

Université de Montréal

Régulation par l'angiotensine II de la croissance et de l'apoptose cellulaire dans la
cardiomyopathie hypertensive.

Par

Diane Beaudry

Département de Pharmacologie

Faculté de Médecine

Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures

En vue de l'obtention du grade de Maîtrise

en Pharmacologie

DÉCEMBRE 2002

©, Diane Beaudry, 2002



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.

Université de Montréal
Faculté des études supérieures

Ce mémoire intitulé:

Régulation par l'angiotensine II de la croissance et de l'apoptose cellulaire dans la
cardiomyopathie hypertensive.

Présenté par:

Diane Beaudry

A été évalué par les personnes suivantes:

André deLéan
président-rapporteur

Denis deBlois
directeur de recherche

Pavel Hamet
codirecteur

Richard Momparler
membre du jury

Résumé

Objectifs: Le blocage des récepteurs AT1 de l'angiotensine II induit une régression de l'hypertrophie cardiaque chez les rats SHR via l'apoptose des non-cardiomyocytes (NCM). Cette étude vise à déterminer si le valsartan peut prévenir l'hyperplasie des NCM dans un modèle de surcharge pressive cardiaque induite par une coarctation aortique abdominale.

Méthodes et résultats: Une coarctation de l'aorte abdominale a été réalisée sur des rats Sprague Dawley. Les rats ont reçu ou non le valsartan à partir du jour de la chirurgie jusqu'à 8 semaines post-opération. La coarctation a induit l'hypertrophie ventriculaire gauche du jour 7 au jour 56 (45% vs témoins). Le valsartan a empêché cette hypertrophie jusqu'au jour 28 (19%), en plus de bloquer la synthèse d'ADN observée aux jours 7 (196%) et 14 (116%) dans les ventricules gauches. L'apoptose n'a pas contribué au remodelage cardiaque aux temps observés. Au-dessus de la coarctation, la pression artérielle et la pression pulsée ont été augmentés de 60% et 163% et le gradient trans-sténotique a augmenté de 579% après 28 jours. Le valsartan n'a pas eu d'effet significatif sur ces paramètres. Après 56 jours, le valsartan a bloqué la hausse de NCM dans le ventricule gauche (vs témoins: $207 \pm 6 \times 10^6$ cellules), et a prévenu partiellement la fibrose estimée par le contenu en hydroxyproline (118% vs témoins). La densité capillaire était similaire entre les groupes au jour 56 post-opération.

Conclusions: Le valsartan prévient le développement de l'hypertrophie cardiaque et l'hyperplasie des NCM tout en réduisant la hausse de pression artérielle induite par la coarctation. Ce traitement contribue à l'inhibition partielle de la fibrose cardiaque.

Mots-clés: angiotensine II, aorte, apoptose, AT1, coarctation, croissance, hyperplasie, hypertension, hypertrophie.

Summary

Objectives: Left ventricular hypertrophy (LVH) is an adaptive response of the heart to increased afterload. It has been shown that left ventricular hypertrophy is associated with fibrosis and apoptosis of cardiomyocytes. However, the balance between cell growth and apoptosis during cardiac remodeling remains poorly defined. Angiotensin II type I receptor (AT1) blockade with valsartan reverses fibroblasts hyperplasia in part via the induction of apoptosis and inhibition of cell growth during the regression of left ventricular hypertrophy in the heart of spontaneously hypertensive rats. This study was thus designed to better understand the effect of AngII AT1 receptor blockade (using the drug valsartan) in the regulation of cardiovascular cell growth and apoptosis during the development of cardiac hypertrophy due to suprarenal aortic banding. **Methods:** Banding of the abdominal aorta was done on male Sprague-Dawley rats. Valsartan or placebo were started on the day of the surgery for a period of up to 56 days. **Results:** Banding significantly increased left ventricular hypertrophy at days 7, 14, 28 and 56 (45% vs Sham). Valsartan completely prevented left ventricular hypertrophy until day 28 (19% vs Sham). Valsartan abolished the DNA synthesis induced after 7 (196% vs Sham) and 14 days (116% vs Sham) of banding. Apoptosis did not contribute to cardiac remodeling at the time observed. Above the banding mean arterial pressure and pulse pressure were increased by 60% and 163% and trans-stenotic gradient was increase by 579%. Valsartan did not have any significant effect on these parameters. Treatment with valsartan prevented the 40% increase in fibroblasts (vs Sham: $207 \pm 6 \times 10^6$ cells) after 8 weeks of banding and partially prevented the increase in left ventricular fibrosis in banded rats (118% vs Sham) as assessed by hydroxyproline content. The capillary density was identical in all groups following 4 weeks of banding. Cardiomyocyte hypertrophy, assessed by the cross-sectional area, was significantly increased by 57% following banding and valsartan prevented that increase. **Conclusions:** Valsartan prevents cardiac hypertrophy and hyperplasia mainly by preventing fibroblast proliferation without any detectable effect on

apoptosis and blood pressure at the time studied. Inhibition of cardiac hyperplasia in the presence of valsartan contribute to the partial inhibition of cardiac fibrosis.

Key words : angiotensin II, aorta, apoptosis, AT1, banding, growth, hyperplasia, hypertrophy, hypertension.

TABLE DES MATIÈRES

RÉSUMÉ	I
SUMMARY	II
TABLE DES MATIÈRES	IV
LISTE DES FIGURES	VI
LISTE DES TABLEAUX	VII
LISTE DES ABBRÉVIATIONS	VIII
1. INTRODUCTION	1
1.1 L' HYPERTROPHIE CARDIAQUE.....	3
1.1.1 L'hypertrophie cardiaque physiologique	3
1.1.2 L'hypertrophie cardiaque pathologique	4
1.1.2.1 Contribution des cardiomyocytes	5
1.1.2.2 Contribution des fibroblastes	6
1.1.2.3 Contribution de la matrice extracellulaire	7
1.1.2.4 Contribution du système nerveux sympathique	8
1.1.3 Vaisseaux et hypertrophie cardiaque	8
1.2 LE SYSTÈME RÉNINE-ANGIOTENSINE-ALDOSTÉRON (SRAA).....	10
FIGURE 1	11
1.2.1 Les systèmes rénine-angiotensine locaux.....	12
1.2.2 Régulation de la sécrétion de rénine	13
1.2.3 L'Angiotensine II par voies alternatives	13
1.2.4 L'Angiotensine II : ses récepteurs, ses fonctions.....	14
1.2.5 L'aldostérone et le coeur	15
1.3 INHIBITEURS DU SRAA	17
1.3.1 Les inhibiteurs de l'enzyme de conversion de l'Ang II (IECA).....	17
1.3.2 Les antagonistes des récepteurs à l'Ang II (ARA).....	18
1.3.3 IECA VS ARA	19
1.4 MODÈLES EXPÉRIMENTAUX DE MALADIES CARDIOVASCULAIRES	20
2. HYPOTHESE ET OBJECTIFS	23
PREVENTION BY VALSARTAN OF CARDIAC FIBROBLAST HYPERPLASIA IN RATS WITH COARCTATION OF THE ABDOMINAL AORTA	24
ABSTRACT	25
INTRODUCTION	27
ANIMAL AND SURGICAL PROCEDURES.....	28
HEMODYNAMICS	29
TISSUE PREPARATION	29
CARDIAC DNA ANALYSIS.....	30
<i>IN SITU</i> DNA FRAGMENTATION LABELING	30
WESTERN-BLOT ANALYSIS OF CASPASE-3	31
MORPHOMETRIC ANALYSIS.....	32
DETERMINATION OF THE CAPILLARY DENSITY IN THE LEFT VENTRICLE.....	33
DETERMINATION OF HYDROXYPROLINE CONTENT	34
STATISTICAL ANALYSIS.....	34

RESULTS	35
EFFECT OF BANDING ON HEMODYNAMIC PARAMETERS	35
EFFECT OF VALSARTAN ON CARDIAC HYPERTROPHY AND DNA CONTENT	35
EFFECT OF VALSARTAN ON DNA SYNTHESIS AND DEGRADATION	36
EFFECT OF VALSARTAN ON CARDIAC HYPERPLASIA	37
DISCUSSION	39
ACKNOWLEDGMENTS	45
REFERENCES	45
TABLE 1	51
FIGURE 1A	52
FIGURE 1B	53
FIGURE 2A	54
FIGURE 2B	55
FIGURE 3A	56
FIGURE 3B	57
FIGURE 4	58
TABLE 2	59
TABLE 3	60
3.1 METHODES ET RESULTATS SUPPLEMENTAIRES	61
FIGURE 5A	62
FIGURE 5B	63
FIGURE 5C	64
FIGURE 6	65
4. DISCUSSION	66
4.1 NOUVELLES DONNÉES	66
4.2 COMPARAISONS AVEC LES DONNÉES DE LA LITTÉRATURE	67
4.3 L' AORTE DANS NOTRE MODÈLE.....	75
4.4 PERSPECTIVES D' Avenir	76
4.5 IMPACTS CLINIQUES	77
4.6 CONCLUSION	78
5. BIBLIOGRAPHIE	79

Liste des figures

1. INTRODUCTION

Figure 1. Le système rénine-angiotensine-aldostérone.

3. ARTICLE

Figure 1. Effects of pressure overload produced by abdominal aortic banding with or without valsartan. A, Left ventricular weight (mg) / body weight (g) ratio. B, Right ventricular weight (mg) / body weight (g) ratio. *P < 0.017 vs sham-operated rats; #P < 0.017 vs valsartan treated rats.

Figure 2. Effects of pressure overload produced by abdominal aortic banding with or without valsartan on DNA content (μg) / ventricle (g). A, Left ventricle. B, Right ventricle. *P < 0.017 vs sham-operated rats, #P < 0.017 vs valsartan treated rats.

Figure 3. Effects of pressure overload produced by abdominal aortic banding with or without valsartan on DNA synthesis (CPM / 100 μg DNA). *P < 0.017 vs sham-operated rats; #P < 0.017 vs valsartan treated rats, #P < 0.017 vs valsartan treated rats.

Figure 4. Effects of pressure overload produced by abdominal aortic banding with or without valsartan on total number of cardiomyocytes and non-cardiomyocytes in the left ventricle. *P < 0.017 vs sham-operated rats, #P < 0.017 vs valsartan treated rats.

3. MÉTHODES ET RÉSULTATS

Figure 5. Effets d'une surcharge pressive induite par une coarctation de l'aorte abdominale avec ou sans valsartan. A, Aires de section des aortes thoraciques (mm^2). B, Aires de section des aortes abdominales (mm^2). C, Ratio des aires de section des aortes thoraciques / aires de section des aortes abdominales. *P < 0.017 vs rats témoins, #P < 0.017 vs rats traités au valsartan.

Liste des tableaux**3. ARTICLE**

TABLE 1.	Effect of aortic constriction and valsartan treatment on hemodynamic measurements.	51
TABLE 2.	Effect of aortic constriction and valsartan treatment on DNA fragmentation labeled in situ and caspase-3 expression.	59
TABLE 3.	Effect of aortic coarctation and valsartan on cardiac morphometry.	60

Liste des abréviations

α -MHC	α -Myosin-heavy-chain
Ac-SDKP	N-acetyl-seryl-aspartyl-lysyl-proline
ADN	Acide déoxyribonucléique
Aldo	Aldostérone
ANF	Atrial natriuretic factor
Ang I	Angiotensine I
Ang II	Angiotensine II
ARA	Antagoniste des récepteurs de l'angiotensine II
ARM	Antagoniste des récepteurs de minéralocorticoïdes
ARNm	Acide ribonucléique messenger
AT ₁	Récepteur de type 1 de l'angiotensine II
AT _{1a}	Récepteur de type 1a de l'angiotensine II
AT ₂	Récepteur de type 2 de l'angiotensine II
AT ₃	Récepteur de type 3 de l'angiotensine II
AT ₄	Récepteur de type 4 de l'angiotensine II
BK	Bradykinine
Ca ²⁺ -ATPase 2a	Calcium-ATPase 2a
CML	Cellules de muscle lisse
CMLV	Cellules de muscle lisse vasculaires
CsA	Cyclosporine
ECA	Enzyme de conversion de l'angiotensine
ECE	Enzyme de conversion de l'endothéline

eNOS	Nitrique synthase endothéliale
EPN	Endopeptidase neutre
ERO	Espèces réactives de l'oxygène
ET-1	Endothéline
ETA	Récepteur A de l'endothéline
H ₂ O ₂	Peroxyde d'hydrogène
HVG	Hypertrophie ventriculaire gauche
IECA	Inhibiteur de l'enzyme de conversion de l'angiotensine
iNOS	Nitrique synthase inductible
K ⁺	Ion potassium
MEC	Matrice extracellulaire
MLC-2	Myosin light chain-2
Na ⁺ /H ⁺	Ion sodium/proton
NaCl	Chlorure de sodium
NE	Norépinéphrine
nNOS	Nitrique synthase neurale
Pré-pro-ET-1	Pré-pro-endothéline-1
RM	Récepteur de minéralocorticoïdes
RSH	Rat spontanément hypertendu
SRA	Système rénine-angiotensine
SRAA	Système rénine-angiotensine-aldostérone
TGF-β1	Transforming growth factor-β1

1. INTRODUCTION

Dans les sociétés développées, l'hypertension demeure un problème commun et sérieux, contribuant de façon importante aux causes les plus fréquentes de morbidité et de mortalité. L'espérance de vie aux États-Unis était à son apogée en l'an 2000, soit 76.9 ans. Un accroissement du nombre de personnes âgées qui présentent un risque élevé fera augmenter le besoin de tous les services de santé requis pour traiter les maladies cardiovasculaires efficacement - soins ambulatoires, hôpitaux de soins actifs et de soins chroniques, réadaptation, soins et soutien à domicile, produits pharmaceutiques, éducation sanitaire et autres interventions. Bien que de nombreuses mesures préventives et thérapeutiques aient permis une nette amélioration du taux de mortalité dûe aux maladies cardiovasculaires (41,6% en 1996), il n'en demeure pas moins que ces maladies comptaient encore pour 30% des causes de décès aux États-Unis en l'an 2000¹. L'association « American Heart » a estimé les coûts relatifs des maladies cardiovasculaires aux États-Unis en 1999 à \$286,5 milliards incluant les coûts de soin de santé de même que la perte de productivité résultant de maladie ou de décès². Les maladies cardiovasculaires (cardiopathies et accidents vasculaires cérébraux) comptent parmi les principales causes de maladie, d'invalidité et de décès au Canada, et elles imposent un lourd fardeau à l'individu, à la collectivité et au système de santé.

Parmi les causes de morbidité et de mortalité les plus communes on retrouve l'hypertension, l'infarctus du myocarde, de même que la défaillance cardiaque et rénale. L'anomalie la plus fréquemment observée dans les maladies cardiaques est sans aucun doute l'hypertrophie ventriculaire gauche (HVG). Plusieurs études cliniques ont démontré que les individus comportant des signes d'hypertrophie ventriculaire gauche sont plus susceptibles de développer ce genre de maladies^{3 4 5 6 7}.⁸ En effet, un suivi de 10 ans de près de 300 patients atteints d'hypertension essentielle a permis de démontrer une hausse de la mortalité cardiovasculaire de 28 fois et une augmentation de la mortalité toutes causes confondues de 8 fois, chez les patients ayant une masse ventriculaire gauche augmentée (>125 g/m²) comparativement à ceux n'ayant pas d'hypertrophie ventriculaire gauche⁷. Cette

anomalie dans la structure peut être primaire comme dans la cardiomyopathie hypertrophique ou être une réponse secondaire à une augmentation du stress sur la paroi causée par l'hypertension, une maladie cardiaque valvulaire, ou un dommage cardiaque, comme l'infarctus du myocarde.

Par exemple, une augmentation de la post-charge ventriculaire gauche, un dommage ventriculaire aigu ou chronique et la stimulation des systèmes neurohumoraux provoque le développement de l'hypertrophie ventriculaire gauche via, entre autre, l'hypertrophie des cardiomyocytes et augmente la fonction systolique ventriculaire gauche à court et à moyen terme. À long terme cependant, une dysfonction diastolique, une nécrose myocytaire, une fibrose et un manque d'énergie myocellulaire se développe et contribue ultimement à une dilatation ventriculaire gauche, puis la défaillance. Cette hypertrophie des cardiomyocytes et de la paroi ventriculaire gauche est marquée par une hausse globale des protéines cellulaires, plus spécifiquement des protéines de contraction⁹. De façon intéressante, les protéines normalement exprimées durant l'embryogénèse sont à nouveau exprimées et s'accumulent dans le coeur hypertrophié via un changement dans les isoformes de ces protéines^{10 11 12 13 14}.

De plus, la structure cardiaque est influencée non seulement par la charge hémodynamique, mais aussi par divers facteurs neurohumoraux incluant le système rénine-angiotensine (SRAA), la stimulation α - et β -adrénergique ainsi que la thyroxine. En effet, en plus de ces effets cellulaires directs sur la structure cardiaque, l'angiotensine II (AngII) contribue à l'hypertrophie et au remodelage cardiaque via une augmentation du volume plasmatique suite à une rétention de sodium (changement dans le pré-charge) ainsi qu'une augmentation de la pression artérielle (post-charge altérée). Ainsi, il est primordial de tenter d'améliorer cette situation et l'élucidation des mécanismes impliqués dans le développement de ces maladies s'avère donc une avenue intéressante pour y parvenir.

1.1 L'hypertrophie cardiaque

La réponse de croissance du coeur suite à un stress, que ce soit un infarctus du myocarde, l'hypertension ou une maladie valvulaire, représente un facteur déterminant de la morbidité et de la mortalité. Le coeur utilise la croissance comme mécanisme majeur d'adaptation à long terme. La réponse du coeur à un stimulus physiologique ou pathologique se limite à une hypertrophie, une dilatation ou la combinaison des deux. Un concept a été mis de l'avant voulant que la croissance compensatoire précoce soit bénéfique, alors que la croissance subséquente devienne pathologique et contribue ainsi à une mortalité accrue¹⁵. Ainsi, l'hypertrophie cardiaque est un processus où on observe une hausse de la masse cardiaque principalement via une augmentation de la taille des cardiomyocytes différenciés, ainsi que par l'activation des fibroblastes. L'hypertrophie cardiaque peut être d'ordre physiologique ou pathologique.

1.1.1 L'hypertrophie cardiaque physiologique

L'hypertrophie cardiaque physiologique résulte de la cardiogénèse durant le développement embryonnaire, de la croissance cardiaque post-natale, d'une augmentation modeste de la grosseur du myocarde observée lors de la sénescence ainsi qu'une augmentation de la masse cardiaque se produisant chez les athlètes. Les phases précoces de croissance cardiaque *in utero* dépendent d'un programme de développement déterminé génétiquement pouvant se produire sans activité contractile. Subséquemment, les forces mécaniques occupent une place d'importance dans le développement du phénotype cardiaque normal. Par conséquent, pendant la période embryonnaire ainsi que durant les semaines suivant la naissance, on observe une croissance cardiaque via une hyperplasie, puis une hypertrophie des cardiomyocytes; par exemple, le coeur des mammifères voit sa masse augmentée de 6 fois de la naissance à sa maturation complète. À l'opposé, chez l'adulte, on observe une croissance cardiaque restreinte en réponse à un stimulus. Bien que le nombre de cardiomyocytes n'augmente pas dans le coeur adulte durant l'hypertrophie, les cardiomyocytes, lors d'une réponse de croissance néonatale normale, démontrent une capacité de synthèse d'ADN (noyaux multiples)¹⁶ ainsi qu'une réexpression de

plusieurs protéines fœtales généralement exprimées uniquement dans les cellules embryonnaires. Les changements moléculaires biochimiques et physiologiques associés à ce genre d'hypertrophie cardiaque diffèrent tant qualitativement que quantitativement de ceux observés lors de l'hypertrophie pathologique.

1.1.2 L'hypertrophie cardiaque pathologique

L'hypertrophie cardiaque pathologique consiste en une adaptation de la réponse suite à une augmentation anormale globale ou régionale de la charge de travail cardiaque¹⁷. Cette hypertrophie peut aussi être le reflet d'une réponse à une stimulation neuronale répétée et ainsi être le mécanisme initiateur de l'hypertension^{18,19} de même qu'un amplificateur de cette charge de travail²⁰. Initialement, l'augmentation de la masse cardiaque sert à normaliser le stress sur la paroi de façon à maintenir une fonction cardiovasculaire normale au repos ainsi qu'à l'exercice, on l'appelle *hypertrophie compensée*²¹. Dans ce type d'hypertrophie, l'homogénéité du tissu est préservée, c'est à dire que l'espace occupé par les compartiments musculaire, vasculaire et interstitiel est demeuré constant²². La surcharge pressive produit une augmentation du stress systolique sur la paroi ventriculaire et induit ainsi une hypertrophie ventriculaire concentrique. Si le stimulus d'hypertrophie pathologique est suffisamment intense ou prolongé, il en résulte une *hypertrophie décompensée*, puis la défaillance cardiaque. Contrairement à l'hypertrophie compensée, dans ce type d'hypertrophie on observe une croissance disproportionnée des fibroblastes, une perte des cardiomyocytes et ainsi une perte de proportionnalité intercompartimentale. La défaillance cardiaque qui suit ce genre d'hypertrophie, représente la dernière étape de la maladie cardiaque après que le coeur ait épuisé toutes ses réserves et mécanismes compensatoires.

L'hypertrophie cardiaque pathologique peut être observée dans l'hypertension artérielle pulmonaire ou systémique, dans l'obstruction à la sortie du ventricule gauche ou lors d'une coarctation aortique. Une hyperplasie cardiaque a par ailleurs été observée chez des rats spontanément hypertendus (RSH) nouveaux nés^{23 24 25}. La surcharge volumique comme celle observée lors d'une regurgitation mitrale ou aortique ou suite à une fistule artérioveineuse produit elle aussi une hypertrophie cardiaque pathologique. Ces diverses conditions induisent une hausse du stress

diastolique sur la paroi (regurgitation mitrale) ou du stress à la fois diastolique et systolique sur la paroi (regurgitation aortique et fistule artérioveineuse) ce qui provoque une hypertrophie eccentricque du ventricule gauche²⁶.

1.1.2.1 Contribution des cardiomyocytes

Lors de l'hypertrophie cardiaque, on dénote une augmentation importante de la synthèse protéique, celle-ci devenant supérieure à la dégradation protéique. En situation normale, ces deux processus sont étroitement contrôlés de façon à observer un équilibre en azote. Puisque la demi-vie moyenne des protéines cardiaques est de 5 jours, la composition du coeur adulte est régénérée à chaque 3 semaines environ. La contribution des cardiomyocytes à cette hypertrophie cardiaque, ceux-ci étant différenciés de façon terminale, représente une hypertrophie « réelle » de ces cellules, c'est à dire qu'on observe une hausse du contenu en constituants cellulaires sans toutefois observer de division cellulaire. En plus de cette augmentation du volume cellulaire, de l'accumulation des protéines totales et d'une hausse d'assemblage myofibrillaire, on observe des changements dans le patron d'expression de protéines et de gènes lors de la croissance hypertrophique *in vivo* et dans des cultures de cardiomyocytes, permettant de distinguer ce type de croissance de la croissance de maturation normale. Ainsi, suite à un stimulus hypertrophique sur les cardiomyocytes, l'expression de gènes « précoces » codant pour des facteurs de transcription (*c-fos*, *c-jun*, *Egr-1*) est rapidement et transitoirement augmentée²⁷ À plus long terme, l'hypertrophie cardiaque résultant d'une surcharge volumique ou pressive implique une reprise du programme foetal d'expression des gènes, la réexpression d'ANF étant observée dans les cardiomyocytes. De la même façon, des gènes codant pour des protéines de contraction constitutivement exprimées (α -actine du muscle cardiaque, MLC-2) sont aussi régulés à la hausse à plus long terme. À l'opposé, l'expression de la Ca^{2+} -ATPase 2a se voit réduite suite à une hypertrophie de surcharge pressive²⁸. Ces divers processus procurent au coeur un degré de plasticité additionnel pour s'adapter à des exigences fonctionnelles changeantes. L'accumulation de diverses protéines tant structurales que fonctionnelles lors de l'hypertrophie cardiaque se reflète par une augmentation de dépôt de collagène dans

la matrice extracellulaire, ce qui contribue aux changements observés dans les propriétés musculaires.

Les conséquences de cette hausse de la masse cardiaque et de l'abondance en protéines, ainsi que la composition du coeur hypertrophié sont considérables et dépendent de plusieurs facteurs dont le modèle utilisé, l'espèce animale de même que la nature, l'intensité et la durée du stimulus hypertrophique. Les résultats obtenus lors de recherches cliniques et sur les animaux suggèrent que les changements fonctionnels évoluent de façon continue passant d'une cavité normale et d'une fonction cardiaque normale à une cavité anormale combinée à une fonction cardiaque non altérée pour ensuite observer une cavité et une fonction anormales.

L'hypertrophie cardiaque décompensée peut ainsi être le résultat de divers mécanismes intrinsèques ou extrinsèques au cardiomyocyte comme la nécrose, l'apoptose²⁹, une croissance inadéquate via des voies de signalisation altérées, des changements dans les protéines cardiaques de contraction, de régulation, de structure et du cycle du calcium, d'altérations de la matrice extracellulaire et de remodelage. Parmi les stimuli d'origine hormonale ou « neurale » d'hypertrophie cardiaque, on retrouve essentiellement les agonistes α - et β -adrénergiques, la thyroxine et l'angiotensine II (Ang II). Cette dernière occupe une part importante de nos travaux.

