

Université de Montréal

Modulation des voies de signalisation de l'Ang II par des activateurs du récepteur des proliférateurs de peroxyosomes γ dans l'hypertension artérielle

par

Karim Benkirane

Département de biochimie

Faculté de médecine

Thèse présentée à la Faculté des études supérieures
en vue de l'obtention du grade de Ph.D.
en Biochimie

Avril 2006



© Karim Benkirane, 2006

W
4
U58
2006
v.131

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

Cette thèse intitulée :

Modulation des voies de signalisation de l'Ang II par des activateurs du récepteur des
proliférateurs de peroxyosomes γ dans l'hypertension artérielle

présentée par :
Karim Benkirane

a été évaluée par un jury composé des personnes suivantes :

Dr Muriel Aubry, président-rapporteur
Dr Ernesto L. Schiffrin, directeur de recherche
Dr Timothy L. Reudelhuber, codirecteur
Dr Gaétan Thibault, membre du jury
Dr Darren Richard, examinateur externe
Dr Denis Deblois, représentant du doyen de la FES

Résumé

L'angiotensine (Ang) II est impliquée dans la physiopathologie de l'hypertension artérielle (HTA), le remodelage vasculaire, l'inflammation vasculaire et cardiaque ainsi que dans la résistance à l'insuline. Les thiazolidinediones, comme la rosiglitazone et la pioglitazone, sont des activateurs du facteur de transcription PPAR (récepteur des proliférateurs de peroxyosomes) γ qui diminuent la résistance à l'insuline, l'inflammation et le remodelage vasculaire induit par l'Ang II.

Les buts de cette thèse sont 1) d'étudier les effets, *in vitro* et *in vivo*, d'agonistes de PPAR γ sur les voies de signalisation (PI3K et MAPK) de l'Ang II; 2) d'évaluer les effets à long terme de la pioglitazone sur l'inflammation cardiaque dans un modèle de rats spontanément hypertendus prédisposés aux accidents cérébrovasculaires (SHRSP).

D'une part, mes études *in vitro* faites sur des cellules du muscle lisse vasculaire (CMLV) dérivées de vaisseaux de résistance mésentériques démontrent que l'activation de PPAR γ par différents agonistes, notamment la rosiglitazone et la prostaglandine J2, inhibent les effets médiés par l'Ang II via son récepteur AT $_1$. Entre autres, l'activation de ce dernier diminue l'activité des protéines : SHIP2, Akt/PKB, ERK 1/2 et 4E-BP1. De plus, la stimulation à l'Ang II induit une augmentation de la synthèse d'ADN et de protéines qui est inhibée par le co-traitement avec des activateurs de PPAR γ .

D'autre part, mes études *in vivo* démontrent qu'un traitement à la rosiglitazone de sept jours, chez le rat Sprague Dawley, permet d'inhiber les effets stimulateurs de l'Ang II en diminuant la pression artérielle systolique ainsi que diverses protéines (Akt/PKB, SHIP2, ERK1/2, 4E-BP1 et AT $_1$) impliquées dans les voies de signalisation de l'Ang II. De plus, mes études démontrent que la régulation des voies de signalisation de l'Ang II dans l'aorte (vaisseau de conductance) et les artères mésentériques (vaisseaux de résistance) sont différentes. Le traitement à la rosiglitazone, chez les rats infusés à l'Ang II, diminue les effets activateurs de l'Ang II sur ses voies de signalisation dans ces différents vaisseaux.

Chez les rats SHRSP, un traitement de dix semaines à la pioglitazone diminue, dans le ventricule gauche, l'activité des facteurs de transcription NF κ B et AP-1 ainsi que l'expression du TNF α et de la molécule d'adhésion PECAM. Aussi, le traitement à la pioglitazone augmente l'expression des protéines pro-apoptotiques p53 et Bax.

En conclusion, l'activation des PPAR γ pourrait jouer un rôle préventif dans le système cardiovasculaire en diminuant les effets aigus et chroniques de l'Ang II sur la croissance cellulaire et l'inflammation cardiaque chez les patients diabétiques et hypertendus.

Mots-clés: Angiotensine II, PI3K, MAPK, PPAR γ , CMLV, aorte, artère mésentérique, cœur, inflammation.

Abstract

Angiotensin (Ang) II is implicated in hypertension, vascular remodeling, vascular and cardiac inflammation, and insulin resistance. PPAR γ activators, thiazolidinediones (TZD), such as rosiglitazone and pioglitazone, can increase insulin sensitivity and improve Ang II-induced vascular inflammation and remodeling.

The aims of this thesis are 1) to evaluate the *in vitro* and *in vivo* effects of PPAR γ activators on Ang II-induced signaling pathways (PI3K and MAPK) and cell growth; 2) to investigate the long-term effects of pioglitazone on cardiac inflammation in stroke-prone spontaneously hypertensive rats (SHRSP).

My *in vitro* studies showed that vascular smooth muscle cells (VSMC) derived from rat mesenteric arteries treated with PPAR γ activators (prostaglandin J2 and rosiglitazone) for 24 hours, inhibited Ang II-induced PI3K and MAPK signaling pathways through Ang II type 1 (AT₁) receptor dependant manner. This was associated with decreased Ang II-induced DNA and protein synthesis. PPAR γ activation also reduced Ang II-induced growth associated with inhibition of ERK 1/2, Akt/PKB, 4E-BP1, and SHIP2.

In vivo, we evaluated the effects of the PPAR γ activator rosiglitazone on Ang II signaling in aorta and mesenteric arteries. Blood pressure rise in Ang II-infused rats was attenuated by rosiglitazone. Ang II significantly increased AT₁ expression in the mesenteric arteries whereas that of the aorta was decreased, changes which were reversed by rosiglitazone. Akt/PKB activity was increased by Ang II and returned to basal levels under rosiglitazone in both vascular beds. However, Ang II-induced ERK 1/2 activity increased in aorta but not in mesenteric vessels, where 4E-BP1 activity was significantly increased by Ang II and inhibited by PPAR γ activation. In response to Ang II, SHIP2 activity was increased in both vascular beds.

In SHRSP rats, left ventricular NF κ B and AP-1 binding activities, the expression of TNF α , and the adhesion of molecule PECAM were significantly decreased by pioglitazone treatment. Expression of the pro-apoptotic proteins p53 and bax were significantly increased by pioglitazone.

In conclusion, PPAR γ activation may play a preventive role by inhibiting acute and chronic Ang II-induced PI3K and MAPK signaling pathways implicated in vascular growth and remodeling. TZDs may play a preventive cardiovascular role by offsetting the cardiac inflammatory response. All of which, PPAR- γ activators could contribute to regression of vascular remodeling and cardiac inflammation in models of hypertension, and accordingly in hypertensive patients.

Keywords: Angiotensin II, PI3K, MAPK, PPAR γ , VSMC, aorta, mesenteric artery, heart, inflammation

Table des matières

Résumé	iii
Abstract	v
Table des matières	vii
Abréviations	xi
Liste des tableaux	xvi
Liste des figures	xvii
CHAPITRE I: Introduction et objectifs de la thèse	1
Introduction	2
1. Le système cardiovasculaire	2
2. L'hypertension artérielle	3
3. Le remodelage vasculaire	6
4. Principaux modèles animaux d'HTA	9
4.1 Modèles d'hypertension expérimentaux	9
4.1.1 Modèle de Goldblatt	9
4.1.2 Modèle d'HTA induite par l'Ang II	10
4.1.3 Hypertension induite par les stéroïdes	11
4.1.4 Diète basée sur le sel	11
4.1.5 Diète basée sur le sucre	12
4.2 Modèles d'HTA génétique	12
4.2.1 Modèle génétique naturel d'HTA	13
4.2.1.1 Modèle de rats spontanément hypertendus	13
4.2.1.2 Modèle de rats SHRSP	14
4.2.1.3 Modèle de rats hypertendus et maladies associées	14
4.2.2 Modèles de rats génétiquement modifiés d'HTA	16
4.2.2.1 Modèle expérimental dirigé génotypiquement et le SRAA	16
4.2.2.2 Modèle expérimental dirigé génotypiquement et l'ET	17
5. Physiologie moléculaire et régulation des CMLV dans l'HTA	19

5.1	Les CMLV et les agents vasoactifs	20
6.	Le système rénine angiotensine aldostérone	21
6.1	L'Ang II	21
6.2	Les dérivés de l'Ang II.....	23
6.3	Effets physiologiques de l'Ang II.....	24
6.3.1	Effets physiologiques aigus de l'Ang II.....	25
6.3.2	Effets physiologiques chroniques de l'Ang II.....	25
6.3.3	Régulation des mécanismes activateurs de l'Ang II	26
7.	Les récepteurs de l'Ang II.....	27
7.1	Le récepteur AT ₁	27
7.2	Les antagonistes du récepteur AT ₁	29
7.3	L'oligomérisation des récepteurs AT ₁	31
7.4	Les voies de signalisation du récepteur AT ₁	32
7.4.1	Le récepteur AT ₁ et les protéines G hétérodimériques.....	33
7.4.2	Les phospholipases dans l'HTA.....	34
7.4.3	La voie JAK/STAT.....	38
7.4.4	Les voies des MAPK	39
7.4.4.1	La voie des protéines ERK 1/2	40
7.4.4.2	La voie des protéines MAPK/p38 kinases.....	42
7.4.4.3	La voie des protéines JNK/SAPK.....	43
7.4.5	La voie de la PI3 kinase	44
7.4.6	Les phosphatases	47
7.4.6.1	Les phosphatases PTEN et MTM.....	48
7.4.6.2	Les phosphatases SHIP.....	49
7.4.7	La voie de signalisation Akt/PKB	50
7.4.8	L'Ang II et les DRO	52
7.4.9	L'Ang II et les récepteurs à activité tyrosine kinases	53
7.4.10	L'Ang II et la traduction protéique.....	55

7.4.11	L'Ang II et la prolifération des CMLV	57
8.	L'Ang II et l'inflammation	59
9.	Le récepteur AT ₂	61
9.1	Les voies de signalisation du récepteur AT ₂	62
10.	Les activateurs de PPAR	63
10.1	Les PPAR et leurs ligands	64
10.1.1	Les PPAR et les ligands endogènes	65
10.1.2	Les PPAR et les ligands exogènes	66
10.2	PPAR α et le système cardiovasculaire	67
10.3	PPAR β/δ et le système cardiovasculaire	69
10.4	PPAR γ et le système cardiovasculaire	69
10.5	Les agonistes multi-activateurs des PPAR	72
11.	Les objectifs de cette thèse	74
CHAPITRE II: Article 1		76
	Abstract	78
	Introduction	78
	Methods	80
	Results	82
	Discussion	84
	References	88
CHAPITRE III: Article 2		101
	Abstract	103
	Introduction	104
	Methods	105
	Results	107
	Discussion	108
	References	112
CHAPITRE IV: Article 3		125

Abstract	127
Introduction	127
Methods	129
Results	132
Discussion	133
References	137
CHAPITRE V: Discussion et conclusion	153
12. Discussion	154
12.1 L'Ang II, ses récepteurs et PPARγ	155
12.2 L'Ang II et la voie ERK1/2	156
12.3 Les activateurs de PPARγ et la voie ERK1/2	159
12.3.1 L'activation des MAPK par les agonistes des PPAR	160
12.3.2 La régulation des PPAR par les MAPK	164
12.4 Les activateurs de PPARγ et la voie de la PI3K	165
12.5 Les activateurs de PPARγ et la croissance cellulaire associée à la voie de la PI3K et des MAPK	167
12.5.1 Les activateurs de PPARγ, la croissance cellulaire et la protéine régulatrice 4E-BP1	168
12.6 PPARγ et la résistance à l'insuline dans l'HTA	170
12.6.1 La phosphatase SHIP2 et la régulation de l'activité de l'Ang II	172
12.7 PPARγ dans le remodelage et l'inflammation cardiaque	176
12.7.1 Les activateurs de PPARγ dans le remodelage cardiaque	176
12.7.2 Les activateurs de PPARγ dans l'inflammation cardiaque	178
13. Conclusion	182
14. Limites de nos études	183
15. Perspectives	184
ANNEXE	I

Abréviations

4E-BP : *Eukaryotic initiation factor-4E-binding protein*

1-K, 1C : *One-kidney, one clip*

2-K, 1C : *Two-kidney, one clip*

2-K, 2C : *Two-kidney, two clips*

AA : Acide arachidonique

ADN : Acide désoxyribonucléique

AGT : Angiotensinogène

AIRE : *Acute Infarction Ramipril Efficacy*

Ang : Angiotensine

Ang (1-7) : Angiotensine (1-7)

Ang (1-9) : Angiotensine (1-9)

AP-1 : *Activator protein 1*

ARA : Antagoniste du récepteur de l'Ang II

ARNm : Acide ribonucléique messenger

AT₁ : Récepteur de type 1 de l'Ang II

AT₂ : Récepteur de type 2 de l'Ang II

ATP : Adénosine triphosphate

B₂ : Récepteur de type 2 de la bradykinine

CAGE : *Chymostatin-sensitive angiotensin generating enzyme*

CaM : Calmoduline

CBP : *CREB-binding protein*

Cdc : *Cell division control*

CDK : *Cyclin dependent kinase*

CE : Cellule endothéliale

CMLV : Cellule du muscle lisse vasculaire

CMS : Cellule musculaire squelettique

COX : Cyclooxygénase
CREB : *Cyclic AMP response element binding protein*
CYP450 : Cytochrome P450
DAG : Diacylglycérol
DHA : Acide docohexaénoïque
DOCA : Deoxycorticostérone acétate
DRO : Dérivés réactifs de l'oxygène
E2F : *E2 factor*
ECA : Enzyme de conversion de l'Ang II
ECA 2 : ECA de type 2
EETs : Acides époxyeicosatriénoïques
EGF(R) : *Epidermal growth factor (receptor)*
eIF : *Eukaryotic initiation factor*
eNOS : *Endothelial NOS*
ER : Récepteur aux œstrogènes
ERK : *Extracellular signal-regulated kinase*
ET-1 : Endothéline-1
ET_A : Récepteur de type A de l'ET-1
ET_B : Récepteur de type B de l'ET-1
FAT : Translocase d'acide gras
GLUT4: *Glucose transporter 4*
GMPc : Guanosine monophosphate cyclique
Grb2 : *Growth factor receptor-bound protein 2*
GSK3 : *Glycogen synthase kinase 3*
HDL : *High density lipoprotein*
HETEs : Acides hydroxyeicosatétraénoïques
HODE : Acide hydroxyoctadécadiénoïque
HOPE : *Heart Outcomes Prevention Evaluation*

HPETEs : Acides hydroperoxyeicosatetraenoïques

Hsp27 : *Heat shock protein 27*

HTA : Hypertension artérielle

ICAM-1 : *Intercellular adhesion molecule-1*

IECA: Inhibiteur de l'ECA

IGF(R) : *Insulin-like growth factor (receptor)*

IFN : Interféron

ILK : *Integrin-linked kinase*

IL : Interleukine

ink : *Inhibitors of CDK*

IP₃ : Inositol 1,4,5-triphosphate

IRS-1 : *Insulin receptor substrate*

IRAP : *Insulin-regulated membrane aminopeptidase*

JAK : Janus kinase

JNK : *c-jun N-terminal protein kinase*

K_d : Constante de dissociation

K_m : Constante de Michaelis-Menten

LH: *Lyon hypertensive*

LOX : Lipoxygénase

MAPK : *Mitogen-activated protein kinase*

MEK : *Mitogen extracellular regulated kinase*

MEKK : MAPK kinase kinase

MCP : *Monocyte chemotactic protein*

MEC : Matrice extracellulaire

MHS : *Milan hypertensive strain*

MLK : *Mixed-lineage kinase*

MMP : Métalloprotéase de la matrice extracellulaire

MTM : Myotubularine

mTOR : *Mammalian target of rapamycin*

NAD(P)H : *Nicotinamide adenine dinucleotide/nicotinamide adenine dinucleotide phosphate*

Nb : Nombre

NFκB : *Nuclear factor κB*

NO : Monoxyde d'azote

NOS : *Nitric oxide synthase*

Nox : NAD(P)H oxidase

p90Rsk : *p90 ribosomal S6 kinase*

PA : Pression artérielle

PAI-1 : Activateur du plasminogène-1

PAK : *p21 (rac/Cdc42)-activated protein kinase*

PECAM : *Platelet endothelial cell adhesion molecule*

PDGF(R) : *Platelet-derived growth factor (receptor)*

PDK1 : *3'-phosphoinositide-dependent kinase-1*

PH : *Pleckstrin homology*

Phox : *Phagocyte oxidase*

PI3K : Phosphatidylinositol 3-kinase

PKB : Protéine kinase B

PKC : Protéine kinase C

PI : Phosphatidylinositol

PI(4,5)P₂ : Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate

PLC : Phospholypase C

PPAR : *Peroxisome proliferator-activated receptor*

PPRE : *PPAR response element*

PGC-1 : *PPARγcoactivator-1*

PGI₂ : Prostacycline

PTEN : *Phosphatase and tensin homolog*

Pyk2 : *Proline-rich tyrosine kinase*
Rac : *Ras-related C3 botulinum toxin substrate*
Rb : *Retinoblastoma*
RBD : *Ras-binding domain*
RCPG : *Récepteur couplé aux protéines G*
RTK : *Récepteurs à activité tyrosine kinase*
RXR : *Retinoid X receptor*
S6K1 : *p70 ribosomal protein S6 kinase 1*
SAPK : *Stress-activated protein kinase*
SAVE : *Survival and Ventricular Enlargement*
SD : *Sprague Dawley*
SH2 : *Src-homology 2*
Shc : *Src homology 2 domain containing*
SHIP : *SH2-containing inositol phosphatase*
SHR : *Spontaneously hypertensive rat*
SHRSP : *SHR-Stroke prone*
siRNA : *small interfering RNA*
SOLVD : *Studies of Left Ventricular Dysfunction*
Sos : *Son of sevenless*
SRAA : *Système rénine-angiotensine-aldostérone*
SRC : *Steroid receptor coactivator-1*
STAT : *Signal transducers and activators of transcription*
TGF β : *Tumor growth factor β*
TNF α : *Tumor necrosis factor α*
TxA₂ : *Thromboxane A₂*
TZD : *Thiazolidinedione*
VCAM-1 : *Vascular Cell Adhesion Molecule-1*
WKY : *Wistar-Kyoto*

Liste des tableaux**CHAPITRE I**

Tableau I-1 : Sous-unités catalytiques et régulatrices de la classe I et II de la famille PI3K.	46
--	----

CHAPITRE III

Table III-1 : Body weight and systolic blood pressure..	118
--	-----

CHAPITRE V

Tableau V-1 : Activation des MAPK par certains ligands des PPAR dans différents types cellulaires.	161
---	-----

Liste des figures

CHAPITRE I

Figure I-1 : Pression artérielle retrouvée le long de l'arbre vasculaire.	6
Figure I-2 : Altérations de la lumière artériolaire par le remodelage.....	7
Figure I-3 : Système rénine-angiotensine aldostérone.	22
Figure I-4 : Schéma des principales voies de signalisation activées par le récepteur AT ₁ . .	33
Figure I-5 : Activation des voies MAPK (p38, JNK et ERK1/2).	40
Figure I-6 : Régulation du PI(3,4,5)P ₃ par les phosphatases PTEN et SHIP2.	49
Figure I-7 : Mécanisme d'activation de la protéine kinase Akt/PKB et certaines de ses cibles moléculaires.	51
Figure I-8 : Synthèse protéique dans l'hypertrophie cellulaire médié par l'Ang II.	56
Figure I-9 : Activation des voies PI3K et MAPK par l'Ang II dans la progression du cycle cellulaire.	57
Figure I-10 : Les PPAR dans le système cardiovasculaire.	65

CHAPITRE II

Figure II-1 : Peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR)- γ activators inhibit vascular smooth muscle cell (VSMC) growth.	94
Figure II-2 : Effect of ANG II on PPAR- γ expression and activity.	95
Figure II-3 : Effect of PPAR- γ activators on ANG II signaling pathways.	96
Figure II-4 : Acute and chronic effect of rosiglitazone on 4E-binding protein 1	98
Figure II-5 : Rosiglitazone effect on AT ₁ receptor signaling.....	99
Figure II-6 : Rosiglitazone effect on SHIP2..	100

CHAPITRE III

Figure III-1 : Rosiglitazone effect on vascular PPAR- γ expression and activity.....	119
Figure III-2 : Effect of rosiglitazone on vascular AT ₁ receptor expression.....	120

Figure III-3 : Vascular effect of rosiglitazone on PI3K/p85 α /Akt signaling.....	121
Figure III-4 : Vascular effect of rosiglitazone on 4E-BP1 activation.	122
Figure III-5 : Vascular effect of rosiglitazone on SHIP2 activation.	123
Figure III-6 : Effect of rosiglitazone on MAPK signaling pathway..	124

CHAPITRE IV

Figure IV-1: PPAR γ activity in the heart of SHRSP..	143
Figure IV-2 : Body weight, systolic blood pressure and left ventricular mass/body of SHRSP.	144
Figure IV-3 : Echocardiography of SHRSP.....	145
Figure IV-4 : Left and right ventricle mass/body weight ratio of SHRSP.....	146
Figure IV-5 : Northern blot of LV atrial natriuretic factor and glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase of SHRSP.	147
Figure IV-6 : Collagen content in epi-endocardial, mid-myocardial, and endo-epicardial regions of LV myocardium of SHRSP after 20 weeks of treatment.....	148
Figure IV-7 : Left ventricle NF κ B and AP-1 activity in SHRSP.....	149
Figure IV-8 : Left ventricle expression of TNF α , PECAM, VCAM-1, COX-2 in SHRSP.	150
Figure IV-9 : Left ventricle expression of Bax and p53 in SHRSP.....	152

CHAPITRE V

Figure V-1 : Schéma synthèse de nos études sur l'activation de la voie ERK1/2 par l'Ang II et son implication dans les processus menant à la croissance cellulaire et au remodelage vasculaire.....	157
Figure V-2 : Schéma synthèse de nos études sur l'activation de la voie PI3K par l'Ang II et son implication dans les processus menant à la croissance cellulaire et au remodelage vasculaire.....	165

Figure V-3 : Schéma synthèse de nos études sur les effets inhibiteurs de PPAR γ sur l'activation des voies de signalisation des ERK1/2 et PI3K par l'Ang II dans la croissance cellulaire.	170
Figure V-4 : Effets régulateurs de l'Ang II, via les voies de signalisation PI3K/Akt/PKB, sur la croissance cellulaire et le métabolisme du glucose dans les CMLV.....	175
Figure V-5 : Schéma proposé représentant l'effet inhibiteur de PPAR γ sur le remodelage et l'inflammation cardiaque dans le cœur de rats SHRSP traités à long terme à la pioglitazone.....	181

DÉDICACE

«À ma mère, pour son amour, sa douceur et sa créativité. À mon père, pour son amour, sa loyauté et sa confiance. À mes frères et sœurs, pour leur affection et leurs sourires. Et à toi, mon amour et amie, pour ta complicité, ton soutien et ton amour!»

Remerciements

J'exprime mes sincères remerciements à toutes les personnes ayant participé de près ou de loin à cette thèse de doctorat et plus particulièrement :

À mon directeur, le Dr Ernesto L. Schiffrin, qui m'a ouvert les portes de son laboratoire afin que je puisse m'épanouir scientifiquement d'abord comme étudiant d'été, ensuite comme étudiant à la maîtrise et au doctorat. Je le remercie pour ses conseils judicieux, son esprit critique et pour sa confiance lors de l'élaboration de mes projets. Merci énormément pour votre investissement scientifique, pour la qualité et l'efficacité de vos recherches fondamentales et cliniques dans le domaine de l'hypertension artérielle. Un immense merci pour votre générosité intellectuelle qui a enrichi, et qui continuera d'enrichir la communauté scientifique. Merci !

À mon codirecteur, le Dr Tim Reudelhuber, pour sa courtoisie, sa confiance et son expertise dans le domaine de l'hypertension artérielle. Je le remercie pour son ouverture d'esprit, son imagination et sa curiosité scientifique.

À la Dr Rhian Touyz, pour sa grande générosité humaine et scientifique. Merci pour ces nombreux conseils et commentaires.

À Émilie Viel, pour son aide, sa confiance, sa complicité et surtout, son amitié. Merci pour tous ces beaux moments à tes côtés. Merci pour toutes ces discussions.

À Pascal Brassard, pour ses conseils, son aide, ses rires et ces discussions scientifiques. Merci pour ta fraternité très précieuse.

Au Dr Farhad Amiri, pour l'efficacité de ces corrections associées à l'ensemble de cette thèse. Pour son aide et ses conseils.

À Isabelle Blain, pour sa disponibilité et ces nombreux conseils linguistiques. Un gros merci pour ton rire contagieux.

Aux techniciens André Turgeon et Suzanne Diébold, pour leur précieuse aide et fiabilité à l'animalerie et dans le laboratoire. À André, pour tous ses jeux de mots et ses sourires continus. À Suzanne, pour ses expressions françaises.

À tous mes collègues et amis du laboratoire, anciens et présents, qui m'ont apporté leur soutien technique et moral tout au long de ces projets. Surtout à vous, Dr Quy N. Diep et Dr Mohammed El Mabrouk, merci pour votre aide très précieuse.

À tous les membres et étudiants du Groupe de recherche en hypertension de l'Institut de Recherches cliniques de Montreal pour leurs nombreux conseils.

Aux membres et jury qui ont formé mon comité de thèse. Merci pour votre expertise scientifique et vos nombreux conseils.

