulation of cardiac apoptosis in essential hypertension: potential role of angiotensin II. *Hypertension* 2002; 39: 75–80.
70. Cao Y, Li H, Mu FT et al. Telomerase activation causes vascular smooth muscle cell proliferation in genetic hypertension. *FASEB J* 2002; 16: 96–8.
71. Diep QN, Li JS, Schiffrin EL. In vivo study of AT(1) and AT(2) angiotensin receptors in apoptosis in rat blood vessels. *Hypertension* 1999; 34: 617–24.
72. Daemen MJAP, Lombardi DM, Bosman FT et al. Angiotensin II induces smooth muscle cell proliferation in the normal and injured arterial wall. *Circ Res* 1991; 68: 450–6.
73. Bennett MR, Evan GI, Newby AC. Deregulated expression of the c-myc oncogene abolishes inhibition of proliferation of rat vascular smooth muscle cells by serum reduction, interferon-gamma, heparin, and cyclic nucleotide analogues and induces apoptosis. *Circ Res* 1994; 74: 525–36.
74. Minamino T, Kourembanas S. Mechanisms of telomerase induction during vascular smooth muscle cell proliferation. *Circ Res* 2001; 89: 237–43.
75. Liu JP. Studies of the molecular mechanisms in the regulation of telomerase activity. *FASEB J* 1999; 13: 2091–104.
76. Lloyd AC. Limits to lifespan. *Nat Cell Biol* 2002; 4: E25–E27.
77. Touyz RM, El Mabrouk M, He G et al. Mitogen-activated protein/extracellular signal-regulated kinase inhibition attenuates angiotensin II-mediated signaling and contraction in spontaneously hypertensive rat vascular smooth muscle cells. *Circ Res* 1999; 84: 505–15.
78. Aviv A. Chronology versus biology: telomeres, essential hypertension, and vascular aging. *Hypertension* 2002; 40: 229–32.
79. Jeanclos E, Schork NJ, Kyvik KO et al. Telomere length inversely correlates with pulse pressure and is highly familial. *Hypertension* 2000; 36: 195–200.
80. Serrano AL, Andres V. Telomeres and cardiovascular disease: does size matter? *Circ Res* 2004; 94: 575–84.
81. Kim S, Murakami T, Izumi Y et al. Extracellular signal-regulated kinase and c-Jun NH<sub>2</sub>-terminal kinase activities are continuously and differentially increased in aorta of hypertensive rats. *Biochem Biophys Res Commun* 1997; 236: 199–204.
82. Diep QN, Schiffrin EL. Increased expression of peroxisome proliferator-activated receptor-alpha and -gamma in blood vessels of spontaneously hypertensive rats. *Hypertension* 2001; 38: 249–54.
83. Buus CL, Pourageaud F, Fazzi GE et al. Smooth muscle cell changes during flow-related remodeling of rat mesenteric resistance arteries. *Circ Res* 2001; 89: 180–6.
84. Cho A, Mitchell L, Koopmans D et al. Effects of changes in blood flow rate on cell death and cell proliferation in carotid arteries of immature rabbits. *Circ Res* 1997; 81: 328–37.
85. Wernig F, Mayr M, Xu Q. Mechanical stretch-induced apoptosis in smooth muscle cells is mediated by {beta} 1-integrin signaling pathways. *Hypertension* 2003; 41: 903–11.
86. Intengan HD, Schiffrin EL. Vascular remodeling in hypertension: roles of apoptosis, inflammation, and fibrosis. *Hypertension* 2001; 38: 581–7.
87. Cattaruzza M, Dimigen C, Ehrenreich H et al. Stretch-induced endothelin B receptor-mediated apoptosis in vascular smooth muscle cells. *FASEB J* 2000; 14: 991–8.
88. Sotoudeh M, Li YS, Yajima N et al. Induction of apoptosis in vascular smooth muscle cells by mechanical stretch. *Am J Physiol – Heart Circ Physiol* 2002; 282: H1709–H1716.