1.1.2.2 Contribution des fibroblastes

Parallèlement, le remodelage cardiaque suite à un stimulus implique entre autre les cellules endothéliales, les cellules de muscle lisse, les macrophages ainsi que les fibroblastes, ces derniers étant responsables de la production et de la dégradation des protéines structurales comme le collagène et l'élastine. Lors du développement de l'hypertrophie cardiaque, l'activation des fibroblastes cardiaques provoque une augmentation de la fibrose cardiaque qui peut éventuellement mener à une compliance réduite et une dureté accrue du myocardec contribuant ainsi à une fonction diastolique altérée³⁰. La fibrose cardiaque peut être de type « réparatrice » ou « réactive ». La fibrose est réparatrice lorsqu'il y a perte de matériel myocardique due à la nécrose ou l'apoptose, ou après une ischémie cardiaque et elle est majoritairement interstitielle, alors qu'en l'absence de perte cellulaire, suite à

l'inflammation elle est réactive et elle est surtout périvasculaire. La fibrose est par conséquent caractérisée par des accumulations importantes de tissu conjonctif périvasculaire et interstitiel pouvant affecter l'apport en oxygène aux cardiomyocytes, la contractilité de même que la relaxation du coeur³¹. Ces changements interstitiels contribuent ainsi au pronostic d'hypertrophie ventriculaire gauche.

Les mécanismes responsables de ces changements demeurent peu définis, mais des évidences suggèrent entre autre qu'une hausse de la pression artérielle et/ou une augmentation de l'angiotensine II puisse jouer un rôle primordial³².

1.1.2.3 Contribution de la matrice extracellulaire

La matrice extracellulaire (MEC) est composée de plusieurs protéines dont le collagène, les composantes de la matrice péricellulaire (la fibronectine et les protéoglycans), les composantes de la membrane basale (la laminine, le collagène de type IV) et des facteurs de croissance. La composante la plus importante est le collagène de type I qui est aussi la composante majeure de la fibrose. La MEC consiste en un réseau fibrillaires qui entoure les myofibres et toute la structure cardiaque. Dans des conditions normales, la MEC, et surtout le collagène de type I est un facteur biologique déterminant de la mécanique cardiaque³³. En effet, la MEC est un constituant structural qui maintient l'alignement des myocytes et des vaisseaux et prévient le glissement des myocytes durant la contraction. Elle joue un rôle fonctionnel actif de transducteur de force qui facilite l'étirement durant la systole. En tant que composante fonctionnelle passive, elle est le facteur déterminant de la rigidité diastolique. Enfin, la MEC est essentielle en tant que médiateur de facteur de croissance et dans la modulation du phénotype cellulaire durant le développement ontogénique et l'hypertrophie³⁴. En situation de stress cependant, la MEC s'adapte via l'accumulation de fibres de collagène nécessaire pour supporter les myofibrilles hypertrophiés. Ces changements fibrotiques dans la MEC ont pour conséquences d'augmenter la rigidité du myocarde et possiblement aussi de provoquer une dysfonction diastolique dans le coeur hypertrophié. Plusieurs facteurs ont été identifiés comme potentiellement importants en tant que médiateurs de la production de collagène cardiaque. De nombreuses interventions pharmacologiques avec des

inhibiteurs de l'enzyme de conversion et des antagonistes du récepteur AT_1 de l'Ang II ont permis de démontrer l'importance de l'Ang II dans la modulation de la fibrose cardiaque chez l'humain et dans des modèles animaux de défaillance cardiaque^{35 36}, tel que discuté plus bas.

1.1.2.4 Contribution du système nerveux sympathique

Il semblerait que l'activation des récepteurs adrénergiques puisse être un effecteur primaire initiant ou maintenant l'hypertrophie cardiaque due à une hausse de l'activité sympathique cardiaque et des niveaux élevés de catécholamines circulantes. En outre, il a été démontré qu'une infusion de norépinéphrine (NE) chez le chien induit une hypertrophie cardiaque et ce indépendamment des changements de la pression artérielle, des pressions intracardiaques et de la charge de travail cardiaque³⁷³⁸. De plus, des études effectuées chez le rat ont indiqué que la NE et la norfenéphrine ont augmenté le ratio masse ventriculaire gauche/ masse corporelle chez ces animaux et que l'administration de prazosin (un bloqueur des récepteurs α_1 -adrénergiques) ou de métoprolol (en quantité bloquant les récepteurs β_1 - et β_2 -adrénergiques) ont partiellement bloqué cette hausse de la masse ventriculaire gauche³⁹. Ces données suggèraient que l'hypertrophie cardiaque qui se développe en réponse à la NE soit médiée de façon directe par la stimulation des récepteurs α - et β -adrénergiques et ne fasse pas suite à des changements hémodynamiques. Par ailleurs, il a été démontré que l'Ang II augmente le tonus sympathique⁴⁰ et la relâche de NE suite à une stimulation directe des nerfs sympathiques postganglioniques⁴¹. Ainsi, une hausse de l'Ang II pourrait contribuer via cette voie au développement de l'hypertrophie cardiaque.

1.1.3 Vaisseaux et hypertrophie cardiaque

La paroi vasculaire occupe une place d'importance de par ses rôles multiples dans le maintien de l'équilibre cardiovasculaire et en tant qu'organe complexe composé d'une partie cellulaire (cellules endothéliales, cellules de muscle lisse (CML) et fibroblastes) et d'une partie non-cellulaire (MEC). Dans la média artérielle intacte, les CML et la matrice sont responsables des caractéristiques structurales et fonctionnelles

de la paroi vasculaire, incluant la contraction-relaxation, la croissance, le développement, le remodelage et la réparation ; elles sont aussi impliquées dans la pathogénèse de maladies cardiovasculaires comme l'athérosclérose, la resténose et l'hypertension⁴². Les vaisseaux doivent donc contrôler de façon autonome leur structure afin de remplir leurs rôles variés. L'hypertrophie et l'hyperplasie des CML peuvent mener à une réduction de la lumière des artères coronaires et ainsi diminuer la réserve coronarienne.

Dans les artères normales adultes, la paroi musculaire ou média est composée de cellules de muscle lisse quiescentes qui se contractent lorsqu'elles sont exposés à des agonistes vasopresseurs, mais qui répondent aux facteurs de croissance⁴³. Par ailleurs, sous l'influence d'un stimulus, ces cellules quiescentes peuvent moduler leur phénotype. Exposées à une hausse de la charge hémodynamique, à un dommage vasculaire ou à d'autres stress physiologiques, les CML peuvent réagir de diverses façons. En effet, il a été démontré que dans des modèles où l'hypertension se développe lentement comme chez le rat spontanément hypertendu ou dans un modèle « Golblatt deux-reins un-clip », la réponse de croissance majeure observée dans les grosses artères est l'hypertrophie (cellule plus grosse) ou l'hyperploïdie (cellule plus grosse accompagnée de synthèse d'ADN) des CML^{44 45}. En revanche, une étude utilisant un modèle d'hypertension induite par une coarctation aortique inter-rénale chez le rat a révélé que la réponse principalement induite dans ce modèle est l'hyperplasie (prolifération) des CML⁴⁶. De plus, dans les gros vaisseaux des patients ou animaux hypertendus de façon chronique, la croissance des CML se reflète en grande partie par une hypertrophie et très peu d'hyperplasie^{44 47}. Cette réponse adaptée au stress sur la paroi normalisée confère aux vaisseaux une capacité accrue pour supporter les pressions lumenales plus intenses. Par le fait même, cette facilité de contraction peut éventuellement amplifier la réponse aux agonistes contracteurs, exagérant ou perpétuant l'hypertension. À l'opposé, lors d'une induction de l'hypertension de façon aiguë, de même que suite à un dommage sur la paroi, les CML de l'aorte et de la carotide démontrent une réponse classique migratoire et proliférative⁴⁶.

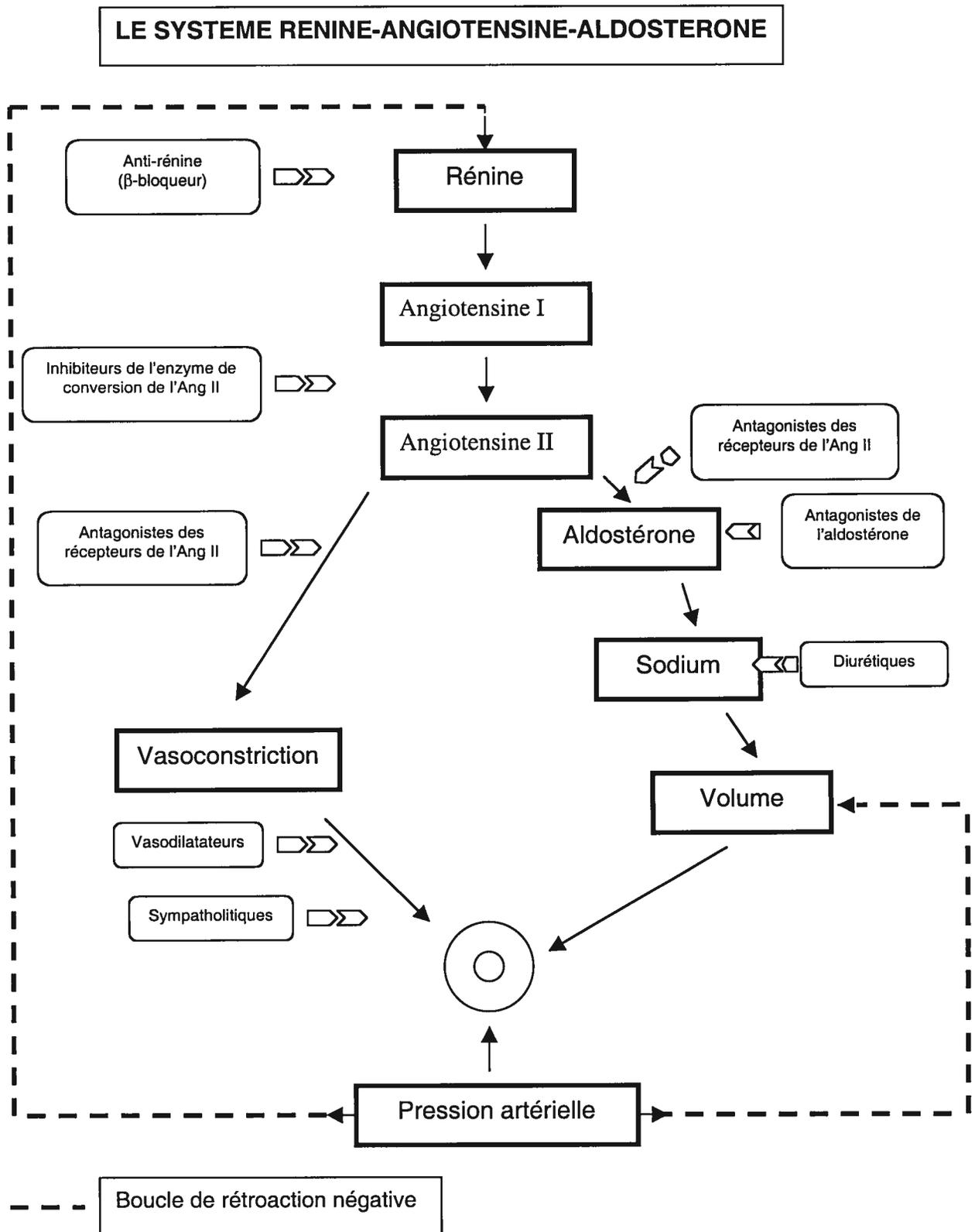
La très grande complexité des voies de signalisation régissant ces réponses variées, suggère que des altérations de ces voies dans les CML contribuent aux anomalies structurales et fonctionnelles sous-jacentes au processus de pathologie vasculaire dans les maladies cardiovasculaires comme l'hypertension, l'athérosclérose et la resténose. De nombreuses études ont permis de démontrer que l'Ang II contrôle les fonctions de la CML de par sa modulation du tonus vasomoteur ainsi que la croissance et de l'apoptose, par son influence sur la migration cellulaire et sur le dépôt de matrice, par son effet pro-inflammatoire, par son influence sur d'autres facteurs de croissance et substances vasoconstrictrices.

1.2 Le système rénine-angiotensine-aldostérone (SRAA)

Le système rénine-angiotensine-aldostérone (SRAA) joue un rôle important dans le maintien de l'équilibre hydro-minéral ainsi que dans la perfusion des organes, cependant, ce dernier joue aussi un rôle primordial dans le contrôle de la pression artérielle à court et à long terme (figure 1). Les facteurs susceptibles de faire baisser la pression artérielle via une baisse du volume sanguin (causée par une diète faible en sodium, des diurétiques, des pertes sanguines, la défaillance cardiaque, une cirrhose du foie ou un syndrome néphrotique) de même que par une réduction de la résistance périphérique totale activeront la relâche de rénine par les reins. La rénine, l'enzyme produite par les cellules juxtaglomérulaires du rein, est responsable du clivage de l'angiotensinogène (synthétisée par le rein) afin de libérer l'angiotensine I (Ang I) inactive. Le retrait des deux derniers acides aminés de l'Ang I par l'enzyme de conversion de l'angiotensine (ECA), enzyme associée à l'endothélium, génère le peptide actif, soit l'Ang II. L'Ang II a la particularité de stimuler la conversion de la corticostérone en aldostérone (Aldo) dans les cellules glomérulaires de la glande surrénale, cet effet peut être bloqué par un antagoniste compétitif de l'Ang II.

Le coeur exprime plusieurs constituants du SRAA cardiaque et l'Ang II a plusieurs effets tant sur les cardiomyocytes que sur les fibroblastes cardiaques. L'Ang II provoque entre autre l'hypertrophie des cardiomyocytes, l'hyperplasie des fibroblastes cardiaques ainsi que la fibrose cardiaque interstitielle. Ces actions de l'Ang II ont un impact négatif en favorisant la progression de l'hypertrophie

Figure 1



ventriculaire gauche vers un remodelage menant à la défaillance cardiaque. Ainsi, des changements dans l'espace interstitiel affectent profondément le métabolisme et la performance des cardiomyocytes, altérant éventuellement la fonction ventriculaire. Par exemple, la fibrose interstitielle contribue à la rigidité de la paroi ventriculaire et conséquemment altère la compliance cardiaque, contribuant ainsi à une fonction diastolique diminuée. D'autre part, l'augmentation de la matrice extracellulaire (MEC) et du volume occupé par les fibroblastes, ne contribuant pas à la contraction systolique, signifie que le travail systolique est effectué par une plus faible proportion de la masse cardiaque, contribuant à une dysfonction systolique. De plus, la fibrose interstitielle en augmentant la distance à diffuser par l'oxygène, diminue potentiellement la pression en oxygène pour les cardiomyocytes au travail. Enfin, l'accumulation de MEC peut altérer le couplage électrique des cardiomyocytes en causant leur séparation.

1.2.1 Les systèmes rénine-angiotensine locaux

Quoique la vision traditionnelle du SRAA en soit une d'un système endocrine classique, de récentes évidences suggèrent l'existence de SRAA locaux, intrinsèques et extrinsèques. En effet, plusieurs tissus dont le cerveau, les vaisseaux sanguins⁴⁸, le coeur^{49 50}, les reins et les surrénales expriment des ARNm pour l'angiotensinogène et/ou l'ECA. Par ailleurs, la production locale de l'Ang II par ces SRAA intrinsèques locaux module la structure et la fonction vasculaire, cardiaque et rénale et ce, en dépit de leur faible contribution aux niveaux circulants de rénine ou d'angiotensine active. D'autre part, puisque l'ECA est présente sur les cellules endothéliales dans toute la circulation et puisque la rénine circulante d'origine rénale peut être séquestrée par la paroi artérielle et d'autres tissus, la conversion de l'angiotensinogène en Ang I, puis en Ang II peut se produire essentiellement dans ou à la surface des parois vasculaires et non pas dans la circulation comme telle ; on retrouve donc aussi des SRAA extrinsèques locaux.

1.2.2 Régulation de la sécrétion de rénine

La sécrétion de rénine par les cellules juxtaglomérulaires se fait principalement via trois mécanismes distincts. La première voie intrarénale et nommée la *voie macula densa* et réagit à des changements dans la réabsorption du NaCl en envoyant des signaux chimiques aux cellules juxtaglomérulaires voisines pour modifier la sécrétion de rénine. Une hausse du flux de NaCl dans la macula densa empêchera la sécrétion de rénine via la relâche d'adénosine, alors qu'une baisse de ce flux stimulera la sécrétion de rénine via la libération de prostaglandines. La rénine est aussi relâchée via la *voie intrarénale barorécepteur* (baroréflexe) suite à des changements de pression sanguine dans les vaisseaux préglomérulaires. Une chute de la pression sanguine stimulera la relâche de rénine, alors qu'une élévation de la pression sanguine inhibera cette sécrétion. Enfin, la voie du récepteur β -adrénergique est modulée par la relâche de norépinéphrine des terminaisons nerveuses sympathiques post-ganglionnaires. La sécrétion de rénine étant à la hausse suite à l'activation des récepteurs β -adrénergiques sur les cellules juxtaglomérulaires.

Ces trois mécanismes régulateurs de la sécrétion de rénine font partie d'un réseau physiologique très étroit dans lequel une augmentation de la sécrétion de rénine stimule la formation d'Ang II qui agit sur ses récepteurs de type 1 (AT_1) présents sur les cellules juxtaglomérulaires, lesquelles inhiberont la relâche de rénine. On appelle ce mécanisme : *petite boucle de rétro-action négative*. L'Ang II peut aussi faire augmenter la pression via ses récepteurs AT_1 , ce qui a pour effet d'inhiber la relâche de rénine via l'activation des barorécepteurs de haute pression, réduisant ainsi le tonus sympathique, via une hausse de pression dans les vaisseaux préglomérulaires ou via une réduction de la réabsorption dans le tubule proximal, augmentant ainsi le flux de NaCl dans la macula densa. L'inhibition de la relâche de rénine suite à une augmentation de la pression via Ang II se nomme : *grande boucle de rétro-action négative*.

1.2.3 L'Angiotensine II par voies alternatives

Certains tissus contiennent des enzymes autres que la rénine pour convertir l'angiotensinogène en Ang I (protéases non-rénine) ou Ang II (cathepsine G, tonine)

et des enzymes autre que l'ECA pour convertir Ang I en Ang II (cathepsine G, enzyme génératrice d'Ang II chymostatine-sensible et chymase cardiaque)⁵¹. De plus en plus d'évidences suggèrent que la chymase contribue de façon importante à la conversion de Ang I vers Ang II, particulièrement dans le coeur^{52 53}. En effet, cette chymase pourrait être responsable de 80% de la production d'Ang II dans le coeur humain⁵⁴.

1.2.4 L'Angiotensine II : ses récepteurs, ses fonctions

Le peptide actif du SRAA, l'Ang II, transmet ses multiples actions principalement par deux types de récepteurs membranaires (situés sur divers organes ou tissus) distincts tant par leurs propriétés pharmacologiques que par leurs structures moléculaires, ces récepteurs sont appelés AT₁ et AT₂. Ces récepteurs sont tous deux membres de la famille des récepteurs à sept domaines transmembranaires couplés aux protéines G. Pratiquement tous les effets biologiques connus de l'Ang II comme la vasoconstriction, la relâche d'aldostérone, la stimulation de la transmission sympathique et la croissance cellulaire sont presque exclusivement médiés par le récepteur AT₁^{55 56}. Selon certains, le récepteur AT₂ joue possiblement un rôle dans la médiation de l'anti-prolifération, l'apoptose, la différenciation et peut-être dans la vasodilatation^{57 58}. Certaines évidences suggèrent l'existence de récepteurs à l'angiotensine supplémentaires tels que les récepteurs AT₃ et AT₄, de même qu'un récepteur à l'angiotensine(1-7). Cependant, les rôles joués par ces récepteurs sont en grande partie à élucider.

Les effets majeurs de l'Ang II peuvent se résumer par 3 phénomènes distincts : une réponse pressive rapide (altération de la résistance périphérique), une réponse pressive lente (altération de la fonction rénale) ainsi qu'un remodelage et une hypertrophie vasculaire et cardiaque (altération de la structure cardiovasculaire).

L'Ang II augmente la résistance périphérique totale via des effets directs et indirects sur les vaisseaux sanguins. Par exemple, via l'activation des récepteurs AT₁ situés sur les CML, l'Ang II provoque la contraction des artérioles pré-capillaires et, à un moindre degré, celle des veinules post-capillaires. L'effet engendré est plus ou moins intense à travers la circulation. D'autre part, l'Ang II facilite la neurotransmission

noradrénergique soit en augmentant la relâche de norépinéphrine par les terminaisons nerveuses sympathiques⁵⁹, soit en inhibant le recaptage de la norépinéphrine par les terminaisons nerveuses ou en potentialisant la réponse vasculaire à la norépinéphrine⁶⁰. De plus, l'Ang II peut provoquer une hausse de la résistance périphérique via l'augmentation du tonus sympathique ou parfois même via la relâche de catécholamines de la glande médullo-surrénale.

L'altération de la fonction rénale par l'Ang II peut se produire selon divers mécanismes. Par exemple, de faibles concentrations d'Ang II stimulent l'échange Na^+/H^+ dans le tubule proximal, ce qui a pour effet d'augmenter la réabsorption de Na^+ , Cl^- et de bicarbonate par le rein. Par ailleurs, en stimulant la zona glomerulosa du cortex de la surrénale, l'Ang II augmente la synthèse et la sécrétion d'aldostérone qui agit sur les tubules collecteurs et « distaux » pour provoquer la rétention de Na^+ et l'excrétion de K^+ et H^+ . De plus, une réduction du débit sanguin rénal survient lorsque l'Ang II provoque: la contraction directe des muscles vasculaires rénaux, l'augmentation du tonus sympathique rénal ou la hausse de neurotransmission noradrénergique rénale.

L'Ang II altère la structure cardiovasculaire en partie, en stimulant la migration, la prolifération⁶¹, l'hypertrophie, et/ou la capacité de synthèse des cellules de muscle lisse vasculaire (CMLV), des cardiomyocytes et/ou des fibroblastes⁶² en agissant directement sur les cellules pour induire l'expression de proto-oncogènes spécifiques. Certaines protéines ainsi synthétisées augmenteront à leur tour la production de facteurs de croissance. De plus, l'Ang II provoque une hausse de la synthèse des protéines de la MEC. Finalement, en plus des effets directs de l'Ang II sur la structure cardiovasculaire, des changements dans la pré-charge ainsi que dans la post-charge cardiaque contribuent possiblement au remodelage et à l'hypertrophie cardiaque. Il a donc été proposé que l'Ang II puisse fonctionner comme une hormone à actions paracrine et autocrine^{63 64}.

1.2.5 L'aldostérone et le coeur

L'aldostérone joue un rôle essentiel dans le contrôle de l'homéostasie corporelle du sodium et du potassium en agissant sur les tissus comme les reins et le côlon. Depuis

quelques années déjà cependant, plusieurs arguments expérimentaux et cliniques indiquent que l'Aldo puisse moduler la fonction cardiaque. Par exemple, l'étude multicentrique CONSENSUS a démontré une relation entre la concentration plasmatique d'Aldo et la mortalité des patients avec défaillance cardiaque « congestive »⁶⁵. D'autre part, il a été démontré qu'une hausse d'Aldo plasmatique affecte la géométrie ventriculaire dans l'aldostéronisme primaire⁶⁶. De plus, la synthèse d'Aldo dans le coeur de rat a été démontrée par le groupe de Silvestre en 1998⁶⁷, ce qui démontre l'existence d'un système tissulaire, c'est à dire la présence dans une cellule ou un groupe de cellules de tous les éléments biochimiques nécessaires pour la synthèse de l'hormone et de ses récepteurs spécifiques, rendant une action paracrine ou autocrine possible. L'hybridation *in situ* a par ailleurs permis de démontrer la présence de récepteurs spécifiques à l'Aldo, les récepteurs de minéralocorticoïdes (RM), dans les cardiomyocytes, les cellules endothéliales et les fibroblastes⁶⁸.

Un des effets les plus documenté de l'Aldo sur le coeur est l'induction d'une importante fibrose avec des conséquences néfastes pour le coeur⁶⁹. Ce groupe a démontré que la fibrose est observée seulement si les consommations en Aldo et en sodium sont augmentées. L'administration d'une faible dose de spironolactone, un antagoniste des récepteurs minéralocorticoïdes (ARM), permet la prévention de la fibrose seulement, mais pas l'hypertension qui y est associée et l'HVG, alors qu'une forte dose permet de prévenir tous les effets secondaires, confirmant ainsi l'effet spécifique de l'Aldo⁷⁰. De plus, la réponse cardiaque induite par l'Aldo est indépendante des facteurs hémodynamiques puisque l'hypertrophie augmentée et la hausse d'ARNm de l'ANF est observée dans le ventricule gauche seulement, alors que la fibrose est visible dans les deux ventricules^{71 72 73}. Les mécanismes par lesquels l'Aldo induit une fibrose sont inconnus, mais la densité ventriculaire des récepteurs AT₁ est augmentée de 1.5 fois chez les rats traités pendant un mois avec Aldo-sel et cette hausse est bloquée par le losartan ou le spironolactone suggérant la potentialisation des propriétés fibrogéniques de l'Ang II⁷⁴. Ainsi, ces différents rôles de l'Aldo peuvent sensibiliser les réponses cardiaques à l'Ang II circulante ou produite localement.

1.3 Inhibiteurs du SRAA

Étant donné les nombreuses actions moléculaires et cellulaires occasionnées par l'Ang II dans les maladies rénales et cardiovasculaires, et ce indépendamment de son effet élévateur sur la pression sanguine, il est d'un grand intérêt de pouvoir bloquer ces effets néfastes de l'Ang II. Ainsi, plusieurs antagonistes ont été développés dont les deux types principaux, soit les inhibiteurs de l'ECA (IECA) et les antagonistes des récepteurs à l'Ang II (ARA). Cependant, des inhibiteurs de vasopeptidases qui bloquent en même temps l'ECA ainsi que l'endopeptidase neutre (EPN) ont aussi été développés et d'autres classes d'inhibiteurs de vasopeptidase seront vraisemblablement développés (bloqueurs combinés de l'ECA, de l'EPN, de l'enzyme de conversion de l'endothéline (ECE) ou de l'enzyme de conversion de TNF α). D'autre part, des efforts sont fournis pour tenter de développer des inhibiteurs de la rénine⁷⁵. De plus, à ce jour, peu d'antagonistes des récepteurs à l'Aldo ont été développés, soit le spironolactone et l'epronolone. Une étude avec le spironolactone « RALES: Randomized Aldactone Evaluation Study » a permis de démontrer une baisse de mortalité de 30% chez les patients avec une défaillance cardiaque avancée⁷⁶. La mort soudaine et le décès suite à une défaillance cardiaque progressive ont tous deux été réduits par le spironolactone. De plus, le taux d'hospitalisation suite à une détérioration de la défaillance cardiaque a été diminué de 35 % avec le spironolactone comparativement au groupe placebo. D'autre part, certains travaux ont permis d'émettre l'hypothèse que le remodelage cardiaque puisse être bloqué de façon efficace par de petites doses d'un antagoniste de l'Aldo^{77 78}. Ces agents semblent donc être plus que des diurétiques faibles, ils pourraient s'avérer de puissants agents anti-remodelage. Ainsi, il faut compter sur une seconde génération d'antagonistes des récepteurs d'Aldo présentement en développement.