Aux Instituts de recherches en santé du Canada pour leur support financier associé à l'élaboration de cette thèse. À l'Institut de Recherches cliniques de Montreal pour sa fine pointe technologique et ses services scientifiques. À l'Université de Montréal pour la qualité de ses cours et de ses enseignants.

Aux membres de ma famille, pour leur soutien et leur compréhension.

À la muse et pianiste qui partage ma vie dans les bons et mauvais moments, Marie-Ève Scarfone. Merci pour ton écoute attentive, ta compréhension, ta joie de vivre, tes sourires et ta musique. Merci pour ta complicité...tu es fantastique !

Merci...à vous tous !

CHAPITRE I: Introduction et objectifs de la thèse

Introduction

Les maladies cardiovasculaires sont la cause majeure de mortalité et de morbidité en Amérique du Nord et prennent une expansion importante dans les pays industrialisés. Une énergie importante est fournie, dans le domaine médical et scientifique, afin de démystifier les causes et les conséquences de ces maladies. Une attention particulière est portée sur la mise au point de techniques et d'analyses qui permettent le traitement et la prévention de ces physiopathologies. Je me propose ici de faire un ouvrage en cinq chapitres qui couvriront certains des rudiments et des acquis scientifiques du domaine cardiovasculaire, plus spécifiquement l'hypertension artérielle (HTA), à l'érudition actuelle de ces connaissances. Tout d'abord, je passerai en revue (Chapitre I) la littérature dans le domaine du système cardiovasculaire d'un point de vue physiologique et moléculaire afin de mettre en contexte trois articles scientifiques (Chapitres II-IV) que je présenterai. Finalement, j'approfondirai et discuterai des résultats obtenus dans ces articles (Chapitre V) afin de mieux comprendre les enjeux de cette problématique médico-sociale importante.

1. Le système cardiovasculaire

Le système cardiovasculaire est composé à la fois du cœur, des vaisseaux sanguins et du sang. Le cœur est structuré en différentes épaisseurs. En effet, trois tuniques composent la paroi cardiaque : l'endocarde, le myocarde et le péricarde. L'endocarde est la couche la plus interne des cavités du cœur et donne naissance aux valvules cardiaques qui sont composées de plusieurs valves. Le myocarde est la couche médiane de la structure musculaire cardiaque. Celui-ci est composé de fibres musculaires striées et assure, par sa contraction, le remplissage et le désapprovisionnement du sang systémique et pulmonaire. La répartition des fibres musculaires du myocarde n'est cependant pas équivalente à travers le cœur. Effectivement, les fibres musculaires sont plus nombreuses dans le ventricule gauche que dans le ventricule droit et elles sont plus nombreuses dans les ventricules que

dans les oreillettes. Le péricarde est composé de deux feuillets et enveloppe le cœur. Le feuillet externe est une membrane fibreuse solide qui fixe le cœur au diaphragme, au sternum et aux gros vaisseaux. Le feuillet interne est en continuité avec le précédent et forme l'épicaire. Ces deux feuillets délimitent la cavité péricardique qui contient une mince couche de liquide qui est produit par les cellules péricardiques et permet le glissement des deux feuillets l'un sur l'autre au cours des battements cardiaques. Ainsi, le cœur agit comme une pompe et permet de recueillir et redistribuer le sang dans le système par l'intermédiaire du système vasculaire.

Le système vasculaire est un réseau de conduits, vaisseaux, qui permet la circulation sanguine (décrit par l'anglais William Harvey au XVIIe siècle) à travers l'organisme entier (1). Ce système est composé d'artères, d'artérioles, de capillaires, de veines, de veinules et de vaisseaux lymphatiques. Dans les organes, les artères se ramifient en artérioles, de plus petits vaisseaux, qui donnent naissance aux capillaires, des vaisseaux microscopiques qui irriguent chaque tissu. À l'extrémité terminale des capillaires, ils se regroupent pour former les veinules qui à leur tour se réunissent pour former les veines. Cependant, le système vasculaire ne sert pas uniquement à transporter le sang et les gaz, il sert aussi à véhiculer une quantité importante de substances nutritives, de cellules et de protéines impliquées dans le système immunitaire ainsi qu'à réguler la pression artérielle (PA). La modification exagérée de ces dernières résulte généralement en un déséquilibre de l'homéostasie et peut, par conséquent, provoquer différents troubles cardiovasculaires.

2. L'hypertension artérielle

Les maladies cardiovasculaires sont la cause du plus grand nombre de décès dans le monde industrialisé. Malgré le fait qu'il existe plusieurs pathologies et troubles cardiovasculaires, je m'attarderai, ici, sur la physiopathologie de l'HTA. En premier lieu, la PA est définie comme une pression pulsée qui résulte de la contraction régulière du cœur et

créé un système de forces qui propulse le sang dans toutes les artères du corps. Sous certaines normes cliniques, une exagération de la PA peut être identifiée comme de l'HTA. L'HTA est considérée, parmi une gamme importante de maladies cardiovasculaires, comme le tueur silencieux, car il ne présente aucun symptôme en soi (2). Chez la plupart des patients hypertendus, on ne retrouve pas de causes évidentes et par conséquent, l'HTA est qualifiée d'essentielle. Environ 90 à 95% des patients hypertendus développent ce type d'HTA (3). Il existe plusieurs facteurs de risques, influençables et non influençables, qui induisent le développement de l'HTA essentielle (4). D'une part, l'obésité, le stress ainsi que la consommation de sel et d'alcool constituent des facteurs influençables qui peuvent être contrôlés. D'autre part, les antécédents familiaux, le sexe, l'âge et l'ethnie sont des facteurs non influençables qui peuvent affecter le développement d'HTA essentielle ou primaire (4). Aussi, différentes données démontrent l'importance du facteur génétique dans le développement de l'HTA. Effectivement, les afro-américains ont une tendance plus élevée au développement de l'HTA par rapport aux caucasiens (5). Dans un autre ordre d'idées, l'HTA dont la ou les causes sont connues est nommée HTA secondaire et correspond à environ 5 à 10% des patients hypertendus. Ce type d'hypertension peut être dû à une maladie rénale, à une maladie des glandes surrénales ou encore, à une coarctation aortique (rétrécissement congénital de l'aorte) (6). Ce type d'hypertension peut aussi être retrouvé chez les femmes lors de leur première grossesse (7). Cela dit, l'HTA est une physiopathologie qui peut être rapidement diagnostiquée chez les patients qui la développent.

L'HTA est caractérisée par une élévation anormale, permanente ou paroxystique de la PA au repos. D'après l'Organisation Mondiale de la Santé et la Société Internationale d'Hypertension, un patient est considéré hypertendu lorsque sa PA systolique est supérieure à 140 mmHg et/ou sa pression diastolique est supérieure à 90 mmHg (8). La PA dépend en partie du débit cardiaque et en partie du degré de résistance vasculaire périphérique. Lors de la contraction cardiaque, le sang est propulsé hors du cœur et circule à travers l'arbre

vasculaire qui a pour but de diminuer la PA en périphérie. Il est important de dissocier les artères de gros et de moyen calibre (aorte thoracique ou abdominale et la carotide commune), qui ont une fonction de conduction et d'amortissement, des artérioles qui distribuent et résistent à l'écoulement sanguin. Plus précisément, les artères de conductance sont des vaisseaux à prédominance élastique dont le diamètre est supérieur à 300 μm et contribuent environ à 10 % de la résistance vasculaire. Les artères de résistance, qui constituent le lit précapillaire, sont des vaisseaux plus rigides et de plus petit calibre dont le diamètre se situe entre 150 et 300 μm (9). C'est dans cette zone qu'il y a la plus importante diminution de la PA (figure I-1). Cette résistance périphérique peut être expliquée comme étant une force opposée par les artérioles et les petites artères au volume sanguin lors de la systole. D'après la Loi de Poiseuille :

$$R = \frac{8}{\pi} \times \frac{\nu \times L}{r_i^4}$$

(où R correspond à la résistance vasculaire, ν correspond à la viscosité sanguine, L correspond à la longueur du vaisseau et r_i correspond au rayon interne du vaisseau), ces deux types d'artères contribuent de façon déterminante (40 %) à la résistance de l'écoulement sanguin et par conséquent, jouent un rôle important dans le développement de l'HTA (9). Ceci est appuyé par le fait qu'une augmentation de la résistance périphérique subsiste même après une diminution du débit cardiaque. Comme la loi de Poiseuille l'indique, une simple variation du rayon interne provoquera un changement important sur la résistance vasculaire. En effet, chez des modèles d'HTA, un remodelage vasculaire est caractérisé par une réduction significative du rayon interne des petits vaisseaux (10,11).

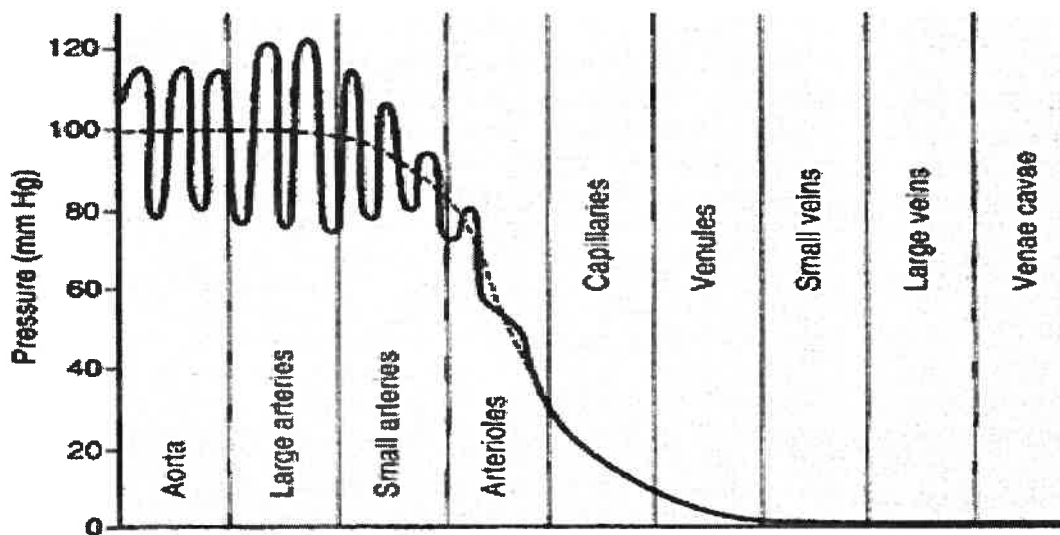


Figure I-1 : Pression artérielle retrouvée le long de l'arbre vasculaire. La PA générée par le sang diminue lorsqu'il s'éloigne du cœur en obéissant à la Loi de Poiseuille (12).

3. Le remodelage vasculaire

Le concept de remodelage vasculaire a été initialement proposé par les Drs Baumbach et Heistad pour montrer comment les artérioles cérébrales pouvaient être réduites, sans l'augmentation de la surface sectionnelle de la paroi vasculaire (13). Leur approche originale a été de dissocier, dans les modifications géométriques artériolaires d'un modèle expérimental hypertendu, deux processus : le remodelage hypertrophique et le remodelage eutrophique. Par la suite, les concepts de remodelage ont été étendus par les Dr Mulvany et Heagerty aux artérioles périphériques humaines afin de désigner toute augmentation du rapport épaisseur/rayon des artérioles survenant en l'absence d'augmentation de la surface de section pariétale (14,15). À ce jour, il existe plusieurs types de remodelage vasculaire. De prime abord, il existe trois types de remodelage : eutrophique, hypertrophique et hypotrophique. De plus, si le remodelage vasculaire est

accompagné d'une diminution ou d'une augmentation de sa lumière interne celui-ci est nommé remodelage interne ou externe respectivement (figure I-2) (16). Lors du remodelage eutrophique, le rapport épaisseur/rayon est modifié sans changement de la quantité ou des caractéristiques du matériel pariétal (16). Néanmoins, si la quantité du matériel est augmentée ou diminuée, nous parlons de remodelage vasculaire hypertrophique ou hypotrophique, respectivement (16). Dans l'HTA, les deux remodelages principaux retrouvés sont les remodelages hypertrophiques et eutrophiques. Une augmentation de la PA ou de différents facteurs associés directement ou indirectement à cette hausse de PA provoque l'épaississement de la paroi vasculaire et représente une forme d'adaptation hypertrophique.

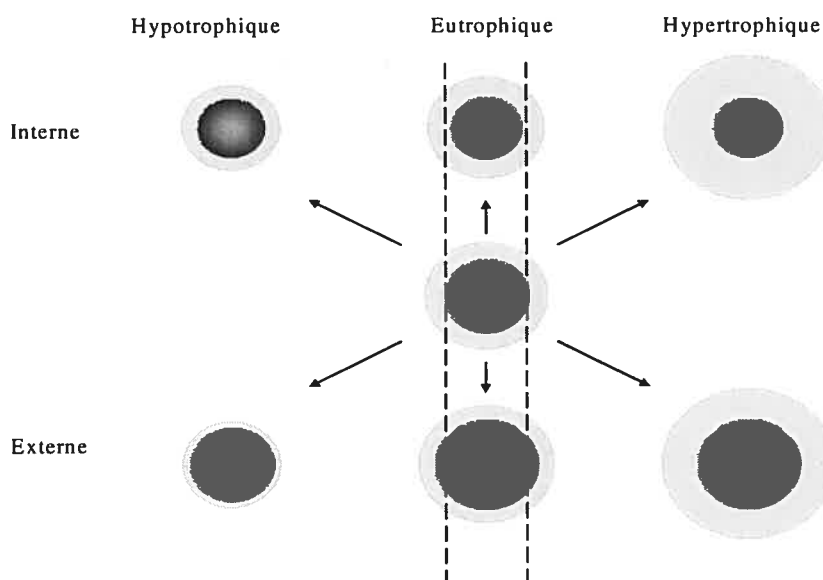


Figure I-2 : Altérations de la lumière artériolaire par le remodelage. Six modèles sont proposés par Mulvany *et coll.*(16)

Entre autres, ce type de remodelage vasculaire est observé dans les modèles expérimentaux d'HTA sévère (rats traités aux sels DOCA (*Deoxycorticosterone acetate*), ceux-ci seront discutés à la section 4.1.3) associée à une augmentation de l'ET-1 (17). L'augmentation

principale du matériel pariétal se retrouve au niveau de la média, la partie médiane et contractile de la paroi vasculaire. Cette section se compose majoritairement de cellules du muscle lisse vasculaire (CMLV) et de matrice extracellulaire (MEC). Lors du remodelage hypertrophique, ces composantes sont augmentées d'une part, par une hypertrophie et/ou une hyperplasie des CMLV et d'autre part, par une augmentation de la synthèse de MEC (les glycosaminoglycanes, le collagène, la fibronectine) par les CMLV (18,19).

Le second cas de remodelage vasculaire observé dans l'HTA est le remodelage eutrophique. Comme il a été mentionné, ce type de remodelage correspond à un remaniement autour d'une lumière vasculaire plus petite sans pour autant altérer la surface de section de la média. En plus des différents facteurs de croissance et de l'HTA, une vasoconstriction prolongée favorise de façon importante ce processus morphologique (20). Ce remodelage vasculaire se retrouve entre autres dans l'HTA essentielle humaine et dans une HTA où le SRAA (système rénine-angiotensine-aldostérone) est impliqué (21,22). Étant donné qu'il n'y a pas de variation de la surface de section de la média, cela signifie qu'il n'y a pas de croissance cellulaire nette à ce niveau et, par conséquent, suggère un mécanisme compensatoire de la synthèse du matériel de la média. Ceci permet de proposer différents mécanismes compensatoires entre la croissance et la mort programmée (apoptose) des CMLV, ainsi que la synthèse de MEC. Par conséquent, une régulation différentielle entre ces trois facteurs semble déterminer et caractériser le remodelage eutrophique (23,24). De plus, différentes molécules d'adhésion des CMLV agissent comme site de liaison du collagène et de la fibronectine. Dans l'HTA, la régulation de ces différentes molécules d'adhésion au niveau des CMLV est altérée et par conséquent, entraîne différents réarrangements des composantes de la paroi vasculaire impliquées dans le remodelage vasculaire (20). Cependant, les conditions et les mécanismes moléculaires initiateurs sous lesquels ces différentes altérations structurales se produisent sont encore mal connus. L'utilisation d'outils expérimentaux *in vivo* et *in vitro* sont nécessaires afin

d'expliquer, dans les conditions d'HTA, ces différents types d'altérations structurales et ainsi décortiquer l'implication de chacune des composantes de la paroi vasculaire.

4. Principaux modèles animaux d'HTA

L'HTA a une physiopathologie multifactorielle qui implique plusieurs interactions complexes entre différents facteurs génétiques et environnementaux. Le développement de différents modèles expérimentaux d'HTA permet de disséquer et d'isoler plusieurs facteurs qui sont associés à la régulation de la PA, des traits héréditaires d'HTA ainsi que la réponse cellulaire à différentes blessures. Néanmoins, il est important que le modèle expérimental d'HTA contienne des caractéristiques anatomiques, hémodynamiques et physiologiques cardiovasculaires similaires à l'humain. Le modèle idéal doit pouvoir développer des maladies et des complications humaines caractéristiques (hypertension, athérosclérose, insuffisance cardiaque, etc.) qui peuvent se développer de façon accélérée. Il est inévitable de mentionner qu'aucune espèce ne peut répondre à toutes ces caractéristiques et, par conséquent, le choix d'un modèle expérimental est dicté par les applications spécifiques de la recherche envisagée. Ainsi, certains des modèles les plus étudiés sont traités dans cette section.

4.1 Modèles d'hypertension expérimentaux

4.1.1 Modèle de Goldblatt

Goldblatt *et coll.* ont introduit, en 1934, le premier modèle expérimental d'HTA en induisant une constriction unilatérale de l'artère rénale (modèle 2-K, 1C, deux reins, une clamp) qui provoque ainsi une ischémie rénale (25). L'occlusion partielle 2-K, 1C

provoque une augmentation graduelle et chronique de la PA qui est influencée par le type de sténose provoqué. De plus, l'HTA rénovasculaire induite par sténose peut aussi être pratiquée en bloquant une partie de l'aorte (coarctation) entre les deux artères rénales (26,27). Dans le modèle 2K1C le SRAA est stimulé de façon prononcée pendant les premières neuf semaines et, par la suite, revient à la normale. De plus, un remodelage vasculaire eutrophique est associé à cette HTA (28). Un second modèle expérimental d'HTA est la sténose 1-K, 1C. Dans ce modèle, l'animal est néphrectomisé unilatéralement et une clamp est posée sur l'artère rénale. Ce type de modèle expérimental ressemble à un modèle de sténose rénovasculaire bilatérale (2-K, 2C). Contrairement au modèle 2-K, 1C où l'HTA est dépendante de l'élévation importante de l'activité de la rénine plasmatique, le modèle 1-K, 1C exprime, dans les premiers jours, une augmentation transitoire de l'activité de la rénine plasmatique qui retourne au niveau basal par la suite (29,30). Ainsi, le SRAA ne semble pas être impliqué de façon chronique dans ce modèle. Ceci est appuyé par le fait que des inhibiteurs du SRAA ne semblent pas diminuer la PA dans cette première étape. Cependant, une diurèse sévère accompagnée d'une perte sévère en sodium réactive le SRAA. De plus, dans le modèle 1-K, 1C la production d'ET-1 est augmentée et ceci est associée à un remodelage hypertrophique des artères (31).

4.1.2 Modèle d'HTA induite par l'Ang II

L'augmentation de la synthèse de l'Ang II provoque une hausse de la PA par l'intermédiaire de plusieurs mécanismes. En effet, ce peptide provoque la constriction des CMLV, une augmentation de la synthèse d'aldostérone, une rétention sodique ainsi qu'une activation du système nerveux central et périphérique. Chez le rat, l'infusion d'Ang II développe l'HTA et par conséquent, ressemble à un modèle d'HTA rénovasculaire humaine où la concentration de rénine est élevée. À ceci est associée un remodelage cardiaque et vasculaire ainsi que différents troubles rénaux (32-34). Aussi, une infusion intrarénale

chronique d'Ang II augmente la PA et est associée à un remodelage vasculaire préglomérulaire rénale (35).

4.1.3 Hypertension induite par les stéroïdes

Une méthode fréquente pour induire l'HTA consiste à administrer à l'animal une diète riche en sel et minéralocorticoïdes, plus particulièrement le DOCA ou l'aldostérone. L'ablation d'un rein est nécessaire pour induire une HTA sévère chez le rat (36,37). Ce type d'HTA, associé à une rétention hydrosodée, est caractérisé par une hypertrophie et une fibrose cardiaque sévère, de la protéinurie secondaire à la sclérose glomérulaire, et au niveau vasculaire, une raréfaction capillaire, une dysfonction endothéliale ainsi qu'un remodelage vasculaire hypertrophique (38-40). De plus, le niveau de rénine retrouvé chez ce modèle est très bas tandis que le niveau d'ET-1 vasculaire est augmenté. Le traitement avec des antagonistes des récepteurs de l'ET-1 de type A et B (ET_A et ET_B) permet à la fois de diminuer la PA, les modifications vasculaires et en partie les altérations cardiaques (40-42). Dans un autre ordre d'idée, les glucocorticoïdes peuvent aussi induire l'HTA chez le rat et la souris,(43) probablement en activant le SRAA, mais ils semblent moins efficaces que le DOCA (44).

4.1.4 Diète basée sur le sel

L'hérédité de la sensibilité au sel est impliquée dans l'HTA essentielle et par conséquent, plusieurs diètes riches en sel ont permis de générer des modèles d'HTA expérimentale (45). Une diète riche en sel (8% de NaCl) administrée à des rats génétiquement sensibles au sel permet de produire l'HTA chez ces derniers. En effet, le rat Dahl est une souche de rat qui est sensible au sel et est caractérisée par une HTA et une

faible fréquence cardiaque même sous une diète faible en sel (0.5% NaCl) (46). Ce modèle a une augmentation de la rétention d'eau, du sel et du volume plasmatique. De plus, il développe des lésions parenchymateuses rénales et l'activité du système nerveux sympathique est amplifiée. Chez ce modèle, une diète riche en sel active le SRAA et la production d'ET-1 qui semblent aussi impliquée dans le développement de l'HTA, le remodelage vasculaire et cardiaque (47-49).

4.1.5 Diète basée sur le sucre

Une diète riche en fructose induit à la fois une résistance à l'insuline et une hypertension chez le rat (50,51). Ces troubles métaboliques sont associés à une diminution des récepteurs à l'insuline et à une augmentation du récepteur AT₁ (52). Cependant, malgré le développement d'une résistance à l'insuline, ce type de diète ne permet pas de développer l'HTA chez le chien (53). Ainsi, le tout démontre l'implication du bagage génétique dans le développement de l'HTA et nécessite donc l'utilisation de modèles génétiquement ciblés.

4.2 Modèles d'HTA génétique

Comme il a été mentionné, l'hypertension essentielle est la forme la plus fréquente d'HTA retrouvée chez l'humain. Ici, plusieurs gènes contribuent au phénotype individuel, et ce, sous l'effet de différents allèles. Par conséquent, un seul défaut génétique ne peut pas expliquer le développement de l'hypertension essentielle chez l'humain. Le décodage du génome humain, de la souris et du rat a permis l'élaboration de différents modèles d'animaux transgéniques et génétiquement ciblés pour permettre l'étude de l'HTA. Deux approches expérimentales sont utilisées pour étudier l'HTA chez les différents modèles animaux. La première méthode est dirigée par le phénotype et prend avantage des

variations naturelles parmi certaines contraintes innées des animaux afin de quantifier certains traits et gènes qui en sont responsables. La seconde méthode est dirigée par le génotype d'un ou plusieurs gènes connus et ils sont étudiés par une approche génétique (ex : surexpression d'un gène ou invalidation d'un gène).

4.2.1 Modèle génétique naturel d'HTA

4.2.1.1 Modèle de rats spontanément hypertendus

En 1963, les Drs Okamoto et Aoki ont utilisé l'approche d'accouplement pour produire, à partir de la souche normotendue Wistar, les souches de rats spontanément hypertendus SHR ou SHRSP (SHR stroke-prone) (54,55). Cependant, la souche de rats SHR contient plus d'une contrainte génétique et, par conséquent, peut exprimer une multitude de gènes ou facteurs qui peuvent être à l'origine de l'HTA : des anomalies qui altèrent le fonctionnement du système nerveux central et périphérique, des causes hormonales et vasculaires, ainsi qu'un dysfonctionnement rénal. Ce modèle expérimental peut ainsi ressembler, de façon mendélienne, à l'hypertension essentielle retrouvée chez l'humain (39). En plus de l'HTA développée chez les rats SHR, ceux-ci développent une hypertrophie et une insuffisance cardiaque ainsi qu'une dysfonction rénale malgré leur insensibilité à une surcharge hydrosodée. Aussi, ce modèle présente une hypersensibilité artérielle à différents agents vasoconstricteurs tels l'Ang II et la noradrénaline, en plus d'avoir une dysfonction endothéliale et de développer un remodelage hypertrophique/eutrophique (56,57). Pour amplifier les contraintes cardiovasculaires des rats SHR, ceux-ci ont une raréfaction capillaire cardiaque. Cependant, le traitement avec des inhibiteurs de l'enzyme de conversion de l'Ang II (IECA) baisse la PA, le remodelage vasculaire et améliore la fonction endothéliale (56,58).