89. Masaki T, Miwa S, Sawamura T et al. Subcellular mechanisms of endothelin action in vascular system. *Eur J Pharmacol* 1999; 375: 133-8.
90. Lauth M, Berger MM, Cattaruzza M et al. Elevated perfusion pressure upregulates endothelin-1 and endothelin B receptor expression in the rabbit carotid artery. *Hypertension* 2000; 35: 648-54.
91. Touyz RM, Berry C. Recent advances in angiotensin II signaling. *Braz J Med Biol Res* 2002; 35: 1001-15.
92. Taniyama Y, Griendling KK. Reactive oxygen species in the vasculature: molecular and cellular mechanisms. *Hypertension* 2003; 42: 1075-81.
93. Blanco-Colio LM, Villa A, Ortego M et al. 3-Hydroxy-3-methyl-glutaryl coenzyme A reductase inhibitors, atorvastatin and simvastatin, induce apoptosis of vascular smooth muscle cells by downregulation of Bcl-2 expression and Rho A prenylation. *Atherosclerosis* 2002; 161: 17-26.
94. Knapp AC, Huang J, Starling G et al. Inhibitors of HMG-CoA reductase sensitize human smooth muscle cells to Fas-ligand and cytokine-induced cell death. *Atherosclerosis* 2000; 152: 217-27.
95. Redondo S, Ruiz E, Santos-Gallego CG et al. Pioglitazone induces vascular smooth muscle cell apoptosis through a peroxisome proliferator-activated receptor-gamma, transforming growth factor-beta 1, and a Smad2-dependent mechanism. *Diabetes* 2005; 54: 811-17.
96. Diep QN, Touyz RM, Schiffrin EL. Docosahexaenoic acid, a peroxisome proliferator-activated receptor-alpha ligand, induces apoptosis in vascular smooth muscle cells by stimulation of p38 mitogen-activated protein kinase. *Hypertension* 2000; 36: 851-55.
97. Kondo S, Hashimoto N, Kikuchi H et al. Apoptosis of medial smooth muscle cells in the development of saccular cerebral aneurysms in rats [see comments]. *Stroke* 1998; 29: 181-18.
98. Takagi Y, Ishikawa M, Nozaki K et al. Increased expression of phosphorylated c-Jun amino-terminal kinase and phosphorylated c-Jun in human cerebral aneurysms: role of the c-Jun amino-terminal kinase/c-Jun pathway in apoptosis of vascular walls. *Neurosurgery* 2002; 51: 997-1002.
99. Frosen J, Piippo A, Paetau A et al. Remodeling of saccular cerebral artery aneurysm wall is associated with rupture: histological analysis of 24 unruptured and 42 ruptured cases. *Stroke* 2004; 35: 2287-93.
100. Mulvany MJ. Small artery remodeling and significance in the development of hypertension. *News Physiol Sci* 2002; 17: 105-09.
101. Pollman MJ, Hall JL, Mann MJ et al. Inhibition of neointimal cell bcl-x expression induces apoptosis and regression of vascular disease. *Nat Med* 1998; 4: 222-7.
102. Schwartz SM, deBlois D, O'Brien ER. The intima. Soil for atherosclerosis and restenosis. *Circ Res* 1995; 77: 445-65.
103. Bennett MR, Evan GI, Schwartz SM. Apoptosis of human vascular smooth muscle cells derived from normal vessels and coronary atherosclerotic plaques. *J Clin Invest* 1995; 95: 2266-74.
104. Walsh K, Smith RC, Kim HS. Vascular cell apoptosis in remodeling, restenosis, and plaque rupture. *Circ Res* 2000; 87: 184-8.
105. Izumi Y, Kim S, Yoshizawa M et al. Activation of apoptosis signal-regulating kinase 1 in injured artery and its critical role in neointimal hyperplasia. *Circulation* 2003; 108: 2812-18.
106. Sata M, Tanaka K, Ishizaka N et al. Absence of p53 leads to accelerated neointimal hyperplasia after vascular injury. *Arterioscl Thromb Vasc Biol* 2003; 23: 1548-52.