1.3.1 Les inhibiteurs de l'enzyme de conversion de l'Ang II (IECA)

Il est bien établi que les IECAs n'atténuent pas seulement la formation d'Ang II, médiée par l'ECA, dans la circulation et les tissus périphériques, mais permet aussi l'accumulation de bradykinine (BK) par l'inhibition de sa dégradation, car l'ECA est

identique à la kininase II^{79 80}. La BK stimule à son tour la relâche de prostaglandines vasodilatatrices⁸¹ et d'oxide nitrique⁸². Dans l'article de revue de Linz, les effets d'une accumulation de bradykinine dans les tissus sont présentés. Ainsi, l'accumulation de bradykinine dans les tissus suite à une inhibition de l'ECA contribue à la réduction de la pression sanguine chez les rats avec une hypertension rénovasculaire, à la prévention de la formation d'une néointima suite à un dommage dans les carotides, à l'amélioration de la performance cardiaque, à l'augmentation du débit sanguin coronaire, à la prévention d'arythmies induites par ischémie-reperfusion et à la régression de l'HVG induite par une surcharge pressive suite à une coarctation aortique. Des études récentes n'ont toutefois pas permis de démontrer un rôle pour la bradykinine dans les effets cardiaques et vasculaires des IECAs^{83 84 85}. D'autre part, la concentration plasmatique du N-acetyl-seryl-aspartyl-lysyl-proline (Ac-SDKP), un inhibiteur naturel de l'entrée en phase S du cycle cellulaire des cellules souches hématopoïétiques pluripotentielle est augmentée de cinq fois en présence d'IECA chez l'humain⁸⁶, l'Ac-SDKP étant hydrolysé exclusivement par l'ECA. Rhaleb et son équipe ont permis de démontrer que l'Ac-SDKP inhibait la synthèse d'ADN et de collagène dans les fibroblastes cardiaques suggérant son rôle potentiel en tant que régulateur endogène de la prolifération des fibroblastes et de la synthèse de collagène dans le coeur. Ainsi, l'Ac-SDKP peut possiblement contribuer aux effets cardioprotecteurs des IECA en limitant la prolifération des fibroblastes et par le fait même, en limitant la production de collagène, ce qui contribuerait à réduire la fibrose chez les patients hypertendus⁸⁷. Par ailleurs, l'Ang II peut être générée par des voies alternatives comme par la voie chymase-dépendante, laquelle n'est pas affectée en présence d'IECA, empêchant ainsi la suppression complète du SRAA. Le développement d'antagonistes des récepteurs AT₁ s'avère donc une alternative de choix.

1.3.2 Les antagonistes des récepteurs à l'Ang II (ARA)

Les antagonistes des récepteurs à l'Ang II disponibles en clinique se lient au récepteur AT₁ avec une très forte affinité et sont généralement beaucoup plus sélectif pour le récepteur AT₁ que pour le récepteur AT₂. Cette inhibition des réponses

biologiques à l'Ang II est souvent insurmontable et peut être due à la cinétique de dissociation lente du composé pour le récepteur AT₁. Plusieurs ARAs ont été testés en clinique et se sont tous révélés efficaces quant à la réduction de la pression sanguine⁸⁸. Contrairement aux IECAs, les ARAs n'empêchent pas la dégradation de la bradykinine et il est invoqué que c'est peut-être pour cette raison qu'ils ne provoquent pas de toux^{89 90}. Chez des patients avec défaillance cardiaque chronique les ARAs ont permis de réduire l'activité sympathique et d'augmenter l'activité parasympathique du système nerveux en plus de réduire les niveaux de norépinéphrine⁹¹. De plus, il a été démontré que l'action des ARAs dans le développement d'une HVG va au-delà de leurs effets sur la pression sanguine tant chez l'humain⁹² que dans des modèles animaux^{93,94}. Par ailleurs, des études ont révélé que les réponses de vasoconstriction aiguës à l'Ang II sont bloquées par le candersartan, un ARA⁹⁵. Dans une autre étude, il a été démontré qu'un traitement avec le candersartan a permis l'inhibition de la réponse pressive induite par l'Ang II, une diminution de la pré-charge et de la post-charge, une amélioration de la fonction systolique et diastolique du ventricule gauche, un remodelage du ventricule gauche modéré ainsi qu'une zone d'infarctus diminuée dans un modèle in vivo d'ischémie-reperfusion⁹⁶. Pour la présente étude, nous avons d'ailleurs choisi de travailler avec un ARA, le valsartan, afin de mieux élucider les rôles potentiels des récepteurs AT₁ dans notre modèle.

1.3.3 IECA VS ARA

Il est important de connaître et de comparer l'efficacité thérapeutique des IECAs aux ARAs. En effet, bien que ces deux classes de médicaments bloquent le SRAA, les ARAs diffèrent des IECAs de plusieurs façons. Premièrement, les ARAs diminuent l'activation des récepteurs AT₁ plus efficacement que le font les IECAs. En réduisant la biosynthèse d'Ang II par l'action de l'ECA sur l'Ang I, les IECAs n'inhibent toutefois pas les voies alternatives de génération d'Ang II. De leur côté, les ARAs en agissant sur le récepteur AT₁ freinent les effets de l'Ang II via ce récepteur peu importe la voie biochimique empruntée pour la formation de l'Ang II. Deuxièmement, les ARAs activent indirectement les récepteurs AT₂ contrairement

aux IECAs. Bien que les IECAs provoquent une hausse de la sécrétion de rénine, ils ne sont pas associés à une hausse des niveaux d'Ang II, car la conversion de l'Ang I en Ang II est bloquée par ces derniers. À l'opposé, les ARAs stimulent aussi la sécrétion de rénine menant à une augmentation considérable des niveaux circulants d'Ang II. Puisque les récepteurs AT₂ ne sont pas bloqués par les ARAs présentement disponibles, ceux-ci stimulent indirectement les récepteurs AT₂ par les niveaux d'Ang II augmentés. De plus, il a été démontré que certains des effets médiés par le récepteur AT₂, notamment l'augmentation de GMPc vasculaire⁹⁷, puissent être bloqués par un antagoniste des récepteurs B2^{98,99}. Troisièmement, puisque l'ECA est impliquée dans l'élimination de l'angiotensine (1-7) (Ang (1-7)) les inhibiteurs de cette enzyme peuvent faire augmenter les niveaux d'Ang (1-7) de façon beaucoup plus importante que les ARAs. Enfin, les IECAs provoquent l'augmentation des niveaux de plusieurs substrats de l'ECA incluant la bradykinine et l'Ac-SDKP. Cependant, la question à savoir si ces différences pharmacologiques entre les IECAs et les ARAs occasionnent des différences significatives dans leurs vertus thérapeutiques est encore controversée. En revanche, les IECAs ont des effets secondaires importants comme la toux et l'angio-oedème, possiblement provoqués par la bradykinine, que les ARAs n'engendrent pas^{100,101}.

1.4 Modèles expérimentaux de maladies cardiovasculaires

Les phénotypes moléculaires de l'hypertrophie cardiaque diffèrent selon le type de maladie cardiaque. Par exemple, chez les rats spontanément hypertendus (RSH), le modèle le plus populaire d'hypertension essentielle humaine, les niveaux d'ARNm pour l' α -actine squelettique, l'ANF et les collagènes de type I et III sont supérieurs à ceux des rats normotendus Wistar-Kyoto, alors que les niveaux de l' α -MHC sont inférieurs chez les RSH¹⁰². Ainsi, chez les RSH on observe une hypertrophie cardiaque accompagnée d'une reprogrammation des gènes cardiaques. Un traitement légèrement hypotenseur avec un ARA ou un IECA atténue la hausse d'ARNm de l'ANF et du collagène de type I et III, alors qu'un bloqueur des canaux calciques ou un bloqueur α 1-adrénergique n'ont aucun effet sur l'expression de ces ARNm. D'autre part, la lignée de rats transgéniques hypertendus portant le gène Ren-2, est

caractérisé par une absence d'augmentation de rénine plasmatique et rénale et une concentration de rénine adrénérgique élevée comme chez les RSH¹⁰³. En comparant les effets d'un ARA avec ceux d'un bloqueur de canaux calciques, d'un bloqueur β -adrénérgique et d'un bloqueur α -adrénérgique, Ohta et son équipe ont démontré que le récepteur AT₁ est impliqué dans l'hypertrophie cardiaque et la reprogrammation génétique¹⁰⁴. Une sous-lignée de RSH les « stroke-prone » RSH, un modèle humain d'hypertension maligne, démontre un phénotype cardiaque différent des lignées précédentes. En effet, dans ce modèle, on observe une augmentation de l'expression des ARNm des β -MHC et de TGF- β 1^{105 106}. Un traitement au losartan a permis de réduire l'HVG et de normaliser l'expression altérée de l' α -MHC, de l' α -actine squelettique, de l'ANF, du TGF- β 1 et des collagènes de types I et III de façon supérieure à l'amlodipine malgré des effets hypotenseurs similaires. Cependant, ces 2 médicaments n'ont pas empêché significativement l'augmentation des niveaux d'ARNm de β -MHC.

Un autre modèle populaire pour étudier les mécanismes d'hypertrophie cardiaque *in vivo* est le modèle de surcharge pressive aiguë. Ce modèle est caractérisé par une hypertrophie cardiaque aiguë induite par une surcharge pressive sévère et rapide du coeur, contrairement aux modèles précédents où l'hypertrophie cardiaque se développe lentement. Par exemple, une coarctation aortique abdominale induit le développement progressif d'une hypertrophie cardiaque compensée avec un volume myocytaire augmenté, mais sans dilatation de la cavité du ventricule gauche, du moins durant les quatre premières semaines¹⁰⁷. De plus, une coarctation de l'aorte abdominale provoque l'hyperactivité du SRAA via une réduction de la perfusion rénale¹⁰⁸. D'autre part, une coarctation de l'aorte thoracique provoque quant à elle un développement rapide de l'HVG avec une augmentation minimale du volume myocytaire et une dilatation du ventricule gauche résultant en une défaillance cardiaque¹⁰⁷. De plus, une surcharge pressive aiguë induite par un bandage aortique abdominal chez les rats provoque des augmentations rapides des ARNm de β -MHC, de l' α -actine squelettique, de l'ANF, du TGF- β 1 et des collagènes de type I et III dans le ventricule gauche, alors qu'une chute de l'ARNm de l' α -MHC est observé¹⁰⁹. Un traitement au losartan a permis de supprimer l'HVG et la régulation à la hausse de

l'ANF et du TGF- β 1 suite à la coarctation, ce qui suggère que le récepteur AT₁ puisse contribuer à l'hypertrophie cardiaque et la hausse d'ANF et de TGF- β 1 dans ce modèle¹¹⁰. De la même façon, des études effectuées avec le ramipril ont permis de prévenir l'HVG et de normaliser les niveaux d'ANF^{111 112}. Il a aussi été démontré que dans un tel modèle une progression rapide de la fibrose cardiaque marquée est associée à une dysfonction diastolique¹¹³. De plus, les niveaux d'expression de eNOS sont à la hausse dans le coeur et l'aorte thoracique des animaux ayant subi une coarctation aortique abdominale, de même que les niveaux de nNOS dans leur cerveau, cependant ceux de iNOS ne sont pas augmentés¹¹⁴.

Pour les besoins de la présente étude, nous avons par ailleurs arrêté notre choix sur un modèle de surcharge pressive induite par une coarctation de l'aorte abdominale. Ce modèle représente l'anomalie la plus fréquemment observée des maladies cardiaques, soit l'hypertrophie cardiaque. Cette anomalie pouvant mener à l'hypertension, l'infarctus du myocarde ou la défaillance cardiaque, il est donc primordial d'étudier les mécanismes impliqués dans le développement de l'hypertrophie cardiaque. Le développement de l'hypertrophie cardiaque étant progressif dans ce modèle, il s'avère plus pratique qu'un modèle de RSH, afin de mieux comprendre et élucider les événements et les mécanismes impliqués à chaque étape du remodelage cardiaque. D'autre part, le SRAA étant activé par la coarctation, la contribution de ce système lors du développement de l'hypertrophie cardiaque peut être élucidé, encore une fois à toutes les étapes du développement. Par ailleurs, les effets d'une surcharge pressive sur les cardiomyocytes, les fibroblastes et la matrice extracellulaire peuvent être suivis progressivement grâce à ce modèle. Enfin, la coarctation aortique abdominale permet d'étudier les comportements de l'aorte en situation d'hypotension (aorte abdominale) de même qu'en situation d'hypertension (aorte thoracique).

2. HYPOTHESE ET OBJECTIFS

Dans cette étude, nous avons donc formulé l'hypothèse que l'Ang II contrôle l'équilibre croissance-apoptose de façon opposée dans les cardiomyocytes et les non-cardiomyocytes lors du développement de l'hypertrophie cardiaque induite par une surcharge pressive suite à une coarctation aortique abdominale. Par ailleurs, l'apoptose observée lors du remodelage cardiaque sera dépendante des caspases. Nous avons de plus émis l'hypothèse qu'un traitement au valsartan préviendrait la fibrose et l'hypertrophie en réduisant la survie et la croissance des non-cardiomyocytes.

Le but de la présente étude est de mieux comprendre le rôle d'AngII comme régulateur de l'équilibre croissance/mort cellulaire dans le développement de l'hypertrophie cardiovasculaire. Nous examinerons également le rôle potentiel des récepteurs AT₁ dans ce modèle. Nous déterminerons aussi si l'apoptose dans le présent modèle est associée à l'activation des caspases. Nous tenterons d'évaluer les effets d'une surcharge pressive sur les populations cellulaires cardiaques et vasculaires (croissance/apoptose), de même que sur la morphologie de ces divers types de cellules (nombre/grosseur). Les effets de la coarctation sur la pression artérielle seront aussi observés. De plus, les effets de la surcharge pressive sur la MEC seront évalués au cours de cette étude. Enfin, nous tenterons de vérifier la contribution des récepteurs AT₁ lors du remodelage cardiovasculaire par l'administration du valsartan.

ACCORD DES COAUTEURS

1. Identification de l'étudiant : Diane Beaudry, [REDACTED]

Sigle et titre du programme : M.Sc. en Pharmacologie

2. Description de l'article:

Auteurs : Diane Beaudry, Pavel Hamet et Denis deBlois.

Titre : PREVENTION BY VALSARTAN OF CARDIAC FIBROBLAST HYPERPLASIA IN RATS WITH COARCTATION OF THE ABDOMINAL AORTA.

Revue : Hypertension ou autre. Article en phase finale de préparation.

3. Déclaration de tous les coauteurs autres que l'étudiant:

À titre de coauteur de l'article identifié ci-dessus, je suis d'accord pour que Diane Beaudry inclut cet article dans son mémoire de maîtrise qui a pour titre : Régulation par l'angiotensine II de la croissance et de l'apoptose cellulaire dans la cardiomyopathie hypertensive.

Dr Pavel Hamet

[REDACTED SIGNATURE]

02/11/02

Coauteur

Signature

Date

Dr Denis deBlois

[REDACTED SIGNATURE]

25/11/02

Coauteur

Signature

Date

**PREVENTION BY VALSARTAN OF CARDIAC FIBROBLAST HYPERPLASIA IN
RATS WITH COARCTATION OF THE ABDOMINAL AORTA.**

Diane Beaudry¹, Pavel Hamet² & Denis deBlois^{1,3}

Departments of Pharmacology¹ and Medecine²

University of Montreal Hospital (CHUM) Research Center

3840, St-Urbain St., room 7-132B, Montreal, Quebec H2W 1T8, Canada

Tel. (514) 890-8000 ext.12919, Fax: (514) 412-7152,

email: 

³Author for correspondence

Supported by Novartis. DD is a scholar of the FRSQ.

Will be submitted for publication in june 2003.

ABSTRACT

Objectives: AT1 receptor blockade with valsartan reverses fibroblasts hyperplasia in part via the induction of apoptosis and inhibition of cell growth during the regression of left ventricular hypertrophy in the heart of spontaneously hypertensive rats. The present study examined the hypothesis that valsartan can prevent fibroblast hyperplasia in a rat model of cardiac pressure-overload induced by suprarenal abdominal aortic banding. Methods: Banding of the abdominal aorta was done on male Sprague-Dawley rats. Valsartan or placebo were started on the day of the surgery for a period of up to 56 days. Results: Banding significantly increased left ventricular hypertrophy at days 7, 14, 28 and 56 (45% vs Sham). Valsartan completely prevented left ventricular hypertrophy until day 28 (19% vs Sham). Valsartan abolished the DNA synthesis induced after 7 (196% vs Sham) and 14 days (116% vs Sham) of banding. Apoptosis did not contribute to cardiac remodeling at the time observed. Above the banding mean arterial pressure and pulse pressure were increased by 60% and 163% and trans-stenotic gradient was increase by 579%. Valsartan did not have any significant effect on these parameters. Treatment with valsartan prevented the 40% increase in fibroblasts (vs Sham: $207 \pm 6 \times 10^6$ cells) after 8 weeks of banding and partially prevented the increase in left ventricular fibrosis in banded rats (118% vs Sham) as assessed by hydroxyproline content. The capillary density was identical in all groups following 4 weeks of banding. Cardiomyocytes hypertrophy, assessed by the cross-sectional area, was significantly increased by 57% following banding and valsartan prevented that increase. Conclusions: Valsartan

prevents cardiac hypertrophy and hyperplasia mainly by preventing fibroblast proliferation without any detectable effect on apoptosis and blood pressure at the time studied. Inhibition of cardiac hyperplasia in the presence of valsartan contribute to the partial inhibition of cardiac fibrosis.

INTRODUCTION

Left ventricular hypertrophy (LVH) is an adaptive response of the heart to increased afterload. Although hypertrophy initially permits normalization of cardiac wall stress, it eventually leads to various cardiovascular complications like symptomatic congestive heart failure, myocardial infarction and death¹. Hypertrophy of the heart involves cellular hyperplasia (mainly in non-myocytes) as well as cellular hypertrophy and eventually cell death (mainly in myocytes)^{2 3}. As the heart progresses toward failure, connective tissue accumulates thereby affecting cardiac oxygen supply and contractile behavior⁴. Besides hemodynamic factors, neurohormones may modulate the extent of cardiac hypertrophy and fibrosis. Angiotensin II (AngII) is emerging as a key regulator of cardiovascular mass and structure. Suppressing the AngII pathway prevents or reverses the development of cardiac hypertrophy and increases survival in patients and animal models^{5 6 7}. AngII acting via AT1 receptors stimulates cardiomyocyte apoptosis *in vivo* and *in vitro*^{8 9 10}. In contrast, cultured fibroblasts respond to AT1 receptor stimulation with increased proliferation⁴. Long treatment (10-14 weeks) with inhibitors of the AngII pathway suppresses cardiomyocyte apoptosis in SHR and in dogs *in vivo*^{11 12 13 14}. In the short term, however, AT1 blockade in SHR rapidly reduces growth and stimulates apoptosis in fibroblasts^{15 16}. However, the role and regulation of cell growth and apoptosis in the more acute model of cardiac remodeling due to aortic banding remains to be better defined. This study was thus designed to better understand the effect of AngII AT1 receptor blockade in the regulation of cardiovascular cell growth and apoptosis during the development of cardiac hypertrophy due to suprarenal aortic banding.

MATERIALS AND METHODS

Animal and Surgical Procedures

This investigation conformed 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), and all the procedures were approved by the institutional Animal Care Committee of the Centre hospitalier de l'Université de Montréal (CHUM). Banding of the abdominal aorta above the renal arteries was done on male Sprague-Dawley rats (300-350g, from Charles River Laboratories, St-Constant, Canada) after at least 72 hours of housing. Briefly, animals were anesthetized with a single subcutaneous injection of ketamine (50 mg/kg ; MTC Pharmaceuticals, Cambridge, Canada), xylazine (5 mg/kg ; Bayer, Etobicoke, Canada), and acepromazine (2.5 mg/kg ; Ayerst Laboratories, Montreal, Canada), and the abdominal aorta was exposed through an incision 1cm below the diaphragm on the left side of the animal. The banding was produced by placing a blunted 20-gauge needle along the denuded aorta just above the renal arteries and fixed tightly to the aorta with a silk thread #2-0 (Ethicon, Inc). Then the gauge-needle was removed resulting in the constriction of the aorta at a known and constant diameter. Sham-operated controls underwent an identical procedure except for the placement of the suture. The two different layers of abdominal muscles were sutured separately and the skin incision was closed with wound clips, then the animals were allowed to recover on a 37°C heating pad. Buprenorphine was administered subcutaneously up to 48 hours following surgery. Valsartan a selective AT₁ antagonist (30mg/kg/day p.o.; gift of Novartis, Montreal, Canada) or placebo treatment were started on the day of the surgery for a period of 2,

4, 7, 14, 28 and 56 days, the concentration of the drug was adjusted twice a week according to water consumption and body weight. Food and water were administered *ad libitum*.

Hemodynamics

Trans-stenotic pressure gradients were determined in anesthetized (pento) rats before sacrifice at selected time points by introducing a catheter in the left carotid artery and the left femoral artery. Catheters were connected to pressure transducers (Harvard Apparatus) connected to a Macintosh Power Book G4 running the BioPac data acquisition software. After baseline measurements were recorded, a group of animals was subjected to abdominal aortic banding and the change in blood pressure (BP) was recorded to assess the effect of the banding acutely. To assess the chronic effects of banding on BP measurements, we recorded pressure data (MAP and PP above and below the site of banding and HR), at day 28 post-banding in all groups analysed.

Tissue Preparation

At the different time points selected after aortic banding, rats were anesthetized with the same cocktail used previously for the surgical procedure. To evaluate DNA synthesis *in vivo*, rats received an intra-veinous injection of ^3H -thymidine in the left femoral vein (0.5 mCi/kg, New England Nuclear, Mississauga, Canada) 1.5 hour before sacrifice. Moreover, 15 minutes before sacrifice, all rats were injected intra-veinously in the right femoral vein with propidium iodide ($5\mu\text{mol/kg}$, Sigma) to evaluate the non-viable cells in the different tissues collected. In order to induce a cardiac arrest in diastole, rats received an injection of CdCl_2 (100mM) via the vena cava. All the rats were weighed and their hearts were rapidly isolated. Right and left

atria were removed and the right ventricular free wall was separated from the remaining portion of the heart. Both ventricles were weighed separately to estimate hypertrophy. A 5 mm section of the left ventricle was made perpendicularly to the vertical axis of the heart using a scalpel and fixed in phosphate-buffered 4% paraformaldehyde for further histological studies (whole heart sections at 28 days post-banding) ; the remaining of the left ventricle as well as the right ventricle were snap frozen separately in liquid nitrogen and kept at -80°C until analysis.

Cardiac DNA Analysis

The left ventricle was pulverized in liquid nitrogen-dry ice with the use of mortar and pestle to obtain a fine tissue powder which was stored at -80°C until being processed as previously described for DNA extraction¹⁷ (the right ventricle underwent the same procedure). Briefly, an aliquot of around 50 mg was incubated in a buffer containing 20 mmol/L EDTA, 50 mmol/L Tris-HCl (pH 8.0), 0.5% SDS, and 500 µg/mL proteinase K for 3 hours at 50°C, then treated with RNase (final concentration, 250 µg/mL) for 1 hour at 37 °C. After extraction with phenol and chloroform, DNA was precipitated with 100% cold ethanol and resuspended in deionized water. DNA content was measured by spectrophotometry, and DNA concentration per milligram of tissue powder was calculated. In order to evaluate the cardiac DNA synthesis, the *in vivo* incorporation of ³H-thymidine into the ventricles was quantified by measuring the specific activity of the DNA extracted.

***In situ* DNA Fragmentation Labeling**

To detect possible DNA fragmentation *in situ*, 3'-end tail labeling was performed by the adapted method of Gavrieli¹⁷ as previously described. Heart sections were

exposed to an enzymatic reaction with a solution containing 2 mM CoCl₂, 0.5 mM DTT, 100 mM potassium cacodylate, 30 mM Tris-HCl, pH 7.4, 0.05 mg/ml BSA, 0.35 mM dATP, 50 nM ³²P-dCTP (3000 Ci/mmol) and 4.5 U of tdt and covered with a plastic cover-slip. After a 30 min incubation at 37°C, the cover-slips were removed and the slides were washed before being exposed for 48 hours to a phosphor-sensitive screen which was eventually scanned with a Molecular Dynamics Typhoon 8600 Variable Mode Imager, and the number of pixels per section was estimated by image analysis software (ImageQuant 5.1).