4.2.1.2 Modèle de rats SHRSP

Le rat de lignée SHRSP est considéré comme un bon modèle pour étudier les mécanismes d'hypertrophie vasculaire et cardiaque retrouvés dans un modèle d'HTA sévère ou maligne. Comme la lignée de rats SHR, celle des rats SHRSP développe plusieurs troubles cardiovasculaires, mais, contrairement aux rats SHR, les rats SHRSP sont prédisposés aux accidents cérébrovasculaires et sont très sensibles à une surcharge hydrosodée (59). Effectivement, à l'âge adulte, ces rats développent une PA systolique supérieure à 240 mmHg et meurent généralement d'hémorragie cérébrale (60). Cela dit, le SRAA semble être impliqué dans le développement de troubles cardiovasculaires dans ce modèle, car l'utilisation d'IECA retarde la progression de l'hypertrophie cardiaque, réduit le remodelage vasculaire et diminue la PA (61-63). L'utilisation d'antagonistes du récepteur AT₁ (ARA) permet de diminuer la progression de maladie rénale ainsi que l'HTA accélérée (64,65). Néanmoins, le SRAA n'est pas le seul mécanisme qui altère le système cardiovasculaire dans ce modèle. L'implication de l'ET-1 semble aussi jouer un rôle important dans le remodelage vasculaire et cardiaque. En effet, l'ET-1 semble être augmentée au niveau de l'aorte et des artères mésentériques des rats SHRSP (66). De plus, des antagonistes des récepteurs ET_A et ET_B permettent de diminuer le remodelage hypertrophique des artères cérébrales et du cœur ainsi que de prolonger la survie (67-69).

4.2.1.3 Modèle de rats hypertendus et maladies associées

Plusieurs maladies et dysfonctions métaboliques peuvent être associées avec l'HTA. Notamment, une élévation importante du cholestérol plasmatique est observée chez les rats Lyon hypertendus et, par conséquent, ressemble à ce qui est souvent observé dans l'hypertension essentielle humaine (70). D'autres modèles sont accompagnés d'obésité et de résistance à l'insuline (diabète de type 2) comme le rat obèse Zucker,(71) le rat obèse

Wistar (72) ou le modèle de rat d'obésité viscéral et hypertendu (73). Un autre modèle d'HTA et d'athérosclérose est le rat transgénique Dahl (Tg53) qui développe des maladies coronariennes et surexprime la protéine de transfert (*Cholesterol Ester Transport Protein*) hépatique humaine (74). Cette enzyme est une protéine importante du métabolisme lipidique et sa surexpression semble être impliquée dans le développement de l'HTA. Ainsi, l'ensemble de ces modèles et leur physiopathologie se rapproche cliniquement des risques cardiovasculaires retrouvés dans le syndrome métabolique.

De façon générale, dans la plupart des modèles expérimentaux dirigés en fonction du phénotype, l'HTA est associée avec une hypertrophie cardiaque, une dysfonction endothéliale et des troubles fonctionnels rénaux (protéinurie, diminution de la clairance de la créatinine). La sévérité de la maladie développée semble dépendre de l'origine animale, du bagage génétique ainsi que du degré d'HTA. Par exemple, le rat Dahl semble être plus susceptible au développement d'insuffisance rénale et cardiaque que le rat SHR qui lui en retour, développe une HTA beaucoup plus sévère (39). En effet, les rongeurs, à titre de modèles expérimentaux d'HTA, développent rarement des complications et troubles sévères associés à l'humain comme l'athérosclérose, l'infarctus myocardique, la formation d'anévrisme ou encore d'insuffisance cardiaque (39,75). De façon intéressante, dans le modèle expérimental de rat "Fawn-hooded" qui développe de l'HTA modérée ainsi que de l'insuffisance rénale chronique, la susceptibilité de développer des complications semble être guidée génétiquement et ce, de façon partiellement indépendante de l'HTA (76). Donc, ceci soulève la possibilité que la vulnérabilité de certains organes cibles à développer certaines défaillances soit indépendante de l'HTA en soi. Par conséquent, des modèles de rats génétiquement modifiés d'HTA sont requis afin d'explorer l'existence de susceptibilités spécifiques.

4.2.2 Modèles de rats génétiquement modifiés d'HTA

Les recherches en hypertension expérimentale basées sur des méthodes moléculaires ont permis de progresser de façon importante dans le domaine et d'identifier certains gènes impliqués dans certaines pathologies cardiovasculaires. Concrètement, les mutations de certains gènes qui causent les formes mendéliennes de l'HTA chez l'humain ont été identifiées comme celles impliquées dans l'expression d'hormones minéralocorticoïdiennes circulant et leur récepteur associé ou encore dans l'expression de canaux et de transporteurs ioniques rénaux (77). De plus, pour compléter ces études faites chez l'humain, certains modèles de rats génétiquement modifiés permettent de contribuer aux connaissances sur les causes génétiques possibles de l'HTA. Afin de décortiquer l'implication de certaines composantes dans le développement de l'HTA, la fonction génétique est le plus souvent étudiée par l'utilisation de modèles qui surexpriment un gène (transgénique) ou l'invalident (*knockout*).

4.2.2.1 Modèle expérimental dirigé génotypiquement et le SRAA

Dans l'HTA, l'association de polymorphismes génétiques pour le récepteur AT₁, l'angiotensinogène (AGT) et l'ECA est largement étudiés. Chez la souris et le rat, plusieurs composantes du SRAA sont étudiées par l'utilisation d'approches transgéniques et/ou d'invalidation. Tout d'abord, la souris et le rat possèdent deux sous-types du gène AT₁ (AT_{1a} et AT_{1b}) et du gène de la rénine (Ren-1d et Ren-2d). La surexpression chez la souris du gène de l'AGT de rat, avec ou sans la surexpression de la rénine de rat, provoque une augmentation de la PA (78,79). Néanmoins, l'invalidation de ce gène provoque une hypotension (80). Cette observation est aussi obtenue chez la souris, particulièrement chez les mâles, si le gène de l'ECA est invalidé (81). Effectivement, l'invalidation allélique de l'AGT, la rénine et de l'ECA réduit de 25 à 50 % la PA lorsque comparé aux souris de

types sauvages ou hétérozygotes (82). Le polymorphisme du récepteur AT₁ semble jouer un rôle important dans l'hypertension essentielle et dans la susceptibilité de certains organes à développer différentes physiopathologies (83-85). En effet, la surexpression du récepteur AT₁ induit le remodelage cardiaque, une augmentation de la rigidité et de la contractilité vasculaire à l'Ang II (86-88). Cependant, une surexpression du récepteur AT₂ stimule la production de bradykinine, de NO et de GMPc qui contribuent à la vasodilatation et atténuent le remodelage cardiaque (89,90). Certaines études démontrent que les souris qui ont un déficit en gènes AT_{1a} et AT_{1b} développent de l'hypotension artérielle ainsi que des troubles dans la croissance et la structure rénale (91,92). Cependant, un déficit pour le gène AT₂ provoque une HTA et une sensibilité au sel (93). L'effet de l'inactivation des gènes des récepteurs AT₁ et AT₂ sera discuté plus en détail à la section 7.

4.2.2.2 Modèle expérimental dirigé génotypiquement et l'ET

L'ET est un autre peptide vasoconstricteur important dans la régulation du système cardiovasculaire. Il existe chez l'homme, trois isoformes de l'endothéline : ET-1, ET-2 et ET-3. Cependant, l'endothéline principalement sécrétée par l'endothélium est l'ET-1. Les stress mécaniques, l'Ang II, la vasopressine, les catécholamines ainsi que plusieurs autres facteurs permettent la relâche de ce peptide (94). L'augmentation de l'ET-1 est associée à certaines formes d'HTA et le polymorphisme du gène ET-2, chez certains patients hypertendus, pourrait influencer la sévérité de l'HTA (95). Aussi, le polymorphisme des récepteurs de l'ET-1 est associé au développement de l'HTA (96,97). Dans le même ordre d'idée, une surexpression du gène de l'ET-1 par l'intermédiaire d'adénovirus, chez le rat, provoque une augmentation de la PA. Cependant, l'augmentation de l'ET-1, dans ce modèle, provoque une diminution de l'expression de l'ARNm et protéique du récepteur ET_A dans l'aorte, mais ne semble pas affecter le récepteur ET_B (98). Par opposition, dans un modèle de souris où le gène de l'ET-1 est invalidé, celles-ci ont des anomalies morphologiques et meurent à la naissance. Cela dit, l'activation du récepteur ET_B par l'ET-

Il favorise la vasodilatation et diminue les effets du récepteur ET_A. Effectivement, chez les souris où le gène ET_B est invalidé plutôt que celui de ET_A, la PA est plus élevée (99). Finalement, un modèle transgénique pour le gène ET-1 ciblé dans les vaisseaux sanguins a récemment été produit. Ce modèle, qui n'exhibe aucun changement au niveau de la PA, démontre une dysfonction endothéliale et un remodelage vasculaire des vaisseaux de petit calibre à caractère hypertrophique (100).

Il existe encore plusieurs autres modèles expérimentaux qui répondent à différentes problématiques cardiovasculaires. Néanmoins, l'ensemble des modèles expérimentaux mentionnés dans ce chapitre représente les modèles les plus courants en recherche cardiovasculaire. Ainsi, les différents modèles expérimentaux présentés développent de l'HTA associée à une altération de la fonction endothéliale et rénale ainsi qu'au remodelage vasculaire et cardiaque. Quelques uns de ces modèles expérimentaux plus extrêmes (Dahl sensible au sel et SHRSP) développent de l'insuffisance cardiaque, des lésions tissulaires ainsi que des accidents cérébrovasculaires. Chacun de ces modèles confère, en soi, certaines caractéristiques précises qui permettent de décortiquer les mécanismes associés à certaines dysfonctions et troubles cardiovasculaires. Ceci est autant plus important si l'on considère l'hétérogénéité et les différences génétiques chez l'humain. En effet, comme il a été mentionné plus haut, certains groupes sociaux (afro-américains vs Caucasiens) ont une prévalence plus élevée pour certains troubles cardiovasculaires. Par conséquent, l'utilisation de modèles *in vitro* permet d'approfondir, au niveau moléculaire, les multiples mécanismes impliqués dans la physiopathologie cardiovasculaire. En particulier, la culture d'organes ou de différentes souches de cellules (CMLV, CE ou cardiaques) permet de cibler certaines voies de signalisation intracellulaire d'hormones vasoconstrictrices (Ang II, ET-1 ou vasopressine) ainsi que d'autres molécules (NO, GMPc ou les dérivés réactifs de l'oxygène (DRO)) impliquées dans l'HTA.

5. Physiologie moléculaire et régulation des CMLV dans l'HTA

Les CMLV, comme la plupart des cellules musculaires, sont des cellules d'origines mésodermiques. Cependant, contrairement aux cellules musculaires cardiaques ou squelettiques qui sont irréversiblement différenciées, les CMLV sont assez flexibles et peuvent changer leur phénotype en fonction de leur environnement (101). De plus, contrairement aux cellules musculaires squelettiques (CMS) qui sont multinucléées, les CMLV sont mononucléées (101). Comme les cellules musculaires cardiaques et squelettiques, les CMLV contiennent des filaments d'actine et de myosine. Cependant, ces derniers ne sont pas organisés en myofibrilles individualisées (101). La myosine des CMLV diffère de celle des muscles squelettiques. Effectivement, l'activité de dégradation de l'ATP dans les CMLV est dix fois plus faible que celle des CMS (101). Comme pour la myosine des CMS, celle des CMLV interagit avec l'actine seulement si les chaînes légères sont phosphorylées. De plus, ces cellules ont un mode de contraction relativement différent de celui des cellules musculaires cardiaques et CMS. *In vivo*, les CMLV sont organisées dans les vaisseaux sanguins en feuillets et sont parallèles les unes aux autres. *In vitro*, cette organisation spatiale est aussi observée. Les CMLV sont associées entre elles par différentes protéines de pontage ainsi que par un réseau de MEC essentiellement composé de collagène et d'élastine (101). Par conséquent, ce type d'association joue un rôle majeur dans la structure et la fonction vasculaire. Ainsi, la modulation des CMLV (croissance, apoptose, synthèse de MEC, réorganisation du réseau cellule-cellule et cellule-MEC) dans les vaisseaux sanguins peut provoquer une altération structurelle importante pouvant mener au remodelage et à la raréfaction vasculaire retrouvée dans l'HTA (16,102).

Comme mentionné antérieurement, le lit vasculaire se compose de vaisseaux de différents calibres dont l'architecture diffère en fonction de leur rôle physiologique. De façon grossière, les vaisseaux sont structurés en trois tuniques (intima, média, adventice) distinctes superposées qui peuvent être très grandes ou réduites à une simple monocouche

cellulaire (15). L'intima est principalement constituée, de l'intérieur vers l'extérieur, d'une monocouche de cellules endothéliales et d'une fine couche de tissu conjonctif. Cette couche, qui est en contact direct avec le sang, est identique morphologiquement quel que soit le territoire vasculaire et il y a très peu de différences dans sa structure. Cependant, dans les artères élastiques, l'intima est très épaisse et peut contenir des CMLV. La média contient exclusivement des CMLV et de la MEC (fibres élastiques, fibres d'élastines, fibres de collagène et des protéoglycanes) (103). Cette tunique est très variable selon les différents territoires vasculaires et le niveau ainsi que l'architecture de ses composantes varient selon la fonction des vaisseaux. Finalement, l'adventice est peu ou très présente selon le type de vaisseau. Généralement, cette tunique externe vasculaire est constituée majoritairement de fibres de collagène et également quelques fibres élastiques épaisses, des fibroblastes, des macrophages et des lymphocytes (103). Quel que soit le type de vaisseau, son architecture est à peu près la même. Dans tous les cas, malgré des degrés différents des composites vasculaires, un équilibre entre les trois tuniques est important pour maintenir un bon fonctionnement vasculaire. Néanmoins, dans l'HTA, plusieurs facteurs contribuent à l'altération des composantes vasculaires et altèrent la fonction de ces derniers. Bien que chacune des couches, ainsi que leurs compositions, soit impliquée dans différentes fonctions vasculaires, je ne m'attarderai que sur la régulation des CMLV dans la physiopathologie de l'HTA.

5.1 Les CMLV et les agents vasoactifs

Dans l'HTA, les différentes composantes de la paroi vasculaire sont sous le contrôle de plusieurs agents vasoconstricteurs (l'Ang II, l'ET-1, la vasopressine, les DRO, les thromboxanes et les catécholamines) ou vasodilatateurs (NO, les facteurs hyperpolarisants endothéliaux, la bradykinine et les peptides natriurétiques) (104). Ces agents vasoactifs permettent de réguler la contraction vasculaire en activant ou inhibant plusieurs voies de signalisation intracellulaire. De plus, les facteurs vasoconstricteurs comme l'Ang II, l'ET-1,

la vasopressine ou l'anion superoxyde ont aussi des effets prolifératifs, tandis que les facteurs vasodilatateurs semblent avoir des effets antiprolifératifs (104). Dans l'ensemble, ces agents régulent les mécanismes contractiles et la croissance des CMLV ainsi que la production de MEC. L'Ang II, principale hormone effectrice du SRAA, joue un rôle important dans la régulation de la PA ainsi que dans le développement de la physiopathologie de l'HTA.

6. Le système rénine angiotensine aldostérone

6.1 L'Ang II

Le SRAA (figure I-3) est l'un des plus importants systèmes régulateurs de la PA. Les différents processus enzymatiques qui mènent à la génération d'Ang II sont bien établis. De façon générale, l'AGT, une prohormone, est synthétisée et libérée en concentration variable à travers le système (foie, cerveau, glandes sexuelles et autres tissus et organes) et est hydrolysée par la rénine en un décapeptide, l'Ang I. La rénine active, qui est synthétisée et stockée par les cellules juxtaglomérulaires de l'artériole afférente du glomérule rénal, est l'une des étapes limitantes dans le processus de synthèse de l'Ang II (105). La rénine active est sécrétée en réponse à quatre mécanismes régulateurs majeurs: les barorécepteurs rénaux, la macula densa, la stimulation des récepteurs β_1 par les nerfs rénaux et certains facteurs humoraux (PGI_2 , NO, facteur hyperpolarisant dérivé de l'endothélium). Une fois sécrétée, la rénine ou même la prorénine peuvent se lier à différents récepteurs (mannose-6-phosphate et *N*-acyl-D-glucosamine 2 épimérase) et permet la synthèse d'Ang I. Toutefois, la liaison de la rénine à ces récepteurs n'est pas requise afin de libérer l'Ang I. Cependant, l'association de rénine avec ses récepteurs permet l'activation de voies de signalisation comme celle des ERK1/2 impliquées dans la croissance cellulaire (106). Cela dit, la synthèse de rénine active permet d'augmenter le niveau d'Ang I (105). À son tour, l'Ang I peut être clivée en octapeptide actif, l'Ang II,

sous l'activité enzymatique de l'ECA. Cependant, l'activité enzymatique de l'ECA n'est pas sélective à l'Ang I. En effet, celle-ci clive une variété d'autres peptides comme la bradykinine, les enképhalines et la substance P (107). Sur une base cinétique de l'activité enzymatique, l'ECA agit plus comme une enzyme kinase qu'une enzyme convertase ou encore, comme une enzyme enképhalinase. Effectivement, le K_m de l'ECA pour la bradykinine est très petit comparativement à celui de l'Ang I (107). Par conséquent, l'activation de l'ECA favorise la dégradation de la bradykinine (un vasodilatateur) et favorise la synthèse de l'Ang II (un vasoconstricteur).

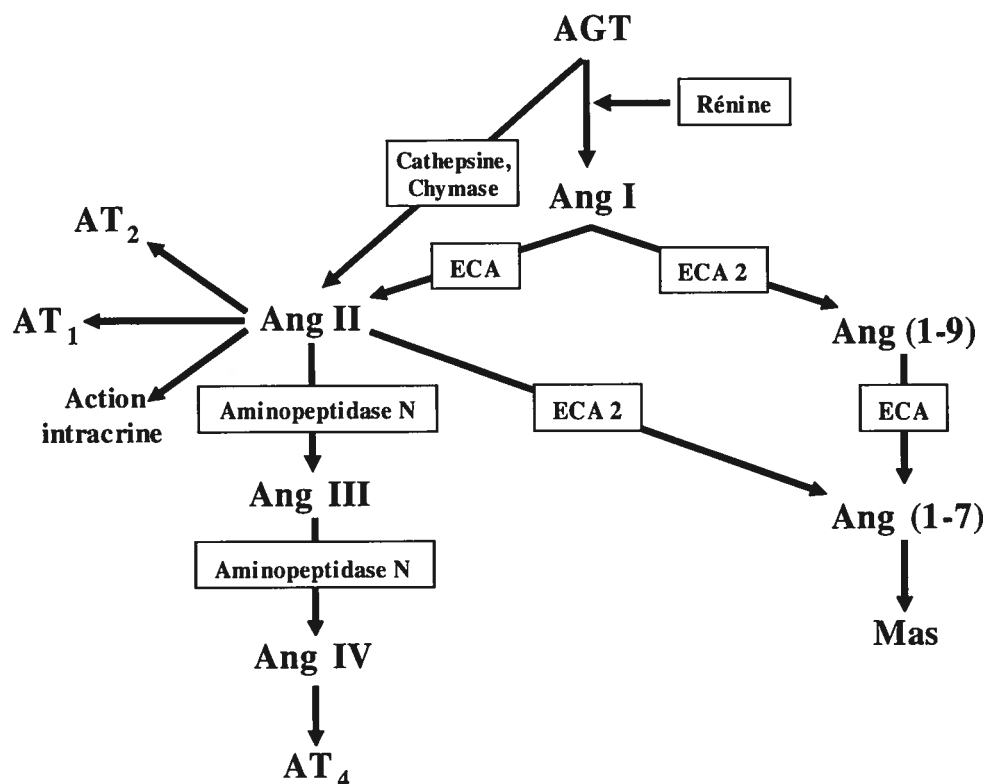


Figure I-3 : Système rénine-angiotensine aldostérone. Cascades enzymatiques et synthèse de l'Ang II et de ses dérivés à partir de l'AGT. Modifié de la référence (108)

L'Ang I qui est transformée en Ang II peut se produire partiellement au niveau du poumon, où le niveau d'ECA endothéliale est très élevé, ou au niveau tissulaire par l'action de l'ECA de la paroi vasculaire. De plus, des études faites sur des CMLV en culture démontrent que l'Ang II peut aussi être produite par l'intermédiaire de la cathepsine D ou G à partir d'AGT intracellulaire (109). À ceci s'ajoute différentes études qui démontrent la production d'Ang II par l'action enzymatique de la chymase (110). Cette dernière semble être impliquée dans la physiopathologie de l'HTA et un modèle de souris transgénique qui surexprime cette enzyme démontre plusieurs troubles cardiovasculaires (110,111). Une fois synthétisée, l'Ang II peut se lier à ses récepteurs et activer plusieurs voies de signalisation impliquées dans la synthèse d'autres facteurs importants pour le système cardiovasculaire. En effet, l'Ang II peut lier le récepteur AT_1 au niveau des glandes surrénales où elle favorise la synthèse d'une hormone minéralocorticoïde, l'aldostérone. Cette dernière joue un rôle crucial dans le maintien de la volémie plasmatique et de la PA via son action sur le rein. L'aldostérone est synthétisée au niveau de la zone glomérulée de la surrénale et excrétée dans la circulation sanguine. Ses récepteurs se situent essentiellement au niveau du tube contourné distal où elle favorise la réabsorption de Na^+ et l'excrétion de K^+ . Ses récepteurs se trouvent aussi dans les cellules vasculaires et les cellules cardiaques (112,113). Dans ces tissus, l'aldostérone augmente la production de collagène ce qui entraînerait une augmentation de la résistance vasculaire, du remodelage cardiaque et vasculaire, favorisant le développement de l'HTA (114). De plus, l'aldostérone favorise la dysfonction endothéliale. Comme pour l'Ang II, l'aldostérone semble promouvoir ses effets en partie par l'augmentation de la synthèse des DRO (115).

6.2 Les dérivés de l'Ang II

L'Ang II est l'agent actif principal du SRAA et il joue un rôle important dans l'HTA. Néanmoins, plusieurs autres composantes du SRAA jouent un rôle important dans les mécanismes régulateurs du système cardiovasculaire que se soit pour potentialiser ou

atténuer les effets hypertenseurs de l'Ang II. En effet, plusieurs autres dérivés de l'Ang II et de l'Ang I sont connus. L'Ang I peut être transformé en Ang (1-9) par un homologue de l'ECA, l'ECA 2 et est par la suite converti en Ang (1-7). Ce dernier peptide peut aussi être synthétisé directement suite à la conversion de l'Ang II par l'ECA 2. L'Ang (1-7) semble pouvoir contrebalancer les effets de l'Ang II dans le système cardiovasculaire en ayant des effets vasodilatateurs et cardioprotecteurs (116). Santos *et coll.* ont publié que le proto-oncogène *Mas* codant pour le récepteur Mas pouvait être un récepteur endogène pour l'Ang (1-7) et que celui-ci pouvait interagir avec le récepteur AT₁ (117,118). L'Ang (1-7) n'est cependant pas le seul métabolite actif de l'Ang II. Effectivement, l'Ang II peut être converti en Ang III par l'intermédiaire d'une glutamyl-aminopeptidase A (119). Ce métabolite permet, tout comme l'Ang II, de lier les récepteurs AT₁ et AT₂ et d'augmenter la production de l'hormone antidiurétique au niveau cérébral et induire une élévation de la PA. L'Ang III peut aussi être métabolisée en Ang IV par l'action d'une arginyl-aminopeptidase N. Ce peptide induit ses effets en liant le récepteur AT₄ récemment identifié comme l'aminopeptidase membranaire IRAP (*insulin-regulated membrane aminopeptidase*). L'IRAP est retrouvé dans plusieurs tissus comme les glandes surrénales, les poumons, le cœur, le cerveau et les reins (120). Au niveau cérébral (l'hippocampe), l'Ang IV semble jouer un rôle pour la mémoire tandis qu'au niveau du cortex rénal, ce peptide joue un rôle sur l'augmentation du flot sanguin (121).

6.3 Effets physiologiques de l'Ang II

Le SRAA altère la PA par l'intermédiaire de différents effets tissulaires comme : la vasoconstriction, l'augmentation de l'activité du système nerveux sympathique, le changement de la structure et des fonctions du lit vasculaire ainsi que par des modifications dans l'homéostasie des fonctions rénales (104). Néanmoins, les modifications de la PA par l'Ang II peuvent être régulées par des effets aigus ou chroniques de l'Ang II. Ces différents

types d'effets sont des processus majeurs dans le développement de l'HTA et les troubles cardiovasculaires qui peuvent lui être associés.

6.3.1 Effets physiologiques aigus de l'Ang II

Une fois synthétisée, l'Ang II peut lier les récepteurs AT₁ et AT₂ au niveau de différents types cellulaires (CMLV, CE, cardiomyocytes, fibroblastes, monocytes et polymorphonucléaires) retrouvés dans plusieurs tissus et induire plusieurs effets stimulateurs. La plupart des actions rapides de l'Ang II se produisent lorsqu'il y a une baisse de la volémie plasmatique et de la PA. Physiologiquement, une augmentation de la rétention sodique au niveau tubulaire rénale, une augmentation de la sécrétion d'aldostérone et d'hormones antidiurétiques ainsi qu'une vasoconstriction diminuant la capacité de l'arbre vasculaire sont observées suite à une baisse du volume sanguin. De plus, l'Ang II peut aussi augmenter la PA en augmentant la libération de catécholamines des terminaisons nerveuses sympathiques (122).