107. Blanc-Brude OP, Yu J, Simosa H et al. Inhibitor of apoptosis protein survivin regulates vascular injury. *Nat Med* 2002; 8: 987-94.
108. Yoshimura S, Morishita R, Hayashi K et al. Inhibition of intimal hyperplasia after balloon injury in rat carotid artery model using cis-element 'decoy' of nuclear factor-kappaB binding site as a novel molecular strategy. *Gene Ther* 2001; 8: 1635-42.
109. Cai W, Devaux B, Schaper W et al. The role of Fas/APO 1 and apoptosis in the development of human atherosclerotic lesions. *Atherosclerosis* 1997; 131: 177-86.
110. Wharton J, Strange JW, Moller GM et al. Anti-proliferative effects of phosphodiesterase type 5 inhibition in human pulmonary artery cells. *Am J Respir Crit Care Med* 2005; 172: 105-13.
111. Nishimura T, Vaszar LT, Faul JL et al. Simvastatin rescues rats from fatal pulmonary hypertension by inducing apoptosis of neointimal smooth muscle cells. *Circulation* 2003; 108: 1640-5.
112. Abe K, Shimokawa H, Morikawa K et al. Long-term treatment with a Rho-kinase inhibitor improves monocrotaline-induced fatal pulmonary hypertension in rats. *Circ Res* 2004; 94: 385-93.
113. Cowan KN, Heilbut A, Humpl T et al. Complete reversal of fatal pulmonary hypertension in rats by a serine elastase inhibitor. *Nat Med* 2000; 6: 698-702.
114. McMurtry MS, Archer SL, Altieri DC et al. Gene therapy targeting survivin selectively induces pulmonary vascular apoptosis and reverses pulmonary arterial hypertension. *J Clin Invest* 2005; 115: 1479-91.
115. Zhang S, Fantozzi I, Tigno DD et al. Bone morphogenetic proteins induce apoptosis in human pulmonary vascular smooth muscle cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2003; 285: L740-L754.
116. Barton M, Kiowski W. The therapeutic potential of endothelin receptor antagonists in cardiovascular disease. *Curr Hypertens Rep* 2001; 3: 322-30.
117. Kiefer FN, Neysari S, Humar R et al. Hypertension and angiogenesis. *Curr Pharm Des* 2003; 9: 1733-44.
118. Vega F, Panizo A, Pardo-Mindan J et al. Susceptibility to apoptosis measured by MYC, BCL-2, and BAX expression in arterioles and capillaries of adult spontaneously hypertensive rats. *Am J Hypertens* 1999; 12: 815-20.
119. Nusz DJ, White DC, Dai Q et al. Vascular rarefaction in peripheral skeletal muscle after experimental heart failure. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2003; 285: H1554-H1562.
120. Ohashi H, Takagi H, Oh H et al. Phosphatidylinositol 3-kinase/Akt regulates angiotensin II-induced inhibition of apoptosis in microvascular endothelial cells by governing survivin expression and suppression of caspase-3 activity. *Circ Res* 2004; 94: 785-93.
121. Silvestre JS, Tamarat R, Senbonmatsu et al. Antiangiogenic effect of angiotensin II type 2 receptor in ischemia-induced angiogenesis in mouse hindlimb. *Circ Res* 2002; 90: 1072-9.
122. Benndorf R, Boger RH, Ergun S et al. Angiotensin II type 2 receptor inhibits vascular endothelial growth factor-induced migration and in vitro tube formation of human endothelial cells. *Circ Res* 2003; 93: 438-47.
123. Michel F, Ambroisine ML, Duriez M et al. Aldosterone enhances ischemia-induced neovascularization through angiotensin II-dependent pathway. *Circulation* 2004; 109: 1933-7.
124. Rossig L, Hermann C, Haendeler J et al. Angiotensin II-induced upregulation of MAP kinase phosphatase-3 mRNA levels mediates endothelial cell apoptosis. *Basic Res Cardiol* 2002; 97: 1-8.