Western-Blot Analysis of Caspase-3

Protein was extracted from an aliquot of 50 mg frozen tissue using a lysis buffer containing 10mMTris-HCl pH7.5, 1% Triton x-100, 4mM βglycerophosphate, 4mM sodium fluoride, 1mM EDTA, 1mM EGTA, 200μM sodium orthophosphate, 51μM benzamidine, 0.5 mM phenylmethylsulfonylfluoride (PMSF), 21μM leupeptin, 5mM DTT and 1μM microcystin (Sigme-Aldrich Canada Ltd, Oakville, ON). Following 3 cycles at -80°C/37°C, lysates were centrifuged at 13000rpm for 15 minutes at 4°C and supernatant were used to determine protein concentration with the Bio-Rad protein assay (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA). Subsequently, 50 μg of proteins were separated by electrophoresis on a 15% polyacrylamide gel for 1 hour at 130V and transferred to Hybond-C extra membrane (Amersham, Bioscience, London, UK) in a Trans-Blot SD Semi-Dry Transfer Cell (Bio-Rad). Membranes were blocked with 5% non-fat milk and incubated with specific antibody to caspase-3 (1:500) (sc-7148, Santa Cruz Biotechnology, Inc) for 1 hour at room temperature. After 5 successive washings, membranes were incubated with goat anti-rabbit horseradish

peroxidase-conjugated antibody (1:1500) (sc-2004, Santa Cruz Biotechnology, Inc) for 1 hour at room temperature. Membranes were then incubated with ECL Plus (Life Science Products, Boston, MA) for 1 minute, exposed for 5 minutes to Kodak Scientific Imaging Film and developed. The film was then numerized using an Astra 1200S scanner (Scanjet 6200C, Hewlett Packard (Canada) Ltd, Mississauga, ON). NIH Image 1.61 program (developed at the National Institute of Health and available on the Internet at <http://rsb.info.nih.gov/nih-image/>) was used to quantifie the band intensity.

Morphometric Analysis

After a preliminary study showing that the right ventricles did not show any differences in the total number of cardiac cells between the groups (data not shown), we chose to assess the total number of cardiomyocytes and non-cardiomyocytes in the left ventricles available at 4 weeks after surgery according to the method previously described by Anversa et al.¹⁸. Briefly, 4 pictures each of the sub-epicardium, sub-endocardium and mid-myocardium were taken at a magnification of 400X (with a Zeiss Axioskop microscope connected to a SPOT digital camera and a Macintosh G4 computer) after Hematoxyline (Sigma, MO, USA) staining of 5 μ m thick sections. In each picture, we counted the number of myocyte nuclear profiles in a measured area. Average nuclear length was determined from an average of 50 measurements in longitudinally oriented myocytes. From these values, we could calculate the average number of myocytes nuclei per unit volume. To evaluate the volume percent of cardiomyocytes in the tissue, we counted the fraction of points in a grid of 165 sampling points overlaying the myocyte compartment in each of the fields

($66 \mu\text{m}^2$). The left ventricular weight was estimated by multiplying the percent value of left ventricular cross-sectional area relative to total ventricular cross-sectional area with the left ventricular weight. Dividing the left ventricular weight by the specific gravity of muscle tissue (1.06 g/mL) gave us the left ventricular volume. To obtain the aggregate volume of cardiomyocytes, we multiplied this value with the volume percent of cardiomyocytes. The total number of cardiomyocytes was then calculated by multiplying the aggregate volume of myocytes by the average number of nuclei per unit volume. The total number of non-cardiomyocytes was calculated similarly. We also measured the average cross-sectional area of at least 100 cardiomyocytes per section using the NIH Image program 1.61.

Determination of the Capillary Density in the Left Ventricle

As an estimate of endothelial cell number, changes in capillary density were assessed at 28 days after surgery. We stained $5\mu\text{m}$ thick sections of the left ventricle with TRITC-labeled lectin as previously described¹⁹. Sections were deparaffinized, incubated at room temperature in a saponine-EGTA solution, washed 3 times in PBS and incubated for 1 hour at 37°C in a moist chamber with $40\mu\text{l}$ solution of PBS diluted $5\mu\text{g/ml}$ TRITC-labeled lectin. The slides were then mounted in a fluorescence-enhancing medium (Vectashield, Vector Laboratories). The number of capillaries per section was evaluated in 3 pictures each of the sub-epicardium and sub-endocardium at a magnification of 400X (with a Zeiss Axioskop microscope connected to a SPOT digital camera and a Macintosh G4 computer).

Determination of Hydroxyproline Content

Tissue hydroxyproline (HOP) content was determined by the method of Switzer²⁰. Tissues were weighted in dry culture tubes and dried at 65°C for 18-24 hours. After being cooled at room temperature in a dessicator, the tubes were weighted, then 1.0 ml HCl 6N was added to each mg of dry tissue weight to hydrolyse the samples at 110°C for 24 hours. Following hydrolysis, 50 μ l of the hydrolysate was evaporated and 1 ml of deionized water was added to each tube and mixed. One ml Borate buffer (1:5) was added to all tubes, then hydroxyproline oxidation was performed by adding 0.3 ml ChloramineT in a time sequence of exactly 20 minutes. Sodium Thiosulfate was used to stop the oxidation process and Potassium Chloride was added to saturate all tubes. The tubes were then heated in boiling water for 20 minutes. After cooling, Toluene was added to all tubes which were shaken for 5 minutes. Following a brief centrifugation at low speed, 1.0 ml toluene extract was transferred to 12 X 75 mm test tubes and 0.4 ml Ehrlich's reagent was added. After allowing the color to develop for 30 minutes, absorbance was read at 565 nm against a reagent blank. To calculate the hydroxyproline content of each sample, a linear regression of absorbance versus μ g hydroxyproline was used.

Statistical Analysis

Results were analyzed using unpaired Student's t test with Bonferroni correction for multiple comparison where appropriate. Values are presented as mean \pm SEM. $P < 0.05$ was considered statistically significant.

RESULTS

Effect of Banding on Hemodynamic Parameters

The hemodynamic measurements obtained both acutely and chronically are presented in Table 1. Acutely, the mean arterial pressure (MAP) above the banding site was increased by 8.7% vs Sham after the banding and reduced by 3% below the banding resulting in a 300% rise in the trans-stenotic pressure gradient vs Sham. The pulse pressure (PP) above the banding was increased by 76% vs Sham immediately after the coarctation was done. After 4 weeks of banding, MAP above and below the ligature were increased significantly (60% and 39% respectively) compared to Sham-operated animals. The PP both above and below the banding was increased by 163% and 82% vs controls, respectively. Valsartan attenuated the increase in the MAP and the PP above the banding vs Sham. However, valsartan could not completely prevent the development of an important gradient (414% vs Sham) across the banding.

Effect of Valsartan on Cardiac Hypertrophy and DNA Content

At each time point selected during this study, the body weights were not significantly different between the groups (Sham at 2 days : 338 ± 3 g and Sham at 56 days : 565 ± 14 g). Aortic banding of the abdominal aorta induced left ventricular hypertrophy (LVH) starting 7 days after surgery (figure1). The left ventricular weight to body weight ratio (LVW/BW) was increased by 14% vs Sham at day 7 post-banding. At day 56, this ratio reached a 45% increase compared to Sham-operated controls. Treatment with the AT1 receptor antagonist valsartan completely abolished this hypertrophy at 7 and 14 days and partially at 28 and 56 days. Banding provoked a non-significant increase (42% vs Sham) in DNA content in the left ventricle at 4 days post-banding and the presence of valsartan accentuated further that increase reaching

a significantly different value of 47% vs Sham. On the other hand, the DNA content was significantly increased in the LV by 25% after 28 days of banding and by 41% after 8 weeks, valsartan partially prevented these increases. No differences between the groups were seen in the right ventricular weight to body weight ratio (RVW/BW). The DNA content in the RV was similar in the banded animals and the sham-operated group. However, the DNA content in the RV was increased by 25% in the treated group at day 4 post-banding vs controls (figure 2).

Effect of Valsartan on DNA Synthesis and Degradation

Left ventricular DNA synthesis was transiently and significantly decreased by 39% vs Sham in the banded group at 4 days but then transiently increased at 7 days (196% vs Sham) and 14 days (60% vs Sham) post-banding (figure 3). Valsartan completely prevented both the decrease and the increase observed in the coarctated group at these time points in the left ventricle. In the right ventricle, no differences were observed between the banded group and the sham-operated group. However, DNA synthesis was significantly decreased by 62% after 4 days of banding with valsartan treatment vs Sham.

We tested the hypothesis that apoptosis contributed to ventricular remodeling in this model. We could not demonstrate any significant changes in DNA fragmentation between the groups studied (between 2 and 28 days), even if we noticed a slight increase at days 7 and 14 post-banding in the banded group (Table 2). To further confirm the absence of apoptosis at these time points, we measured the protein expression of pro-caspase-3 (32kDa), and activated caspase-(20kD fragment) and observed no significant differences between the groups studied (Table 2).

Effect of Valsartan on Cardiac Hyperplasia

To further evaluate the effect of a preventive treatment of 8 weeks with valsartan on cardiac hyperplasia, we counted the total amount of cardiac cells in the left ventricle isolated at that time only. The total amount of cardiomyocytes and non-cardiomyocytes was shown to be similar between the groups in the right ventricle for a sub-group of rats (data not shown), we therefore concentrated our efforts on the left ventricle only. These data showed us that the number of non-cardiomyocytes (NCM) per unit area was increased significantly by 6% vs Sham following banding (table 3). The volume of the left ventricle was significantly increased by 35% after banding vs Sham. We also noticed that the volume occupied by cardiomyocytes (CM) was increased by 35% with banding vs Sham. We also measured the CSA of individual cardiomyocytes which was significantly increased by 69% following banding vs Sham. Finally, total fibroblasts number was increased by 40% in the left ventricle at 56 days post-banding vs Sham, this increase was completely abolished with valsartan (figure 4).

The staining of the left ventricular sections with lectin allowed us to assess whether changes in endothelial cell number contributed to the observed increase in NCM number 56 days after surgery (Table 3). The number of capillaries per unit area was decreased by 18% following banding. However, the number of capillaries per cardiomyocytes remained unchanged with banding. Treatment with valsartan did not affect capillary density per CM number after 56 days of banding.

Left ventricular fibrosis was assessed by determining the hydroxyproline content (representative of collagen content) of the left ventricle at day 56 following surgery.

The hydroxyproline content of the left ventricle was 119% greater in the banded group vs Sham: $5.3 \pm 1.0 \mu\text{mole HOP/left ventricle}$ (Table3). Treatment with valsartan completely prevented fibrosis to occur at that time. We also evaluated fibrosis in left ventricular sections stained with Masson Trichrome at the same time. We observed a pronounced perivascular fibrosis in the left ventricle of banded rats compared to sham-operated and valsartan treated rats (data not shown).

DISCUSSION

Evidence that the renin-angiotensin system (RAS) might be involved in the regulation of cardiac growth have emerged from studies using inhibitors of the system *in vivo* showing that regression or prevention of cardiac hypertrophy could occur in different experimental animal models. Banding above the renal arteries promotes overactivity of the renin-angiotensin system due to the low renal perfusion pressure²¹. The resulting increase in renin eventually leads to increased circulating levels of AngII which has numerous effects on the efferent pathways. It was previously reported that banding of the abdominal aorta induced a left ventricular hypertrophy and perivascular fibrosis^{22 23}. Indeed, several studies using this model have shown that treatment with either an ACE inhibitor or an AT1 receptor antagonist could completely or partially prevent LVH development in rat models of abdominal coarctation^{21 23 24 25 26 27 28}. For instance, Jalil et al. have shown that the ACE inhibitor captopril, administered in drinking water, could prevent left ventricular hypertrophy (LVH) up to 8 weeks after banding. More recently, Ogawa et al. showed that administration of ramipril for 6 weeks by oral gavage could also prevent the development of LVH. On the other hand, some other groups have not been able to prevent LVH using different treatment²⁹. In fact, Regan's group using losartan for 4 weeks in the same model could not prevent both the increase in BP and LVH. The discrepancies between these studies are difficult to explain but could result from differences in experimental models.

It was previously shown that increased pulse pressure reflecting large artery stiffness is a strong predictor of general and cardiovascular mortality in different populations³⁰

³¹. This study examined alterations in cardiac cell population dynamics and hemodynamic parameters in response to pressure overload due to supra-renal aortic coarctation in rats, and their modulation by the AT1 receptor antagonist valsartan. Pulse pressure was significantly increased following banding of the abdominal aorta in rats. However, a 4 weeks treatment with relatively high doses (30 mg/kg/day) of the AT1 receptor antagonist valsartan only partially prevented the increase in pulse pressure observed above the banding and was able to partially prevent LVH. Moreover, the results of this study demonstrated that valsartan completely abolished the transient increase in DNA synthesis in the left ventricles seen after 7 and 14 days post-banding which was eventually shown to be responsible for the increase in non-cardiomyocytes number observed 56 days post-banding. The results from this study seem to indicate that apoptosis does not play an important role during the first 8 weeks of cardiovascular remodeling in this model. Nevertheless, using thoracic banding of the aortic arch, Teiger et al.¹⁷ demonstrated that cardiac hypertrophy is initiated by a wave of apoptosis of cardiomyocytes, apoptosis being at its peak at day 4 post-banding in this model. The discrepancies among our study and others may result, at least in part, from the different location of the banding as well as the degree of banding. In fact, Teiger used a more severe type of banding resulting in a greater degree (130 % increase vs sham-operated animals) of hypertrophy after 30 days than in our model which might involve a different activation of systemic and/or local RAS or more severe hemodynamic stress on the heart. Moreover, Calderone et al.³² has previously shown that stimulus-specific heterogeneity in the signaling events and peptide growth factors coupled to gene expression could play a role in determining

the type of hypertrophy that is caused by various forms of hemodynamic overload. These differences in severity of pressure overload could partially account for the apparent lack of involvement of apoptosis in our model. Moreover, as shown by Ding et al³³, positive in situ TUNEL was virtually absent in LV sections of sham-operated mice and mice subjected to ascending aortic stenosis for 4 weeks. Their findings are consistent with Teiger's which reported a transient wave of apoptosis immediately after aortic banding but no increase in apoptosis after 30 days of pressure overload (early hypertrophy). They further observed an increase in apoptosis in the LV of mice after 7 weeks of banding (early heart failure).

In the present study, we were able to partially prevent development of LVH and fibrosis following banding of the abdominal aorta in rats using valsartan for 8 weeks. Moreover, valsartan almost completely prevented the increase in MAP above the banding after 4 weeks. The pulse pressure and the trans-stenotic pressure gradient were still evident in the animals treated with valsartan. Pulse pressure is related to the viscoelastic properties of the arterial wall and the timing of the reflecting waves. Therefore, in our model, we can speculate that the increased pulse pressure observed is the result of increased stiffness, earlier wave reflections within the thoracic aorta due to the banding and the banding itself. The diminished pulse pressure observed in the treated group possibly had beneficial effects on thoracic aorta remodeling and likely contributed to the attenuated LVH observed in this group. In support of this, it was previously shown that local pulse pressure is a strong independent determinant of carotid artery enlargement whereas mean blood pressure is not, suggesting that pulsatile stress plays a more important role than steady stress³⁴.

As previously shown, AngII acts via AT1 receptors to alter sympathovagal balance, therefore facilitating the sympathetic outflow to the heart and peripheral circulation during baroreceptors unloading³⁵. Chronic AT1 receptor blockade with losartan in banded rats by normalizing sympathovagal balance and sympathetic tone to the periphery but not changing the pressure load indicated that these effects were pressure independent³⁶. We can thus speculate that valsartan presumably acted similarly in our study. It is also possible that increased sympathetic output which have been shown to induce cardiac hypertrophy in animal models could play a role in our model³⁷. In fact, it was previously shown that plasma norepinephrin (NE) were increased after banding³⁸ and that an increase in circulating Ang II induced a further increase in NE plasmatic concentration³⁵. Moreover, it has been shown that in rat left ventricle, the ET-dependent signaling pathway leading to early development of cardiac hypertrophy and fetal gene expression is primarily activated by norepinephrine³⁹. Endothelin whose presence has been reported to be increased in the ventricles of aortic-banded rats may thus play an important role in the early development of cardiac hypertrophy in our model⁴⁰.

The increase in collagen content in the left ventricle following banding of the abdominal aorta was almost completely prevented with valsartan suggesting that the hemodynamic changes observed could be partly mediated by AT1 receptor. Effectively, the presence of diffuse fibrosis within the myocardium, documented by morphological and morphometric techniques, has been shown to be accompanied by increased stiffness. This reduced collagen content may be the result of the prevention of NCM hyperplasia with valsartan at day 56 in the treated group. In addition,

reduced AngII-dependent collagen production likely contributed. Moreover, we have to keep in mind that the cardiac cell population consists of around 30% cardiomyocytes contributing to 70% of the heart mass while the non-cardiomyocytes represent around 70% of the cell population but only 30% of the cardiac mass. Thus, the increase in left ventricular mass seen in the banded group can be explained by an increase in myocytes CSA (mass), an increase in the number of NCM cells and an increase in extra-cellular-matrix (ECM).

The increased DNA synthesis observed in the left ventricle of banded rats in our model, indicates that proliferation plays a major role in the hypertrophic remodeling of the heart seen during the first 8 weeks of aortic banding. Moreover, the observations that CM number and capillary number per cardiomyocyte were not changed strongly suggest that the proliferating cells are mostly fibroblasts. Our valsartan treatment completely prevented the growth of non-cardiomyocytes at day 56. On the other hand, valsartan only partially prevented cardiomyocytes from being hypertrophied after 8 weeks of banding. These results are in accordance with a previous study⁴¹ showing that the AT2 receptor appears to play an important role in the regulation of pressure-overload-induced hypertrophy. In that study, they banded the aorta above the left renal artery of AT2 knock-out mice but did not observe LVH in those animals. Moreover, by measuring the left ventricular myocyte cross sectional area (CSA) they demonstrated that the CSAs in aortic-banded AT2 knock-out mice (*Agtr2*^{-/-}) increased slightly but not significantly as compared with those in sham-operated *Agtr2*^{-/-} mice but still being significantly less than those in aortic-banded wild-type mice. Similarly, Harada et al.²² using a pressure overload model of cardiac

hypertrophy in Ang II type 1A receptor knockout mice demonstrated that AT1-mediated Ang II signaling is not essential for the development of pressure overload-induced cardiac hypertrophy. After 40 days of abdominal aortic banding, the CSA of cardiac myocytes were increased in both knock-out and wild-type mice. They therefore concluded that there could be two distinct pathways in pressure overload-induced cardiac hypertrophy : one that is AT1- dependent while the other is AT1-independent, the later potentially fully able to substitute for the AT1-dependent pathway. Moreover, the offuscation in fibroblast proliferation and collagen deposition could increase stress load on CM and result in CM hypertrophy. The discrepancies between studies using an Ang II receptor antagonist or AT receptor knock-outs indicate that the role of AT1 and AT2 receptor need to be better elucidated.

In this study, we can speculate that the sequence of events occurring during the first 8 weeks of abdominal aortic banding are the following : LVH is observed after 7 days of banding, when DNA synthesis is substantially increased in the LV. DNA content in the LV following banding is significantly increased after 28 days and further increased after 56 days, time where fibroblast number is significanty increased.

These results are to our knowledge the first to examine alterations in cardiac cell population dynamics and hemodynamic parameters in response to pressure overload due to supra-renal aortic coarctation in rats and their modulation by the AT1 receptor antagonist valsartan. The AT1 receptor antagonist valsartan partially prevented LVH, the increase in both blood pressure and pulse pressure. These effects prevented NCM hyperplasia resulting in a reduced myocardial fibrosis and a decrease cardiomyocytes hypertrophy. These data also suggest that AT1-independent signaling pathways

involved in pressure overload-induced cardiac hypertrophy probably exist. Since new generation of antihypertensive drugs must do more than simply reduce blood pressure by protecting against the local effects of high blood pressure and the structural remodeling in blood vessels, these results suggest that valsartan could be an alternative or a complement to ACE inhibitors in the management of hypertension, especially for ACE inhibitor-intolerant patients. The prevention of left ventricular fibrosis by valsartan involved attenuation of cardiac fibroblast hyperplasia mainly via an inhibition of cell proliferation.

Acknowledgments

This work was supported by Novartis and the Canadian Institute for Heart Research. Denis deBlois is a scholar of the FRSQ.

References

1. Levy D, Garrison RJ, Savage DD, Kannel WB, Castelli WP. Prognostic implications of echocardiographically determined left ventricular mass in the Framingham Heart Study. *N Engl J Med.* 1990;322:1561-6.
2. Walsh RA, Dorn II GW. *Growth and hypertrophy of the heart and blood vessels.* 1 ed. New-York: McGraw-Hill; 1998.
3. Anversa P, Olivetti G, Leri A, Liu Y, Kajstura J. Myocyte cell death and ventricular remodeling. *Curr Opin Nephrol Hypertens.* 1997;6:169-176.
4. 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;73:413-423.
5. Kim S, Ohta K, Hamaguchi A, Omura T, Yukimura T, Miura K, Inada Y, Ishimura Y, Chatani F, Iwao H. Angiotensin II type I receptor antagonist

inhibits the gene expression of transforming growth factor-beta 1 and extracellular matrix in cardiac and vascular tissues of hypertensive rats.

Journal of Pharmacology & Experimental Therapeutics. 1995;273:509-515.

6. Investigators TS. Effect of enalapril on mortality and the development of heart failure in asymptomatic patients with reduced left ventricular ejection fractions. *New England Journal of Medicine*. 1992;327:6858-691.
7. Ruzicka M, Leenen FH. Update on local cardiac renin-angiotensin system. *Curr Opin Cardiol*. 1997;12:347-53.
8. Shizukuda Y, Buttrick PM, Geenen DL, Borczuk AC, Kitsis RN, Sonnenblick EH. Beta-adrenergic stimulation causes cardiocyte apoptosis: influence of tachycardia and hypertrophy. *Am J Physiol*. 1998;275:H961-H968.
9. Pierzchalski P, Reiss K, Cheng W, Cirielli C, Kajstura J, Nitahara JA, Rizk M, Capogrossi MC, Anversa P. p53 Induces myocyte apoptosis via the activation of the renin-angiotensin system. *Exp Cell Res*. 1997;234:57-65.
10. Kajstura J, Cigola E, Malhotra A, Li P, Cheng W, Meggs LG, Anversa P. Angiotensin II induces apoptosis of adult ventricular myocytes in vitro. *J Mol Cell Cardiol*. 1997;29:859-870.
11. Diez J, Panizo A, Hernandez M, Vega F, Sola I, Fortuno MA, Pardo J. Cardiomyocyte apoptosis and cardiac angiotensin-converting enzyme in spontaneously hypertensive rats. *Hypertension*. 1997;30:1029-1034.
12. Fortuno MA, Ravassa S, Etayo JC, Diez J. Overexpression of Bax protein and enhanced apoptosis in the left ventricle of spontaneously hypertensive rats: effects of AT1 blockade with losartan. *Hypertension*. 1998;32:280-286.

13. Li Z, Bing OH, Long X, Robinson KG, Lakatta EG. Increased cardiomyocyte apoptosis during the transition to heart failure in the spontaneously hypertensive rat. *Am J Physiol.* 1997;272:H2313-H2319.
14. Goussev A, Sharov VG, Shimoyama H, Tanimura M, Lesch M, Goldstein S, Sabbah HN. Effects of ACE inhibition on cardiomyocyte apoptosis in dogs with heart failure. *Am J Physiol.* 1998;275:H626-H631.
15. 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;34:229-35.
16. Der Sarkissian S, Tea B-S, Hamet P, deBlois D. PD123319 prevents the anti-proliferative and pro-apoptotic effects of valsartan in non-cardiomyocytes in the SHR heart (Abstract). *Canadian Journal of Cardiology.* 1999;15 (Suppl D):386.
17. Teiger E, Dam TV, Richard L, Wisnewsky C, Tea BS, Gaboury L, Tremblay J, Schwartz K, Hamet P. Apoptosis in pressure overload-induced heart hypertrophy in the rat. *J Clin Invest.* 1996;97:2891-2897.
18. Anversa P, Palackal T, Sonnenblick EH, Olivetti G, Meggs LG, Capasso JM. Myocyte cell loss and myocyte cellular hyperplasia in the hypertrophied aging rat heart. *Circ Res.* 1990;67:871-885.
19. Der Sarkissian 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;57:775-83.

20. Switzer BR. Determination of hydroxyproline in tissue. *J Nutr Biochem.* 1991;2:229-231.
21. Baker KM, Chernin MI, Wixson SK, Aceto JF. Renin-angiotensin system involvement in pressure-overload cardiac hypertrophy in rats. *Am J Physiol.* 1990;259:H324-32.
22. Harada K, Komuro I, Shiojima I, Hayashi D, Kudoh S, Mizuno T, Kijima K, Matsubara H, Sugaya T, Murakami K, Yazaki Y. Pressure overload induces cardiac hypertrophy in angiotensin II type 1A receptor knockout mice. *Circulation.* 1998;97:1952-9.
23. Linz W, Scholkens BA, Ganten D. Converting enzyme inhibition specifically prevents the development and induces regression of cardiac hypertrophy in rats. *Clin Exp Hypertens A.* 1989;11:1325-50.
24. Jalil JE, Janicki JS, Pick R, Weber KT. Coronary vascular remodeling and myocardial fibrosis in the rat with renovascular hypertension. Response to captopril. *Am J Hypertens.* 1991;4:51-5.
25. Ogawa T, Linz W, Stevenson M, Bruneau BG, Kuroski de Bold ML, Chen JH, Eid H, Scholkens BA, de Bold AJ. Evidence for load-dependent and load-independent determinants of cardiac natriuretic peptide production [see comments]. *Circulation.* 1996;93:2059-67.
26. Rossi MA, Peres LC. Effect of captopril on the prevention and regression of myocardial cell hypertrophy and interstitial fibrosis in pressure overload cardiac hypertrophy. *Am Heart J.* 1992;124:700-9.

27. Scholkens BA, Linz W, Martorana PA. Experimental cardiovascular benefits of angiotensin-converting enzyme inhibitors: beyond blood pressure reduction. *J Cardiovasc Pharmacol.* 1991;18:S26-30.
28. Everett AD, Tufro-McReddie A, Fisher A, Gomez RA. Angiotensin receptor regulates cardiac hypertrophy and transforming growth factor-beta 1 expression. *Hypertension.* 1994;23:587-92.
29. Regan CP, Anderson PG, Bishop SP, Berecek KH. Pressure-independent effects of AT1-receptor antagonism on cardiovascular remodeling in aortic-banded rats. *Am J Physiol.* 1997;272:H2131-H2138.
30. Benetos A, Safar M, Rudnichi A, Smulyan H, Richard JL, Ducimetieere P, Guize L. Pulse pressure: a predictor of long-term cardiovascular mortality in a French male population. *Hypertension.* 1997;30:1410-5.
31. Benetos A, Rudnichi A, Safar M, Guize L. Pulse pressure and cardiovascular mortality in normotensive and hypertensive subjects. *Hypertension.* 1998;32:560-4.
32. Calderone A, Takahashi N, Izzo NJ, Jr., Thaik CM, Colucci WS. Pressure- and volume-induced left ventricular hypertrophies are associated with distinct myocyte phenotypes and differential induction of peptide growth factor mRNAs. *Circulation.* 1995;92:2385-2390.
33. Ding B, Price RL, Goldsmith EC, Borg TK, Yan X, Douglas PS, Weinberg EO, Bartunek J, Thielen T, Didenko VV, Lorell BH. Left ventricular hypertrophy in ascending aortic stenosis mice: anoikis and the progression to early failure. *Circulation.* 2000;101:2854-62.