6.3.2 Effets physiologiques chroniques de l'Ang II

L'administration chronique de faibles doses (sous-presseur) d'Ang II pendant quelques jours ou semaines chez le rat entraîne une augmentation de la PA, des modifications trophiques au niveau du cœur et des vaisseaux sanguins, une hypertrophie des cellules contractiles cardiaques et vasculaires ainsi qu'une augmentation de la synthèse de MEC (104). Aussi, ces effets semblent être provoqués par l'activation du récepteur AT₁. L'utilisation d'agents synthétiques hypotenseurs qui préviennent la synthèse de l'Ang II (IECA) ou bloquent son action sur le récepteur AT₁ (les ARA) peuvent retarder ou même renverser l'hypertrophie ventriculaire gauche ainsi que certaines modifications structurales

(remodelage) vasculaires dans l'HTA humaine (104). Une stimulation chronique à l'Ang II provoque des effets inflammatoires en stimulant la migration des monocytes et des cellules polymorphonucléaires. La synthèse de plusieurs marqueurs inflammatoires est aussi observée. En effet, des cytokines et leurs récepteurs associés, des protéines d'adhésion (VCAM-1 (*Vascular cell adhesion molecule-1*), ICAM-1 (*Intercellular adhesion molecule-1*), PECAM (*Platelet endothelial cell adhesion molecule*), MCP-1 (*Monocyte chemoattractant protein-1*)), les DRO ainsi que plusieurs facteurs de transcription (NF κ B (*Nuclear factor κ B*) et AP-1 (*Activator protein-1*)) sont augmentés par une infusion prolongée à l'Ang II (104,123,124). Par conséquent, le tout contribue au remodelage et à la dysfonction des composantes du système cardiovasculaire.

6.3.3 Régulation des mécanismes activateurs de l'Ang II

Les effets aigus et chroniques de l'Ang II peuvent être augmentés ou diminués par la libération d'autres hormones et peptides en réponse à l'Ang II. En effet, la synthèse et la libération de l'aldostérone et de catécholamines sont augmentées par l'Ang II (125). Comme il a été expliqué précédemment, ces hormones sont impliquées dans l'augmentation du volume sanguin ainsi que dans le maintien de la PA. En plus de ces effets fibrotiques dans le cœur et les vaisseaux sanguins, l'aldostérone amplifie aussi les effets de l'Ang II sur la libération d'inhibiteur de l'activateur de plasminogène au niveau de l'endothélium (126,127). Aussi, l'Ang II augmente la libération d'ET-1 et de thromboxane au niveau de l'endothélium qui contribuent aussi à la vasoconstriction. Les effets rapides de l'Ang II sur la stimulation de la croissance, de la fibrose et l'inflammation dans le système cardiovasculaire peuvent être amplifiés par la transactivation de différents facteurs de croissance (PDGF (*Platelet-derived growth factor*), EGF (*Epidermal growth factor*), TGF β (*Tumor growth factor β*) et IGF-1 (*Insulin-like growth factor-1*)). De plus, l'Ang II amplifie ces effets hypertenseurs et hypertrophiants sur le système cardiovasculaire en favorisant la production de DRO (128). Effectivement, l'activation du récepteur AT₁ stimule la

formation de DRO comme le peroxyde d'hydrogène et le superoxyde qui peuvent endommager les lipides de la membrane cellulaire, certaines protéines et acides nucléiques. D'une part, les DRO peuvent augmenter la contraction et la croissance des CMLV et d'autre part, ils peuvent favoriser la dysfonction endothéliale en endommageant les CE (128). Cela dit, les effets rapides de l'Ang II peuvent aussi protéger les reins et autres organes vitaux d'une vasoconstriction excessive en augmentant la production de NO et de prostacycline (PGI_2) vasculaire (128,129). Néanmoins, les effets protecteurs de l'Ang II semblent être surmontés dans l'HTA et autres maladies cardiovasculaires par les différents effets mentionnés ci-haut.

7. Les récepteurs de l'Ang II

L'Ang II peut induire une cascade d'évènements biochimiques intracellulaires en agissant via deux types de récepteurs (AT_1 et AT_2) bien caractérisés. Malgré que ces deux récepteurs partagent uniquement 34 % de leur séquence en acides aminés, ceux-ci ont une affinité très élevée pour l'Ang II et virtuellement aucune pour l'Ang I (130). Pour sa part, l'Ang III ne semble pas avoir de récepteur spécifique, mais semble toutefois avoir une affinité pour les récepteurs AT_1 et AT_2 (121). L'Ang IV peut lier ces récepteurs de façon très modeste ainsi que lier le récepteur AT_4/IRAP . Finalement, l'Ang (1-7) ne lie pas les récepteurs de l'Ang II mais semble être spécifique pour le récepteur Mas (121).

7.1 Le récepteur AT_1

L'utilisation de différents ARA démontrent que le récepteur de type AT_1 médie la plupart des effets classiques de l'Ang II. Entre autres, l'Ang II induit via ce récepteur l'augmentation de la PA, la vasoconstriction, la stimulation de l'aldostérone et du système sympathique, la rétention rénale de sodium et d'eau, la croissance, la migration, l'apoptose

et la différenciation cellulaire (130). Le récepteur AT₁ est hautement distribué dans les tissus adultes comme les vaisseaux sanguins, le cœur, les reins, les glandes surrénales, le foie, le cerveau et les poumons (131). Chez l'humain, le gène du récepteur AT₁ est localisé sur le chromosome 3q24 et chez le rat, deux sous-types du récepteur AT₁, AT_{1a} et AT_{1b}, se retrouvent sur les chromosomes 17 et 2 respectivement (131). Ces deux isoformes ont en plus de leur grande homologie de séquence en acides aminés (96%) et en acides nucléiques (92%), des propriétés pharmacologiques similaires (130). Malgré le fait que ces deux isoformes du récepteur AT₁ ont une affinité similaire pour l'Ang II, plusieurs études démontrent que le récepteur AT_{1a} est le récepteur majoritairement impliqué dans la régulation de la PA. En effet, chez des souris invalidées pour le gène AT_{1a}, la PA est plus basse que chez les souris de type sauvage ou hétérozygote (132). De plus, une étude utilisant ce même type de souris a démontré l'importance de l'expression du récepteur AT_{1a}, et non pas du récepteur AT_{1b}, dans l'augmentation des sous-unités de la NAD(P)H oxydase de CE aortique de souris insulino-résistantes associée à la dysfonction endothéliale (133). Néanmoins, l'infusion d'Ang II, chez les souris invalidées pour le gène AT_{1a}, provoque une augmentation de la PA, laquelle peut être diminuée par un traitement avec un ARA. Par conséquent, ces données suggèrent l'implication du récepteur AT_{1b} dans le développement de l'HTA (134). Cependant, chez les souris invalidées pour le gène AT_{1b}, aucune variation significative de la PA n'est observée lorsque comparée aux souris de type sauvages ou hétérozygotes (91). Ainsi, le récepteur AT_{1a} semble prendre en charge les fonctions du récepteur AT_{1b} mais l'inverse ne semble pas être observé. Finalement, chez des souris dont les gènes pour les récepteurs AT_{1a} et AT_{1b} sont simultanément invalidés, une PA, un poids corporel, cardiaque et rénale plus faible sont observés comparativement aux souris de type sauvage. De plus, ces altérations semblent affecter les reins et les vaisseaux sanguins. Effectivement, dans ce modèle de souris, la structure rénale est altérée et une hypertrophie vasculaire rénale est observée (91). Ces conditions peuvent être secondaires à la baisse de PA et à l'hypoperfusion rénale.

7.2 Les antagonistes du récepteur AT₁

Plusieurs études cliniques (SOLVD, SAVE, AIRE, HOPE) ont démontré les effets bénéfiques d'un blocage chronique du SRAA chez des patients qui sont porteurs de certains troubles cardiovasculaires (135). Entre autres, l'utilisation d'IECA (captopril, quinapril, enalapril et ramipril) peut, dans certains cas, diminuer la PA, le risque d'infarctus du myocarde et d'insuffisance cardiaque, diminuer la progression de l'athérosclérose et du remodelage cardiaque ainsi que le taux de mortalité (136). Néanmoins, l'ECA dégrade la bradykinine et d'autres kinines en métabolites inactifs. L'inhibition de l'ECA est associée à une potentialisation des effets endogènes des kinines, ce qui est l'un des effets recherchés des IECA pour la protection des organes. Cette potentialisation des effets endogènes des kinines peut aussi provoquer chez certains patients de la toux sèche et exceptionnellement l'œdème angionévrotique (135). Malgré le fait que les IECA aient été les seuls médicaments disponibles jusqu'à 1995 à pouvoir interférer avec le SRAA, il a été rapidement démontré que d'autres enzymes comme la chymase, la CAGE (*chymostatin-sensitive Ang-II generating enzyme*), la cathepsine G ou encore l'activateur tissulaire du plasminogène pouvaient aussi produire de l'Ang II disponible pour le récepteur AT₁ (135). Ainsi, il a été nécessaire de produire des agents plus sélectifs du SRAA afin de mieux contrôler les effets de l'Ang II. D'une part, des antagonistes peptidiques (la saralaline, la sarilesine et la sarmesine) du récepteur AT₁, basés sur la séquence de l'Ang II, ont été conçus. Ces agents devaient être utilisés par voie intraveineuse, donc leur utilité potentielle chez l'humain était limitée. D'autre part, au milieu des années 80, Takeda a développé des drogues synthétiques non peptidiques qui interfèrent avec le SRAA (135). Effectivement, ces antagonistes du récepteur AT₁ ont été conçus et développés pour être des antagonistes compétitifs dépourvus d'effets activateurs au niveau du récepteur. Le losartan a été le

premier antagoniste non peptidique du récepteur AT_1 et, par conséquent, la famille des sartans a ainsi été créée. Par la suite, d'autres ARA comme l'irbesartan, le candesartan, le valsartan, l'éprosartan, le tasosartan et le telmisartan ont été produits afin d'améliorer la condition cardiovasculaire (135).

À ce jour, les sartans sont subdivisés en antagonistes surmontables (compétitifs et réversibles) et insurmontables (non-compétitifs et irréversibles) dont les propriétés pharmacocinétiques comme l'affinité et la durée d'activité guident les effets de l'Ang II. Les antagonistes surmontables (losartan, eprosartan et telmisartan) permettent de déplacer la courbe dose-réponse de l'Ang II vers la droite sans pour autant affecter l'effet maximal de l'Ang II. Pour leur part, les antagonistes insurmontables (métabolite actif du losartan, irbesartan, valsartan et candesartan) provoquent une diminution de l'effet maximal de l'Ang II (137). Certains de ces antagonistes, comme le losartan ou le candesartan, sont administrés sous une forme inactive ou partiellement active et nécessitent d'être métabolisés par le foie ou la paroi intestinale avant d'être transformés en forme active (135). Le losartan est particulier dans sa fonction, car même à l'état non métabolisé, celui-ci présente un effet antagoniste important. Néanmoins, le métabolite EXP3174, produit par l'oxydation du losartan par le cytochrome P450 (CYP450), présente un potentiel de 10 à 40 fois plus élevé que le losartan en plus de pouvoir se lier de façon non compétitive au récepteur AT_1 (135). Cela dit, les effets antagonistes du losartan et de son métabolite EXP3174 sont additifs et suggèrent le losartan comme une prodrogue (135). Dans un autre ordre d'idée, certains de ces ARA démontrent des effets indépendants de ceux observés par le blocage du récepteur AT_1 . Effectivement, une étude récente démontre l'activation partielle du récepteur $PPAR\gamma$ par le telmisartan, l'irbesartan et le losartan. Néanmoins, l'activation de $PPAR\gamma$ par ces agonistes partiels, se réalise à des concentrations différentes. Des concentrations faibles de telmisartan, intermédiaires d'irbesartan et très élevées de losartan permettent d'activer le récepteur $PPAR\gamma$ dans la lignée cellulaire de fibroblastes 3T3-L1 (138). Ces différences sont attribuées aux propriétés physico-chimiques des sartans.

En effet, une forte lipophilicité est requise pour obtenir une absorption suffisante de façon à ce que les molécules puissent se lier aux récepteurs PPAR γ . De plus, l'activation des récepteurs PPAR γ par ces ARA est observée même en l'absence de récepteurs AT $_1$ et suggère ainsi que l'activation de PPAR γ est indépendante du blocage des récepteurs AT $_1$. Par conséquent, ces observations démontrent de nouveaux effets pléiotropes de certains ARA susceptibles de pouvoir expliquer certains effets insulinosensibilisateurs et/ou antidiabétiques (139,140).

7.3 L'oligomérisation des récepteurs AT $_1$

Plusieurs études portées sur les récepteurs couplés aux protéines G (RCPG) démontrent la possibilité d'interaction entre certains de ceux-ci pour former des homo-oligomères ou des hétéro-oligomères. D'une part, l'homo-oligomérisation de plusieurs RCPG comme les récepteurs β 2-adrénrgiques, muscariniques, dopaminergiques D2 a été reportée suite à une stimulation par leur agoniste (130). De plus, une étude démontre que le récepteur AT $_1$ peut s'homodimériser dans les cellules monocytaires. Cette étude confirme, entre autres, que le facteur XIIIa (une transglutaminase) induit une homodimérisation des récepteurs AT $_1$, chez les patients hypertendus (141). Aussi, l'homodimérisation des récepteurs AT $_1$ augmente l'accumulation d'inositol phosphate et la mobilisation de calcium de façon plus importante que les récepteurs AT $_1$ retrouvés sous leur forme monomérique. D'autre part, il a été démontré que l'activité du récepteur AT $_1$ peut être significativement augmentée par son association avec le récepteur de type 2 de la bradykinine (B $_2$). Effectivement, l'association des récepteurs AT $_1$ et B $_2$, stimulée par l'Ang II, permet d'augmenter la mobilisation du calcium et l'accumulation d'inositol phosphate dans les cellules mésangiales et les CMLV (142,143). Aussi, l'association de ces deux récepteurs favorise la production de DRO vasculaire impliqués dans l'HTA (144). Dans les cellules du tubule proximal rénal, le récepteur AT $_1$ s'associe avec le récepteur dopaminergique D $_5$ tant chez le rat WKY que chez le rat SHR. La stimulation de ces cellules par l'Ang II semble

affecter les niveaux d'expression de ces récepteurs ainsi que leur association (145). Dans ces mêmes cellules, une autre étude démontre que le récepteur AT₁ peut s'associer avec le récepteur ET_B et régule son niveau d'expression chez le rat SHR (146). Aussi, certaines études démontrent que l'hétérodimérisation du récepteur AT₂ avec le récepteur AT₁ inhibe les voies de signalisation de ce dernier et que cet effet antagoniste est indépendant de la liaison de l'Ang II sur le récepteur AT₂. En effet, le récepteur AT₂ a été rapporté comme un récepteur constitutivement actif qui permet de diminuer les effets activateurs du récepteur AT₁ sur la migration et la croissance cellulaire de CMLV (130,147). Cela dit, que ce soit l'homo-oligomérisation ou l'hétéro-oligomérisation du récepteur AT₁ avec lui-même ou d'autres RCPG, une perturbation des interactions intermoléculaires entre ces récepteurs semble altérer la fonction du récepteur AT₁. Ce type de notion permet ainsi de proposer de nouvelles approches pharmacologiques dans le traitement de maladies cardiovasculaires comme l'HTA.

7.4 Les voies de signalisation du récepteur AT₁

L'Ang II induit directement ses effets par son association avec ses récepteurs, indirectement via la libération d'autres facteurs ou encore, en interférant avec les voies de signalisation d'autres agents vasoactifs. Néanmoins, une fois l'Ang II lié au récepteur AT₁, des cascades moléculaires importantes sont initiées au niveau membranaire (protéines G), intracellulaire et nucléaire. Entre autres, ces cascades d'évènements sont impliquées dans plusieurs mécanismes régulateurs et activateurs intracellulaires. Ainsi, dépendamment du type cellulaire et de son environnement ou de la fréquence d'activation (aiguë ou chronique) du récepteur AT₁ par l'Ang II, différentes voies de signalisation sont activées. Ceci implique que les effets de l'Ang II et les voies de signalisation induites peuvent être multiphasiques avec des caractéristiques temporelles bien distinctes. Par conséquent, il serait trop ambitieux de discuter de l'ensemble des protéines connues impliquées dans les voies de signalisation induite par l'Ang II. Ainsi, je m'attarderai à certaines voies

classiques majeures retrouvées dans le système cardiovasculaire qui sont impliquées dans la croissance cellulaire et l'inflammation retrouvée dans l'HTA (figure I-4).

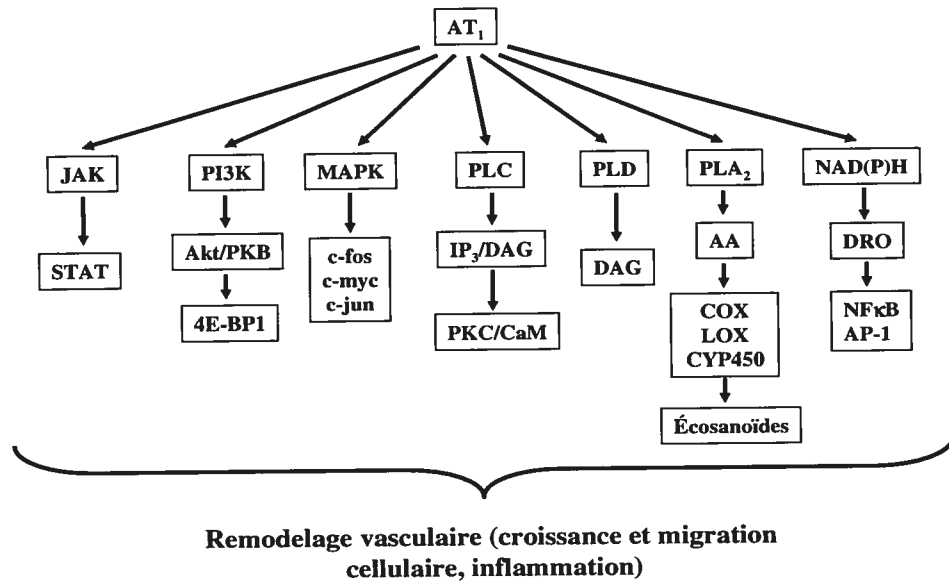


Figure I-4 : Schéma des principales voies de signalisation activées par le récepteur AT₁.

7.4.1 Le récepteur AT₁ et les protéines G hétérodimériques

Le récepteur AT₁ est un récepteur à sept domaines transmembranaires dont la queue aminoterminal est extracellulaire et la queue carboxyterminale est intracellulaire. Ce récepteur de 359 acides aminés, dont le poids moléculaire est de 41 kDa, est dépourvu d'activité tyrosine kinase intrinsèque et est un membre de la famille des RCPG qui lie les protéines G hétérodimériques (130). L'interaction du récepteur AT₁ avec différentes protéines G comme les protéines G_{q/11}, G_{i/o}, G_{α12}, et G_{α13} induit différentes cascades signalétiques intracellulaires spécifiques responsables du contrôle cellulaire et de sa fonction (128). Par exemple, dans les CMLV, l'association du récepteur AT₁ avec la protéine G_{q/11} induit l'activation de la phospholipase (PL) C et par conséquent, augmente la

libération de Ca^{2+} intracellulaire responsable des effets vasomoteurs de l'Ang II (128,131). Néanmoins, l'association du récepteur AT_1 avec des protéines de la classe $\text{G}_{i/o}$, au niveau du rein et des glandes surrénales, diminue la formation d'AMPc par l'adénylate cyclase. Jusqu'à présent, plusieurs études ont accordé une importance particulière aux protéines G hétérotrimériques et leur implication possible dans l'HTA. Entre autres, la comparaison entre le rat WKY et le rat SHR n'a démontré aucune différence significative des niveaux d'expression des différentes protéines G hétérodimériques, $\text{G}_{q/11}$ et $\text{G}_{i/o}$ dans les CMLV d'artères mésentériques (148). Cependant, une étude réalisée par Siffert *et coll.* démontre que le niveau de sous-unité G_β dans les lymphoblastes et fibroblastes humain, est impliquée dans le développement de l'HTA (149). Dans le même ordre d'idée, une étude épidémiologique démontre qu'une mutation au niveau de la cytosine 825 du gène de la sous-unité G_β est fortement associée à l'HTA retrouvée chez des patients afro-américains hypertendus et chez des patients hypertendus d'origine européenne (150).

7.4.2 Les phospholipases dans l'HTA

Tel que mentionné précédemment, le récepteur AT_1 se retrouve, entre autres, sur les monocytes, les polymorphonucléaires, les CE, les CMLV, les cardiomyocytes et les fibroblastes. Dans ces cellules, le récepteur AT_1 induit l'activation des PLC, PLD et PLA_2 . En premier lieu, l'activation de la PLC est l'un des premiers événements induits par l'Ang II suite à sa liaison avec le récepteur AT_1 . Il existe trois isoformes de la PLC (PLC- β , PLC- γ et PLC- δ) qui hydrolysent rapidement le phosphatidylinositol 4,5-bisphosphates ($\text{PI}(4,5)\text{P}_2$) pour générer l'inositol 1,4,5-triphosphate (IP_3) et le diacylglycérol (DAG) (128). Ces seconds messagers permettent d'induire la libération du Ca^{2+} du réticulum endoplasmique et, ainsi, modulent l'activité des enzymes Ca^{2+} -dépendantes telles que la protéine kinase (PK) C et la Ca^{2+} /calmoduline (CaM) kinase qui entraîne la contraction des CMLV (128). En effet, il a été démontré que l'activation de la PLC- β par l'Ang II corrèle

temporellement avec la contraction de CMLV isolées ou obtenus d'artères de résistance intactes (151). De plus, cette augmentation de Ca^{2+} intracellulaire permet l'activation de la PKC et la régulation du pH intracellulaire via l'échangeur Na^+/H^+ (152). Finalement, des études démontrent que dans les CMLV, la PLC- β est impliquée dans la phase rapide qui suit l'activation du récepteur AT_1 par l'Ang II tandis que la PLC- γ semble être impliquée pendant la phase tardive d'activation (152). À ce jour, il y a peu d'information disponible en ce qui concerne la PLC- δ . Néanmoins, la PLC- $\delta 1$ semble être activée par une protéine G atypique appelée G_h qui joue également le rôle d'une transglutaminase. L'activation de cette enzyme semble être plus sensible au niveau de Ca^{2+} par rapport aux autres isoformes de la famille PLC. Aussi, le niveau d'expression et d'activité de la PLC- δ associé à l'HTA est plus élevé dans l'aorte du rat SHR comparativement aux rats contrôles (153).

Contrairement à la PLC qui est impliquée dans l'hydrolyse de phosphatidylinositol, la PLD, qui regroupe deux isoformes (PLD₁ et PLD₂), hydrolyse la phosphatidylcholine. En effet, le récepteur AT_1 activé recrute la sous-unité $\beta\gamma$ de la protéine $G_{\alpha 12/\beta\gamma}$ et active la PLD via Src et RhoA (154). Une fois la cascade déclenchée, la PLD hydrolyse la phosphatidylcholine en choline et en acide phosphatidique. L'acide phosphatidique est ensuite transformé en DAG sous l'action de la phosphatidate phosphohydrolase (128). Donc, le DAG est le produit de deux voies de signalisation distinctes (PLC et PLD) et lui confère ainsi une importance temporelle dans la régulation des fonctions cellulaires. Effectivement, la stimulation par l'Ang II de CMLV ou de cardiomyocytes induit la synthèse de DAG de façon biphasique. Une première étape de synthèse de DAG par la PLC se produit lors des premiers instants de la stimulation par l'Ang II; puis, une seconde étape de synthèse est obtenue par l'intermédiaire de la PLD. Ainsi, la première étape (PLC), dite rapide et transitoire, précède l'étape longue et soutenue (PLD), ce qui permet de maintenir un niveau élevé de second messagers dans la cellule (155,156). Aussi, l'activation de la PLD par l'Ang II semble être impliquée dans la production d'anions superoxyde par la NAD(P)H qui, en retour, stimule la libération du Ca^{2+} intracellulaire et favorise la croissance cellulaire ainsi que la

contractilité vasculaire (128). Cela suit le même ordre d'idée si l'on considère que dans les CMLV de rats SHR, l'activité de la PLD est plus élevée que dans les CMLV de rats WKY suite à des stimulations à l'Ang II (157). Parallèlement à cette étude, notre laboratoire a démontré que cette augmentation d'activité est aussi observée dans des CMLV de patients hypertendus (158). Par contre, l'inhibition de cette enzyme diminue les effets mitogéniques induits par l'Ang II dans les CMLV (159). Par conséquent, la PLD semble être une composante majeure dans la transmission des effets activateurs de l'Ang II sur la croissance et la contractilité cellulaire retrouvée dans l'HTA.