125. Dimmeler S, Rippmann V, Weiland U et al. Angiotensin II induces apoptosis of human endothelial cells. Protective effect of nitric oxide. *Circ Res* 1997; 81: 970-6.

126. Li JM, Shah AM. Endothelial cell superoxide generation: regulation and relevance for cardiovascular pathophysiology. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2004; 287: R1014–R1030.
127. Haendeler J, Tischler V, Hoffmann J et al. Low doses of reactive oxygen species protect endothelial cells from apoptosis by increasing thioredoxin-1 expression. *FEBS Lett* 2004; 577: 427–33.
128. Weis M, Heeschen C, Glassford AJ et al. Statins have biphasic effects on angiogenesis. *Circulation* 2002; 105: 739–45.
129. Barinaga M. Life-death balance within the cell. *Science* 1996; 274: 724.
130. Van Antwerp DJ, Martin SJ, Kafri T et al. Suppression of TNF-alpha-induced apoptosis by NF-kappaB. *Science* 1996; 274: 787–9.
131. Rossig L, Haendeler J, Mallat Z et al. Congestive heart failure induces endothelial cell apoptosis: protective role of carvedilol. *J Am Coll Cardiol* 2000; 36: 2081–9.
132. Shichiri M, Yokokura M, Marumo F et al. Endothelin-1 inhibits apoptosis of vascular smooth muscle cells induced by nitric oxide and serum deprivation via MAP kinase pathway. *Arterioscl Thromb Vasc Biol* 2000; 20: 989–97.
133. Shichiri M, Kato H, Marumo F et al. Endothelin-1 as an autocrine/paracrine apoptosis survival factor for endothelial cells. [Published erratum appears *Hypertension* 1998; 31: 723.] *Hypertension* 1997; 30: 1198–203.
134. Scatena M, Almeida M, Chaisson ML et al. NF-kappaB mediates alphavbeta3 integrin-induced endothelial cell survival. *J Cell Biol* 1998; 141: 1083–93.
135. Raymond MA, Desormeaux A, Laplante P et al. Apoptosis of endothelial cells triggers a caspase-dependent anti-apoptotic paracrine loop active on vascular smooth muscle cells. *FASEB J* 2004; 18: 705–7.
136. Teiger E, Dam TV, Richard L et al. Apoptosis in pressure overload-induced heart hypertrophy in the rat. *J Clin Invest* 1996; 97: 2891–7.
137. Haunstetter A, Izumo S. Apoptosis: basic mechanisms and implications for cardiovascular disease. *Circ Res* 1998; 82: 1111–29.
138. Anversa P, Olivetti G, Leri A et al. Myocyte cell death and ventricular remodeling. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 1997; 6: 169–76.
139. James TN. Normal and abnormal consequences of apoptosis in the human heart. *Annu Rev Physiol* 1998; 60: 309–25.
140. Leri A, Claudio PP, Li Q et al. Stretch-mediated release of angiotensin II induces myocyte apoptosis by activating p53 that enhances the local renin-angiotensin system and decreases the Bcl-2-to-Bax protein ratio in the cell. *J Clin Invest* 1998; 101: 1326–42.
141. Leri A, Fiordaliso F, Setoguchi M et al. Inhibition of p53 function prevents renin-angiotensin system activation and stretch-mediated myocyte apoptosis. *Am J Pathol* 2000; 157: 843–57.
142. Groholm T, Finckenberg P, Palojoki E et al. Cardioprotective effects of vasopeptidase inhibition vs angiotensin type 1-receptor blockade in spontaneously hypertensive rats on a high salt diet. *Hypertens Res* 2004; 27: 609–18.
143. Linz W, Wohlfart P, Schoelkens BA et al. Late treatment with ramipril increases survival in old spontaneously hypertensive rats. *Hypertension* 1999; 34: 291–5.
144. Linz W, Jessen T, Becker RH et al. Long-term ACE inhibition doubles lifespan of hypertensive rats. *Circulation* 1997; 96: 3164–72.