34. Boutouyrie P, Bussy C, Lacolley P, Girerd X, Laloux B, Laurent S. Association between local pulse pressure, mean blood pressure, and large-artery remodeling. *Circulation*. 1999;100:1387-93.
35. Speth RC, Khosla MC, Spech MM, Ferrario CM. Rat (Ile5) but not bovine (Val5) angiotensin raises plasma norepinephrine in rats. *Hypertension*. 1981;3:II-25-9.
36. Bezerra SM, dos Santos CM, Moreira ED, Krieger EM, Michelini LC. Chronic AT(1) receptor blockade alters autonomic balance and sympathetic responses in hypertension. *Hypertension*. 2001;38:569-75.
37. Zierhut W, Zimmer HG. Significance of myocardial alpha- and beta-adrenoceptors in catecholamine-induced cardiac hypertrophy. *Circ Res*. 1989;65:1417-25.
38. Siri FM. Sympathetic changes during development of cardiac hypertrophy in aortic- constricted rats. *Am J Physiol*. 1988;255:H452-7.
39. Moser L, Faulhaber J, Wiesner RJ, Ehmke H. Predominant activation of endothelin-dependent cardiac hypertrophy by norepinephrine in rat left ventricle. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2002;282:R1389-94.
40. Arai M, Yoguchi A, Iso T, Takahashi T, Imai S, Murata K, Suzuki T. Endothelin-1 and its binding sites are upregulated in pressure overload cardiac hypertrophy. *Am J Physiol*. 1995;268:H2084-91.
41. Senbonmatsu T, Ichihara S, Price E, Jr., Gaffney FA, Inagami T. Evidence for angiotensin II type 2 receptor-mediated cardiac myocyte enlargement during in vivo pressure overload. *J Clin Invest*. 2000;106:R25-9.

TABLE 1

Effect of aortic constriction and valsartan treatment on hemodynamic measurements

Acute	Before n= 5	After n= 5		
MAP (Carotid) (mmHg)	104 ± 4	113 ± 4 *		
MAP (Femoral) (mmHg)	100 ± 5	97 ± 5 *		
PP (Carotid) (mmHg)	13.5 ± 1.8	23.8 ± 2.1 *		
PP (Femoral) (mmHg)	10.7 ± 1.3	9.0 ± 1.2 *		
Transstenotic gradient	4.1 ± 1.5	16.4 ± 1.4 *		
Chronic	Sham	Coarctation	Coarctation + valsartan	
	n= 5	n= 5	n= 6	
MAP (Carotid) (mmHg)	106 ± 6	169 ± 17 *	120 ± 24	
MAP (Femoral) (mmHg)	101 ± 7	144 ± 13 *	106 ± 23	
PP (Carotid) (mmHg)	13.4 ± 1.2	35.2 ± 5.2 *	22.0 ± 3.0	
PP (Femoral) (mmHg)	11.2 ± 0.9	20.5 ± 3.8 *	11.0 ± 5.0	
Transstenotic gradient	2.2 ± 0.9	14.7 ± 4.4 *	11.0 ± 3.0	
Heart Rate	310 ± 8	300 ± 20	337 ± 14	

Values are means ± SEM. MAP: Mean Arterial Pressure. PP: Pulse Pressure

*P < 0.017 vs sham-operated rats.

Figure 1A

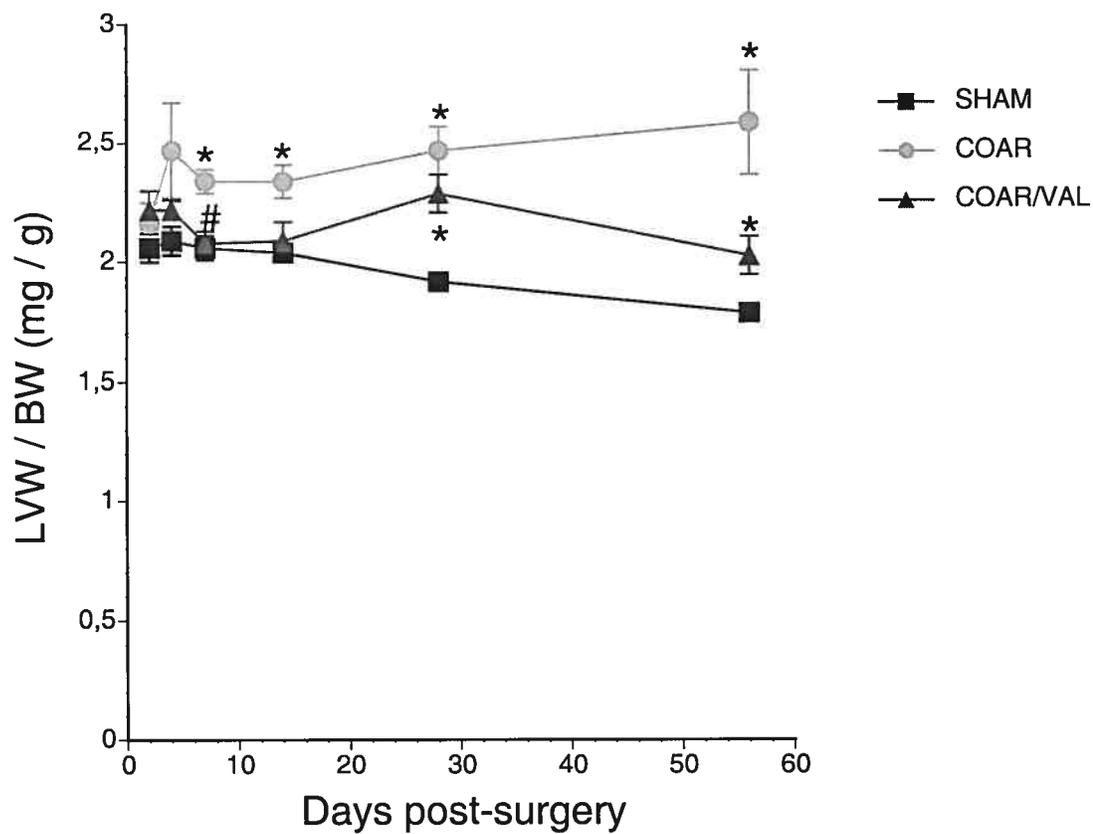


Figure 1. Effects of pressure overload produced by abdominal aortic banding with or without valsartan. A, Left ventricular weight (mg) / body weight (g) ratio. *P < 0.017 vs sham-operated rats; #P < 0.017 vs valsartan treated rats.

Figure 1B

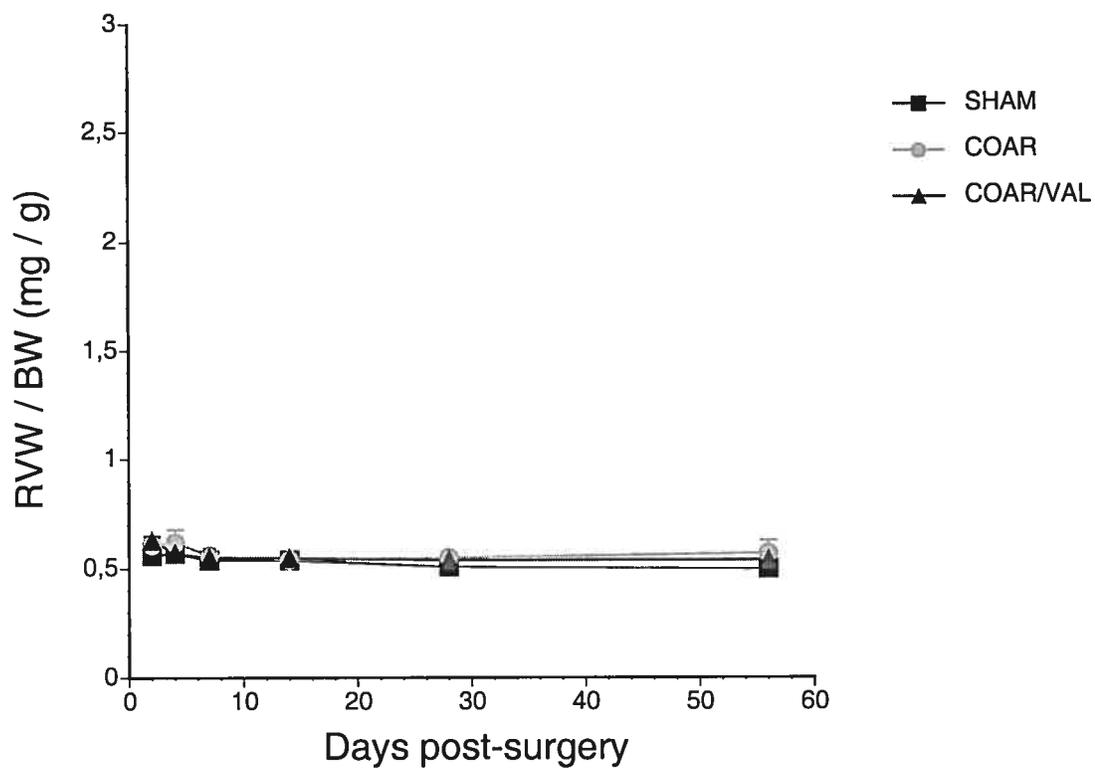


Figure 1. Effects of pressure overload produced by abdominal aortic banding with or without valsartan. B, Right ventricular weight (mg) / body weight (g) ratio. *P < 0.017 vs sham-operated rats; #P < 0.017 vs valsartan treated rats.

Figure 2A

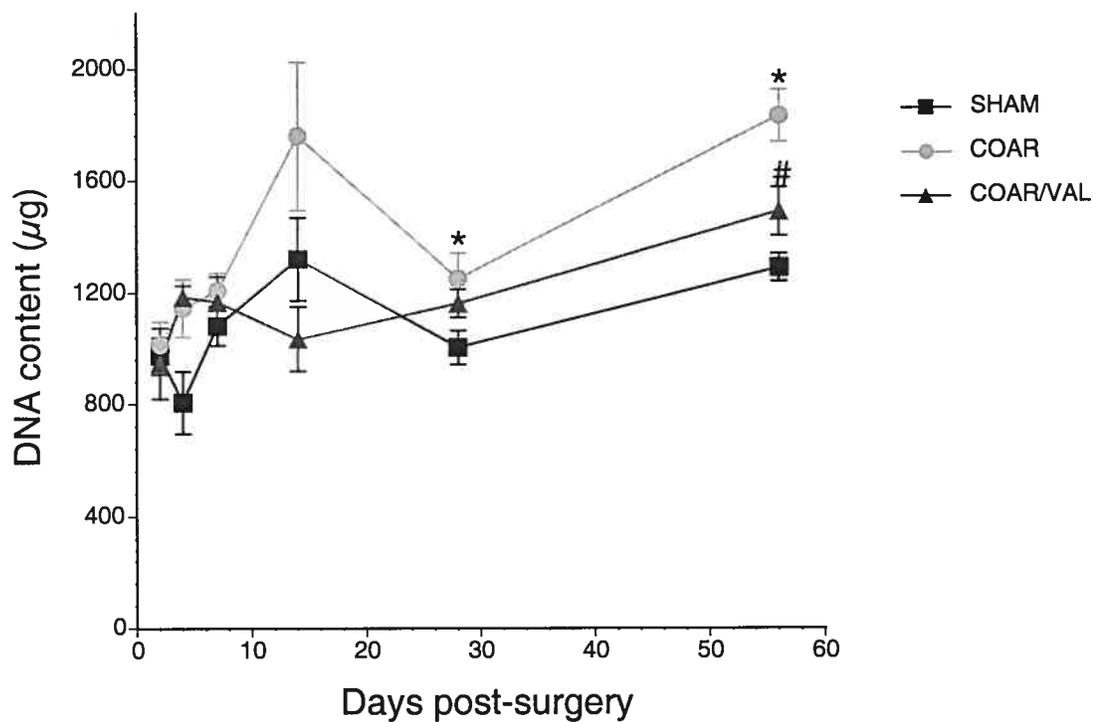


Figure 2. Effects of pressure overload produced by abdominal aortic banding with or without valsartan on DNA content (μg) / ventricle. A, Left ventricle. * $P < 0.017$ vs sham-operated rats; * $P < 0.017$ vs sham-operated rats.

Figure 2B

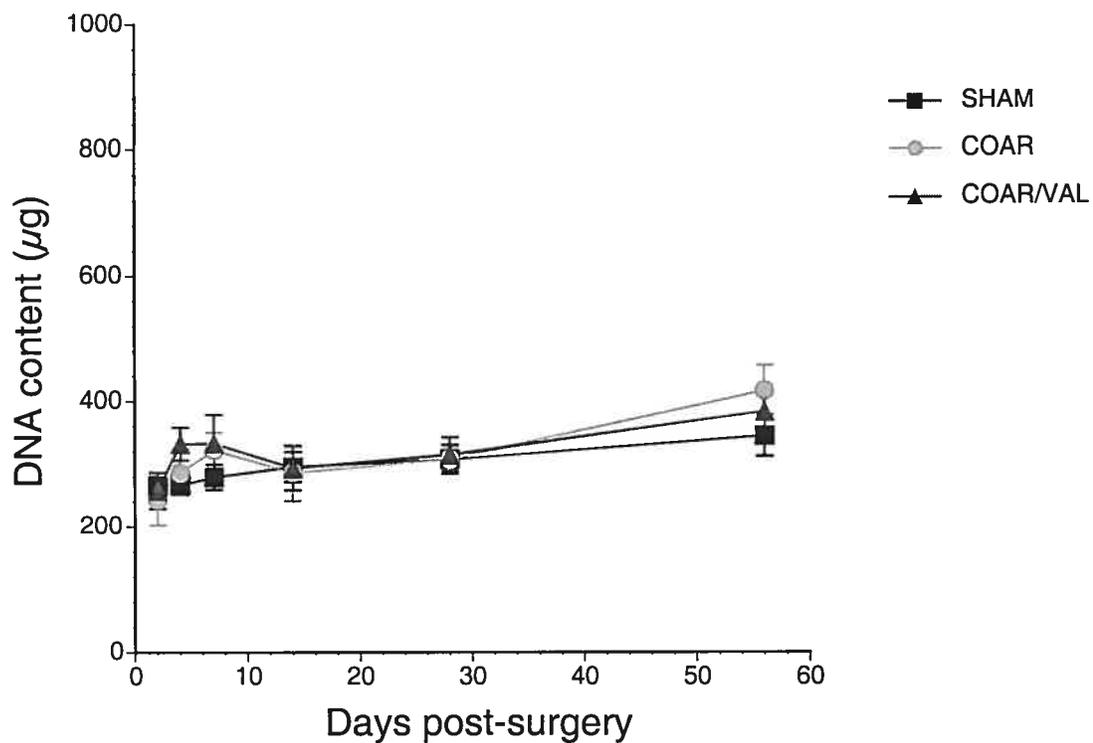


Figure 2. Effects of pressure overload produced by abdominal aortic banding with or without valsartan on DNA content (μg) / ventricle. **B,** Right ventricle. * $P < 0.017$ vs sham-operated rats; * $P < 0.017$ vs sham-operated rats.

Figure 3A

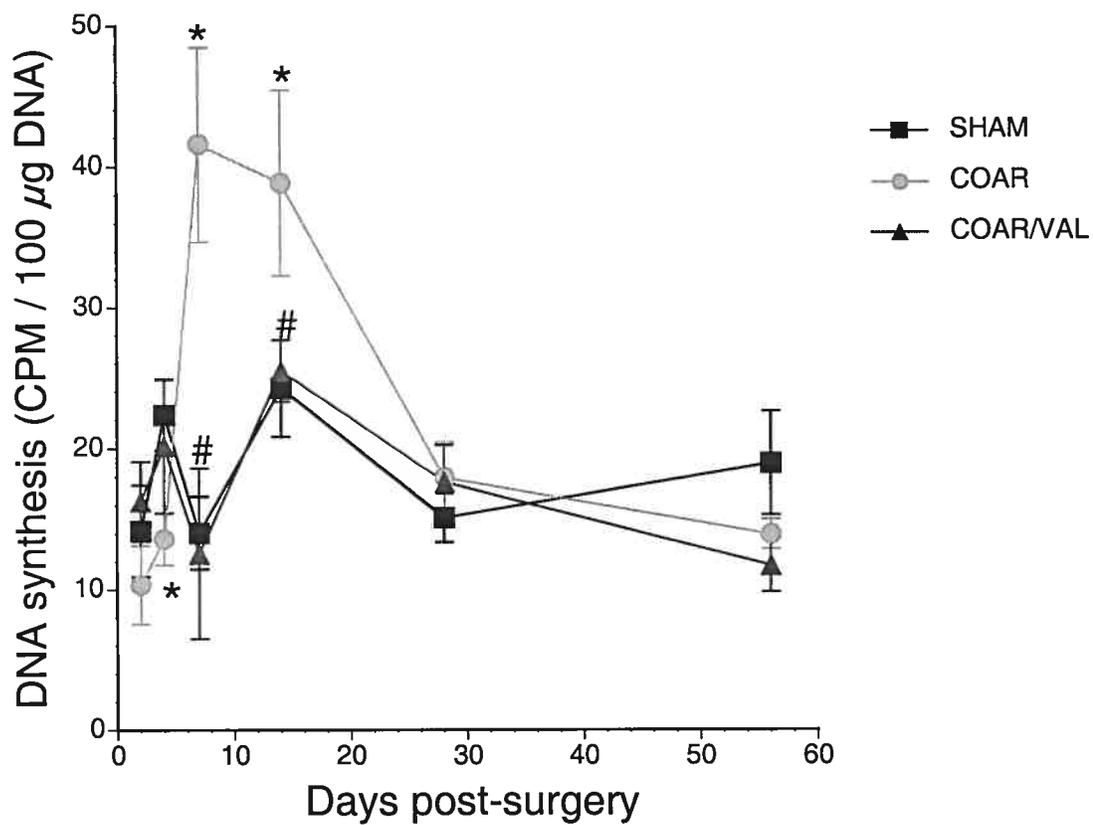


Figure 3. Effects of pressure overload produced by abdominal aortic banding with or without valsartan on DNA synthesis (CPM / 100 μg DNA). A, left ventricle. *P < 0.017 vs sham-operated rats; #P < 0.017 vs valsartan treated rats.

Figure 3B

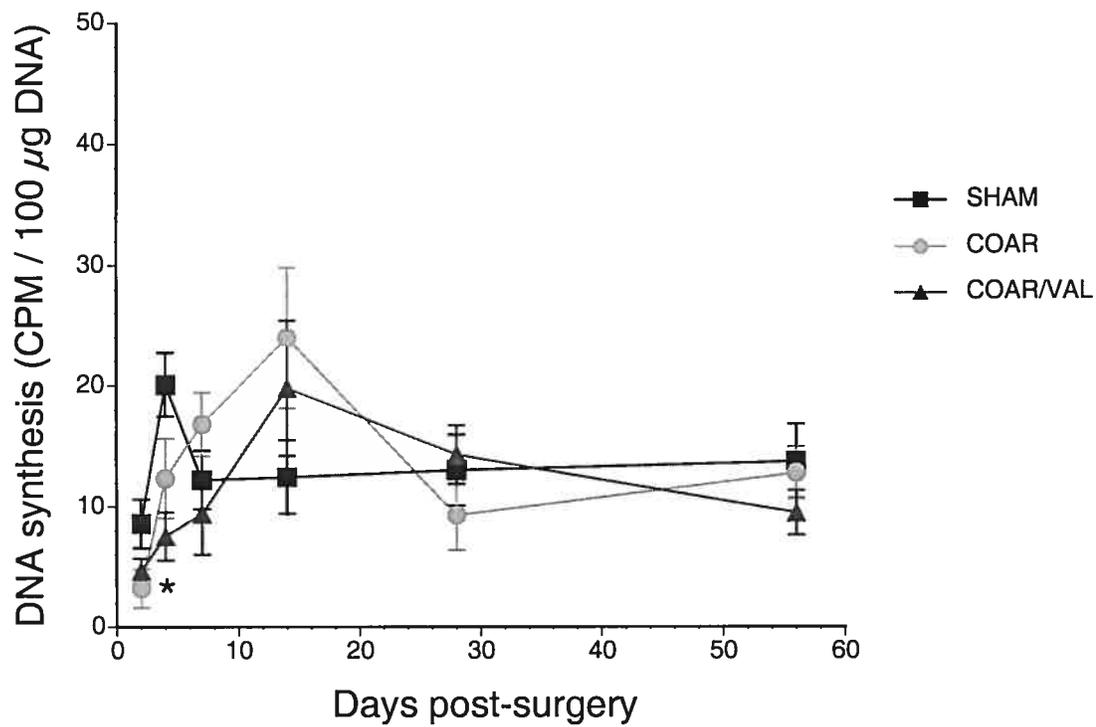


Figure 3. Effects of pressure overload produced by abdominal aortic banding with or without valsartan on DNA synthesis (CPM / 100 μg DNA). B, right ventricle. *P < 0.017 vs sham-operated rats; #P < 0.017 vs valsartan treated rats.

Figure 4

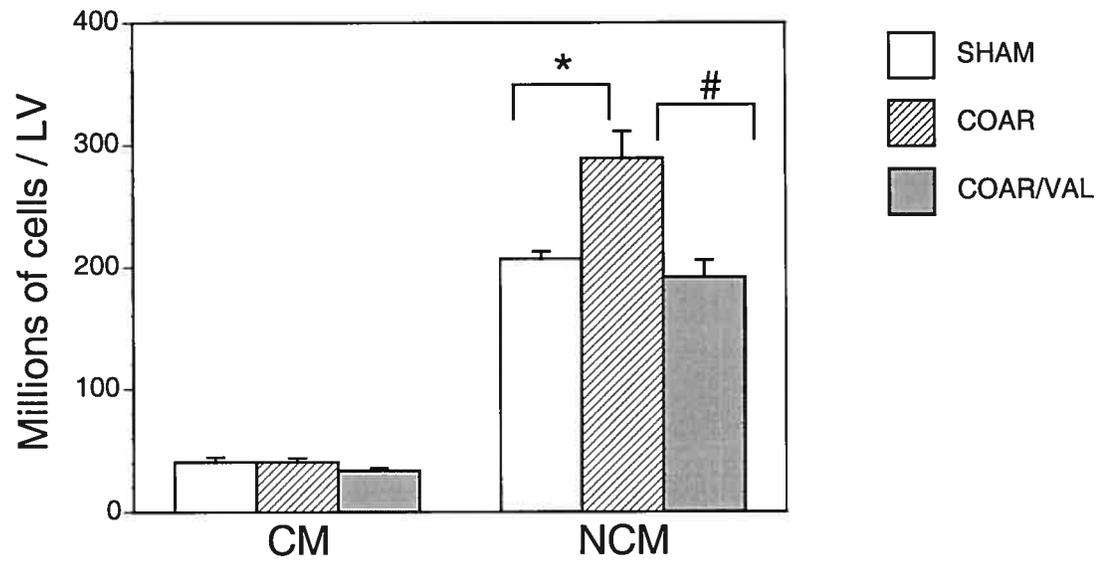


Figure 4. Effects of pressure overload produced by abdominal aortic banding with or without valsartan on total number of cardiomyocytes and non-cardiomyocytes in the left ventricle. * $P < 0.017$ vs sham-operated rats; # $P < 0.017$ vs valsartan treated rats.

TABLE 2

Effect of aortic constriction and valsartan treatment on DNA fragmentation labeled in situ and caspase-3 expression

Days post-surgery	DNA fragmentation		
	Sham (arbitrary units / pixel) n=6	Coarctation (arbitrary units / pixel) n=6	Coarctation + valsartan (arbitrary units / pixel) n=6
2	10.35 ± 2.03	9.80 ± 1.73	11.16 ± 1.69
4	11.92 ± 2.09	10.92 ± 2.44	9.04 ± 1.74
7	8.85 ± 1.74	11.92 ± 2.04	13.49 ± 3.09
14	11.40 ± 3.12	14.55 ± 3.15	13.72 ± 3.75
28	9.78 ± 1.79	12.53 ± 2.36	11.07 ± 1.3
Days post-surgery	Caspase-3 (20kDa/32kDa)		
	Sham n=6	Coarctation n=6	Coarctation + valsartan n=6
2	1.22 ± 0.17	1.42 ± 0.72	1.04 ± 0.34
4	1.70 ± 0.60	1.39 ± 0.18	1.22 ± 0.33
7	2.25 ± 0.61	1.12 ± 0.10	1.21 ± 0.32
14	1.43 ± 0.36	0.99 ± 0.17	0.86 ± 0.12
28	1.19 ± 0.19	1.17 ± 0.20	1.71 ± 0.98
56	1.35 ± 0.17	1.39 ± 0.31	1.56 ± 0.34

Values are means ± SEM.

TABLE 3

Effect of aortic coarctation and valsartan on cardiac morphometry

	Sham	Coarctation	Coarctation + valsartan
	n=5	n=10	n=6
#NCM/Area	1687 ± 23	1794 ± 31 *#	1587 ± 19*
Volume of the left ventricle (mm³)	953 ± 20	1286 ± 86 *#	1006 ± 47
Vol.CM/ventricle (μm²)	818 ± 15	1101 ± 69 *#	847 ± 47
CSA of cardiomyocytes (μm²)	349 ± 33	589 ± 33 *#	457 ± 26 *
Hydroxyproline content (μmole/left ventricle)	5.3 ± 1.0	11.6 ± 1.2 *#	6.5 ± 0.4
Capillary density (# of capillary/cardiomyocyte)	0.73 ± 0.04	0.79 ± 0.03	0.78 ± 0.01

Values are means ± SEM. #NCM: Number of non-cardiomyocytes. CSA: Cross sectional area. CM: Cardiomyocytes.