La troisième PL activée par le récepteur AT_1 est la PLA_2 . L'activation de cette enzyme permet la synthèse d'acide arachidonique (AA) à partir des phospholipides de la membrane cellulaire. Au niveau du tissu rénal, vasculaire et cardiaque, l'AA est métabolisé par les cyclooxygénases (COX), les lipoxygénases (LOX) ou le CYP450 en différents eicosanoïdes. Les COX catalysent la formation de prostaglandines (PG), thromboxane A_2 (TxA_2) et PGI_2 . Les LOX catalysent la formation de leukotriènes, de 5-, 12-, ou 15-acides hydroperoxyeicosatetraénoïques (HPETEs) et d'acides hydroxyeicosatetraénoïques (HETEs). Finalement, le CYP450 monooxygénase catalyse l'AA en acides époxyeicosatriénoïques (EETs) et en produits d'hydroxylation ω et ω_1 20-HETE et 19-HETE (160). Les eicosanoïdes dérivés de l'AA par la PLA_2 sont impliqués dans les mécanismes vasculaires et rénaux qui contribuent à la régulation de la PA. Ces effets sont médiés via le récepteur AT_1 dans les CMLV et les CE. Cependant, dans les cardiomyocytes, les neurones et les cellules épithéliales du tubule proximal rénal de rats néo-nataux, l'Ang II induit ses effets par l'intermédiaire du récepteur AT_2 (161). Au niveau vasculaire, l'activation initiale de la PLA_2 par l'Ang II semble être dépendante de la concentration de Ca^{2+} intracellulaire, de la Ca^{2+} /CaM kinase II et des MAPK (*mitogen-activated protein kinase*) (160,161). Par la suite, une boucle d'activation positive s'enclenche lorsque la PLA_2 et ses métabolites alimentent la voie de signalisation Ras/MAPK qui, amplifie l'activité de la PLA_2 et augmente la production d'AA. Ainsi, la

régulation de la croissance et de la contraction cellulaire médiée par la production d'eicosanoïdes suite à une stimulation par l'Ang II dépend, en partie, de la voie de signalisation des MAPK. Cela dit, les COX et leurs métabolites sont aussi impliqués dans les effets médiés par l'Ang II. Il existe deux isoformes des COX, la COX-1 et la COX-2. La première, identifiée comme constitutive, est retrouvée dans la plupart des types cellulaires et est fortement exprimée dans les CMLV (162). La seconde, est identifiée comme "inductible" pour son niveau d'expression basal faible qui peut être augmenté par des stimuli inflammatoires ou proliférateurs. Par conséquent, la COX-2 est considérée comme un bon marqueur inflammatoire (163). Il a été démontré que l'Ang II active la COX-2, via la voie des MAPK, et induit une croissance cellulaire importante des CMLV qui peut être inhibée par l'utilisation d'inhibiteurs de la COX-2 (NS-398 et nimesulide) (162). Le TxA_2 , qui est l'un des produits de cette enzyme, est impliqué dans les effets contractiles de l'Ang II. De plus, ce métabolite favorise la croissance cellulaire en augmentant la transcription de l'ARNm de *c-fos* et la synthèse protéique (164). Néanmoins, les COX sont aussi impliquées dans les étapes de synthèse de métabolites vasorelaxants comme la PGE_2 et la PGI_2 qui diminuent les effets constricteurs de l'Ang II dans certains lits vasculaires comme les artères pulmonaires, coronaires, et mésentériques (165,166). Ainsi, l'équilibre entre les métabolites produits par les COX, lors d'une stimulation à l'Ang II, permet de guider les fonctions et le destin cellulaire. Finalement, les eicosanoïdes produits par les LOX et CYP450 jouent aussi un rôle dans les effets médiés par l'Ang II dans les CMLV. Effectivement, la 12- et la 15-HETE favorisent les effets stimulateurs de l'Ang II sur la libération de Ca^{2+} dans des cellules en culture ainsi que sur la production de plaquettes. De plus, la LOX semble participer aux effets hypertenseurs de l'Ang II. Ceci a été confirmé par le fait que des inhibiteurs de la LOX diminuent les effets vasoconstricteurs et hypertenseurs induits par l'Ang II dans des rats SHR (167). Dans le même ordre d'idée, l'inhibition du CYP450 atténue l'augmentation de la PA chez des rats infusés avec l'Ang II ainsi que chez des rats SHR (168).

L'activation des différentes PL, par l'Ang II et ses récepteurs, fait partie des étapes primordiales des effets régulateurs, vasomoteurs, proliférateurs et inflammatoires de l'Ang II. Cela dit, malgré le fait que ces enzymes déclenchent une myriade d'événements moléculaires, plusieurs autres voies de signalisation (MAPK, PI3K, JAK/STAT) jouent des rôles importants dans la transmission des effets stimulateurs de l'Ang II.

7.4.3 La voie JAK/STAT

De la même façon que les récepteurs des cytokines, le récepteur AT₁ stimule l'activation d'une tyrosine kinase, JAK (*janus kinase*) 2 en s'associant directement à la protéine via son domaine YIPP de la queue carboxyterminal (169,170). L'activation de cette dernière par le récepteur AT₁ permet de phosphoryler les facteurs de transcription STAT (*signal transducers and activators of transcription*). La phosphorylation et la translocation nucléaire de STAT1 par l'Ang II nécessitent la protéine p59Fyn, un membre de la famille Src (128). Cette protéine, qui joue un rôle de protéine d'échafaudage, est cruciale pour l'association de JAK2 sur STAT1 et permettre sa phosphorylation. Les protéines JAK jouent un rôle important dans la synthèse d'ARNm de protéines impliquées dans la phase aiguë de la croissance cellulaire (171). Il a été démontré que la régulation à la baisse de STAT1 et de STAT3 à l'aide d'anticorps dirigés contre ces derniers, inhibe la croissance cellulaire des CMLV induite par l'Ang II. Cependant, ce type d'évènement n'est pas observé par la stimulation d'autres facteurs de croissance (171). De plus, des données récentes montrent l'activation directe de JAK2 par la NAD(P)H oxydase activée par une stimulation Ang II/AT₁ (172). Ceci suggère donc un rôle important des STAT dans la transmission des effets proliférateurs de l'Ang II. Ainsi, l'activation de cette voie par l'Ang II peu jouer un rôle majeur dans le processus de croissance cellulaire retrouvé dans le remodelage vasculaire.

7.4.4 Les voies des MAPK

Les voies de signalisation associées aux MAPK ont été largement étudiées pour leur implication dans les différents processus comme l'hyperplasie et l'hypertrophie cellulaires et l'activation des voies inflammatoires (128). Ces protéines de la famille des sérine/thréonine kinases se divisent en six sous-familles importantes : **1)** ERK (*extracellular signal-regulated kinase*)1/2, **2)** MAPK/p38, **3)** JNK/SAPK (*c-jun N-terminal protein kinase/stress-activated protein kinase*), **4)** ERK3, **5)** ERK5 et **6)** ERK6.(173) L'activation des MAPK est associée à la croissance cellulaire et l'apoptose, la transformation et la différenciation cellulaire ainsi que la contraction vasculaire. Les ERK1/2 sont activés par des facteurs de croissance et de différenciation tandis que les protéines JNK/SAPK et MAPK/p38 sont généralement activées par des cytokines inflammatoires ou des stress cellulaires (figure I-5) (173). Plusieurs études démontrent l'implication de l'Ang II dans l'activation des voies de signalisation des MAPK. Effectivement, l'Ang II permet d'activer, à différents niveaux, les protéines ERK1/2, MAPK/p38 et JNK/SAPK (174,175). Cette activation requiert différents intermédiaires retrouvés en amont de ces MAPK. Entre autres, les MAPK kinases aussi nommées les MEK permettent l'activation des MAPK en phosphorylant certains de leurs résidus thréonines et tyrosines. L'activation des MEK est aussi dépendante d'autres sérines/thréonines kinases (MEK kinases (MEKK)) comme les protéines de la famille Raf (Raf-1, A-Raf et B-Raf). Ces dernières deviennent actives par de petites protéines G (famille Ras) ou d'autres kinases (176,177). L'état de phosphorylation des protéines Raf est grandement influencé par différentes protéines kinases incluant : Src, PKC, PKB et PAK (*p21 (rac/Cdc42)-activated protein kinase*). En fonction du degré de stimulation, PAK et

Src sont extrêmement efficaces pour activer la voie de Raf/MAPK (176). Les trois voies de signalisation des MAPK les plus étudiées seront abordées dans cette section.

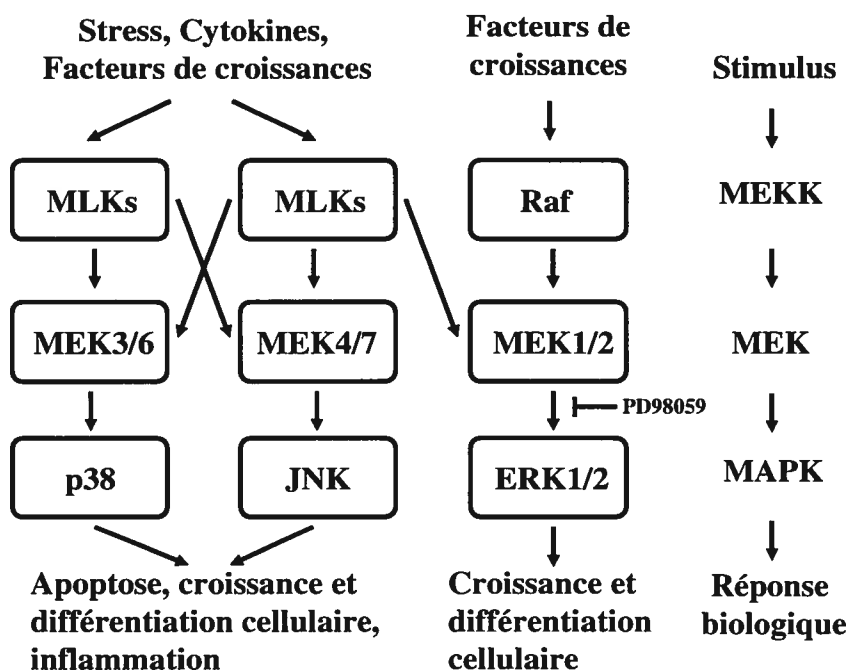


Figure I-5 : Activation des voies MAPK (p38, JNK et ERK1/2).

7.4.4.1 La voie des protéines ERK 1/2

Les protéines ERK1 et ERK2 sont des protéines de 44 et 42 kDa, respectivement, qui ont une homologie de séquence approximative de 85%. Ces deux protéines sont ubiquitaires et hautement exprimées dans les différents tissus du système cardiovasculaire (vaisseaux sanguins, reins, cœur) (178). Cependant, le degré d'expression de ces deux isoformes peut varier d'un type cellulaire à l'autre. D'une part, il a été démontré que le niveau d'expression de la protéine ERK2 est significativement supérieur à son isoforme ERK1 au niveau des cellules immunitaires (176). Néanmoins, dans les vaisseaux sanguins,

ERK1/2 sont exprimées de façon abondante dans les CE, les CMLV et les cellules monocytaires/macrophages (179-181). L'activation de ces protéines est la conséquence d'une cascade d'évènements initiée par des stimuli externes. Le récepteur AT₁ actif s'associe à un complexe protéique (Shc (*Src homology 2 domain containing*), Src, Grb2 (*Growth factor receptor-bound protein 2*) et Sos (*Son of sevenless*)) et permet l'activation de la protéine Ras-GDP en Ras-GTP qui elle, active les MEK1/2. Finalement, la cascade d'activation de cette voie de signalisation se termine lorsque les MEK1/2 activent les ERK1/2 (128). Cependant, l'activation des ERK1/2 peut aussi se faire indépendamment de la protéine Ras. En effet, dans un modèle d'hypertrophie cardiaque, l'activation de la protéine PKC α et PKC ϵ est associée à la translocation et l'activation de ERK1/2 (182). Aussi, dans les CMLV aortiques de rats, l'Ang II permet l'activation des ERK1/2 via la PKC ϵ (183). Dans l'HTA, plusieurs études démontrent, à l'aide d'un inhibiteur spécifique de la MEK (PD98059), l'implication des ERK1/2 dans le développement et le maintien de cette physiopathologie (184,185). Effectivement, dans le remodelage vasculaire associé à l'HTA, plusieurs évènements moléculaires se produisent suite à l'activation des ERK1/2. En effets, l'activation de ces dernières par les MEK1 et 2 peut entraîner l'activation de la PLA₂, de la COX-2, la protéine kinase p90Rsk (*p90 ribosomal S6 kinase*), le remaniement de protéines qui composent le cytosquelette, l'activation et la translocation d'un grand nombre de récepteurs nucléaires (176). Plus précisément, une fois phosphorylées, les protéines ERK1/2 sont dirigées vers le noyau où elles phosphorylent différents facteurs de transcription qui sont impliqués dans la régulation de différents gènes du cycle cellulaire (173,176). Dans les CMLV, la phosphorylation des ERK1/2 provoque l'activation de la protéine kinase p90Rsk et subséquemment de la protéine S6 ribosomale qui joue un rôle important dans la synthèse protéique. De plus, l'activation des ERK1/2 dans les CMLV mène à l'augmentation d'expression de plusieurs proto-oncogènes (*c-fos*, *c-jun* et *c-myc*) impliqués dans la progression du cycle cellulaire et la synthèse protéique (177). Plusieurs études démontrent que l'Ang II stimule la voie des ERK1/2 et confère à cette dernière un

rôle important dans les processus d'hypertrophie, de prolifération et de contraction des CMLV d'artères de résistance (179,186).

7.4.4.2 La voie des protéines MAPK/p38 kinases

La famille des MAPK/p38 regroupe six isoformes de la protéine p38 (p38 α 1/ α 2, p38 β 1/ β 2, p38 δ et p38 γ). Les isoformes α et β sont ubiquitaires, l'isoforme δ se retrouve principalement au niveau des reins, des poumons et du pancréas tandis que l'isoforme γ se retrouve principalement au niveau des muscles squelettiques (187). Les p38 sont activées par une variété de stimuli comme des cytokines, des facteurs de croissance, des RCPG, des chocs osmotiques et plusieurs autres facteurs de stress (176). Les voies de signalisation des p38 sont impliquées dans plusieurs conditions pathologiques comme l'ischémie et l'hypertrophie cardiaque, l'athérosclérose et le remodelage vasculaire retrouvé dans l'HTA. Plus spécifiquement, des études démontrent que l'Ang II peut induire, via le récepteur AT₁, la phosphorylation des p38 vasculaires et jouer un rôle important dans les processus de réponses inflammatoires, d'apoptose, d'inhibition de la croissance et de la contractilité cellulaire. Entre autres, quelques études démontrent que l'inhibition spécifique de la p38 kinase, dans des CMLV d'aorte de rat, diminue la prolifération et la contractilité cellulaire induite par l'Ang II (188,189). Cependant, dans des CMLV d'artères de résistance, l'utilisation de ce même inhibiteur n'affecte pas la croissance cellulaire induite par l'Ang II (19). Par conséquent, ces études démontrent que les mécanismes d'action de l'Ang II sur les voies de signalisation des p38 et la croissance des CMLV varient en fonction du lit vasculaire. Malgré le fait que les p38 peuvent être des régulateurs négatifs des protéines ERK1/2, peu de protéines spécifiques, qui régulent et qui sont régulées par les p38 dans les CMLV stimulés à l'Ang II, sont connues. Néanmoins, certaines études démontrent que les p38 peuvent être activées par la MEK3 et la MEK6 (176,187). De plus, la p38 phosphorylée peu cibler et activer la Hsp27 (*heat shock protein 27*). En effet, cette protéine,

située en aval des p38, joue un rôle dans la restructuration du cytosquelette observée lors de la migration cellulaire et du remodelage vasculaire (187). De plus, certaines études démontrent que le facteur de transcription PPAR (*peroxisome proliferator-activated receptors*) α et son co-activateur PGC (PPAR γ *coactivator*)-1 peuvent être régulés par cette famille de MAPK.(177) Les protéines PPAR α et PGC-1 qui sont des cibles importantes dans l'homéostasie du système cardiovasculaire seront discutés à la section 8.

7.4.4.3 La voie des protéines JNK/SAPK

La troisième classe de MAPK est composée des JNK/SAPK (JNK1/SAPK γ , JNK2/SAPK α et JNK3/SAPK β). Ces protéines qui ont une homologie approximative de 85% peuvent être activées suite à la phosphorylation de leurs sites tyrosine et thréonine. Différentes cytokines, ligands de RCPG (Ang II et ET-1), facteurs de croissance et autres facteurs de stress favorisent l'activation des JNK/SAPK (176). Contrairement aux effets stimulateurs de l'Ang II sur la croissance cellulaire médiés par la voie ERK1/2, l'activation des JNK/SAPK par ce peptide régule la croissance cellulaire en favorisant l'apoptose ou l'arrêt du cycle cellulaire. De plus, l'activation des JNK/SAPK par l'Ang II, requiert la protéine α PAK (*p21 (rac/Cdc42)-activated protein kinase*) qui est activée par la mobilisation du Ca²⁺ et l'activation de la PKC. Une fois activées, les JNK sont mobilisées dans le noyau et activent différents facteurs de transcription comme c-Jun, c-Myc et PPAR γ (177). Encore une fois, il est intéressant de mentionner que l'Ang II active la voie des JNK différemment de celle des ERK1/2. D'une part, l'activation des JNK semble être dépendante à la fois du Ca²⁺, de la présence d'une protéine tyrosine kinase et de la PKC ξ mais ne nécessite pas la protéine Src. D'autre part, l'activation des ERK1/2 peut être Ca²⁺-dépendant ou indépendant et nécessite la présence de Src et de la PKC ξ (190). De plus, les mécanismes activateurs des JNK/SAPK semblent être dirigés en fonction du type cellulaire. Effectivement, dans les fibroblastes cardiaques, l'Ang II stimule la voie des JNK/SAPK via

la voie Pyk (*proline-rich tyrosine kinase*) 2/Rac1 et indépendamment de celle de la PKC. Cependant, dans les CMLV, l'Ang II active la voie des JNK/SAPK dépendamment de la α PAK, de la PKC et du Ca^{2+} (191). Ainsi, les effets fonctionnels de l'Ang II sur la croissance cellulaire dépendent de la voie d'activation des MAPK ainsi que du type cellulaire. Ici, l'activation de la voie des ERK1/2 induit la croissance cellulaire tandis que l'activation de celle des JNK/SAPK favorise l'arrêt du cycle cellulaire ou même, l'apoptose.

Cela dit, nombreux sont les mécanismes initiateurs et régulateurs liés à ces différentes voies de signalisation. Les voies de signalisation des MAPK semblent être largement impliquées dans les mécanismes moléculaires qui mènent au développement et au maintien de différentes physiopathologies cardiovasculaires comme l'hypertrophie cardiaque, l'athérosclérose et l'HTA. Néanmoins, la voie de signalisation des MAPK s'incorpore dans une multitude d'autres voies de signalisation afin de guider la fonction et le destin cellulaire.

7.4.5 La voie de la PI3 kinase

La famille des PI3K (*phosphatidylinositol 3-kinase*) est constituée d'un groupe d'enzymes qui phosphorylent les phosphatidylinositols en position 3'-OH de l'anneau inositol. *In vitro*, les PI3K de la classe I phosphorylent le PI, le PI(4)P et le PI(4,5)P₂ pour produire du PI(3)P, PI(3,4)P₂ et PI(3,4,5)P₃, respectivement. Cependant, en réponse à une stimulation, la phosphorylation de la PI(4,5)P₂ en PI(3,4,5)P₃ est prédominante *in vivo*. Cela dit, cette classe d'enzyme médie plusieurs réponses cellulaires tant dans des conditions physiologiques que physiopathologiques (192). Plusieurs études démontrent l'implication de ces voies de signalisation dans les évènements cardiovasculaires comme le remodelage cardiaque et vasculaire, l'insuffisance cardiaque et la dysfonction endothéliale (193,194). Les structures moléculaires, les mécanismes d'activation ainsi que la spécificité

des substrats subdivisent la famille des PI3K en trois classes (IA, IB et II). La première classe (classes IA et IB) renferme des enzymes hétérodimériques qui se composent d'une sous-unité régulatrice et d'une sous-unité catalytique tandis que les protéines de la classe II se composent d'une seule sous-unité catalytique monomérique (PI3K-C2 α , PI3K-C2 β et PI3K-C2 γ), (tableau I-1, modifié de (192)). Dans la classe IA, il existe trois sous-unités catalytiques (p110 α , β et δ) et trois sous-unités régulatrices (p85 α , p85 β et p55 γ) qui sont principalement exprimées au niveau du cœur et des vaisseaux sanguins. Cependant, la classe IB contient une seule protéine kinase, la sous-unité catalytique (p110 γ) et sa sous-unité régulatrice (p101) qui se retrouvent majoritairement au niveau des cardiomyocytes, des CMLV, des CE et des fibroblastes (192). Cela dit, toutes les sous-unités catalytiques de la classe I ont un domaine RBD (*Ras-binding domain*) qui peut lier la protéine G monomérique Ras, un domaine de liaison aux phospholipides de la membrane plasmique ainsi qu'un domaine à activité kinase. Cependant, même si les quatre isoformes de p110 contiennent un domaine RBD, seuls la p110 α et la p110 γ peuvent être activées par la Ras-GTP *in vitro* (195). De plus, les sous-unités p85 semblent aussi pouvoir contrôler l'activation des p110 par la protéine Ras (195). Plusieurs études démontrent l'implication de différents RTK (récepteur à activité tyrosine kinase) ou RCPG dans l'activation des voies de signalisation de la PI3K. D'une part, les membres de la classe IA sont principalement régulés par les RTK. L'association du domaine SH2 (*Src-homology 2*) des p85 à certains résidus phosphotyrosines spécifiques des RTK permet l'activation des PI3K ainsi que le recrutement de complexes cytosoliques à la membrane plasmique afin de transformer les PI et induire différentes cascades d'évènements. D'autre part, la classe IB est principalement activée par les RCPG. L'ensemble des effets activateurs médiés par les RCPG est relié à l'activation et l'association des protéines G à la p110 γ . Plus spécifiquement, l'association de G $\beta\gamma$ avec le domaine aminoterminal de la protéine p110 γ permet d'induire son activation. De plus, l'association p110 γ -G $\beta\gamma$ semble être amplifiée grâce à la protéine régulatrice p101 (193). Ainsi, il existe plusieurs mécanismes activateurs

des PI3K, ce qui permet d'orienter l'activation de différentes voies de signalisation pour les différentes fonctions cellulaires et physiologiques.

Classe	Sous-unité	Régulation par	Substrat/Produit	Expression
Classe IA (hétéro-dimérique)	Catalytique p110 α , p110 β , p110 δ	Tyrosine kinases Ras Sous-unité G $\beta\gamma$ (pour la p110 β)	PI \rightarrow PI(3)P PI(4)P \rightarrow PI(4,5)P ₂ (<i>in vitro</i>) PI(4,5)P ₂ \rightarrow PI(3,4,5)P ₃ (<i>in vivo</i>)	Cœur, Vaisseaux sanguins
	Régulatrice p85 α , p85 β			Cœur, Vaisseaux sanguins
	Régulatrice p55 γ			Cerveau
Classe IB (hétéro-dimérique)	Catalytique p110 γ	Sous-unité G $\beta\gamma$ Ras	PI \rightarrow PI(3)P PI(4)P \rightarrow PI(4,5)P ₂ (<i>in vitro</i>) PI(4,5)P ₂ \rightarrow PI(3,4,5)P ₃ (<i>in vivo</i>)	Cœur, Vaisseaux sanguins
	Régulatrice P101			
Classe II (mono-dimérique)	PI3K-C2 α	Tyrosine kinases	PI \rightarrow PI(3)P PI(4)P \rightarrow PI(4,5)P ₂	Cœur
	PI3K-C2 β			Cœur
	PI3K-C2 γ			Foie

Tableau I-1 : Sous-unités catalytiques et régulatrices de la classe I et II de la famille PI3K.

L'utilisation de certains inhibiteurs spécifiques comme le LY294002 (un inhibiteur réversible des p110) et la wortmannine (un inhibiteur irréversible de la p110) a démontré le rôle majeur de cette kinase dans le développement de l'hypertrophie et la prolifération des CMLV induites par l'Ang II (194). Effectivement, cette enzyme semble jouer un rôle

primordial dans plusieurs processus cellulaires comme la croissance et la survie cellulaire, la mobilisation de différentes vésicules, la réorganisation du cytosquelette, l'adhésion cellulaire, la production de superoxyde ainsi que le transport du glucose (193). Cela dit, certaines études démontrent l'implication d'une suractivation des voies de signalisation de la PI3K dans le développement de maladies cardiovasculaires comme l'hypertrophie cardiaque, le remodelage vasculaire et cardiaque, l'insuffisance cardiaque, la dysfonction rénale et vasculaire (192). Entre autres, des études démontrent que dans l'aorte de rats hypertendus, l'expression et l'activité de la p110 β et p110 δ sont augmentées, le tout étant associé à un tonus vasculaire spontané amplifié (192). Aussi, l'activation de la PI3K par l'Ang II dans les fibroblastes cardiaques de souris et de rats, entraîne un remodelage myocardique caractérisé par une augmentation du dépôt de la MEC (192). Une autre étude, faite sur des CMLV humaines, a démontré les effets activateurs de l'Ang II sur les voies de signalisation de la PI3K impliquées dans la synthèse protéique (196). Cependant, l'inhibition de cette enzyme par la protéine Rho kinase au niveau des CE peut provoquer une dysfonction endothéliale (197). En effet, la PI3K est directement impliquée dans l'activation de l'enzyme eNOS (*endothelial nitric oxide synthase*) et ainsi, dans la synthèse de NO responsable de la vasodilatation.

Ainsi, ces quelques études permettent d'identifier les PI3K et leurs voies de signalisation comme des protéines majeures dans la régulation du système cardiovasculaire. Effectivement, l'altération de l'expression et de l'activité des PI3K peut entraîner différentes dysfonctions cellulaires et tissulaires observées dans l'HTA. Néanmoins, plusieurs autres protéines sont impliquées dans la régulation de l'activité des PI3K et peuvent être responsables de son débalancement fonctionnel dans cette physiopathologie.

7.4.6 Les phosphatases

Plusieurs phosphatases sont impliquées dans la dysfonction cellulaire et tissulaire observée dans l'HTA. Il existe plusieurs types de phosphatases et leurs cibles moléculaires varient en fonction de leur structure, localisation et type cellulaire. Cependant, cette section est réservée aux phosphatases lipidiques.