145. Pitt B. Effect of aldosterone blockade in patients with systolic left ventricular dysfunction: implications of the RALES and EPHESUS studies. *Mol Cell Endocrinol* 2004; 217: 53–8.
146. De Angelis N, Fiordaliso F, Latini R et al. Appraisal of the role of angiotensin II and aldosterone in ventricular myocyte apoptosis in adult normotensive rat. *J Mol Cell Cardiol* 2002; 34: 1655–65.
147. Sabbah HN, Sharov VG, Gupta RC et al. Chronic therapy with metoprolol attenuates cardiomyocyte apoptosis in dogs with heart failure. *J Am Coll Cardiol* 2000; 36: 1698–705.
148. Iwai-Kanai E, Hasegawa K, Araki M et al. Alpha- and beta-adrenergic pathways differentially regulate cell type-specific apoptosis in rat cardiac myocytes. *Circulation* 1999; 100: 305–11.
149. Ferrari R, Guardigli G, Mele D et al. Oxidative stress during myocardial ischaemia and heart failure. *Curr Pharm Des* 2004; 10: 1699–711.
150. Cesselli D, Jakoniuk I, Barlucchi L et al. Oxidative stress-mediated cardiac cell death is a major determinant of ventricular dysfunction and failure in dog dilated cardiomyopathy. *Circ Res* 2001; 89: 279–86.
151. Izumiya Y, Kim S, Izumi Y et al. Apoptosis signal-regulating kinase 1 plays a pivotal role in angiotensin II-induced cardiac hypertrophy and remodeling. *Circ Res* 2003; 93: 874–83.
152. Zhang D, Gaussin V, Taffet GE et al. TAK1 is activated in the myocardium after pressure overload and is sufficient to provoke heart failure in transgenic mice. *Nat Med* 2000; 6: 556–63.
153. Wang Y, Huang S, Sah VP et al. Cardiac muscle cell hypertrophy and apoptosis induced by distinct members of the p38 mitogen-activated protein kinase family. *J Biol Chem* 1998; 273: 2161–8.
154. Ananthakrishnan R, Moe GW, Goldenthal MJ et al. Akt signaling pathway in pacing-induced heart failure. *Mol Cell Biochem* 2005; 268: 103–10.
155. Harris IS, Zhang S, Treskov I et al. Raf-1 kinase is required for cardiac hypertrophy and cardiomyocyte survival in response to pressure overload. *Circulation* 2004; 110: 718–23.
156. Fortuno MA, Gonzalez A, Ravassa S et al. Clinical implications of apoptosis in hypertensive heart disease. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2003; 284: H1495–H1506.
157. Lemay J, Hamet P, deBlois D. Losartan-induced apoptosis as a novel mechanism for the prevention of vascular lesion formation after vascular injury. *Journal of Renin-Angiotensin-Aldosterone System* 2000; 1: 39–42.
158. Sadoshima J, Izumo S. Molecular characterization of angiotensin II-induced hypertrophy of cardiac myocytes and hyperplasia of cardiac fibroblasts. Critical role of the AT1 receptor subtype. *Circ Res* 1993; 73: 413–23.
159. Horiuchi M, Akishita M, Dzau VJ. Molecular and cellular mechanism of angiotensin II-mediated apoptosis. *Endocr Res* 1998; 24: 307–14.
160. Opie LH, Sack MN. Enhanced angiotensin II activity in heart failure: reevaluation of the counterregulatory hypothesis of receptor subtypes. *Circ Res* 2001; 88: 654–8.
161. Communal C, Singh K, Pimentel DR et al. Norepinephrine stimulates apoptosis in adult rat ventricular myocytes by activation of the beta-adrenergic pathway. *Circulation* 1998; 98: 1329–34.
162. Shizukuda Y, Buttrick PM, Geenen DL et al. Beta-adrenergic stimulation causes cardiocyte apoptosis: influence of tachycardia and hypertrophy. *Am J Physiol* 1998; 275 (3 Pt 2): H961–H968.