*P < 0.017 vs sham-operated rats; #P < 0.017 vs banded rats treated with valsartan.

3.1 METHODES ET RESULTATS SUPPLEMENTAIRES

Pour les besoins de notre publication, les résultats obtenus pour les aortes prélevées chez tous les animaux utilisés ne sont pas présentés dans cet article. Ils sont donc présentés dans cette section accompagnés d'une brève description des méthodes utilisées.

Lors des sacrifices des animaux à tous les temps étudiés, nous avons prélevé, pesé et mesuré les aortes thoraciques (supra-coarctation) ainsi que les aortes abdominales (infra-coarctation). Un anneau d'environ 3mm de chacun de ces tissus a été prélevé et fixé dans la paraformaldéhyde 4%, puis traité selon les procédures histologiques usuelles. Les aortes ont ensuite été coupées en 3 sections consécutives de 3 μ m d'épaisseur, puis colorées à l'hématoxyline afin de déterminer la masse vasculaire via une mesure de l'aire de section de la média tel que décrit précédemment¹¹⁵. Le nombre de CML par unité de longueur d'aorte a été évalué par la méthode du disecteur tridimensionnel aussi décrite dans cette publication.

Les mesures effectuées pour l'aire de section, nous révèlent que la masse des aortes thoraciques est augmentée à partir de la septième journée suivant la coarctation, et ce jusqu'à la 8e semaine (figure 5a) tant dans les groupes traités que ceux non traités. Toutefois, dans les aortes abdominales, aucune différence entre les groupes n'a pu être observée à tous les temps étudiés (figure 5b). Par le fait même, le ratio des masses aortiques supra/infra-coarctation se comporte de la même façon que les aortes thoraciques suite à la coarctation (figure 5c). De plus, le nombre de cellules dans les aortes thoraciques a été augmenté de 98% 8 semaines suite à la coarctation (figure 6). Le traitement au valsartan n'a pas permis d'empêcher cette hausse du nombre de CML.

Figure 5A

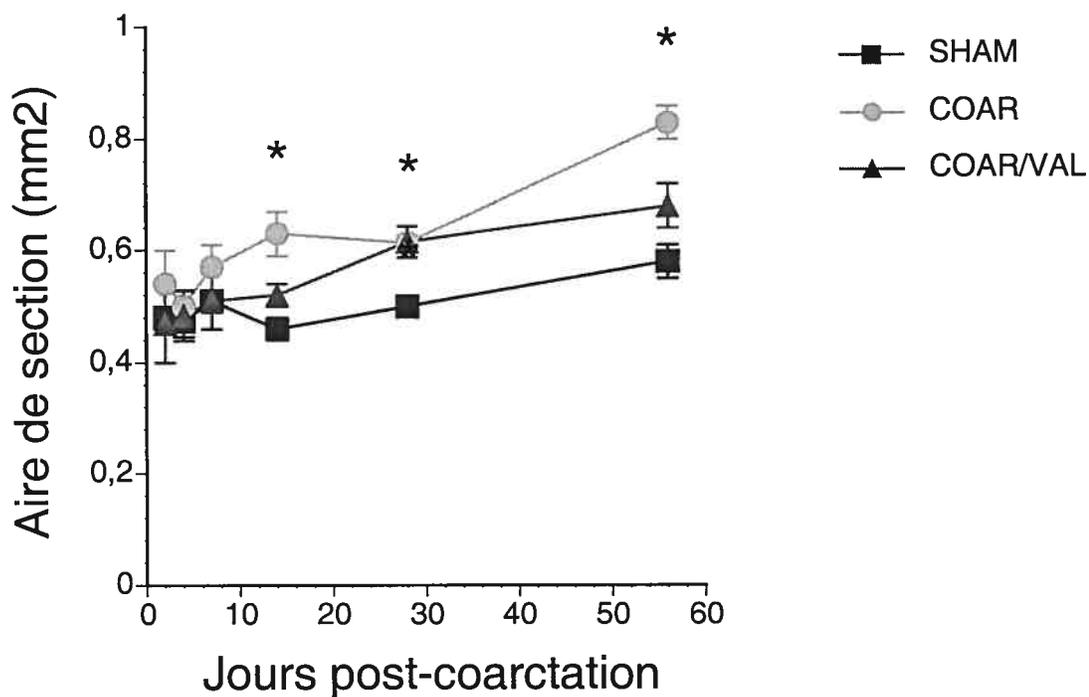


Figure 5A. Effets d'une surcharge pressive induite par une coarctation de l'aorte abdominale avec ou sans valsartan. A, Aires de section des aortes thoraciques (mm²). *P < 0.017 vs rats témoins, #P < 0.017 vs rats traités au valsartan.

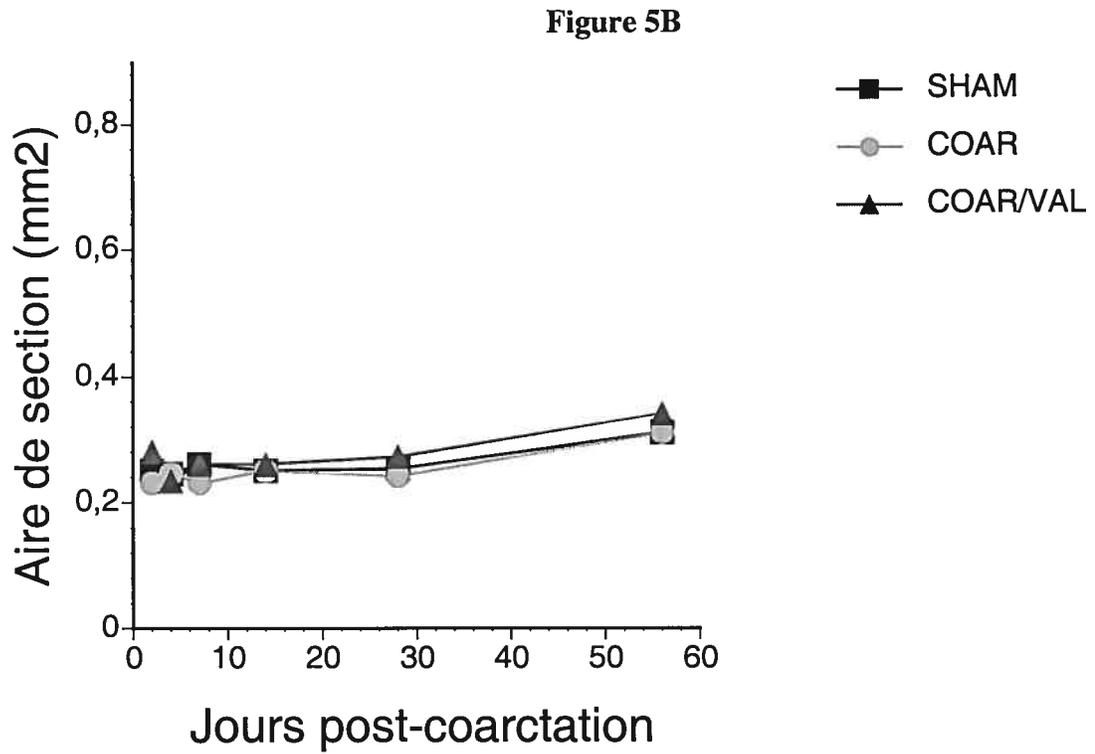


Figure 5B. Effets d'une surcharge pressive induite par une coarctation de l'aorte abdominale avec ou sans valsartan. B, Aires de section des aortes abdominales (mm²). *P < 0.017 vs rats témoins, #P < 0.017 vs rats traités au valsartan.

Figure 5C

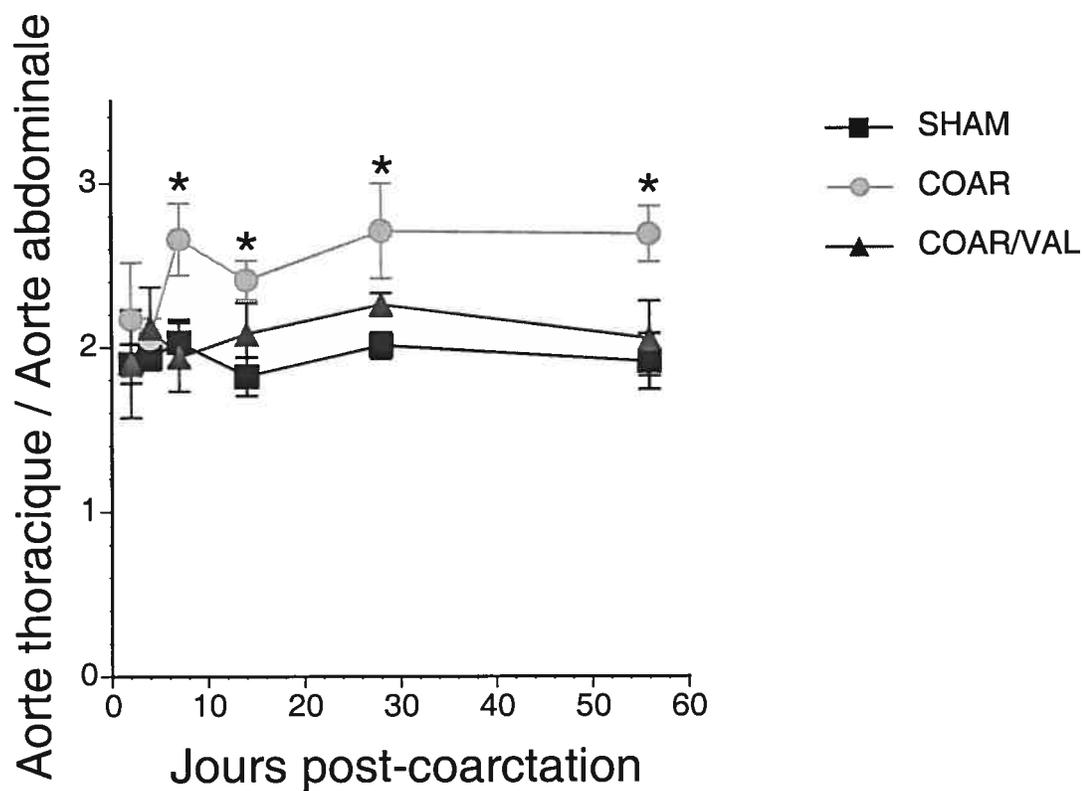


Figure 5C. Effets d'une surcharge pressive induite par une coarctation de l'aorte abdominale avec ou sans valsartan. C, Ratio des aires de section des aortes thoraciques / aires de section des aortes abdominales. *P < 0.017 vs rats témoins, #P < 0.017 vs rats traités au valsartan.

Figure 6

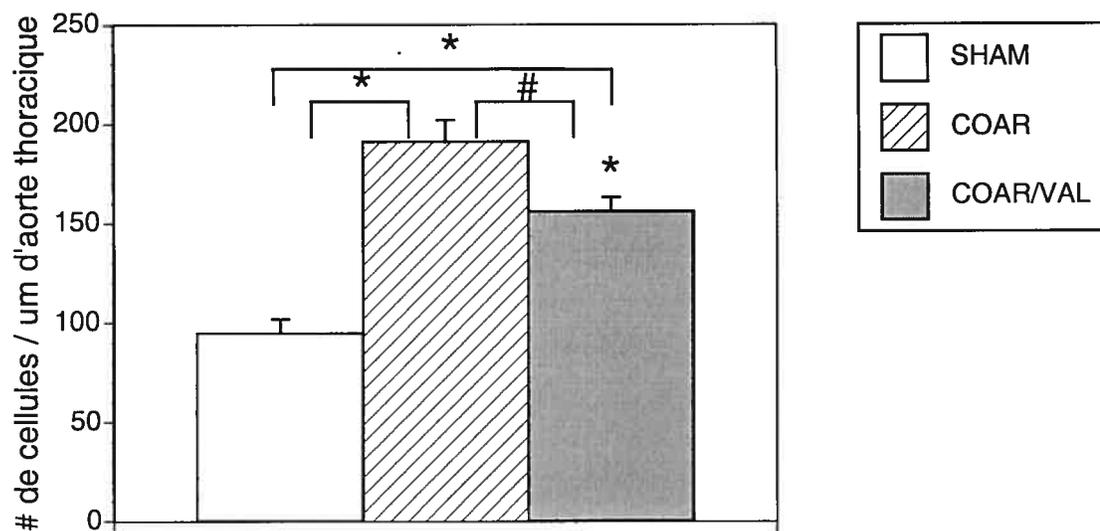


Figure 6. Effets d'une surcharge pressive induite par une coarctation de l'aorte abdominale avec ou sans valsartan. Nombre de cellules par micromètre d'aorte thoracique. *P < 0.017 vs rats témoins, #P < 0.017 vs rats traités au valsartan.

4. DISCUSSION

4.1 Nouvelles données

Les résultats présentés dans ce mémoire sont les premiers à faire état de la dynamique des changements rapides dans les différentes populations cellulaires cardiaques lors du développement de l'hypertrophie cardiaque induite par une surcharge pressive suite à une coarctation aortique abdominale. Bien que la coarctation provoque une augmentation significative de la masse ventriculaire, la tension sévère et soudaine sur le coeur ne mime pas exactement la suite des événements qui surviennent lors du développement de l'hypertrophie cardiaque chez l'homme suite à une hausse lente de la post-charge. Néanmoins, ce modèle s'avère d'une grande utilité, car l'HVG se développe sur une période de temps relativement courte comparativement au RSH chez qui le développement de l'HVG est déterminé génétiquement, permettant une analyse des mécanismes impliqués dans le développement de l'HVG. Ainsi, la séquence des événements impliqués lors du développement de l'HVG dans notre modèle semble être la suivante: l'HVG est visible après 7 jours de coarctation, au moment où la synthèse d'ADN commence à augmenter de façon substantielle dans le ventricule gauche. L'augmentation du contenu en ADN dans le ventricule gauche suite à la coarctation est significative 28 jours après l'imposition de la surcharge pressive, et se poursuit jusqu'à 56 jours, moment où le nombre de fibroblastes est fortement augmenté dans le ventricule gauche de ces animaux. Nous pouvons certainement affirmer que les fibroblastes sont les cellules responsables de cette hausse du nombre de non-cardiomyocytes observée à 56 jours, car la densité capillaire mesurée est similaire entre les groupes à cet instant, excluant ainsi l'hyperplasie des cellules endothéliales. De plus, le contenu en collagène est à la hausse dans le groupe avec coarctation, suggérant une synthèse accrue de collagène via un nombre de fibroblastes plus grand. Dans le présent modèle, aux différents temps sélectionnés pour cette étude, l'apoptose ne semble toutefois pas contribuer de façon importante au remodelage cardiaque menant à l'hypertrophie cardiaque qui a été observée. Ainsi, l'inhibition de l'HVG observée par l'utilisation de valsartan, semble se produire via un blocage total de l'hyperplasie des non-cardiomyocytes

combiné à une baisse de l'hypertrophie des cardiomyocytes et une synthèse de collagène à la baisse.

4.2 Comparaisons avec les données de la littérature

Dans le modèle utilisé, il semble que l'HVG observée soit grandement attribuable à l'hypertrophie des cardiomyocytes et à l'hyperplasie des fibroblastes, cette dernière suggérant une synthèse accrue de matrice extracellulaire, dont le collagène. L'accumulation d'un excès de collagène est considérée comme un processus pathophysiologique important qui contribue à la défaillance cardiaque diastolique. Les mécanismes précis responsables de l'accumulation d'un excès de collagène dans le coeur malade sont peu définis. La fibrose dans le coeur endommagé ou non indique que des mécanismes humoraux sont responsables de ce processus. Par exemple, dans la défaillance cardiaque, plusieurs systèmes humoraux, autocrine et paracrine sont activés, suggérant qu'un « cross-talk » entre les voies de signalisation synergiques ou opposées constitue la forme prédominante de régulation dans ces conditions¹¹⁶. Dans cette publication, on fait état de plusieurs études ayant permis de démontrer que l'Ang II stimule directement la prolifération des fibroblastes cardiaques et la synthèse de collagène via les récepteurs AT₁^{117 118 119}. De plus, il est mentionné qu'une étude *in vitro* a suggéré qu'une communication fibroblaste-myocyte est requise pour la régulation à la hausse du collagène par l'Ang II¹²⁰. Ces travaux et plusieurs autres, dont on fait mention dans l'article, suggèrent fortement que l'Ang II module indirectement la fonction des fibroblastes cardiaques via des facteurs de croissance spécifiques. Afin de mieux comprendre les phénomènes impliqués lors du développement de l'HVG dans notre modèle, un aperçu de quelques facteurs potentiellement responsables est présenté ci-après.

Tout d'abord, nos résultats suggèrent qu'outre les voies induites par l'Ang II, il existe des voies différentes possiblement impliquées dans le développement de l'hypertrophie cardiaque. Par exemple, il a été démontré que la surcharge pressive induite par une coarctation aortique abdominale provoque une activation transitoire du SRAA, coïncidant avec l'apparition de l'HVG, suivie d'une hausse marquée de la densité des récepteurs AT₁ dans le ventricule gauche, d'une augmentation généralisée

de l'activité du système nerveux sympathique, et d'une chute dans la réponse à un stimulus inotropique¹²¹. Les concentrations plasmatiques de norépinéphrine (NE) sont en outre augmentées de façon progressive suite à la coarctation¹²² et une augmentation de l'Ang II circulante induit une hausse de la concentration plasmatique de NE¹²³. De plus, il a été démontré que l'infusion chronique de doses sous-pressives de NE induit l'hypertrophie cardiaque chez des modèles animaux³⁹. Or, une étude plus récente a révélé que la NE active la voie ET-dépendante menant au développement de l'hypertrophie cardiaque¹²⁴, ce phénomène vient donc appuyer l'hypothèse impliquant l'ET-1 en tant que régulateur de la masse cardiaque dans notre modèle.

Afin de supporter cette affirmation, nous faisons référence à une étude où il a été précédemment démontré que l'endothéline-1 (ET-1) endogène synthétisée dans le système cardiovasculaire joue un rôle dans le mécanisme de l'hypertrophie cardiaque durant la phase précoce de surcharge pressive *in vivo*¹²⁵. En effet, ce groupe a montré que l'utilisation d'un antagoniste des récepteurs ETA (le BQ123) a permis de bloquer l'augmentation du ratio masse ventriculaire gauche/masse corporelle ainsi que la hausse du diamètre des cardiomyocytes induites par une semaine de bandage aortique, sans toutefois que ces actions soient encore observées après 2 semaines de bandage aortique. De plus, ces travaux ont indiqué que les niveaux d'ARNm de la pré-pro-ET-1 dans le ventricule gauche sont augmentés de façon transitoire de même que les niveaux plasmatiques d'ET-1 suite à la coarctation. Une autre équipe a démontré que les niveaux ventriculaires d'ET-1 sont augmentés après 8 jours de coarctation aortique abdominale tout comme l'HVG, alors que les niveaux plasmatiques sont augmentés de façon transitoire seulement 30 minutes après la coarctation¹²⁶. Ces divers travaux suggèrent que l'ET-1 cardiaque puisse agir comme un facteur « initiateur » de l'hypertrophie durant la phase précoce de surcharge pressive, alors que d'autres facteurs pourraient prendre la relève en tant que facteurs de « maintien » durant la phase avancée de surcharge pressive. Puisque les changements majeurs sont observables à partir du jour 7 suivant la coarctation dans notre modèle, un rôle pour l'ET-1 est possible. Ainsi, l'augmentation de la sécrétion d'ET-1 par les cardiomyocytes et les fibroblastes induite par la coarctation serait

peut-être empêchée par le valsartan. En effet, la présence du valsartan en inhibant l'Ang II, inhiberait possiblement l'activité sympathique, donc la NE et l'expression de l'ET.

Un autre facteur important à considérer dans notre modèle, est le rôle joué par l'aldostérone (Aldo) dans le remodelage cardiaque. Il a été précédemment démontré que lors d'une coarctation aortique abdominale supra-rénale, l'activation du SRAA systémique et cardiaque se produit de façon très précoce lors du développement de l'HVG¹²¹. Par la suite, la hausse initiale d'Ang II pourrait contribuer à la stimulation sympathique subséquente et au maintien ainsi qu'à la progression de l'HVG. Ainsi, dans notre modèle, nous pourrions envisager la séquence d'événements suivants en ce qui concerne la voie Ang II-dépendante: de la surcharge pressive induite par une coarctation résulte une hypoperfusion rénale, s'en suit donc une hausse de la sécrétion de la rénine, puis de l'Ang II et de l'Aldo. L'Aldo induit par la suite une augmentation de la densité des récepteurs AT₁ dans le coeur potentialisant les réponses cardiaques à l'Ang II. De plus, il a été suggéré que l'ET-1 puisse stimuler directement la sécrétion d'Aldo dans le cortex surrénalien¹²⁷ et comme il a été mentionné précédemment, la sécrétion d'ET-1 est à la hausse durant la phase précoce du développement de l'HVG, ce qui stimulerait davantage la sécrétion d'Aldo et amplifierait d'autant plus les réponses cardiaques à l'Ang II.

Nos résultats sont en accord avec ceux de l'équipe de Regan¹²⁸ qui a suggéré que l'HVG puisse être initiée par des facteurs autres que l'Ang II, possiblement par une induction de la réponse hypertrophique médiée par l'étirement, alors que l'Ang II joue un rôle critique dans le développement de l'épaississement de la paroi artérielle intramyocardique et la fibrose périovasculaire, et ce indépendamment de la pression artérielle. Cependant, dans cette étude, ils ont démontré qu'un traitement au losartan n'a eu aucun effet sur l'augmentation de la pression artérielle moyenne à proximité de la coarctation dans un modèle de surcharge pressive d'hypertrophie cardiaque et que le développement de l'HVG n'a pas été bloqué. Néanmoins, l'augmentation de la résistance coronarienne minimale et la fibrose cardiaque ont été atténués par leur traitement au losartan. Une étude similaire effectuée antérieurement par le même groupe avait permis de tirer les mêmes conclusions dans le même modèle animal

avec un traitement au captopril¹²⁹. De plus, il a été démontré que l'étirement des cardiomyocytes comme dans la surcharge pressive induit l'expression d'angiotensinogène et d'Ang II dans les cardiomyocytes¹³⁰ ce qui suggère que la source d'Ang II pourrait être les cardiomyocytes. Ainsi, l'inhibition de l'hyperplasie des non-cardiomyocytes observée dans notre modèle suite à un traitement au valsartan suggère effectivement que l'Ang II joue un rôle important dans le développement de la fibrose cardiaque observée après 56 jours de coarctation. De plus, l'évaluation du contenu en collagène dans les ventricules gauches à ce même moment confirme le rôle joué par le valsartan dans la prévention de la fibrose cardiaque dans le présent modèle. Le fait que le ventricule droit ne réponde pas à la coarctation suggère un rôle important des influences hémodynamiques dans notre modèle.

Suite à l'obstruction mécanique imposée à l'aorte abdominale, nous ne nous attendions pas à ce que notre traitement au valsartan empêche les effets engendrés par cette surcharge pressive sur les changements hémodynamiques aigus. À l'opposé, nous avons été surpris de constater que nos analyses microscopiques permettant d'évaluer l'aire de section de ce type cellulaire ont révélé que les cardiomyocytes des ventricules gauches des animaux traités au valsartan se sont révélés significativement hypertrophiés lorsqu'ils sont comparés au groupe témoin. Des résultats précédemment publiés par d'autres groupes nous ont toutefois fournis quelques explications. Tout d'abord, le groupe de Harada¹³¹ a suggéré que la signalisation médiée par les récepteurs AT_{1A} de l'Ang II n'est pas le seul facteur essentiel pour le développement de l'hypertrophie cardiaque induite par un stress mécanique. En effet, c'est en serrant l'aorte abdominale de souris knock-out pour le récepteur AT_{1A} de l'Ang II qu'ils ont pu démontrer que la surcharge hémodynamique est suffisante pour induire entièrement l'hypertrophie cardiaque chez ces souris. De plus, l'analyse microscopique a révélé une augmentation de l'aire de section des cardiomyocytes dans les 2 types de souris, indiquant que chaque cardiomyocyte augmente en taille suite à une surcharge pressive sans signalisation via le récepteur AT_1 . Contrairement au groupe de Regan qui a démontré une atténuation de la fibrose cardiaque par un blocage des récepteurs AT_1 ou de l'ECA, cette équipe a démontré que la surcharge

pressive induit une fibrose cardiaque malgré l'absence de signalisation via le récepteur AT₁. L'explication fournie pour cette observation était que certains facteurs humoraux qui activent les tyrosines kinases sont sécrétés en réponse à un stress mécanique. Bien que la prévention de l'hypertrophie cardiaque induite par surcharge pressive dans nos animaux adultes ne soit pas équivalente au modèle de surcharge pressive des souris déficientes en récepteurs AT₁, il ne semble néanmoins pas impossible que ce genre de phénomène se soit produit dans notre modèle lors du blocage des récepteurs AT₁ avec le valsartan.

Par ailleurs, une étude utilisant des souris déficientes génétiquement pour le récepteur AT₂ (Agtr2-/Y) a révélé une prévention de l'HVG résultant d'une surcharge pressive chez ces souris, alors que les fonctions de contractilité cardiaque sont demeurées normales¹³². Une légère hausse de l'aire de section des cardiomyocytes chez les souris sans AT₂ a été observée suite à la coarctation comparativement aux souris sans coarctation, ces aires de section étant toutefois nettement inférieures à celles mesurées chez les souris de type sauvage avec coarctation. Ces résultats suggèrent que le récepteur AT₂ joue un rôle majeur stimulant dans la régulation de l'HVG induite par surcharge pressive. De la même façon, l'équipe d'Akishita¹³³ a démontré que le bandage aortique chez le même modèle de souris a fait augmenter l'aire de section des cardiomyocytes de 15%, que le récepteur AT₂ soit exprimé ou non chez ces souris. Dans notre modèle, le blocage des récepteurs AT₁ par le valsartan a présument provoqué l'activation des récepteurs AT₂ par l'Ang II, ceux-ci ayant la voie libre pour médier leurs signaux menant à l'hypertrophie des cardiomyocytes et l'HVG via des mécanismes encore mal définis.