7.4.6.1 Les phosphatases PTEN et MTM

Les phosphatases des molécules PI sont regroupées en trois groupes : la PTEN (*phosphatase and tensin homolog*), la MTM (myotubularin) et les SHIP (*SH2-containing inositol phosphatase*) 1 et 2. La PTEN et la MTM déphosphorylent l'anneau inositol des PI en position 3' et 4' respectivement tandis que les SHIP1 et 2 déphosphorylent l'anneau inositol en position 5' (figure I-6). La PTEN est largement exprimée dans le système cardiovasculaire. Une quantité élevée de PTEN est retrouvée dans les cardiomyocytes, les CMLV et les cellules endothéliales (192,198). L'inactivation de cette enzyme entraîne une hyperprolifération et la mort embryonnaire (192). Cependant, des souris hétérozygotes pour ce gène ont une susceptibilité augmentée pour le développement du cancer. L'inactivation allélique spécifique de ce gène dans le cœur de souris n'entraîne pas la létalité, mais induit l'hypertrophie cardiaque (198). *In vitro*, des études ont démontré l'implication des DRO dans l'inactivation de la PTEN et par conséquent, dans l'augmentation de la croissance cellulaire (199,200). Pour sa part, la phosphatase MTM est principalement retrouvée dans les muscles squelettiques et le cœur humain où elle semble jouer un rôle important dans le trafic vésiculaire et le maintien de l'architecture du cytosquelette (192). Cependant, cette enzyme est encore mal caractérisée et son implication dans le domaine de l'HTA n'a pas été rapportée.

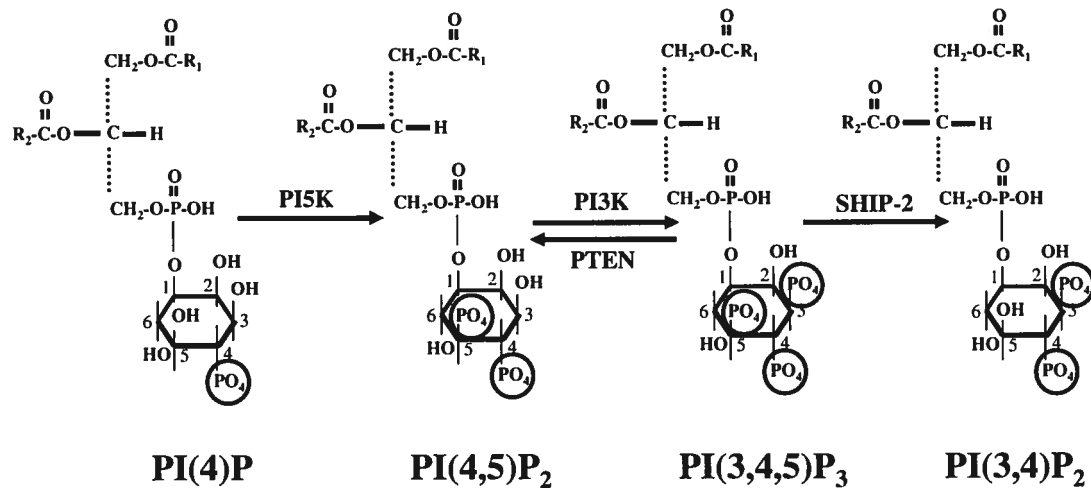


Figure I-6 : Régulation du PI(3,4,5)P₃ par les phosphatases PTEN et SHIP2.

7.4.6.2 Les phosphatases SHIP

Les phosphatases SHIP1 et 2 sont principalement activées en présence de PI(3,4,5)P₃ et favorisent la synthèse de PI(3,4)P₂ (figure I-6). Ces phosphatases peuvent être activées directement par leur association avec des RTK ou des récepteurs des cytokines. L'activité et l'expression de la SHIP1 sont limitées aux cellules hématopoïétiques tandis que la SHIP2 est ubiquitaire. Cela dit, l'activation des SHIP favorise l'activation des MAPK et de la PI3K par la stimulation de facteurs de croissance. L'hormone la plus ciblée par cette activation est l'insuline. En effet, plusieurs études faites sur les animaux et chez l'humain démontrent une augmentation d'expression et d'activité de la SHIP2 dans la résistance à l'insuline (201). Cette résistance à l'insuline empêche l'activation des protéines cibles impliquées dans la translocation du transporteur GLUT4 qui permet l'incorporation intracellulaire du glucose (201). Malgré l'intervention des SHIP sur les voies de la PI3K et MAPK, son implication dans les maladies cardiovasculaires

n'est pas encore claire. Néanmoins, une étude démontre que SHIP2 inhibe les effets prolifératifs du PDGF et de l'IGF-I sur les CMLV d'aorte de rats (202).

7.4.7 La voie de signalisation Akt/PKB

Comme mentionné précédemment, l'Ang II joue un rôle central dans le développement de l'HTA. L'un des effets importants de l'Ang II est sa capacité à induire la croissance cellulaire au niveau vasculaire. Effectivement, l'Ang II stimule l'hypertrophie et l'hyperplasie des CMLV, ce qui favorise le remodelage vasculaire. L'une des cibles importantes de la PI3K est la protéine Akt/PKB (protéine kinase B) qui est directement impliquée dans le phénomène de croissance cellulaire. Chez les mammifères, il existe trois isoformes de la protéine Akt/PKB (Akt1/PKB α et Akt2/PKB β) qui sont hautement exprimées dans le cœur, les CMLV et les CE tandis que Akt3/PKB γ se retrouve principalement dans le cerveau et les testicules (192,203). La régulation de ces protéines est initialement contrôlée par l'activité de la PI3K et de la SHIP2. Plus exactement, les niveaux de PI(3,4,5)P₃ guident l'activité initiale d'Akt/PKB. En effet, ce phospholipide membranaire permet le recrutement et l'association d'Akt/PKB et de PDK1 (3'-*phosphoinositide-dependent kinase-1*) à la membrane plasmique afin qu'elles puissent être activées. Plus précisément, l'activation d'Akt/PKB se déroule en deux étapes importantes (figure I-7). Initialement, il y a recrutement de la protéine à la membrane plasmique via son domaine PH (*pleckstrin homology*) qui s'associe aux différents phospholipides PI(3,4)P₂ et PI(3,4,5)P₃ puis, elle est phosphorylée successivement sur la thréonine 308 (T308) par la PDK1 et sur la sérine 473 (S473) par la PDK2. L'identité exacte de la PDK2 n'est pas encore bien connue malgré le fait que certaines données suggèrent les protéines ILK (*integrin-linked kinase*), p38, PKC α et β et la mTOR (*mammalian target of rapamycin*) comme des candidats potentielles (204). Cela dit, le degré et la durée de phosphorylation du résidu S473 d'Akt/PKB sont fortement guidés par le niveau de PI(3,4)P₂ (205). Par la suite, la protéine Akt/PKB activée peut cibler et phosphoryler différentes protéines puit être

ensuite inactivée par la déphosphorylation de ces résidus T308 et S473. L'activation d'Akt/PKB par l'Ang II induit la phosphorylation de protéines impliquées dans différentes fonctions cellulaires comme la survie cellulaire, la croissance cellulaire et le contrôle du métabolisme du glucose (figure I-7) (206). Entre autres, l'Ang II joue un rôle important dans le développement du remodelage cardiaque et vasculaire. En effet, l'Ang II favorise la croissance des fibroblastes cardiaques, l'hypertrophie des cardiomyocytes, la survie des CE, la migration et la croissance de CMLV de façon Akt/PKB dépendante (207-209).

Cela dit, plusieurs autres facteurs dont les facteurs de croissance, les cytokines, les protéines d'adhésion et les facteurs de stress mécanique permettent d'activer et de réguler la voie de signalisation Akt/PKB. Néanmoins, l'Ang II reste un activateur puissant de cette voie de signalisation impliquée dans la croissance cellulaire et dans le remodelage cardiaque et vasculaire.

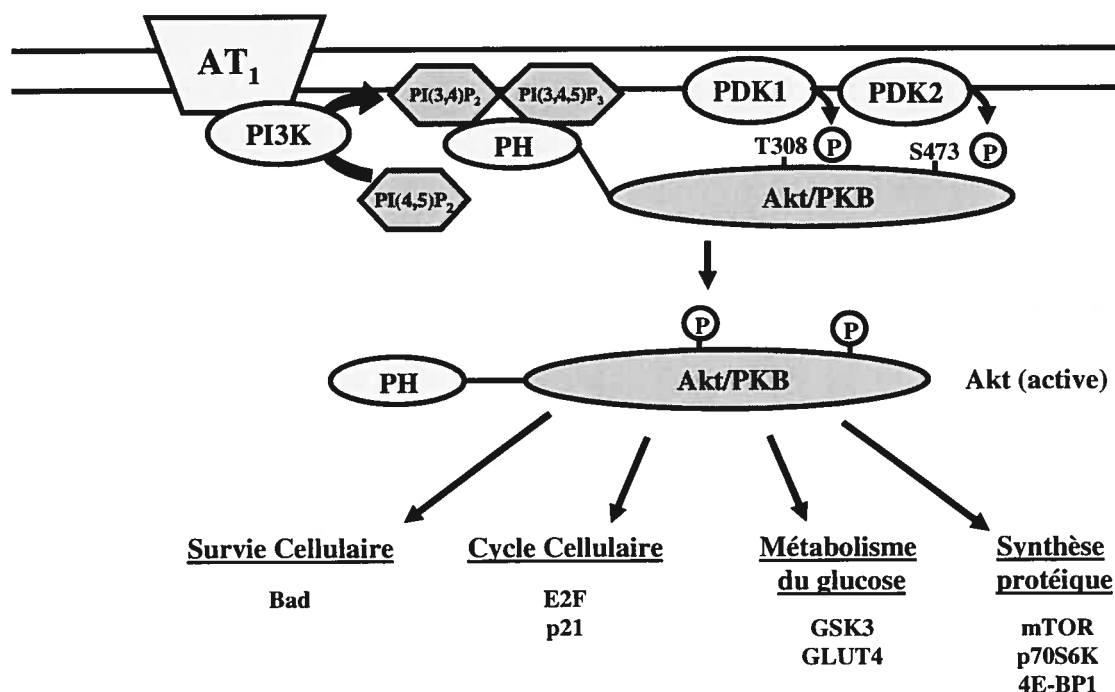


Figure I-7 : Mécanisme d'activation de la protéine kinase Akt/PKB et certaines de ses cibles moléculaires.

7.4.8 L'Ang II et les DRO

L'une des conséquences moléculaires les plus importantes de l'Ang II est son potentiel à augmenter la synthèse de DRO. Dans les CMLV, ces molécules oxydatives comprennent l'anion superoxyde ($O_2 \cdot^-$), le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2), le radical hydroxyl et le radical peroxynitrique ($ONOO^-$). Elles sont impliquées dans plusieurs mécanismes intracellulaires et favorisent entre autres, l'activation de voies inflammatoires, la contraction et la croissance cellulaire. Cependant, l'Ang II augmente aussi le niveau de DRO dans les cellules cardiaques, endothéliales et mésangiales (210). Dans les artères de résistances humaine, le $O_2 \cdot^-$ est produit par la NAD(P)H oxydase qui est composée de cinq différentes sous-unités : la gp91^{phox}/Nox2, ses homologues Nox1, Nox4 et Nox5 et la p22^{phox} qui sont membranaires, les protéines p40^{phox}, p47^{phox} et p67^{phox} qui sont cytosoliques et une petite protéine G Rac1 (cellules vasculaires) ou Rac2 (cellules phagocytaires) (211). Dans les CMLV aortique de rats, la sous-unité gp91^{phox}/Nox2 n'est cependant pas présente. Cela dit, la NAD(P)H oxydase devient fonctionnelle lorsque les sous-unités cytosoliques s'associent aux sous-unités membranaires. D'une part, cette enzyme semble la principale responsable des effets néfastes vasculaires reliés aux DRO. D'autre part, la xanthine oxydase, les oxydases mitochondriales et l'acide arachidonique sont les principales sources de molécules oxydatives dans les tissus non vasculaires (210). Cela dit, l'augmentation de DRO par l'Ang II semble être impliquée de façon spécifique dans l'HTA. En effet, l'infusion d'Ang II sur une période de cinq jours, chez des rats SD, provoque une élévation de la PA ainsi qu'une augmentation du niveau de $O_2 \cdot^-$ dans l'aorte. Néanmoins, une infusion de noradrénaline provoque aussi une élévation de la PA mais n'affecte pas la production de $O_2 \cdot^-$ aortique (212). De plus, l'augmentation du $O_2 \cdot^-$ dans ce modèle, semble être indépendante de l'élévation de la PA, car, à faible dose d'Ang II, l'activité de la NAD(P)H oxydase a été doublée (212). L'implication de $O_2 \cdot^-$ dans le développement de l'HTA peut être expliquée par le fait que cette molécule réactive peut

interagir avec le NO (molécule vasodilatatrice) de source endothéliale pour produire du ONOO⁻ (213). Ceci a été démontré chez le rat SHRSP traité au Tempol (un agent qui mime l'effet de la superoxyde dismutase en diminuant le niveau de O₂^{·-}). Dans cette étude, le Tempol a diminué la PA ainsi que le remodelage vasculaire (214). D'une part, cette réaction diminue les niveaux d'agents vasodilatateurs et d'autre part, le ONOO⁻ est une molécule très instable qui peut oxyder les lipides, induire la nitration des protéines et la dégradation de l'ADN. Aussi, l'augmentation de O₂^{·-} permet d'augmenter le niveau de H₂O₂ qui peut servir de second messenger et potentialiser la concentration intracellulaire de Ca²⁺ pour augmenter la contraction des CMLV (215). De plus, certaines protéines comme les MAPK (ERK, p38 et JNK) et Akt/PKB sont des cibles des DRO et favorisent la croissance cellulaire et les processus inflammatoires (210). À ce propos, la stimulation à l'Ang II permet d'activer les facteurs NFκB et AP-1 par les DRO dans les CMLV humains (216). L'activation de ces récepteurs favorise la synthèse d'une panoplie de marqueurs inflammatoires retrouvés dans l'HTA et le remodelage vasculaire. L'implication de l'Ang II dans les processus inflammatoires sera discutée à la section 10. L'inflammation et le stress oxydatif sont intimement liés par le fait que le stress oxydatif peut provoquer l'inflammation qui, en retour, peut induire le stress oxydatif. L'interdépendance de ces deux processus reflète, par conséquent, une association positive entre les marqueurs inflammatoires et les molécules oxydatives dans l'HTA.

7.4.9 L'Ang II et les récepteurs à activité tyrosine kinases

Les RTK sont des molécules transmembranaires qui comportent un site récepteur sur la face extracellulaire, un site tyrosine kinase sur la face intracellulaire et un segment transmembranaire (217). Ceux-ci sont impliqués dans plusieurs fonctions cellulaires comme la régulation du métabolisme du glucose, la croissance et la migration cellulaire. Plusieurs évidences démontrent l'implication du récepteur AT₁ dans l'activation de RTK comme l'EGFR, le PDGFR et l'IGFR. Malgré le fait que le récepteur AT₁ ne se lie pas

directement sur les RTK, la transactivation de ces récepteurs, par les protéines tyrosine kinases Pyk2 et Src ainsi que par le stress oxydatif, permet la régulation de plusieurs voies de signalisation impliquées dans l'HTA (217). La transactivation de ces récepteurs semble être régulée de façon différente. En effet, la transactivation de l'EGFR semble être dépendante du Ca^{2+} tandis que celle du PDGFR ne l'est pas. De plus, certaines preuves démontrent que l'activation des RTK peu se faire par l'entremise des RCPG. Par exemple, l'activation des RCPG par différents agonistes comme Ang II, ET-1, thrombine, permet d'activer l'EGFR de manière extracellulaire par l'intermédiaire de métalloprotéases de la matrice extracellulaire (MMP). Effectivement, l'activation de MMP permet de cliver, au niveau de la membrane cytoplasmique, la proHB-EGF (*proHeparin-binding EGF-like growth factor*) qui est un agoniste du récepteur EGF. Eguchi *et coll.* ont démontré que dans les CMLV, une stimulation à l'Ang II favorise la synthèse de HB-EGF qui permet d'activer différentes protéines comme des phosphatases et les MAPK (ERK1/2 et p38) (218). Cependant, dans cette étude, l'activation de l'EGFR dépendante de l'Ang II ne semble pas altérer l'activité de la MAPK/JNK. Dans le même ordre d'idée, certaines études *in vitro* rapportent que l'activation dépendante de l'EGFR est importante pour induire les effets trophiques de l'Ang II médiés par le récepteur AT_1 . En effet, ces évènements permettent d'activer la MAPK/ERK1/2 dans les CMLV et d'induire l'hyperplasie cellulaire (219). Aussi, dans les CMLV de rats, l'Ang II augmente l'expression de *c-fos*, ce qui peut être inhibé par un inhibiteur de la EGFR kinase. Finalement, certaines données démontrent que la transactivation de l'EGFR par l'Ang II joue un rôle important dans l'activation de la p70S6K et, par conséquent, dans la synthèse protéique (220). Ainsi, le phénomène de transactivation des RTK par l'Ang II semble être un mécanisme important dans les fonctions cellulaires, spécialement dans l'induction de la croissance cellulaire.

7.4.10 L'Ang II et la traduction protéique

D'un point de vue physiologique, l'Ang II est un peptide multifonctionnel. En plus de ses effets vasoconstricteurs, l'Ang II peut induire la croissance cellulaire en augmentant la synthèse d'ADN ou de protéines. L'une des conséquences de l'activation de la voie PI3K/Akt/PKB est l'activation de protéines impliquées dans les processus de traduction. Entre autres, il a été démontré que l'Ang II peut réguler l'efficacité de la machinerie traductionnelle en phosphorylant la protéine 4E-BP (*eucaryotic initiation factor-4E-binding protein*) qui est impliquée dans la séquestration de la protéine eIF4E (*eucaryotic initiation factor*) du complexe eIF4F (221). En effet, l'activation de la PI3K/Akt/PKB, par l'Ang II, cible plusieurs protéines impliquées dans la synthèse protéique comme la protéine mTOR, la p70 S6K et la 4E-BP1 (figure I-8). Ces protéines jouent sur la première étape de la synthèse protéique en activant les protéines impliquées dans l'initiation de la traduction. Une fois activée, la protéine Akt peut phosphoryler la protéine mTOR, qui, à son tour, peut s'associer et activer différentes protéines impliquées dans la traduction. D'une part, la mTOR peut activer la protéine p70S6K qui est impliquée dans la phosphorylation de la protéine S6 de la sous-unité 40S ribosomal (192). Approximativement 20 à 30 % de la traduction de l'ARNm de gènes impliqués dans la croissance cellulaire est régulée par la p70S6K. D'autre part, la protéine mTOR peut phosphoryler la protéine 4E-BP sur différents résidus sérines/thréonines et permettre sa dissociation du complexe 4E-BP/eIF4E. La protéine eIF4E joue un rôle majeur lors de la traduction de l'ARNm en se liant à la coiffe 5' de l'ARNm, permettant ainsi le recrutement de la sous-unité ribosomale 40S (figure I-8) (222). Aussi, une fois libérée du complexe, l'activité du facteur eIF4E peut être augmentée par les MAPK (ERK1/2, JNK et p38) ou la PKC. Ce mécanisme de régulation, lors du processus de traduction de l'ARNm, joue un rôle important dans le contrôle de la synthèse protéique de la cellule et peut être exagéré dans certaines circonstances (222). L'Ang II a démontré avoir des effets puissants sur la phosphorylation de la protéine 4E-BP1, l'une des isoformes de la famille 4E-BP (221). En effet, il existe trois isoformes : 4E-

BP1, 4E-BP2 et 4E-BP3 qui sont distribués à des niveaux différents dans les tissus. La 4E-BP1 est retrouvée dans la plupart des tissus incluant le cœur et les vaisseaux sanguins, la 4E-BP2 est principalement exprimée dans le rein et le cerveau, tandis que la 4E-BP3 est retrouvée dans le colon, le foie et le cerveau (222).

L'Ang II active plusieurs voies de signalisation impliquées dans la croissance cellulaire. L'activation de la protéine 4E-BP1 semble être l'une des protéines affectées par ce peptide. Néanmoins, peu de données démontrent l'importance de la 4E-BP1 dans les mécanismes hypertrophiques de l'Ang II et son implication dans le remodelage vasculaire.

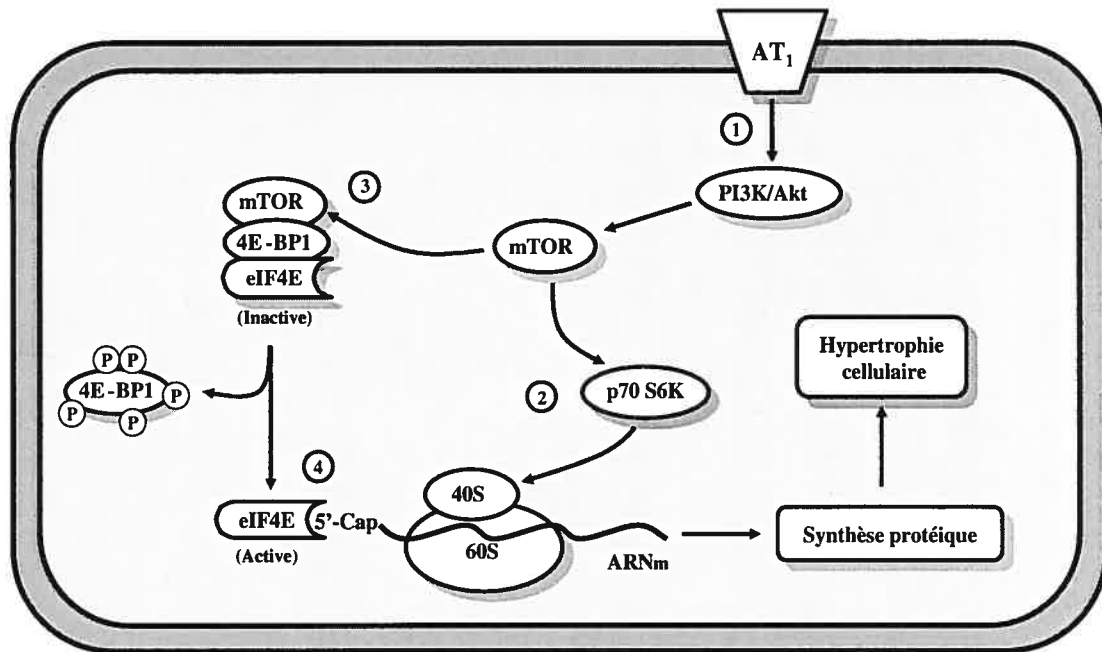


Figure I-8 : Synthèse protéique dans l'hypertrophie cellulaire médiée par l'Ang II. 1) L'activation du récepteur AT₁ stimule la voie PI3K/Akt. La protéine Akt/PKB peut phosphoryler la protéine mTOR qui 2) peut activer la protéine p70 S6K qui est impliquée dans la phosphorylation de la protéine S6 de la sous-unité 40S ribosomale ou 3) phosphoryler et inactiver la protéine 4E-BP1 associée au facteur d'initiation de la

traduction eIF4E. 4) Le facteur eIF4E peut s'associer la région 5'-Cap de l'ARNm afin de recruter les sous-unités ribosomales et induire la synthèse protéique observée dans la croissance cellulaire.

7.4.11 L'Ang II et la prolifération des CMLV

L'un des facteurs importants dans le remodelage vasculaire est la croissance cellulaire exagérée. L'hypertrophie et l'hyperplasie sont deux étapes qui mènent à la croissance cellulaire et au remodelage vasculaire. Néanmoins, l'étape principale dans la prolifération cellulaire est l'induction et le contrôle du cycle cellulaire par différents facteurs exogènes comme le stress mécanique induit par le flot sanguin ou encore par différents facteurs humoraux. L'Ang II, comme plusieurs facteurs de croissance, peut activer les mécanismes d'initiation de la prolifération en liant le récepteur AT₁ et en activant différentes protéines cytosoliques (223). Dans les CMLV, la prolifération cellulaire est contrôlée par plusieurs familles de protéines impliquées dans le cycle cellulaire (224).

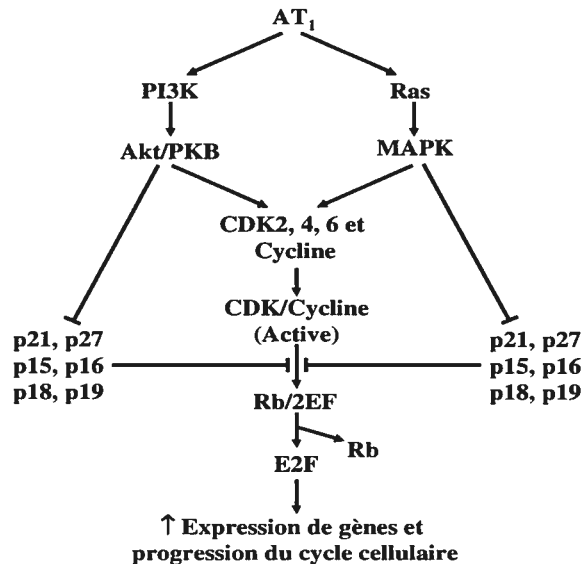


Figure I-9 : Activation des voies PI3K et MAPK par l'Ang II dans la progression du cycle cellulaire.