163. Colombo F, Noel J, Mayers P et al. Beta-adrenergic stimulation of rat cardiac fibroblasts promotes protein synthesis via the activation of phosphatidylinositol 3-kinase. *J Mol Cell Cardiol* 2001; 33: 1091–106.
164. Colombo F, Gosselin H, El Helou V et al. Beta-adrenergic receptor-mediated DNA synthesis in neonatal rat cardiac fibroblasts proceeds via a phosphatidylinositol 3-kinase dependent pathway refractory to the antiproliferative action of cyclic AMP. *J Cell Physiol* 2003; 195: 322–30.

165. Li PF, Dietz R, von Harsdorf R. Superoxide induces apoptosis in cardiomyocytes, but proliferation and expression of transforming growth factor-beta1 in cardiac fibroblasts. *FEBS Lett* 1999; 448: 206–10.
166. Kwon SH, Pimentel DR, Remondino A et al. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> regulates cardiac myocyte phenotype via concentration-dependent activation of distinct kinase pathways. *J Mol Cell Cardiol* 2003; 35: 615–21.
167. Kelly DJ, Zhang Y, Gow R et al. Tranilast attenuates structural and functional aspects of renal injury in the remnant kidney model. *J Am Soc Nephrol* 2004; 15: 2619–29.
168. Kobayashi S, Moriya H, Nakabayashi I et al. Angiotensin II and IGF-I may interact to regulate tubulointerstitial cell kinetics and phenotypic changes in hypertensive rats. *Hypertens Res* 2002; 25: 257–69.
169. Ono H, Ono Y, Takanohashi A et al. Apoptosis and glomerular injury after prolonged nitric oxide synthase inhibition in spontaneously hypertensive rats. *Hypertension* 2001; 38: 1300–6.
170. Ying WZ, Wang PX, Sanders PW. Induction of apoptosis during development of hypertensive nephrosclerosis. *Kidney Int* 2000; 58: 2007–17.
171. Ortiz A, Lorz C, Justo P et al. Contribution of apoptotic cell death to renal injury. *J Cell Mol Med* 2001; 5: 18–32.
172. Savill J, Mooney A, Hughes J. Apoptosis and renal scarring. *Kidney Int Suppl* 1996; 54: S14–S17.
173. Thomas SE, Andoh TF, Pichler RH et al. Accelerated apoptosis characterizes cyclosporine-associated interstitial fibrosis. *Kidney Int* 1998; 53: 897–908.
174. Sugiyama H, Kashihara N, Makino H et al. Apoptosis in glomerular sclerosis. *Kidney Int* 1996; 49: 103–11.
175. Kumar D, Robertson S, Burns KD. Evidence of apoptosis in human diabetic kidney. *Mol Cell Biochem* 2004; 259: 67–70.
176. Kriz W, LeHir M. Pathways to nephron loss starting from glomerular diseases – insights from animal models. *Kidney Int* 2005; 67: 404–19.
177. Mundel P, Shankland SJ. Podocyte biology and response to injury. *J Am Soc Nephrol* 2002; 13: 3005–15.
178. Topaloglu R. Progression to renal failure. *Turk J Pediatr* 2005; 47 (Suppl): 3–8.
179. Okado T, Terada Y, Tanaka H et al. Smad7 mediates transforming growth factor-beta-induced apoptosis in mesangial cells. *Kidney Int* 2002; 62: 1178–86.
180. Ono H, Saitoh M, Ono Y et al. Imidapril improves L-NAME-exacerbated nephrosclerosis with TGF-beta 1 inhibition in spontaneously hypertensive rats. *J Hypertens* 2004; 22: 1389–95.
181. Singhal PC, Gibbons N, Franki N et al. Simulated glomerular hypertension promotes mesangial cell apoptosis and expression of cathepsin-B and SGP-2. *J Investig Med* 1998; 46: 42–50.