Bien que le niveau de récepteurs AT₂ dans le coeur soit faible dans les coeurs adultes, la distribution de ceux-ci est à la hausse au cours du développement de l'hypertrophie cardiaque^{134,135} et leur action est augmentée par un ARA. Il a été démontré que les souris transgéniques sur-exprimant le récepteur AT₂ de l'Ang II, ont une sensibilité amoindrie à l'action pressive médiée par l'Ang II sans effet sur la contractilité cardiaque et principalement dûe à l'effet inhibiteur du récepteur AT₂ sur l'effet chronotropique médié par le récepteur AT₁¹³⁶. Ce nouvel effet du récepteur AT₂ a été observé avec un niveau d'Ang II circulante ne stimulant pas la sécrétion de

catécholamines. Dans cette étude, les niveaux circulants d'Ang II qui ont provoqué des différences observées dans la pression sanguine et le rythme cardiaque entre les souris transgéniques et les souris de type sauvage étaient d'ordre physiologique. Ces données suggéraient qu'en conditions pathologiques, dans lesquelles la distribution relative des récepteurs AT_2 est à la hausse, ces effets médiés par AT_2 puissent jouer un rôle important dans le contrôle du système cardiovasculaire par l'Ang II. De plus, la surexpression des récepteurs AT_2 dans les CMLV aortiques a permis de bloquer les effets vasoconstricteurs et presseurs médiés par le récepteur AT_1 de façon dépendante de l'endothélium¹³⁷. Ces résultats suggéraient que la bradykinine soit libérée par les CMLV, via une stimulation des récepteurs AT_2 , pour agir de façon paracrine sur les récepteurs à la BK situés sur les cellules endothéliales et induire une vasodilatation dépendante de l'endothélium. La prévention partielle de l'HVG par le valsartan dans notre modèle pourrait refléter un effet cardioprotecteur des récepteurs AT_2 par des mécanismes qui demeurent cependant énigmatiques. Afin d'appuyer cette affirmation, mentionnons l'étude de Liu⁹⁸ où il a été proposé que dans la défaillance cardiaque le blocage des récepteurs AT_1 provoque l'augmentation de la rénine et d'angiotensine II qui activent les récepteurs AT_2 , lesquels peuvent jouer un rôle important dans les effets thérapeutiques des bloqueurs AT_1 via les kinines et autres autacoïdes.

Parmi les mécanismes qui peuvent médier l'HVG, nous avons mentionné plusieurs facteurs comme l'étirement, l'Ang II, l'ET-1, la stimulation sympathomimétique et les facteurs de croissance. Tous ces facteurs provoquent une augmentation des concentrations intracellulaires de calcium. La calcineurine est une phosphatase qui est activée par des concentrations élevées de calcium pour activer les gènes de l'hypertrophie¹³⁸. Plusieurs expériences ont impliqué un rôle majeur de la voie calcium-calmoduline-calcineurine-dépendante en tant que mécanisme final commun par lequel divers stimuli hypertrophiques convergent pour médier des réponses hypertrophiques dans les cardiomyocytes. Des inhibiteurs de la calcineurine comme la cyclosporine (CsA) et le FK506 peuvent interrompre cette voie et ainsi prévenir l'hypertrophie cardiaque. Par exemple, le groupe de Sussman a utilisé la coarctation aortique abdominale chez des rats pour démontrer qu'un traitement avec la CsA

prévient le développement de l'hypertrophie cardiaque après 6 jours de surcharge pressive¹³⁹. De la même façon, Shimoyama et son groupe a démontré que la calcineurine est activée par une surcharge pressive dans le coeur suite à une coarctation aortique abdominale de 3 semaines et que celle-ci joue un rôle critique dans le développement de l'hypertrophie cardiaque¹⁴⁰. Cependant, une étude similaire a révélé que l'hypertrophie cardiaque se développant suite à une surcharge pressive, sur une période de 2 à 4 semaines, peut se produire par des voies calcineurine-indépendantes¹⁴¹. Il est intrigant de spéculer que dans notre étude, le valsartan puisse être plus efficace sur les voies calcineurine dépendantes. En effet, le valsartan s'est révélé plus efficace contre le développement de l'HVG entre les jours 0 à 14 qu'entre les jours 28 à 56. Une autre équipe a démontré que la CsA peut atténuer, sans toutefois bloquer, l'HVG induite par surcharge pressive chez la souris¹⁴². Il a été suggéré que ces controverses soient dûes aux inhibiteurs de la calcineurine actuellement disponibles qui seraient des outils inadéquats pour tester l'hypothèse impliquant la voie calcineurine dépendante en tant que mécanisme final commun de divers stimuli hypertrophiques, puisque plusieurs effets confondants sont associés à l'administration systémique de ces inhibiteurs¹⁴³. Dans notre étude, le stimulus hypertrophique extrinsèque de surcharge pressive induit possiblement une hausse d'Ang II, ce qui a pour effet d'augmenter de façon soutenue le calcium cytosolique qui à son tour constitue un stimulus physiologique et/ou pathologique potentiel de la calcineurine. La calcineurine ainsi activée permettrait l'activation transcriptionnelle de gènes foetaux hypertrophiques menant à l'hypertrophie des cardiomyocytes observée dans notre modèle.

D'autre part, il a été démontré que l'ostéopontine peut agir comme une molécule d'adhésion, comme un facteur chimiotactique et comme un substrat pour la migration des macrophages, des CML et des cellules endothéliales¹⁴⁴. De plus, l'ostéopontine peut agir comme une cytokine pour stimuler la production d'immunoglobuline lymphocytaire. Ces actions sont en accord avec un rôle pour l'ostéopontine dans la fibrose ou la guérison en réponse à une agression. Il a d'ailleurs été proposé que l'ostéopontine médie les effets de l'Ang II sur la production de MEC dans le coeur chez l'humain¹⁴⁵. De même, il a été démontré que l'expression d'ARNm de

l'ostéopontine est fortement augmentée dans le développement de l'HVG et est en corrélation avec l'expression de l'ANF, un marqueur bien connu de l'hypertrophie cardiaque^{146,147}. Ashizawa a aussi suggéré que chez les animaux avec bandage aortique, les niveaux d'Ang II élevés puissent contribuer à la production cardiaque d'ostéopontine ou que l'hypertrophie chronique puisse être associée à la production d'ostéopontine. Cette équipe a aussi démontré que la prolifération des fibroblastes cardiaques en culture est complètement bloquée par des anticorps contre l'ostéopontine. Ainsi, il est possible que la production d'ostéopontine par les fibroblastes cardiaques soit reliée à la tension induite par l'Ang II sur les fibroblastes. Dans l'étude de Graf, il a été démontré que l'ET-1 et la NE augmentent les niveaux d'expression d'ARNm de l'ostéopontine dans les cardiomyocytes en culture, alors que l'Ang II les augmente très peu. Puisque la sécrétion d'ET-1 est à la hausse dans l'HVG¹²⁶, il est possible que l'ET-1 contribue à l'expression accrue de l'ostéopontine dans l'HVG observée dans notre modèle.

Outre les divers facteurs pouvant être impliqués dans le développement de l'HVG dans notre modèle, les espèces réactives de l'oxygène (ERO) sont considérées comme d'importantes molécules dans la fonction cardiovasculaire. En effet, il a été démontré que l'hypertrophie des CMLV induite par l'Ang II est médiée par une production intracellulaire de H₂O₂ dérivé, du moins en partie, de la NAD(P)H oxydase associée à la membrane^{148 149 150}. Des résultats similaires ont été démontrés dans les cardiomyocytes, dans lesquels l'hypertrophie induite par l'Ang II est associée à une relâche intracellulaire d'ERO et qu'un antioxydant peut bloquer ces événements¹⁵¹. De plus, il a été démontré tout récemment que dans l'HVG induite par surcharge pressive une activation progressive de la NADPH oxydase est observée, suggérant que ce système enzymatique puisse jouer un rôle dans la pathophysiologie cardiaque¹⁵². Il a par ailleurs été démontré que dans un modèle d'hypertension induite par coarctation abdominale, une hausse de la production de l'anion superoxyde est observée après 2 semaines et une augmentation importante de la protéine eNOS et de l'expression d'ARNm couplées à une relaxation endothélium-dépendante altérée après 6 semaines de bandage aortique¹⁵³. Il semble donc que dans notre modèle les EROs puissent avoir

contribué au développement de l'HVG. Le rôle de l'AngII dans ces phénomènes reste cependant à déterminer.

4.3 L'aorte dans notre modèle

Dans un modèle de surcharge pressive comme la coarctation aortique abdominale, la paroi de l'aorte thoracique des animaux est exposée à une tension accrue, laquelle est « ressentie » principalement par les CMLV de la média. La réponse des CMLV peut différer selon le modèle utilisé, l'âge des animaux utilisés, le degré de coarctation induite, le site de la coarctation. Par exemple, il a été démontré qu'une prolifération des CML se produit suite à une coarctation aortique abdominale suprarénale chez le lapin¹⁵⁴ ou interrénale chez le rat⁴⁶. Par ailleurs, une autre étude a révélé que suite à une coarctation aortique abdominale suprarénale une hypertrophie des CML se produit¹⁵⁵. Ainsi, dans notre modèle, où la pression sanguine est à la hausse, on pouvait s'attendre à une réponse adaptée de la paroi aortique menant à l'hypertrophie de celle-ci et à la normalisation du stress sur la paroi. Les valeurs présentées pour les masses aortiques thoraciques nous démontrent bien l'hypertrophie de cette section de l'aorte et le décompte cellulaire effectué 8 semaines suite à la coarctation nous permet d'affirmer que l'hyperplasie des CMLV contribue à l'élévation de la masse aortique observée. Nous pouvons certainement attribuer cette hypertrophie de l'aorte thoracique à la surcharge pressive appliquée sur cette portion de l'aorte (supra-coarctation), car aucune hypertrophie de l'aorte abdominale (infra-coarctation) n'a été observée bien que celle-ci ait été exposée au même milieu humoral. Un traitement au valsartan n'a permis de prévenir cette hypertrophie de l'aorte thoracique qu'après 8 semaines de coarctation (non signif. à 14j), ce qui nous laisse supposer que l'Ang II puisse contribuer à une réponse menant aux changements pathologiques de la paroi artérielle qui occasionnent la progression des processus vasculaires secondaires. Par ailleurs, la pression pulsée est associée aux propriétés visco-élastiques de la paroi artérielle et la fréquence des ondes de réflexions de la systole. Ainsi, en diminuant la hausse de la pression pulsée, le valsartan a possiblement contribué à améliorer le remodelage de l'aorte thoracique, la rendant moins rigide et contribuant à l'atténuation de l'HVG dans nos animaux traités.

4.4 Perspectives d'avenir

Comme nous venons de le voir, plusieurs avenues intéressantes se présentent à nous afin d'explorer plus à fond les mécanismes impliqués lors du développement de l'hypertrophie cardiaque. Il serait donc d'un grand intérêt de combiner différents inhibiteurs afin de mieux cibler les voies de signalisations mises en oeuvre lors du développement de l'HVG dans notre modèle et ce, à différents temps. Par exemple, un traitement combiné utilisant un ARA et un bloqueur des récepteurs à l'ET-1 nous permettrait d'évaluer le rôle joué par l'ET-1 dans l'effet des ARAs. De la même façon, une combinaison d'un ARA avec un antagoniste des récepteurs β -adrénergiques nous permettrait d'attribuer un rôle ou non à la NE dans notre modèle. De même, l'utilisation des antagonistes de l'aldostérone, de la calcineurine, de la bradykinine, des récepteurs AT_2 de l'Ang II ou d'un anti-oxydant pourrait s'avérer des expériences assez révélatrices quant aux médiateurs de l'HVG dans notre modèle. De plus, il pourrait s'avérer utile de mesurer les niveaux plasmatiques et tissulaires des divers facteurs possiblement impliqués dans le développement de l'HVG dans notre modèle comme la rénine, l'ECA, l'Ang II, l'aldo, la bradykinine, l'ET-1, ainsi que les niveaux d'expression des récepteurs correspondants AT_1 et AT_2 pour l'Ang II, les récepteurs minéralocorticoïdes pour l'aldo, ETA pour l'ET-1 et B2 pour la bradykinine. De plus, les effets de ces différentes combinaisons d'antagonistes dans notre modèle de surcharge pressive sur les niveaux d'expression d'ARNm de la MEC comme la fibronectine, le collagène de type 1 et de type 3 pourraient être mesurés, ainsi que les niveaux d'expression de gènes régulateurs de la fonction cardiaque comme le réticulum sarcoplasmique, la β -MHC, l' α -actine squelettique, la Ca^{2+} -ATPase, de même que ceux des gènes régulateurs de la croissance et de la survie des cellules cardiaques comme la p53, *c-myc*, Fas, Bax, Bcl-2, TGF- β et IGF-I. Bien que quelques mesures hémodynamiques aient été prises dans notre étude, il serait également intéressant de mieux connaître l'effet de ces divers traitements sur les fonctions cardiaques au cours du développement de l'HVG: travail cardiaque, ΔLV dP/dt_{max} , Δt dP/dt_{min} , la circulation sanguine et la résistance pourraient être mesurés..

Par la suite, il serait intéressant de prolonger l'expérience jusqu'à l'apparition d'une HVG décompensée, puis jusqu'à la défaillance cardiaque. Dans une telle étude, toutes les mesures précédemment mentionnées pourraient être effectuées à nouveau. Il nous est permis de croire que dans cette partie de l'expérience l'apoptose jouerait un rôle important. Ainsi, l'étude des mécanismes moléculaires de l'apoptose pourraient être d'une grande importance à ce stade-ci.

De plus, il pourrait s'avérer intéressant de répéter ces expériences dans un modèle de coarctation aortique thoracique lequel semble plus associé à l'apoptose des cardiomyocytes.

Enfin, une étude de régression pourrait être envisagée à la lumière des résultats obtenus lors des études de préventions préalablement effectuées. Le but de cette étude serait de mieux définir les mécanismes impliqués dans la régression de l'hypertrophie cardiaque par l'utilisation d'un antagoniste des récepteurs AT_1 de l'Ang II, le valsartan, ce qui contribuerait grandement à améliorer les thérapies anti-hypertensives présentement disponibles. Suite à la présente étude, nous savons que le valsartan empêche le développement de l'hyperplasie des fibroblastes suite à une surcharge pressive via l'inhibition de la prolifération. Alors que des études de régression chez le RSH avec le valsartan ont permis de démontrer un renversement de l'hyperplasie des fibroblastes via une hausse de l'apoptose. Au cours de cette étude, des rats normotendus Sprague-Dawley subiraient une coarctation de l'aorte abdominale qui permettrait le développement de l'HVG. Un traitement au valsartan serait ensuite administré afin de comparer les mécanismes de régression dans ce modèle à ceux déjà connus chez le RSH.

4.5 Impacts cliniques

Les résultats présentés dans cette étude s'avèrent d'une grande utilité en ce qui concerne la prévention de maladie cardiovasculaire. La nouvelle génération d'antihypertenseurs se doit d'être efficace non seulement pour réduire la pression sanguine, mais aussi pour offrir une protection contre les effets locaux de la pression sanguine élevée et le remodelage structural des vaisseaux sanguins. Les résultats de notre étude suggèrent que le valsartan pourrait s'avérer être une alternative

intéressante ou un complément aux IECAs dans le traitement de l'hypertension, surtout chez les patients intolérants aux IECAs.

4.6 Conclusion

Les résultats présentés dans ce mémoire sont les premiers à faire état des altérations dans les populations cellulaires cardiaques et les paramètres hémodynamiques en réponse à une surcharge pressive induite par une coarctation de l'aorte abdominale chez le rat et leur modulation par l'antagoniste des récepteurs AT_1 de l'Ang II le valsartan. Ces résultats démontrent que lors du développement de l'HVG suite à une coarctation aortique abdominale, le valsartan prévient entièrement l'hyperplasie des fibroblastes sans toutefois prévenir totalement l'hypertrophie des cardiomyocytes. Ce traitement au valsartan a aussi permis de réduire la hausse de pression sanguine et de pression pulsée observée suite à la coarctation. Ces effets se sont produits via une prévention totale de l'hyperplasie des fibroblastes ayant pour résultat une fibrose ventriculaire réduite, de même que par une hypertrophie des cardiomyocytes diminuée. Le récepteur AT_1 de l'Ang II semble donc jouer un rôle important dans le développement de la fibrose cardiaque dans notre modèle de surcharge pressive. D'autre part, ces données nous indiquent aussi que d'autres facteurs que l'Ang II semblent être impliqués lors du développement de l'HVG dans ce modèle. L'élucidation des mécanismes impliqués s'avèrent donc importante afin d'améliorer les traitements présentement disponibles en clinique.

5. BIBLIOGRAPHIE

1. Minino AM, Smith BL. Deaths: preliminary data for 2000. *Natl Vital Stat Rep.* 2001;49:1-40.
2. The Burden of Chronic Diseases and Their Risk Factors: National and State Perspectives. In. Atlanta: Centers for Disease Control and Prevention; National Center for Chronic Disease Prevention and Health Promotion; 2002:1-208.
3. Devereux RB. Importance of left ventricular mass as a predictor of cardiovascular morbidity in hypertension. *Am J Hypertens.* 1989;2:650-4.
4. MacMahon S, Collins G, Rautaharju P, Cutler J, Neaton J, Prineas R, Crow R, Stamler J. Electrocardiographic left ventricular hypertrophy and effects of antihypertensive drug therapy in hypertensive participants in the Multiple Risk Factor Intervention Trial. *Am J Cardiol.* 1989;63:202-10.
5. Cooper RS, Simmons BE, Castaner A, Santhanam V, Ghali J, Mar M. Left ventricular hypertrophy is associated with worse survival independent of ventricular function and number of coronary arteries severely narrowed. *Am J Cardiol.* 1990;65:441-5.
6. Dunn FG, McLenachan J, Isles CG, Brown I, Dargie HJ, Lever AF, Lorimer AR, Murray GD, Pringle SD, Robertson JW. Left ventricular hypertrophy and mortality in hypertension: an analysis of data from the Glasgow Blood Pressure Clinic. *J Hypertens.* 1990;8:775-82.
7. Koren MJ, Devereux RB, Casale PN, Savage DD, Laragh JH. Relation of left ventricular mass and geometry to morbidity and mortality in uncomplicated essential hypertension. *Ann Intern Med.* 1991;114:345-52.
8. Levy D, Garrison RJ, Savage DD, Kannel WB, Castelli WP. Prognostic implications of echocardiographically determined left ventricular mass in the Framingham Heart Study. *N Engl J Med.* 1990;322:1561-6.
9. Lee HR, Henderson SA, Reynolds R, Dunmon P, Yuan D, Chien KR. Alpha 1-adrenergic stimulation of cardiac gene transcription in neonatal rat

- myocardial cells. Effects on myosin light chain-2 gene expression. *J Biol Chem.* 1988;263:7352-8.
10. Izumo S, Lompre AM, Matsuoka R, Koren G, Schwartz K, Nadal-Ginard B, Mahdavi V. Myosin heavy chain messenger RNA and protein isoform transitions during cardiac hypertrophy. Interaction between hemodynamic and thyroid hormone-induced signals. *J Clin Invest.* 1987;79:970-7.
 11. Schwartz K, de la Bastie D, Bouveret P, Oliviero P, Alonso S, Buckingham M. Alpha-skeletal muscle actin mRNA's accumulate in hypertrophied adult rat hearts. *Circ Res.* 1986;59:551-5.
 12. Izumo S, Nadal-Ginard B, Mahdavi V. Protooncogene induction and reprogramming of cardiac gene expression produced by pressure overload. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1988;85:339-43.
 13. Long CS, Ordahl CP, Simpson PC. Alpha 1-adrenergic receptor stimulation of sarcomeric actin isogene transcription in hypertrophy of cultured rat heart muscle cells. *J Clin Invest.* 1989;83:1078-82.
 14. Knowlton KU, Baracchini E, Ross RS, Harris AN, Henderson SA, Evans SM, Glembotski CC, Chien KR. Co-regulation of the atrial natriuretic factor and cardiac myosin light chain-2 genes during alpha-adrenergic stimulation of neonatal rat ventricular cells. Identification of cis sequences within an embryonic and a constitutive contractile protein gene which mediate inducible expression. *J Biol Chem.* 1991;266:7759-68.
 15. Meerson F. *The Failing Heart: Adaptations and Maladaptations.* : New York, Raven; 1983.
 16. Clubb FJ, Jr., Bishop SP. Formation of binucleated myocardial cells in the neonatal rat. An index for growth hypertrophy. *Lab Invest.* 1984;50:571-7.
 17. Hunter JJ, Chien KR. Signaling pathways for cardiac hypertrophy and failure. *N Engl J Med.* 1999;341:1276-83.
 18. Julius S, Krause L, Schork NJ, Mejia AD, Jones KA, van de Ven C, Johnson EH, Sekkarie MA, Kjeldsen SE, Petrin J, et al. Hyperkinetic borderline hypertension in Tecumseh, Michigan. *J Hypertens.* 1991;9:77-84.

19. Hamet P, Tremblay J, Pang SC, Walter SV, Wen YI. Primary versus secondary events in hypertension. *Can J Physiol Pharmacol*. 1985;63:380-6.
20. Korner PI, Bobik A, Angus JJ. Are cardiac and vascular "amplifiers" both necessary for the development of hypertension? *Kidney Int Suppl*. 1992;37:S38-44.
21. Sugden PH, Clerk A. Cellular mechanisms of cardiac hypertrophy. *J Mol Med*. 1998;76:725-46.
22. Weber KT, Brilla CG. Pathological hypertrophy and cardiac interstitium. Fibrosis and renin-angiotensin-aldosterone system. *Circulation*. 1991;83:1849-65.
23. Pang SC, Long C, Poirier M, Tremblay J, Kunes J, Vincent M, Sassard J, Duzzi L, Bianchi G, Ledingham J, Phelan EL, Simpson FO, Ikeda K, Yamori Y, Hamet P. Cardiac and renal hyperplasia in newborn genetically hypertensive rats. *J Hypertens*. 1986;4 (Suppl. 3):S119-S122.
24. Walter SV, Hamet P. Enhanced DNA synthesis in heart and kidney of newborn spontaneously hypertensive rats. *Hypertension*. 1986;8:520-525.
25. Moreau P, Tea BS, Dam TV, Hamet P. Altered balance between cell replication and apoptosis in hearts and kidneys of newborn SHR. *Hypertension*. 1997;30:720-724.
26. Hurst. *The Heart*. 9th ed: McGraw-Hill; 1998.
27. Calderone A, Takahashi N, Izzo NJ, Jr., Thaik CM, Colucci WS. Pressure- and volume-induced left ventricular hypertrophies are associated with distinct myocyte phenotypes and differential induction of peptide growth factor mRNAs. *Circulation*. 1995;92:2385-2390.
28. Arai M, Matsui H, Periasamy M. Sarcoplasmic reticulum gene expression in cardiac hypertrophy and heart failure. *Circ Res*. 1994;74:555-64.
29. Hamet P, Richard L, Dam T-V, Teiger E, Orlov SN, Gaboury L, Gossard F, Tremblay J. Apoptosis in target organs of hypertension. *Hypertension*. 1995;26:642-648.
30. Schnee JM, Hsueh WA. Angiotensin II, adhesion, and cardiac fibrosis. *Cardiovasc Res*. 2000;46:264-8.

31. Sabbah HN, Sharov VG, Lesch M, Goldstein S. Progression of heart failure: a role for interstitial fibrosis. *Mol Cell Biochem.* 1995;147:29-34.
32. Baker KM, Aceto JF. Angiotensin II stimulation of protein synthesis and cell growth in chick heart cells. *Am J Physiol.* 1990;259:H610-8.
33. Weber KT, Sun Y, Tyagi SC, Cleutjens JP. Collagen network of the myocardium: function, structural remodeling and regulatory mechanisms. *J Mol Cell Cardiol.* 1994;26:279-92.
34. Farhadian F, Barrieux A, Lortet S, Marotte F, Oliviero P, Rappaport L, Samuel JL. Differential splicing of fibronectin pre-messenger ribonucleic acid during cardiac ontogeny and development of hypertrophy in the rat. *Lab Invest.* 1994;71:552-9.
35. Garg R, Yusuf S. Overview of randomized trials of angiotensin-converting enzyme inhibitors on mortality and morbidity in patients with heart failure. Collaborative Group on ACE Inhibitor Trials. *Jama.* 1995;273:1450-6.
36. Lijnen P, Petrov V. Antagonism of the renin-angiotensin-aldosterone system and collagen metabolism in cardiac fibroblasts. *Methods Find Exp Clin Pharmacol.* 1999;21:215-27.
37. Laks MM, Morady F, Swan HJ. Myocardial hypertrophy produced by chronic infusion of subhypertensive doses of norepinephrine in the dog. *Chest.* 1973;64:75-8.
38. King BD, Sack D, Kichuk MR, Hintze TH. Absence of hypertension despite chronic marked elevations in plasma norepinephrine in conscious dogs. *Hypertension.* 1987;9:582-90.
39. Zierhut W, Zimmer HG. Significance of myocardial alpha- and beta-adrenoceptors in catecholamine-induced cardiac hypertrophy. *Circ Res.* 1989;65:1417-25.
40. Ferguson AV, Bains JS. Actions of angiotensin in the subfornical organ and area postrema: implications for long term control of autonomic output. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 1997;24:96-101.