Entre autres, les cyclines, les CDK (*cyclin-dependent kinase*) et leurs inhibiteurs peuvent être activés en réponse à l'association de l'Ang II au récepteur AT₁ (figure I-9). L'activation par l'Ang II de certaines sous-unités catalytiques des CDK et leurs activateurs, les cyclines, permet d'induire certains signaux mitogènes qui convergent à certains points de contrôle du cycle cellulaire. L'activation de différentes CDK comme les CDK2, 4, et 6 par les cyclines, initie une cascade d'évènements en phosphorylant/régulant des protéines cibles (retinoblastoma (Rb), E2F) qui modulent la transcription des différentes protéines nécessaires pour la progression et la transition des différentes phases du cycle cellulaire. Par exemple, la phosphorylation de Rb par différents complexes CDK/cycline permet de dissocier le complexe Rb/E2F et de libérer le facteur de transcription E2F qui devient actif (figure I-9). Celui-ci peut ainsi initier la transcription de certains gènes codant pour différentes protéines (cycline E et A, la thymidine kinase, l'ADN polymérase, la polymérase α et le *c-myc*) impliquées dans la progression du cycle cellulaire (224). Aussi, l'augmentation d'expression de la cycline D est associée au passage de la phase G₀ à G₁ et caractérise ainsi l'initiation du cycle cellulaire. Le passage de la phase G₁ à S est caractérisé par une dégradation de la cycline D et par une augmentation d'expression de la cycline E. Par la suite, la progression du cycle cellulaire lors de la phase S est contrôlée par le complexe protéique cycline A/CDK2 tandis que celles des phases G₂ et M sont contrôlées par le complexe cycline A, B/cdc2 (224). L'activité enzymatique des complexes CDK/cyclines est régulée par différentes protéines inhibitrices. Il existe deux familles de protéines inhibitrices, les INK (*inhibitors of CDK*) et les cip. La première famille regroupe les protéines p15^{ink4b}, p16^{ink4a}, p18^{ink4c} et p19^{ink4d} et la seconde regroupe les protéines p21^{cip1}, p27^{kip1} et p57^{kip2}. (225) *In vivo*, il a été démontré que l'Ang II diminue l'expression des protéines p21^{cip1} et p27^{kip1} et augmente l'expression des protéines cycline D1 et CDK4 dans les artères de résistance de rats SD (223). De plus, cette étude démontre que ces effets sont dépendants de l'activation du récepteur AT₁. Les voies des MAPK et de la PI3K semblent être impliquées dans ces évènements. La stimulation des récepteurs AT₁

augmente la voie ERK1/2-*c-fos/c-jun* ainsi que l'activation de la voie PI3K qui contrôle positivement l'expression et l'activité du complexe cycline D1/CDK2 (226,227). De plus, l'activation de la voie PI3K par l'Ang II diminue l'activité inhibitrice de la p27^{kip1} au niveau des CMLV aortiques (228). Par conséquent, l'Ang II favorise la prolifération des CMLV observée dans le remodelage vasculaire retrouvé dans l'HTA. D'une part, l'Ang II favorise la progression du cycle cellulaire en activant via le récepteur AT₁, les voies des MAPK et PI3K ainsi que celles des cyclines/CDK. D'autre part, l'activation de la PI3K par l'Ang II inhibe les protéines impliquées dans l'inhibition des cyclines/CDK.

8. L'Ang II et l'inflammation

Plusieurs études démontrent l'implication de l'Ang II dans les processus inflammatoires qui mènent au développement de maladies cardiovasculaires. La majeure partie des effets inflammatoires médiés par l'Ang II sont le résultat de l'activation du récepteur AT₁. Entre autres, l'activation du récepteur AT₁ favorise la synthèse de MEC, la migration cellulaire, l'apoptose et la croissance cellulaire qui sont observées dans le remodelage vasculaire et cardiaque. Plusieurs marqueurs inflammatoires sont associés à ces événements cardiovasculaires suite à une stimulation par l'Ang II. L'activation des voies inflammatoires par l'Ang II, dans ces tissus, varie en fonction du type cellulaire qui les compose. Dans le cœur, l'Ang II stimule l'hypertrophie des cardiomyocytes via la voie de signalisation NFκB (229,230). Aussi, l'infusion d'Ang II chez les rats SD augmente la fibrose cardiaque et l'infiltration de leucocytes dans le cœur. Le tout est associé à une augmentation de cytokines et de protéines d'adhésion (231). Dans le même ordre d'idées, chez des rats SD infusés à l'Ang II, les niveaux de plusieurs marqueurs inflammatoires (TGFβ, PECAM, VCAM-1, ICAM-1, ED-1 (un antigène de macrophage) et NFκB) sont augmentés dans le cœur (230). En premier lieu, l'Ang II favorise la synthèse du TGFβ1, un inhibiteur de la prolifération cellulaire qui est aussi impliqué dans la synthèse du collagène et, par conséquent, dans les processus de remodelage tissulaire (230). En second lieu, les

molécules d'adhésion comme PECAM, VCAM-1 et ICAM-1 sont des protéines qui favorisent le recrutement et l'infiltration de cellules inflammatoires (monocytes/macrophages) dans les tissus (cœur, vaisseaux, reins). Celles-ci favorisent la synthèse d'agents inflammatoires comme les cytokines. Ces dernières activent leurs récepteurs et activent certaines voies de signalisation (NFκB, AP-1) impliquées dans la croissance et la migration cellulaire ainsi que de favoriser la synthèse, *de novo*, de marqueurs inflammatoires (232). La somme de ces événements contribue au remodelage tissulaire et aux événements cardiovasculaires. L'activation des voies NFκB et AP-1 jouent un rôle majeur dans les processus inflammatoires. L'activation accrue de ces facteurs de transcription par l'Ang II, stimule la synthèse des marqueurs inflammatoires mentionnés précédemment, ainsi que plusieurs autres agents inflammatoires comme la protéine MCP-1 et le facteur TNFα (*tumor necrosis factor α*). L'Ang II augmente l'expression de la molécule MCP-1 dans les cardiomyocytes, les CE et CMLV des artères coronaires et contribue à l'effet chemoattractant des cellules inflammatoires (233). L'augmentation d'expression du TNFα et de ses récepteurs par l'Ang II favorise l'activation des voies inflammatoires NFκB et AP-1. Par conséquent, ces événements sont additionnés à ceux médiés directement par les voies de signalisation de l'Ang II sur les mécanismes inflammatoires. De façon chronique, ces événements favorisent le développement de troubles cardiovasculaires comme le remodelage vasculaire, l'athérosclérose, l'hypertrophie ventriculaire, l'insuffisance cardiaque, l'infarctus du myocarde.

Dans les vaisseaux sanguins, l'Ang II favorise la vasoconstriction, la dysfonction endothéliale, les lésions athérosclérotiques et le remodelage vasculaire. Aussi, l'activation de plusieurs voies inflammatoires semble être associée à ces conditions. De façon générale, la réponse inflammatoire peut se dérouler en trois étapes importantes : 1) l'augmentation de la perméabilité vasculaire, 2) l'infiltration de leucocytes et 3) le remodelage vasculaire. Plusieurs données démontrent que l'Ang II est impliquée dans chacune de ces étapes. En effet, l'Ang II augmente la PA et favorise la perméabilité vasculaire en endommageant

l'endothélium. Aussi, l'Ang II augmente la perméabilité vasculaire via l'activation du récepteur AT₁ tandis que l'activation du récepteur AT₂ inhibe ces effets (234). L'Ang II augmente l'infiltration des leucocytes en stimulant la synthèse de plusieurs protéines d'adhésion (ICAM-1, PECAM, VCAM-1, sélectines) sur les cellules les CE et les CMLV. Une augmentation de certains membres de la famille des intégrines α (CD11b/CD18) est aussi observée sur les cellules monocytaires suite à une stimulation à l'Ang II (235). Ce peptide stimule, via le récepteur AT₁, la synthèse des selectines E, P et L dans les CE et favorise ainsi l'adhésion des leucocytes (236). De plus, l'Ang II active la voie de signalisation NF κ B et augmente la synthèse de VCAM-1 et ICAM-1 (237). De façon similaire, chez des rats infusés à l'Ang II, l'expression de ces protéines d'adhésion est augmentée dans les artères mésentériques (123). En plus d'augmenter les niveaux de cytokines, l'Ang II stimule la synthèse de MCP-1 dans les monocytes/macrophages, les CE et CMLV (238). Finalement, l'accumulation de cellules et molécules inflammatoires au niveau vasculaire contribue au développement de la dysfonction endothéliale et au remodelage vasculaire.

9. Le récepteur AT₂

Le récepteur AT₂ a été cloné chez l'humain, le rat et la souris. Ce récepteur est retrouvé de façon ubiquitaire dans les tissus fœtaux et suggère, par conséquent, une importance potentielle dans le développement et la morphogénèse tissulaire. Cependant, l'expression du récepteur AT₂ diminue rapidement après la naissance et chez l'adulte, son expression est retrouvée majoritairement au niveau de l'utérus, des ovaires, de certains noyaux cérébraux, du cœur et de la médullosurrénale (125,131). L'unique gène du récepteur AT₂ est localisé sur le chromosome X humain. Chez le rat et la souris, contrairement au récepteur AT₁, aucun indice ne suggère que le récepteur AT₂ se divise en sous types. De plus, malgré une faible homologie (34%) entre le récepteur AT₁ et AT₂, le récepteur AT₂ est aussi un récepteur à 7 domaines transmembranaires (131). Certaines

études démontrent que le récepteur AT₂ se couple à la protéine G_i (protéine G inhibitrice) (239). Complémentairement, certaines études démontrent que dans certaines lignées cellulaires, le récepteur AT₂ active certaines phosphatases et inhibe la croissance cellulaire ou induit la mort programmée (apoptose) (240). Contrairement au récepteur AT₁, le récepteur AT₂ n'est pas internalisé ni désensibilisé. De plus, ce dernier semble avoir une activité constitutive et a des effets antagonistes sur l'activité du récepteur AT₁ (130). En effet, le récepteur AT₂ inhibe la croissance cellulaire médié par le récepteur AT₁ dans différents types cellulaires incluant les CMLV. Néanmoins, l'importance physiologique de ce récepteur a été mise en évidence par différentes approches. En effet, l'utilisation de souris, dont le gène AT₂ est invalidé, démontre que la PA ne semble pas varier significativement par rapport aux souris de type sauvage (241). Cependant, une infusion à l'Ang II induit une HTA élevée qui est caractérisée par une hypersensibilité à l'Ang II. Cette hypersensibilité semble être causée par une surexpression du récepteur AT₁ dans les CMLV (242). Une approche pharmacologique a permis d'étudier l'implication du récepteur AT₂ dans l'HTA. Une étude a démontré les effets vasodilatateurs de l'Ang II suite à l'activation du récepteur AT₂. Effectivement, l'Ang II permet d'induire la vasodilatation d'artères mésentériques où les récepteurs AT₁ sont bloqués par le candesartan. De plus, la vasodilatation induite est inhibée si ces vaisseaux sanguins sont traités avec un antagoniste du récepteur AT₂, le PD123319 (243). À ce jour, aucun ligand pour le récepteur AT₂ a été développé pour des fins cliniques.

9.1 Les voies de signalisation du récepteur AT₂

Comme le récepteur AT₁, le récepteur AT₂ peut lier certaines protéines G (244). Une fois activé par l'Ang II, le récepteur AT₂ permet de lier la protéine G_i qui, à son tour, peut activer la phosphatase 2A (une sérine/thréonine phosphatase) ainsi que la phosphatase phosphotyrosine (245). Dans les CMLV, l'activation de ces voies par le récepteur AT₂, inhibe l'activation des MAPK induite par le récepteur AT₁ (246). Par conséquent, ceci

inhibe les effets activateurs de l'Ang II/AT₁ sur la croissance et la prolifération cellulaire. Aussi, la stimulation des récepteurs AT₂ entraîne l'activation du système NO-GMPc impliqué dans la relaxation des CMLV lors du processus de vasodilatation (247). Plus précisément, l'activation du récepteur AT₂ inhibe l'activation de la voie AT₁/PLD/RhoA et diminue la contraction des CMLV aortiques de rat (248). Dans le même ordre d'idée, des études *in vivo* et *in vitro* démontrent l'implication du récepteur AT₂ dans la vasodilatation d'artères de résistance de rats SHRSP. Dans ces modèles, l'inhibition de la voie RhoA/Rho kinase par l'activation du récepteur AT₂ semble être impliquée (249). Néanmoins, il semble que l'activation du récepteur AT₂, dans les CMLV aortiques de rat, permet d'activer la voie NFκB via la production intracellulaire de DRO (250). Cela dit, contrairement aux multiples études sur les fonctions moléculaires et cellulaires du récepteur AT₁ dans les pathophysiologies cardiovasculaires, celles du récepteur AT₂ sont encore peu connues.

10. Les activateurs de PPAR

Plusieurs maladies métaboliques sont associées à l'HTA dont le syndrome métabolique lié à l'adiposité abdominale et le diabète de type 2. Entre autres, plus de 80% des patients diabétiques de type 2 développent de l'HTA (251). Cela dit, la prise en charge de ces maladies est devenue un enjeu majeur de santé publique qui a donné lieu au développement d'un arsenal thérapeutique destiné à lutter contre les anomalies liées au syndrome métabolique et les maladies cardiovasculaires. Les facteurs de transcription PPAR constituent une cible thérapeutique importante depuis une décennie dans le traitement de la résistance à l'insuline associé au diabète de type 2 (252). De plus, ces facteurs de transcription ont démontré des propriétés bénéfiques au niveau du système cardiovasculaire.

Les PPAR, comme plusieurs autres récepteurs nucléaires, possèdent un domaine de liaison à l'ADN et un domaine d'association aux ligands dans la région carboxyterminale du récepteur. Il existe trois isotypes des récepteurs PPAR : PPAR α , PPAR δ/β et PPAR γ (253). Une fois activés par leurs ligands, les PPAR forment des hétérodimères avec le récepteur nucléaire RXR (*9-cis retinoic acid receptor*) et d'autres co-activateurs/corépresseurs dont PGC-1, CBP (*CREB (Cyclic AMP response element binding protein)-binding protein*)/p300 et SRC (*steroid receptor coactivator*)-1 pour en nommer quelques-uns. Les PPAR modulent la transcription de gènes cibles après s'être fixés sur la séquence spécifique PPRE (*peroxisome proliferator response element*) qui est composée de deux séquences consensus d'hexonucléotides (AGGTCA) séparées par un nucléotide quelconque (253). Cette séquence est présente dans les régions régulatrices de plusieurs gènes impliqués dans la régulation du système cardiovasculaire.

10.1 Les PPAR et leurs ligands

Les PPAR sont des facteurs de transcription qui dépendent de ligands spécifiques, endogènes ou exogènes, pour être activés et s'associer au domaine PPRE. Cependant, ces récepteurs n'ont pas une affinité équivalente pour tous les ligands qui peuvent leur être associés. Certains ligands sont spécifiques pour chacun des récepteurs PPAR et guident leurs activités dans la transcription génétique (figure I-10).

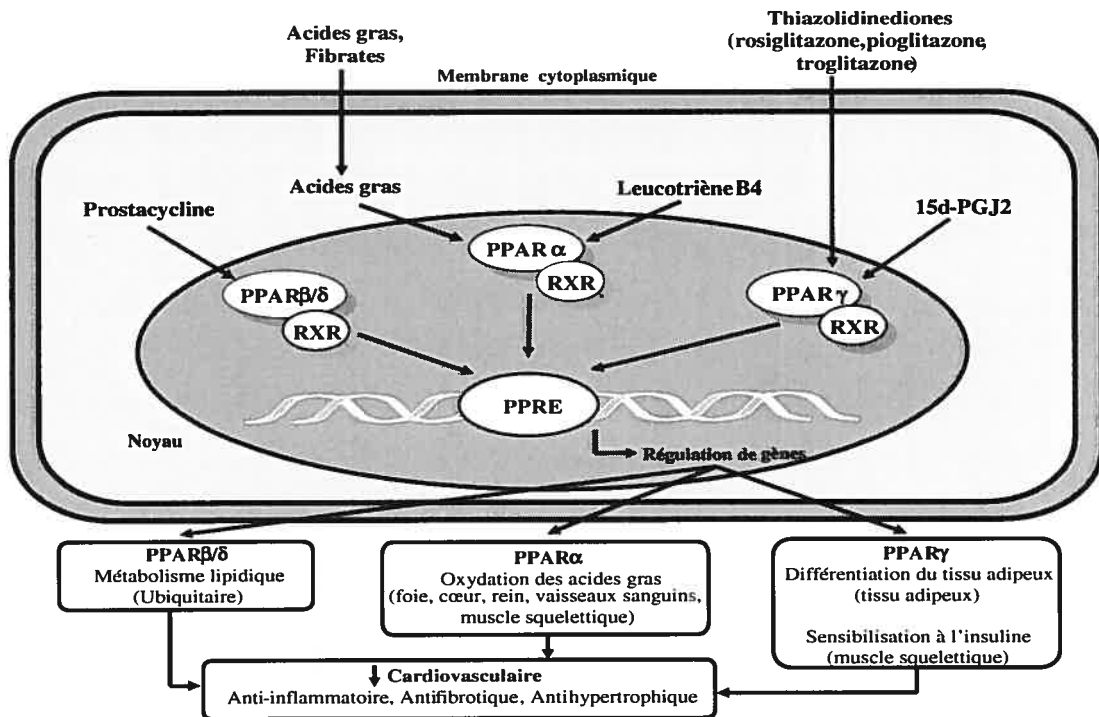


Figure I-10 : Les PPAR dans le système cardiovasculaire. (Modifié de référence (254))

10.1.1 Les PPAR et les ligands endogènes

De façon générale, tous les membres de la famille PPAR peuvent être activés par des eicosanoïdes, des acides gras insaturés et saturés. Pour sa part, le facteur de transcription PPAR γ lie, avec une affinité de l'ordre du micromolaire, les acides gras polyinsaturés comme les acides linoléiques, linoléiques, arachidoniques et eicosapentanoïques pour être activé (255). La conversion de l'acide linoléique en acide 9-hydroxyoctadécadiénoïque (9-HODE) et 13-HODE fournit une source additionnelle de ligand pour ce récepteur nucléaire (256). Aussi, la PGJ2, un dérivé de la PGD2, est un ligand puissant ($K_d = 300\text{nmol/L}$) de PPAR γ (253). Les autres isoformes de PPAR

démontrent aussi une affinité pour la PGJ2 mais elle semble moindre (257). Pour sa part, le facteur de transcription PPAR α a une gamme plus importante de ligands endogènes. Effectivement, ce récepteur s'associe à une variété d'acides gras saturés et insaturés, dont les acides palmitiques, oléiques, linoléiques, docohexaénoïques (DHA) et arachidoniques (255). Comme pour PPAR γ , PPAR α s'associe à ces ligands dans l'ordre du micromolaire. Plusieurs eicosanoïdes (leucotriènes B4 (LTB4), 8S-HETE) lient et activent PPAR α de façon importante (253). Finalement, comme les récepteurs PPAR α/γ , le récepteur PPAR β peut interagir avec des acides gras saturés et insaturés. Cependant, la sélectivité de PPAR β pour ces ligands est intermédiaire entre celle de PPAR α et PPAR γ . Notamment, les acides gras polyinsaturés comme l'acide dihomog- γ -linoléique, l'EPA et l'acide arachidonique ont une faible affinité pour PPAR β (256). Néanmoins, les acides palmitique, stéarique et l'eicosanoïde 8S-HETE sont des ligands plus stables et puissants (253,255).

10.1.2 Les PPAR et les ligands exogènes

En raison du grand nombre de gènes communs régulés par les PPAR, plusieurs ligands synthétiques spécifiques ont été produits afin de contrôler la régulation transcriptionnelle de ces derniers. Aussi, ces agents ont démontré plusieurs effets bénéfiques sur le système cardiovasculaire en diminuant plusieurs facteurs de risques (253). Les TZD comme la rosiglitazone, la pioglitazone, la troglitazone sont quelques membres de la famille des glitazones, des agents synthétiques qui activent spécifiquement le récepteur PPAR γ . Ces agonistes sont principalement employés pour le traitement de la résistance à l'insuline observé chez les patients diabétiques de type 2. La rosiglitazone est l'agoniste de PPAR γ qui a la plus haute affinité (K_d approximatif de 40 nmol/L) pour ce dernier (255). Les autres glitazones ont une affinité beaucoup plus faible pour PPAR γ . Par conséquent, ces observations ont permis d'établir une corrélation entre la liaison des TZD à PPAR γ et les effets agonistes induits. Aussi, le GW2570, un agoniste non-TZD de PPAR γ , est un

puissant activateur et a des propriétés antidiabétiques chez l'humain (258). Pour ajouter à cette liste de ligands, plusieurs drogues non stéroïdiennes anti-inflammatoires dont l'indométhacine, le fénoprofène et l'ibuprofène activent les récepteurs PPAR γ et PPAR α (259). Les ligands synthétiques hypolipémians de PPAR α comme les fibrates, sont des acides carboxyliques amphipatiques qui sont utilisés dans le traitement de l'hypertriglycéridémie. Le clofibrate et le fénofibrate, deux membres de la famille des fibrates, ont une sélectivité dix fois plus élevée pour PPAR α comparativement à PPAR γ (255). Cependant, le benzafibrate est un agoniste qui peut activer les trois isoformes de PPAR. Chez l'humain, les fibrates doivent être utilisés à hautes doses (300-1200 mg/jour) pour avoir des effets bénéfiques sur la diminution des lipides (255). Finalement, un puissant agoniste, le L-165041, a une sélectivité 30 fois supérieure pour PPAR β comparativement à PPAR γ et aucune pour le récepteur PPAR α (255). Chez les rongeurs, cet agent augmente les niveaux de cholestérol HDL.

10.2 PPAR α et le système cardiovasculaire

L'isoforme PPAR α est exprimée de façon prédominante dans les tissus ayant des niveaux élevés de catabolisme des acides gras tels : le foie, le cœur, les reins et les muscles squelettiques (255). En effet, l'expression de PPAR α est en étroite corrélation avec le degré d'activité de β -oxydation mitochondriale et peroxysomale (253). PPAR α est aussi exprimé dans les cellules vasculaires comme les CE, les CMLV et les monocytes/macrophages. La majorité des études faites sur le récepteur PPAR α démontre l'implication de ses agonistes dans l'incorporation cellulaire et la régulation de la β -oxydation des acides gras. Entre autres, ces agonistes augmentent l'expression des protéines transporteurs d'acides gras et de la translocase d'acide gras (FAT : *fatty acid translocase*) (260). Aussi, les fibrates favorisent la synthèse du cytochrome (CY) P450 de classe 4A qui est une enzyme qui catalyse l'hydroxylation- ω des acides gras (261). Ce mécanisme favorise la diminution du

niveau des triglycérides. Dans le cœur, PPAR α permet de fournir de l'énergie au myocarde en régulant plusieurs gènes impliqués dans l'incorporation et l'oxydation des acides gras (262). De plus, l'activation de PPAR α augmente l'expression de l'apolipoprotéine (Apo) A1. L'ApoA1 est l'apolipoprotéine principale associée au cholestérol HDL et joue un rôle crucial dans le transport inverse du cholestérol des cellules périphériques (263). Dans un autre ordre d'idées, les agonistes de PPAR α provoquent des effets anti-inflammatoires dans les vaisseaux sanguins. Effectivement, l'activation de PPAR α inhibe l'expression de cytokines et de molécules d'adhésion, et augmente l'expression de la NOS endothéliale. De façon générale, les activateurs de PPAR α , comme le fénofibrate et le gemfibrozil, réduisent les concentrations plasmatiques de TNF α , d'interféron (IFN)- γ , d'interleukine (IL)-6, d'IL-2 et d'IL-1 β (257). Ces effets bénéfiques semblent être reliés à l'inhibition des facteurs de transcription NF κ B et AP-1 (264,265). Dans les CE, l'activation de PPAR α diminue l'expression de MCP-1, VCAM-1, ICAM-1 et COX-2 associée à l'activité transcriptionnelle de NF κ B et AP-1, tandis que dans les CMLV, l'activation de PPAR α inhibe les effets activateurs de l'Ang II sur la synthèse de COX-2 (257,266). Chez des rats infusés à l'Ang II, le traitement au DHA prévient l'HTA et le remodelage vasculaire. Ceci est associé à une diminution de l'activité de la NAD(P)H oxydase et de l'expression des protéines VCAM-1 et ICAM-1 (267). Aussi, chez des rats infusés à l'Ang II, le fénofibrate diminue les effets inflammatoires et le remodelage cardiaque induit par l'Ang II. L'activation de PPAR α dans le cœur de ces rongeurs diminue l'expression de VCAM-1, ICAM-1, PECAM, ED-1 et NF κ B induite par l'Ang II (230). De plus, le traitement au fénofibrate diminue, dans ce modèle, l'expression du récepteur AT $_1$ et augmente l'expression du récepteur AT $_2$.

10.3 PPAR β/δ et le système cardiovasculaire

Le facteur de transcription PPAR β/δ est retrouvé de façon ubiquitaire, mais est majoritairement exprimé dans le cerveau, le tissu adipeux, la peau et le cœur (255). Comme pour les isoformes PPAR α et γ , l'activation de PPAR β réduit les niveaux de triglycérides et de LDL petite et dense tout en augmentant le cholestérol HDL. Le traitement de souris obèses avec des agonistes de PPAR β diminue l'obésité et la résistance à l'insuline via les mécanismes d'oxydation des acides gras dans les muscles squelettiques (268). Aussi, l'activation de PPAR β dans les cardiomyocytes de rats régule le métabolisme des lipides cardiaques (269). Ces données suggèrent ainsi un rôle potentiel pour PPAR β dans le système cardiovasculaire. Cela dit, malgré le fait que les recherches sur PPAR β n'ont pas progressé au-delà de l'étape préclinique, ces données suggèrent que PPAR β pourrait être une cible thérapeutique dans le traitement de l'obésité et de la résistance à l'insuline. De plus, malgré le fait que les rôles précis de PPAR β dans les mécanismes inflammatoires sont peu connus, celui-ci semble avoir certains effets anti-inflammatoires dans les macrophages (270). Entre autres, l'expression des protéines MCP-1, MCP-3 et NF κ B est diminuée suite à l'activation de PPAR β dans ces cellules (270). Dans les CE, PPAR β diminue l'expression des protéines MCP-1 et VCAM-1 en inhibant NF κ B (271).