182. Mooney A, Jackson K, Bacon R et al. Type IV collagen and laminin regulate glomerular mesangial cell susceptibility to apoptosis via beta(1) integrin-mediated survival signals. *Am J Pathol* 1999; 155: 599–606.
183. Singhal PC, Franki N, Kumari S et al. Extracellular matrix modulates mesangial cell apoptosis and mRNA expression of cathepsin-B and tissue transglutaminase. *J Cell Biochem* 1998; 68: 22–30.
184. Kitamura H, Shimizu A, Masuda Y et al. Apoptosis in glomerular endothelial cells during the development of glomerulosclerosis in the remnant-kidney model. *Exp Nephrol* 1998; 6: 328–36.
185. Yamanaka N, Shimizu A. Role of glomerular endothelial damage in progressive renal disease. *Kidney Blood Press Res* 1999; 22: 13–20.
186. Bhaskaran M, Reddy K, Radhakrishnan N et al. Angiotensin II induces apoptosis in renal proximal tubular cells. *Am J Physiol Renal Physiol* 2003; 284: F955–F965.
187. Quiroz Y, Bravo J, Herrera-Acosta J et al. Apoptosis and NFkappaB activation are simultaneously induced in renal tubulointerstitium in experimental hypertension. *Kidney Int Suppl* 2003; S27–S32.
188. Ding G, Reddy K, Kapasi AA et al. Angiotensin II induces apoptosis in rat glomerular epithelial cells. *Am J Physiol Renal Physiol* 2002; 283: F173–F180.
189. Durvasula RV, Petermann AT, Hiromura K et al. Activation of a local tissue angiotensin system in podocytes by mechanical strain. *Kidney Int* 2004; 65: 30–9.
190. Lodha S, Dani D, Mehta R et al. Angiotensin II-induced mesangial cell apoptosis: role of oxidative stress. *Mol Med* 2002; 8: 830–40.
191. Wolf G, Chen S, Ziyadeh FN. From the periphery of the glomerular capillary wall toward the center of disease: podocyte injury comes of age in diabetic nephropathy. *Diabetes* 2005; 54: 1626–34.
192. Aizawa T, Ishizaka N, Kurokawa K et al. Different effects of angiotensin II and catecholamine on renal cell apoptosis and proliferation in rats. *Kidney Int* 2001; 59: 645–53.
193. Kriz W. Podocytes as a target for treatment with ACE inhibitors and/or angiotensin-receptor blockers. *Kidney Int* 2004; 65: 333–4.
194. Chao J, Chao L. Kallikrein-kinin in stroke, cardiovascular and renal disease. *Exp Physiol* 2005; 90: 291–8.
195. Inada H, Ono H, Minami J et al. Nipradilol prevents L-NAME-exacerbated nephrosclerosis with decreasing of caspase-3 expression in SHR. *Hypertens Res* 2002; 25: 433–40.
196. Watanabe S, Ono H, Ishimitsu T et al. Calcium antagonist inhibits glomerular cell apoptosis and injuries of L-NAME exacerbated nephrosclerosis in SHR. *Hypertens Res* 2000; 23: 683–91.
197. Zhou X, Ono H, Ono Y et al. N- and L-type calcium channel antagonist improves glomerular dynamics, reverses severe nephrosclerosis, and inhibits apoptosis and proliferation in an L-NAME/SHR model. *J Hypertens* 2002; 20: 993–1000.
198. Ono Y, Ono H, Frohlich ED. Hydrochlorothiazide exacerbates nitric oxide-blockade nephrosclerosis with glomerular hypertension in spontaneously hypertensive rats. *J Hypertens* 1996; 14: 823–8.
199. Bridgewater DJ, Ho J, Sauro V et al. Insulin-like growth factors inhibit podocyte apoptosis through the PI3 kinase pathway. *Kidney Int* 2005; 67: 1308–14.
200. Foster RR, Saleem MA, Mathieson PW et al. Vascular endothelial growth factor and nephrin interact and reduce apoptosis in human podocytes. *Am J Physiol Renal Physiol* 2005; 288: F48–F57.