41. Dendorfer A, Thornagel A, Raasch W, Grisk O, Tempel K, Dominiak P. Angiotensin II induces catecholamine release by direct ganglionic excitation. *Hypertension*. 2002;40:348-54.
42. Hadrava V, Kruppa U, Russo RC, Lacourciere Y, Tremblay J, Hamet P. Vascular smooth muscle cell proliferation and its therapeutic modulation in hypertension. *Am Heart J*. 1991;122:1198-1203.
43. Gordon D, Reidy MA, Benditt EP, Schwartz SM. Cell proliferation in human coronary arteries. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1990;87:4600-4604.
44. Owens GK, Schwartz SM. Alterations in vascular smooth muscle mass in the spontaneously hypertensive rat. Role in cellular hypertrophy, hyperploidy, and hyperplasia. *Circ Res*. 1982;51:280-289.
45. Owens GK, Schwartz SM. Vascular smooth muscle cell hypertrophy and hyperploidy in the Goldblatt hypertensive rat. *Circ Res*. 1983;53:491-501.
46. Owens GK, Reidy MA. Hyperplastic growth response of vascular smooth muscle cells following induction of acute hypertension in rats by aortic coarctation. *Circ Res*. 1985;57:695-705.
47. Schwartz SM, Campbell GR, Campbell JH. Replication of smooth muscle cells in vascular disease. *Circ Res*. 1986;58:427-444.
48. Dzau VJ. Vascular renin-angiotensin system and vascular protection. *J Cardiovasc Pharmacol*. 1993;22:S1-9.
49. Baker KM, Booz GW, Dostal DE. Cardiac actions of angiotensin II: Role of an intracardiac renin-angiotensin system. *Annu Rev Physiol*. 1992;54:227-41.
50. Dostal DE, Rothblum KN, Chernin MI, Cooper GR, Baker KM. Intracardiac detection of angiotensinogen and renin: a localized renin-angiotensin system in neonatal rat heart. *Am J Physiol*. 1992;263:C838-50.
51. Dzau VJ, Sasamura H, Hein L. Heterogeneity of angiotensin synthetic pathways and receptor subtypes: physiological and pharmacological implications. *J Hypertens Suppl*. 1993;11:S13-8.
52. Wolny A, Clozel JP, Rein J, Mory P, Vogt P, Turino M, Kiowski W, Fischli W. Functional and biochemical analysis of angiotensin II-forming pathways in the human heart. *Circ Res*. 1997;80:219-27.

53. Wei CC, Meng QC, Palmer R, Hageman GR, Durand J, Bradley WE, Farrell DM, Hankes GH, Oparil S, Dell'Italia LJ. Evidence for angiotensin-converting enzyme- and chymase-mediated angiotensin II formation in the interstitial fluid space of the dog heart in vivo. *Circulation*. 1999;99:2583-9.
54. Urata H, Hoffmann S, Ganten D. Tissue angiotensin II system in the human heart. *Eur Heart J*. 1994;15 Suppl D:68-78.
55. Timmermans PB, Wong PC, Chiu AT, Herblin WF, Benfield P, Carini DJ, Lee RJ, Wexler RR, Saye JA, Smith RD. Angiotensin II receptors and angiotensin II receptor antagonists. *Pharmacol Rev*. 1993;45:205-51.
56. Timmermans PB, Benfield P, Chiu AT, Herblin WF, Wong PC, Smith RD. Angiotensin II receptors and functional correlates. *Am J Hypertens*. 1992;5:221S-235S.
57. Horiuchi M. Functional aspects of angiotensin type 2 receptor. *Adv Exp Med Biol*. 1996;396:217-24.
58. Csikos T, Chung O, Unger T. Receptors and their classification: focus on angiotensin II and the AT2 receptor. *J Hum Hypertens*. 1998;12:311-8.
59. Rump LC, Schwertfeger E, Schaible U, Fraedrich G, Schollmeyer P. Beta 2-adrenergic receptor and angiotensin II receptor modulation of sympathetic neurotransmission in human atria. *Circ Res*. 1994;74:434-40.
60. Zimmerman JB, Robertson D, Jackson EK. Angiotensin II-noradrenergic interactions in renovascular hypertensive rats. *J Clin Invest*. 1987;80:443-57.
61. Dostal DE, Booz GW, Baker KM. Angiotensin II signalling pathways in cardiac fibroblasts: conventional versus novel mechanisms in mediating cardiac growth and function. [Review] [66 refs]. *Molecular & Cellular Biochemistry*. 1996;157:15-21.
62. Schorb W, Booz GW, Dostal DE, Conrad KM, Chang KC, Baker KM. Angiotensin II is mitogenic in neonatal rat cardiac fibroblasts. *Circ Res*. 1993;72:1245-54.
63. Dzau VJ, Gibbons GH. Autocrine-paracrine mechanisms of vascular myocytes in systemic hypertension. *Am J Cardiol*. 1987;60:99I-103I.

64. Weber KT, Sun Y, Campbell SE. Structural remodelling of the heart by fibrous tissue: role of circulating hormones and locally produced peptides. *Eur Heart J*. 1995;16 Suppl N:12-8.
65. Swedberg K, Eneroth P, Kjeksus J, Wilhelmsen L. Hormones regulating cardiovascular function in patients with severe congestive heart failure and their relation to mortality. CONSENSUS Trial Study Group. *Circulation*. 1990;82:1730-6.
66. Rossi GP, Sacchetto A, Pavan E, Palatini P, Graniero GR, Canali C, Pessina AC. Remodeling of the left ventricle in primary aldosteronism due to Conn's adenoma. *Circulation*. 1997;95:1471-8.
67. Silvestre JS, Robert V, Heymes C, Aupetit-Faisant B, Mouas C, Moalic JM, Swynghedauw B, Delcayre C. Myocardial production of aldosterone and corticosterone in the rat. Physiological regulation. *J Biol Chem*. 1998;273:4883-91.
68. Lombes M, Alfaidy N, Eugene E, Lessana A, Farman N, Bonvalet JP. Prerequisite for cardiac aldosterone action. Mineralocorticoid receptor and 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase in the human heart. *Circulation*. 1995;92:175-82.
69. Brilla CG, Pick R, Tan LB, Janicki JS, Weber KT. Remodeling of the rat right and left ventricles in experimental hypertension. *Circ Res*. 1990;67:1355-64.
70. Brilla CG, Matsubara LS, Weber KT. Anti-aldosterone treatment and the prevention of myocardial fibrosis in primary and secondary hyperaldosteronism. *J Mol Cell Cardiol*. 1993;25:563-75.
71. Delcayre C, Silvestre JS. Aldosterone and the heart: towards a physiological function? *Cardiovasc Res*. 1999;43:7-12.
72. Robert V, Van Thiem N, Cheav SL, Mouas C, Swynghedauw B, Delcayre C. Increased cardiac types I and III collagen mRNAs in aldosterone-salt hypertension. *Hypertension*. 1994;24:30-6.
73. Young M, Fullerton M, Dilley R, Funder J. Mineralocorticoids, hypertension, and cardiac fibrosis. *J Clin Invest*. 1994;93:2578-83.

74. Robert V, Heymes C, Silvestre JS, Sabri A, Swynghedauw B, Delcayre C. Angiotensin AT1 receptor subtype as a cardiac target of aldosterone: role in aldosterone-salt-induced fibrosis. *Hypertension*. 1999;33:981-6.
75. Lin C, Frishman WH. Renin inhibition: a novel therapy for cardiovascular disease. *Am Heart J*. 1996;131:1024-34.
76. Pitt B, Zannad F, Remme WJ, Cody R, Castaigne A, Perez A, Palensky J, Wittes J. The effect of spironolactone on morbidity and mortality in patients with severe heart failure. Randomized Aldactone Evaluation Study Investigators [see comments]. *N Engl J Med*. 1999;341:709-17.
77. Modena MG, Aveta P, Menozzi A, Rossi R. Aldosterone inhibition limits collagen synthesis and progressive left ventricular enlargement after anterior myocardial infarction. *Am Heart J*. 2001;141:41-6.
78. Brilla CG, Weber KT. Mineralocorticoid excess, dietary sodium, and myocardial fibrosis. *J Lab Clin Med*. 1992;120:893-901.
79. Linz W, Wiemer G, Gohlke P, Unger T, Scholkens BA. Contribution of kinins to the cardiovascular actions of angiotensin-converting enzyme inhibitors. *Pharmacol Rev*. 1995;47:25-49.
80. Waeber B, Brunner HR. Cardiovascular hypertrophy: role of angiotensin II and bradykinin. *J Cardiovasc Pharmacol*. 1996;27:S36-40.
81. McGiff JC, Terragno NA, Malik KU, Lonigro AJ. Release of a prostaglandin E-like substance from canine kidney by bradykinin. *Circ Res*. 1972;31:36-43.
82. Desta B, Vanhoutte PM, Boulanger CM. Inhibition of the angiotensin converting enzyme by perindoprilat and release of nitric oxide. *Am J Hypertens*. 1995;8:1S-6S.
83. Davie AP, Dargie HJ, McMurray JJ. Role of bradykinin in the vasodilator effects of losartan and enalapril in patients with heart failure. *Circulation*. 1999;100:268-73.
84. Campbell DJ, Duncan AM, Kladis A. Angiotensin-converting enzyme inhibition modifies angiotensin but not kinin peptide levels in human atrial tissue. *Hypertension*. 1999;34:171-5.

85. Rhaleb NE, Peng H, Alfie ME, Shesely EG, Carretero OA. Effect of ACE inhibitor on DOCA-salt- and aortic coarctation-induced hypertension in mice: do kinin B2 receptors play a role? *Hypertension*. 1999;33:329-34.
86. Azizi M, Rousseau A, Ezan E, Guyene TT, Michelet S, Grognet JM, Lenfant M, Corvol P, Menard J. Acute angiotensin-converting enzyme inhibition increases the plasma level of the natural stem cell regulator N-acetyl-seryl-aspartyl-lysyl- proline. *J Clin Invest*. 1996;97:839-44.
87. Rhaleb NE, Peng H, Harding P, Tayeh M, LaPointe MC, Carretero OA. Effect of N-acetyl-seryl-aspartyl-lysyl-proline on DNA and collagen synthesis in rat cardiac fibroblasts. *Hypertension*. 2001;37:827-32.
88. Gavras I. The Role of AII Antagonists in Hypertension: Focus on Telmisartan. In. Boston; 2000.
89. Kang PM, Landau AJ, Eberhardt RT, Frishman WH. Angiotensin II receptor antagonists: a new approach to blockade of the renin-angiotensin system. *Am Heart J*. 1994;127:1388-401.
90. Lacourciere Y. The incidence of cough: a comparison of lisinopril, placebo and telmisartan, a novel angiotensin II antagonist. Telmisartan Cough Study Group. *Int J Clin Pract*. 1999;53:99-103.
91. Krum H. Differentiation in the angiotensin II receptor 1 blocker class on autonomic function. *Curr Hypertens Rep*. 2001;3 Suppl 1:S17-23.
92. Malmqvist K, Kahan T, Edner M, Held C, Hagg A, Lind L, Muller-Brunotte R, Nystrom F, Ohman KP, Osbakken MD, Ostergern J. Regression of left ventricular hypertrophy in human hypertension with irbesartan. *J Hypertens*. 2001;19:1167-76.
93. Mazzolai L, Nussberger J, Aubert JF, Brunner DB, Gabbiani G, Brunner HR, Pedrazzini T. Blood pressure-independent cardiac hypertrophy induced by locally activated renin-angiotensin system. *Hypertension*. 1998;31:1324-30.
94. Varo N, Etayo JC, Zalba G, Beaumont J, Iraburu MJ, Montiel C, Gil MJ, Monreal I, Diez J. Losartan inhibits the post-transcriptional synthesis of collagen type I and reverses left ventricular fibrosis in spontaneously hypertensive rats. *J Hypertens*. 1999;17:107-14.

95. Bivalacqua TJ, Dalal A, Champion HC, Kadowitz PJ. Role of AT(1) receptors and autonomic nervous system in mediating acute pressor responses to ANG II in anesthetized mice. *Am J Physiol*. 1999;277:E838-47.
96. Jugdutt BI, Xu Y, Balghith M, Moudgil R, Menon V. Cardioprotection induced by AT1R blockade after reperfused myocardial infarction: association with regional increase in AT2R, IP3R and PKCepsilon proteins and cGMP. *J Cardiovasc Pharmacol Ther*. 2000;5:301-11.
97. Gohlke P, Pees C, Unger T. AT2 receptor stimulation increases aortic cyclic GMP in SHRSP by a kinin-dependent mechanism. *Hypertension*. 1998;31:349-55.
98. Liu YH, Yang XP, Sharov VG, Nass O, Sabbah HN, Peterson E, Carretero OA. 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*. 1997;99:1926-35.
99. Bader M. Molecular interactions of vasoactive systems in cardiovascular damage. *J Cardiovasc Pharmacol*. 2001;38 Suppl 2:S7-9.
100. Israili ZH, Hall WD. Cough and angioneurotic edema associated with angiotensin-converting enzyme inhibitor therapy. A review of the literature and pathophysiology. *Ann Intern Med*. 1992;117:234-42.
101. Yeo WW, Foster G, Ramsay LE. Prevalence of persistent cough during long-term enalapril treatment: controlled study versus nifedipine. *Q J Med*. 1991;80:763-70.
102. Ohta K, Kim S, Iwao H. Role of angiotensin-converting enzyme, adrenergic receptors, and blood pressure in cardiac gene expression of spontaneously hypertensive rats during development. *Hypertension*. 1996;28:627-34.
103. Mullins JJ, Peters J, Ganten D. Fulminant hypertension in transgenic rats harbouring the mouse Ren-2 gene. *Nature*. 1990;344:541-4.
104. Ohta K, Kim S, Wanibuchi H, Ganten D, Iwao H. Contribution of local renin-angiotensin system to cardiac hypertrophy, phenotypic modulation, and remodeling in TGR (mRen2)²⁷ transgenic rats. *Circulation*. 1996;94:785-91.

105. Kim S, Ohta K, Hamaguchi A, Omura T, Yukimura T, Miura K, Inada Y, Ishimura Y, Chatani F, Iwao H. Angiotensin II type I receptor antagonist inhibits the gene expression of transforming growth factor-beta 1 and extracellular matrix in cardiac and vascular tissues of hypertensive rats. *Journal of Pharmacology & Experimental Therapeutics*. 1995;273:509-515.
106. Kim S, Ohta K, Hamaguchi A, Yukimura T, Miura K, Iwao H. Effects of an AT1 receptor antagonist, an ACE inhibitor and a calcium channel antagonist on cardiac gene expressions in hypertensive rats. *Br J Pharmacol*. 1996;118:549-556.
107. Kobayashi S, Yano M, Kohno M, Obayashi M, Hisamatsu Y, Ryoike T, Ohkusa T, Yamakawa K, Matsuzaki M. Influence of aortic impedance on the development of pressure-overload left ventricular hypertrophy in rats. *Circulation*. 1996;94:3362-8.
108. Baker KM, Chernin MI, Wixson SK, Aceto JF. Renin-angiotensin system involvement in pressure-overload cardiac hypertrophy in rats. *Am J Physiol*. 1990;259:H324-32.
109. Kim S, Iwao H. Molecular and cellular mechanisms of angiotensin II-mediated cardiovascular and renal diseases. *Pharmacol Rev*. 2000;52:11-34.
110. Everett AD, Tufro-McReddie A, Fisher A, Gomez RA. Angiotensin receptor regulates cardiac hypertrophy and transforming growth factor-beta 1 expression. *Hypertension*. 1994;23:587-92.
111. Linz W, Scholkens BA, Ganten D. Converting enzyme inhibition specifically prevents the development and induces regression of cardiac hypertrophy in rats. *Clin Exp Hypertens A*. 1989;11:1325-50.
112. Bruckschlegel G, Holmer SR, Jandeleit K, Grimm D, Muders F, Kromer EP, Riegger GA, Schunkert H. Blockade of the renin-angiotensin system in cardiac pressure-overload hypertrophy in rats. *Hypertension*. 1995;25:250-259.
113. Kuwahara F, Kai H, Tokuda K, Kai M, Takeshita A, Egashira K, Imaizumi T. Transforming growth factor-beta function blocking prevents myocardial

- fibrosis and diastolic dysfunction in pressure-overloaded rats. *Circulation*. 2002;106:130-5.
114. Barton CH, Ni Z, Vaziri ND. Effect of severe aortic banding above the renal arteries on nitric oxide synthase isotype expression. *Kidney Int*. 2001;59:654-61.
 115. deBlois D, Tea B-S, Dam T-V, Tremblay J, Hamet P. Smooth muscle cell apoptosis during vascular regression in spontaneously hypertensive rats. *Hypertension*. 1997;29:340-349.
 116. Dostal DE. Regulation of cardiac collagen: angiotensin and cross-talk with local growth factors. *Hypertension*. 2001;37:841-4.
 117. 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;73:413-423.
 118. Crabos M, Roth M, Hahn AW, Erne P. Characterization of angiotensin II receptors in cultured adult rat cardiac fibroblasts. Coupling to signaling systems and gene expression. *J Clin Invest*. 1994;93:2372-8.
 119. Zhou G, Kandala JC, Tyagi SC, Katwa LC, Weber KT. Effects of angiotensin II and aldosterone on collagen gene expression and protein turnover in cardiac fibroblasts. *Mol Cell Biochem*. 1996;154:171-8.
 120. Pathak M, Sarkar S, Vellaichamy E, Sen S. Role of myocytes in myocardial collagen production. *Hypertension*. 2001;37:833-40.
 121. Akers WS, Cross A, Speth R, Dwoskin LP, Cassis LA. Renin-angiotensin system and sympathetic nervous system in cardiac pressure-overload hypertrophy. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2000;279:H2797-806.
 122. Siri FM. Sympathetic changes during development of cardiac hypertrophy in aortic- constricted rats. *Am J Physiol*. 1988;255:H452-7.
 123. Speth RC, Khosla MC, Spech MM, Ferrario CM. Rat (Ile5) but not bovine (Val5) angiotensin raises plasma norepinephrine in rats. *Hypertension*. 1981;3:II-25-9.

124. Moser L, Faulhaber J, Wiesner RJ, Ehmke H. Predominant activation of endothelin-dependent cardiac hypertrophy by norepinephrine in rat left ventricle. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2002;282:R1389-94.
125. Ito H, Hiroe M, Hirata Y, Fujisaki H, Adachi S, Akimoto H, Ohta Y, Marumo F. Endothelin ETA receptor antagonist blocks cardiac hypertrophy provoked by hemodynamic overload. *Circulation.* 1994;89:2198-203.
126. Arai M, Yoguchi A, Iso T, Takahashi T, Imai S, Murata K, Suzuki T. Endothelin-1 and its binding sites are upregulated in pressure overload cardiac hypertrophy. *Am J Physiol.* 1995;268:H2084-91.
127. Rossi GP, Cavallin M, Nussdorfer GG, Pessina AC. The endothelin-aldosterone axis and cardiovascular diseases. *J Cardiovasc Pharmacol.* 2001;38 Suppl 2:S49-52.
128. Regan CP, Anderson PG, Bishop SP, Berecek KH. Pressure-independent effects of AT1-receptor antagonism on cardiovascular remodeling in aortic-banded rats. *Am J Physiol.* 1997;272:H2131-H2138.
129. Regan CP, Anderson PG, Bishop SP, Berecek KH. Captopril prevents vascular and fibrotic changes but not cardiac hypertrophy in aortic-banded rats. *Am J Physiol.* 1996;271:H906-13.
130. Leri A, Claudio PP, Li Q, Wang X, Reiss K, Wang S, Malhotra A, Kajstura J, Anversa P. 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.
131. Harada K, Komuro I, Shiojima I, Hayashi D, Kudoh S, Mizuno T, Kijima K, Matsubara H, Sugaya T, Murakami K, Yazaki Y. Pressure overload induces cardiac hypertrophy in angiotensin II type 1A receptor knockout mice. *Circulation.* 1998;97:1952-9.
132. Senbonmatsu T, Ichihara S, Price E, Jr., Gaffney FA, Inagami T. Evidence for angiotensin II type 2 receptor-mediated cardiac myocyte enlargement during in vivo pressure overload. *J Clin Invest.* 2000;106:R25-9.

133. Akishita M, Iwai M, Wu L, Zhang L, Ouchi Y, Dzau VJ, Horiuchi M. Inhibitory effect of angiotensin II type 2 receptor on coronary arterial remodeling after aortic banding in mice. *Circulation*. 2000;102:1684-9.
134. Lopez JJ, Lorell BH, Ingelfinger JR, Weinberg EO, Schunkert D, Diamant D, Tang SS. Distribution and function of cardiac angiotensin AT1- and AT2 receptor subtypes in hypertrophied rat hearts. *Am J Physiol*. 1994;267:H844-H852.
135. Tsutsumi Y, Matsubara H, Ohkubo N, Mori Y, Nozawa Y, Murasawa S, Kijima K, Maruyama K, Masaki H, Moriguchi Y, Shibasaki Y, Kamihata H, Inada M, Iwasaka T. Angiotensin II type 2 receptor is upregulated in human heart with interstitial fibrosis, and cardiac fibroblasts are the major cell type for its expression. *Circ Res*. 1998;83:1035-46.
136. Masaki H, Kurihara T, Yamaki A, Inomata N, Nozawa Y, Mori Y, Murasawa S, Kizima K, Maruyama K, Horiuchi M, Dzau VJ, Takahashi H, Iwasaka T, Inada M, Matsubara H. Cardiac-specific overexpression of angiotensin II AT2 receptor causes attenuated response to AT1 receptor-mediated pressor and chronotropic effects. *J Clin Invest*. 1998;101:527-35.
137. 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. Angiotensin II type 2 receptor overexpression activates the vascular kinin system and causes vasodilation. *J Clin Invest*. 1999;104:925-35.
138. Molkenin JD, Lu JR, Antos CL, Markham B, Richardson J, Robbins J, Grant SR, Olson EN. A calcineurin-dependent transcriptional pathway for cardiac hypertrophy. *Cell*. 1998;93:215-28.
139. Sussman MA, Lim HW, Gude N, Taigen T, Olson EN, Robbins J, Colbert MC, Gualberto A, Wieczorek DF, Molkenin JD. Prevention of cardiac hypertrophy in mice by calcineurin inhibition. *Science*. 1998;281:1690-3.
140. Shimoyama M, Hayashi D, Takimoto E, Zou Y, Oka T, Uozumi H, Kudoh S, Shibasaki F, Yazaki Y, Nagai R, Komuro I. Calcineurin plays a critical role in

- pressure overload-induced cardiac hypertrophy. *Circulation*. 1999;100:2449-54.
141. Zhang W, Kowal RC, Rusnak F, Sikkink RA, Olson EN, Victor RG. Failure of calcineurin inhibitors to prevent pressure-overload left ventricular hypertrophy in rats. *Circ Res*. 1999;84:722-8.
 142. Meguro T, Hong C, Asai K, Takagi G, McKinsey TA, Olson EN, Vatner SF. Cyclosporine attenuates pressure-overload hypertrophy in mice while enhancing susceptibility to decompensation and heart failure. *Circ Res*. 1999;84:735-40.
 143. Zhang W. Old and new tools to dissect calcineurin's role in pressure-overload cardiac hypertrophy. *Cardiovasc Res*. 2002;53:294-303.
 144. Singh K, Sirokman G, Communal C, Robinson KG, Conrad CH, Brooks WW, Bing OH, Colucci WS. Myocardial osteopontin expression coincides with the development of heart failure. *Hypertension*. 1999;33:663-70.
 145. Kupfahl C, Pink D, Friedrich K, Zurbrugg HR, Neuss M, Warnecke C, Fielitz J, Graf K, Fleck E, Regitz-Zagrosek V. Angiotensin II directly increases transforming growth factor beta1 and osteopontin and indirectly affects collagen mRNA expression in the human heart. *Cardiovasc Res*. 2000;46:463-75.
 146. Ashizawa N, Graf K, Do YS, Nunohiro T, Giachelli CM, Meehan WP, Tuan TL, Hsueh WA. Osteopontin is produced by rat cardiac fibroblasts and mediates A(II)- induced DNA synthesis and collagen gel contraction. *J Clin Invest*. 1996;98:2218-27.
 147. Graf K, Do YS, Ashizawa N, Meehan WP, Giachelli CM, Marboe CC, Fleck E, Hsueh WA. Myocardial osteopontin expression is associated with left ventricular hypertrophy. *Circulation*. 1997;96:3063-71.
 148. Griendling KK, Minieri CA, Ollerenshaw JD, Alexander RW. Angiotensin II stimulates NADH and NADPH oxidase activity in cultured vascular smooth muscle cells. *Circ Res*. 1994;74:1141-8.
 149. Ushio-Fukai M, Zafari AM, Fukui T, Ishizaka N, Griendling KK. p22phox is a critical component of the superoxide-generating NADH/NADPH oxidase

- system and regulates angiotensin II-induced hypertrophy in vascular smooth muscle cells. *J Biol Chem*. 1996;271:23317-21.
150. Zafari AM, Ushio-Fukai M, Akers M, Yin Q, Shah A, Harrison DG, Taylor WR, Griendling KK. Role of NADH/NADPH oxidase-derived H₂O₂ in angiotensin II-induced vascular hypertrophy. *Hypertension*. 1998;32:488-95.
 151. Nakamura K, Fushimi K, Kouchi H, Mihara K, Miyazaki M, Ohe T, Namba M. Inhibitory effects of antioxidants on neonatal rat cardiac myocyte hypertrophy induced by tumor necrosis factor-alpha and angiotensin II. *Circulation*. 1998;98:794-9.
 152. Li JM, Gall NP, Grieve DJ, Chen M, Shah AM. Activation of NADPH oxidase during progression of cardiac hypertrophy to failure. *Hypertension*. 2002;40:477-84.
 153. Bouloumie A, Bauersachs J, Linz W, Scholkens BA, Wiemer G, Fleming I, Busse R. Endothelial dysfunction coincides with an enhanced nitric oxide synthase expression and superoxide anion production. *Hypertension*. 1997;30:934-41.
 154. Bevan RD, van Marthens E, Bevan JA. Hyperplasia of vascular smooth muscle in experimental hypertension in the rabbit. *Circ Res*. 1976;38:58-62.
 155. Olivetti G, Anversa P, Melissari M, Loud A. Morphometry of medial hypertrophy in the rat thoracic aorta. *Lab Invest*. 1980;2:559-565.