10.4 PPAR γ et le système cardiovasculaire

Le récepteur PPAR γ a trois isoformes (PPAR γ_1 , γ_2 et γ_3). Les ARNm de PPAR γ_1 et PPAR γ_3 sont retrouvés dans la plupart des tissus dont le tissu adipeux, le gros intestin, les vaisseaux sanguins et les cellules de la lignée monocyttaire. PPAR γ_2 est cependant retrouvé principalement dans les adipocytes et favorise l'absorption des lipides et la différenciation adipocytaire (272-274). En plus de ces effets sur la différenciation adipocytaire, PPAR γ est impliqué dans la régulation de plusieurs gènes des voies métaboliques de l'insuline ainsi

que plusieurs médiateurs anti-inflammatoires (253). Les agonistes des PPAR γ induisent, en plus de leur action sur le métabolisme glucidique (augmentation de la sensibilité à l'insuline et diminution de l'hyperglycémie), des effets bénéfiques sur le métabolisme lipidique (275). Favorablement, les TZD diminuent les niveaux de LDL petite et dense, augmentent le taux de cholestérol HDL et diminuent les concentrations d'acides gras et de triglycérides (275). Défavorablement, l'activation des PPAR γ peut cependant provoquer une augmentation des concentrations de cholestérol total et LDL chez certains patients (275). Toutefois, la pioglitazone, comparativement à la rosiglitazone, semble être favorable à la diminution de la concentration et de la grosseur des particules de LDL (276). Les TZD démontrent aussi des effets bénéfiques sur plusieurs autres facteurs et marqueurs de risque cardiovasculaire. Effectivement, l'activation des PPAR γ est associée à une diminution de la PA, une amélioration de la fonction endothéliale et une diminution de l'activateur du plasminogène (PAI-1) et de la microalbuminurie (123,272). De façon générale, le traitement aux TZD diminue l'inflammation, l'expression de molécules d'adhésion, la synthèse de cytokines, la migration cellulaire et la croissance cellulaire dans les vaisseaux sanguins (123,277). Ces réponses sont particulièrement fréquentes dans les artères où des plaques athéromateuses se développent. En effet, l'activation de PPAR γ inhibe la migration et la prolifération des CMLV dans les lésions athérosclérotiques (277). De plus, ces agents diminuent la progression et l'épaisseur de l'intima/média qui est souvent retrouvée chez les patients qui développent de l'athérosclérose (278). Aussi, les TZD augmentent l'expression de PPAR γ dans les macrophages et inhibent l'expression de la NOS inductible et de la MMP-9. L'inhibition des facteurs de transcription NF κ B et AP-1 par PPAR γ semble être en partie responsable de ces événements. Dans l'HTA, l'activation des PPAR γ atténue les effets activateurs, vasomoteurs et inflammatoires de l'Ang II. Chez les rats infusés à l'Ang II, les TZD (pioglitazone et rosiglitazone) préviennent l'augmentation de la PA, le remodelage d'artères de résistances et la dysfonction endothéliale (123). Dans ce modèle, l'Ang II augmente l'expression du récepteur AT $_1$, de protéines du cycle cellulaire, de protéines d'adhésion (VCAM-1 et PECAM) ainsi que la synthèse d'ADN. Ces effets

activateurs sont inhibés par un cotraitement aux TZD (123). Dans les CE, une stimulation avec des TZD ou la 15d-PGJ2 augmente la production de NO favorable à la vasodilatation sans affecter l'expression de la NOS endothéliale. Ceci est associé à une diminution de l'expression de l'ARNm et des protéines des sous-unités nox-1, gp91^{phox} (nox-2) et nox-4 qui composent la NAD(P)H oxydase (279). Aussi, chez le rat DOCA, la rosiglitazone prévient l'HTA induite par le sel ainsi que le remodelage vasculaire. La rosiglitazone, mais pas le fénofibrate, prévient la dysfonction endothéliale. Cependant, ces deux agents diminuent le niveaux de DRO vasculaire (280). Dans les cardiomyocytes, l'Ang II augmente la synthèse protéique et favorise l'hypertrophie cellulaire. Le traitement avec des TZD prévient les effets hypertrophiants de l'Ang II. Toutefois, certaines évidences démontrent que le traitement avec des activateurs de PPAR γ peut aggraver l'insuffisance cardiaque. Cela dit, ces effets pourraient être la conséquence d'une rétention de liquides occasionnée par les effets insulino-mimétiques de ces activateurs plutôt que des effets inotropes négatifs directs sur le muscle cardiaque (281). Certaines données démontrent l'effet protecteur de TZD sur la synthèse de MEC induite par l'Ang II dans les fibroblastes cardiaques. Effectivement, l'activation de PPAR γ dans des fibroblastes cardiaques en cultures permet de diminuer significativement, chez ces derniers, les effets stimulateurs de l'Ang II sur la synthèse de collagène de type I et de la MMP-1 (282). Finalement, des études faites chez l'humain montrent qu'une mutation dans le gène du récepteur PPAR γ provoque des maladies vasculaires qui sont associées à la résistance à l'insuline, au diabète, à l'HTA (283).

De façon générale, les PPAR jouent un rôle important dans le système cardiovasculaire en régulant l'inflammation et le remodelage vasculaire et cardiaque. L'utilisation d'agonistes spécifiques pour les PPAR a permis de démontrer l'implication de ces récepteurs dans la régulation de plusieurs gènes retrouvés dans le système cardiovasculaire. Cependant, l'utilisation d'agonistes combinés (PPAR α/γ) pourrait permettre un contrôle plus adéquat dans le traitement des dyslipidémies, diabète et maladies cardiovasculaires associées.

10.5 Les agonistes multi-activateurs des PPAR

L'utilisation d'agonistes multi-activateurs de PPAR α et PPAR γ dans le traitement de plusieurs maladies chroniques est présentement sous évaluation. Les connaissances actuelles sur leurs homologies structurales et leurs effets complémentaires sur l'homéostasie énergétique en font une cible de choix. Ces observations ont encouragé la synthèse d'agonistes qui peuvent activer les récepteurs PPAR α/γ et permettent des effets pharmacologiques bénéfiques, supérieurs à ceux obtenus par l'activation d'un seul récepteur. Effectivement, malgré le fait que les activateurs de PPAR γ diminuent de façon importante l'hyperglycémie chez les patients diabétiques de type 2, la rosiglitazone ne fournit pas d'effet important sur le niveau de lipides circulants. La pioglitazone, pour sa part, est associée à une amélioration modeste des niveaux lipidiques circulants. Distinctement, les agonistes de PPAR α comme les fibrates permettent d'améliorer nettement les niveaux lipidiques circulants en diminuant les triglycérides et les LDL ainsi qu'en augmentant le niveau de HDL. Cependant, ces agents n'améliorent pas significativement l'hyperglycémie. Par conséquent, des agonistes combinatoires ne sont pas uniquement utiles comme agents thérapeutiques potentiels, mais permettent aussi d'enrichir les connaissances moléculaires actuelles des PPAR. Plusieurs groupes de recherche ont élaboré la synthèse d'agonistes combinatoires efficaces comme le ragaglitazar, le tesaglitazar, l'acide chromane-2-carboxylique et le MCC-555. Ces agents sont efficaces par leurs propriétés antihyperglycémiantes, antihyperlipidémiantes et anti-inflammatoires (284). Dans une étude clinique en phase II, la ragaglitazar a diminué le glucose plasmatique, l'hémoglobine A1c, les triglycérides, les acides gras libres et le niveau total de cholestérol chez des sujets diabétiques de type 2 (285,286). Cependant, cet agoniste de PPAR α et PPAR γ , a des effets carcinogènes chez les rongeurs (284). Cet effet est probablement dû à la surexpression du récepteur PPAR α dans ces modèles expérimentaux. Par conséquent, ces résultats ne sont probablement pas représentatifs des effets de cet agent chez l'humain. Pour sa part, l'activateur MCC-555 qui est un activateur de PPAR α/β et γ

diminue l'activité du facteur nucléaire NFκB et l'expression des gènes et protéines de différents marqueurs inflammatoires comme VCAM-1 et le TNFα dans les CE humaine (286). Néanmoins, ce type d'agoniste n'est pas encore utilisé dans les études cliniques. Le tesaglitazar est un autre puissant activateur de PPARα/γ qui est présentement en phase III clinique qui démontre des effets bénéfiques chez les rongeurs diabétiques et dyslipidémiques (287). Cela dit, certaines données cliniques démontrent des effets néfastes du muraglitazar, un autre agoniste PPARα/γ, sur les événements cardiovasculaires des patients diabétiques de type 2. Effectivement, comparativement aux groupes placebo et traités à la pioglitazone, le groupe traité avec le muraglitazar a une prévalence plus élevée à l'infarctus du myocarde, aux embolies et à l'insuffisance cardiaque. Aussi, le taux de mortalité dans ce dernier groupe est plus élevé comparativement aux autres groupes (288). Cela dit, malgré ces données cliniques peu encourageantes, la mise au point d'agonistes combinés des PPAR est une approche intéressante et prometteuse qui nécessite d'être approfondie.

11. Les objectifs de cette thèse

L'HTA est associée à plusieurs complications physiologiques comme le diabète de type 2. Chez les patients hypertendus, différents événements cardiovasculaires ont été rapportés. Entre autres, une augmentation du remodelage vasculaire est observée chez ces derniers et favorise la progression de l'HTA. Le tout a pour conséquence d'augmenter les événements cardiovasculaires comme le remodelage et la dysfonction cardiaque, l'insuffisance cardiaque et rénale, l'infarctus du myocarde ainsi que l'insuffisance rénale. L'Ang II est le plus important peptide du SRAA et joue un rôle majeur dans la croissance des CMLV et dans la progression du remodelage vasculaire observé dans l'HTA. Cependant, la majorité des données concernant les voies de signalisation de l'Ang II ont été obtenues à partir d'études faites sur les vaisseaux de conductance. Plusieurs études démontrent l'importance des vaisseaux de résistance dans la progression de l'HTA. Aussi, il a été démontré que les TZD, des agents qui augmentent la sensibilité à l'insuline et qui activent le facteur de transcription PPAR γ permettent de diminuer certains effets de l'Ang II. Par conséquent, mes études ont été dédiées aux effets inhibiteurs d'activateurs de PPAR γ sur les voies de signalisation de l'Ang II qui sont impliquées dans la croissance des CMLV. Ces études, *in vivo* et *in vitro*, nous aideront à comprendre davantage les bénéfices d'activateurs de PPAR γ sur les mécanismes moléculaires de l'Ang II dans la physiopathologie de l'HTA. Par conséquent, l'hypothèse principale de cette thèse est que des agonistes de PPAR γ inhibent différentes voies de signalisation de l'Ang II, *in vitro* et *in vivo*, ainsi que l'inflammation cardiaque retrouvée dans un modèle de rat spontanément hypertendu.

Les objectifs de la première étude (chapitre II, article 1):

1. Déterminer, *in vitro*, les effets d'activateurs endogènes et exogènes de PPAR γ sur la croissance cellulaire induite par l'Ang II.

2. Déterminer, *in vitro*, si l'Ang II affecte les voies de signalisation PI3K et MAPK dans des CMLV dérivées d'artères de résistances et quels sont les effets d'agonistes de PPAR γ sur ces dernières.

Les objectifs de la deuxième étude (chapitre III, article 2):

1. Déterminer, *in vivo*, les effets activateurs de l'Ang II sur les voies des MAPK et PI3K dans différents lits vasculaires de rats infusés à l'Ang II.
2. Déterminer les effets de la rosiglitazone sur les voies de signalisation de l'Ang II dans différents lits vasculaires de rats infusés à l'Ang II.

Les objectifs de la troisième étude (chapitre IV, article 3):

1. Évaluer à long terme les effets anti-inflammatoires de la pioglitazone dans le cœur de rats génétiquement hypertendus.
2. Évaluer à long terme les effets de la pioglitazone sur le remodelage et la fonction cardiaque de rats génétiquement hypertendus.

CHAPITRE II: Article 1

Contribution personnelle dans cette étude :

- L'isolement et la culture des CMLV
- L'extraction et le dosage des protéines tissulaires
- La mise au point des expériences de cette étude
- La rédaction de l'article
- Les réponses aux commentaires des arbitres qui ont évalué cet article

PPAR- γ inhibits ANG II-induced cell growth via SHIP2 and 4E-BP1

Karim Benkirane, Farhad Amiri, Quy N. Diep, Mohammed El Mabrouk,
and Ernesto L. Schiffrin

From the Multidisciplinary Research Group on Hypertension, Clinical Research Institute of
Montreal, Montreal, Quebec, Canada.

Article publié dans

American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology
(290:H390-H397, 2006)

Abstract

The present study evaluated the effects of Peroxisome Proliferator-Activated Receptor (PPAR)- γ activators on ANG II-induced signaling pathways and cell growth. Vascular smooth muscle cells (VSMC) derived from rat mesenteric arteries were treated with ANG II, with/without the AT₁ receptor blocker valsartan or the AT₂ receptor blocker PD-123319, after pretreatment for 24 h with the PPAR- γ activators 15-deoxy- $\Delta^{12,14}$ -prostaglandin J₂ (15d-PGJ₂) or rosiglitazone. Both 15d-PGJ₂ and rosiglitazone decreased ANG II-induced DNA synthesis. Rosiglitazone treatment increased nuclear PPAR- γ expression and activity in VSMC. However, rosiglitazone did not alter expression of PPAR- α/β , ERK 1/2, Akt, or ANG II receptors. 15d-PGJ₂ and rosiglitazone decreased ERK 1/2 and Akt peak activity, both of which were induced by ANG II via the AT₁ receptor. Rosiglitazone inhibited ANG II-enhanced phosphorylation of eukaryotic initiation factor 4E-binding protein 1 (4E-BP1), as well as Src homology (SH) 2-containing inositol phosphatase 2 (SHIP2). PPAR- γ activation reduced ANG II-induced growth associated with inhibition of ERK 1/2, Akt, 4E-BP1, and SHIP2. Modulation of these pathways by PPAR- γ activators may contribute to regression of vascular remodeling in hypertension.

Introduction

Peroxisome Proliferator-Activated Receptors (PPARs) are transcription factors of the nuclear hormone receptor family that bind to the PPAR-response element (PPRE) (39). Three isoforms, encoded by separate genes, have been demonstrated. PPAR- α is predominantly expressed in tissues exhibiting high fatty acid catabolism such as liver, heart, kidney, and skeletal muscle, whereas PPAR- γ is most abundantly expressed in adipose tissue, large intestine, and cells of the monocyte lineage. PPAR- γ is implicated in adipocyte differentiation, cellular energy homeostasis and regulation of genes that affect insulin activity (1,22,29,39). PPAR- β/δ , which is expressed ubiquitously, is involved in fatty acid

oxidation (13). PPARs are activated by natural ligands such as fatty acids and eicosanoids. The lipid-lowering fibrates and the insulin-sensitizing thiazolidinediones (TZDs) or glitazones are synthetic ligands for PPAR- α and PPAR- γ , respectively. The role of PPARs in gene regulation has been studied primarily in liver and adipose tissue, and they have been implicated in metabolic diseases such as obesity, diabetes, and atherosclerosis (35). However, PPAR- γ is also present in vascular smooth muscle cells (VSMCs), but its function in resistance arteries, which are important in blood pressure (BP) elevation in hypertension, remains to be elucidated (7,29,34).

Vascular remodeling, which is the pathophysiological adaptation of the vascular wall in hypertension, involves several processes including VSMC growth, apoptosis, and collagen deposition. ANG II plays a detrimental role in the pathogenesis of hypertension through VSMC growth by activation of ANG II type 1 (AT₁) receptors (9,36). The AT₁ receptor activates phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) and MAPK pathways, both of which are involved in growth-promoting processes (23,37). We have shown that both PPAR- α and PPAR- γ are expressed at significantly greater levels in blood vessels of spontaneously hypertensive rats than of normotensive Wistar-Kyoto rats, suggesting PPARs may contribute to regulation of different genes of the vasculature in hypertension (7,20). In addition to the known inhibitory effects of TZDs on insulin-induced VSMC proliferation in vitro (14), we previously showed that TZDs have antihypertensive effects in ANG II-induced hypertension by exerting direct effects on the vascular wall, independent of their role on lipid metabolism (6).

In VSMCs, insulin exerts a mitogenic effect mediated through the MAPK pathway. Insulin-mediated signaling pathways may be inhibited by ANG II in VSMCs (31), mainly occurring through two signaling mechanisms. The PI3K pathway mediates insulin-sensitive metabolic processes, including stimulation of glucose transport and activation of the p70 S6 kinase, Akt/protein kinase B, and eukaryotic initiation factor (eIF) 4E-binding protein 1 (4E-BP1), thus subsequently stimulating glycogen and protein synthesis (21). Moreover, tyrosine-phosphorylated Src homology (SH) 2-containing inositol phosphatase 2 (SHIP2)

has been demonstrated to regulate PI3K/Akt signaling pathway by altering PI3K enzymatic product and play an important role in insulin resistance (27). The second mechanism is the MAPK pathway that mediates insulin growth-promoting effects. It has been shown that TZDs troglitazone and pioglitazone decreased BP in insulin-resistant rats and in type 2 diabetic patients (19,24). Furthermore, rosiglitazone, another TZD, enhanced the ability of insulin to transport glucose into skeletal muscle, thus lowering circulating insulin levels (26). However, the mechanisms by which PPAR- γ activators affect ANG II signaling pathways remain unclear. Thus we hypothesized that PPAR- γ activators inhibit ANG II-induced cell growth by interfering with the PI3K/Akt signaling pathways in VSMCs from resistance arteries. We questioned whether this occurs through inhibition of SHIP2 activity, which would reduce the bioactive phospholipids produced by PI3K that stimulate Akt, or whether it results from inhibition of 4E-BP1, which would have an effect further downstream to inhibit protein synthesis and cell growth.

Methods

Cell culture

VSMCs were obtained from mesenteric arteries of male Sprague-Dawley rats (Charles River, St. Constant, Quebec, Canada) as previously described (10). Cells from *passages* 3–6 were grown in DMEM with 10% calf serum (Invitrogen, Grand Island, NY). All chemicals were purchased from Sigma (St. Louis, MO) unless otherwise indicated.

[³H]thymidine and [³H]leucine incorporation and cell proliferation

Subconfluent cells (85–90%) were serum deprived for 24 h before experiments to render them quiescent. DNA and protein synthesis, markers of hyperplasia and hypertrophy, respectively, were evaluated by [³H]thymidine and [³H]leucine incorporation as previously described (36), while cell proliferation was determined with light microscopy. Briefly, cells were stimulated for 24 h with ANG II (10^{-7} mol/l, Peptide International, Louisville, KY) without or with increasing concentrations of rosiglitazone (10^{-7} – 10^{-5} mol/l, Cayman

Chemical, Ann Arbor, MI) or the putative endogenous PPAR- γ activator 15d-PGJ₂ (10^{-8} – 10^{-5} mol/l, Cayman Chemical). Cells exposed to [³H]thymidine or [³H]leucine were then incubated with trichloroacetic acid (0.75 mol/l, 45 min) and then with NaOH (1 mol/l, 1 h at 37°C) and were analyzed by liquid scintillation counting.

Electrophoretic mobility shift assay

Quiescent cells were stimulated with rosiglitazone (10^{-7} mol/l) for 24 h, and nuclear extract was obtained by using Pierce NE-PER kit (Rockford, IL). Protein concentration was determined with Bio-Rad D_c kit (BioRad Laboratories, Hercules, CA). VSMC PPAR- γ activity was detected using the Nushift kit (Active Motif, Carlsbad, CA). Wild-type oligonucleotides 5'-GGAACTAGGTCAAAGGTCATCCCCT-3' and mutant oligonucleotides 5'-GGAACTAGAACAAAGAACATCCCCT-3' were used in a competition assay. Supershift was performed using PPAR- γ antibody from Active Motif.

Western blot analysis

Cells, prestimulated with or without rosiglitazone (10^{-7} mol/l) or 15d-PGJ₂ (5×10^{-6} mol/l) for 24 h, were stimulated for various times with or without ANG II (10^{-7} mol/l) in the presence/absence of valsartan (10^{-5} mol/l, gift from Novartis) or PD-123319 (10^{-6} mol/l, Tocris, Ellisville, MO). After stimulation, lysis buffer [1 mmol/l NaF, 5 mmol/l NaCl, 1 mmol/l EDTA, 1 mmol/l NP40 (Roche Diagnostics, Indianapolis, IN), 10 mmol/l HEPES, 1 μ g/ml pepstatin A, 1 μ g/ml leupeptin, 1 μ g/ml aprotinin, 1 mmol/l sodium orthovanadate, 1 mmol/l PMSF] was added to cells, and total protein was extracted as previously described (36). Samples were analyzed by Western blotting using specific antibodies: PPAR- γ (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA) or phospho- and non-phospho-specific Akt, 4E-BP1, and ERK 1/2 (Cell Signaling, Beverly, MA). Band intensity was measured by the ImageQuant 5.0 software (Molecular Dynamics, Sunnyvale, CA).

Immunoprecipitation.

Stimulated cells were lysed, and 500 μ g of total protein extract were immunoprecipitated with SHIP2 (UpState, Lake Placid, NY) antibody and then incubated with protein G Plus-Agarose (Calbiochem, Mississauga, Canada). Thereafter, Western blotting was carried out as mentioned above, and membranes were incubated with the anti-phosphotyrosine (PY20, BD Transduction Laboratories, Mississauga, Canada) antibody for activity measurement and then stripped and reblotted with SHIP2 antibody for protein expression. For SHIP2 experiments, unstimulated Jurkat cell lysate was used as a positive control (UpState).

Data analysis

Values are shown as means \pm SE. Differences between mean values were evaluated as appropriate by Student's *t*-test or by one-way ANOVA, followed by Tukey-Kramer's post hoc test. *P* < 0.05 was considered significant.

Results**Cell growth**

ANG II induced a fourfold increase in [³H]thymidine DNA incorporation, which was significantly decreased (*P* < 0.001) by 24 h treatment with 15d-PGJ₂ (5 μ mol/l) or rosiglitazone (10 μ mol/l) (Fig. 1, A and B). Similarly, ANG II induced a significant increase in [³H]leucine incorporation (*P* < 0.01), whereas neither 15d-PGJ₂ nor rosiglitazone alone had any effects on both thymidine and leucine incorporations. Twenty-four-hour treatment with 15d-PGJ₂ (5 μ mol/l) or rosiglitazone (10 μ mol/l) significantly decreased ANG II-induced [³H]leucine incorporation (*P* < 0.001) and (*P* < 0.05), respectively (Fig. 1, C and D). Accordingly, ANG II-induced increase in cell number was prevented by pretreatment with rosiglitazone and 15d-PGJ₂, respectively (Fig. 1E).

Effect of rosiglitazone on PPAR- γ expression and activation

Rosiglitazone treatment for 24 h significantly increased PPAR- γ 1 nuclear expression but had no effect on PPAR- γ 2 (Fig. 2A). As assessed by electrophoretic mobility shift assay, rosiglitazone induced a twofold increase in PPAR- γ binding (Fig. 2B).

Effects of PPAR- γ activators on ANG II receptors and signaling

ANG II induced a time-dependent tyrosine/threonine phosphorylation of ERK 1/2, which was reduced, at 5 min, by 55% by 15d-PGJ₂ and by 59% by rosiglitazone (Fig. 3A), whereas neither agent affected ERK 1/2 expression. These results demonstrate that 15d-PGJ₂ treatment inhibits ANG II-induced ERK 1/2 phosphorylation more rapidly (2.5 min) than rosiglitazone treatment (5 min). Similarly to ERK 1/2, Akt serine phosphorylation induced by ANG II was partially inhibited by rosiglitazone and 15d-PGJ₂ (71% and 58%, respectively) while Akt expression remained unaltered compared with controls (Fig. 3B). ANG II significantly increased 4E-BP1 phosphorylation, which was significantly inhibited by rosiglitazone ($P < 0.01$, Fig. 4A). Long-term treatment with ANG II (24 h) also significantly increased 4E-BP1 activity. 4E-BP1 was completely inhibited with rosiglitazone cotreatment ($P < 0.001$, Fig. 4B), while rosiglitazone alone did not significantly alter 4E-BP1 serine phosphorylation. VSMC AT₁ or AT₂ expression was unaltered by 24 h rosiglitazone treatment (data not shown). The AT₁ antagonist valsartan significantly ($P < 0.001$) inhibited ANG II-induced ERK 1/2 and Akt phosphorylation, by 88% and 62%, respectively, whereas the AT₂ antagonist PD-123319 had no effect (Fig. 5). Rosiglitazone did not have any additional effect on AT₁ or AT₂ blockade, suggesting that its inhibitory effects on ANG II stimulatory events were downstream of the AT₁ receptor (Fig. 5). Stimulation with ANG II significantly increased SHIP2 activity ($P < 0.01$), which was inhibited by rosiglitazone ($P < 0.001$) (Fig. 6). Rosiglitazone alone decreased SHIP2 activity by 81% ($P < 0.01$). However, SHIP2 protein expression was unaltered under the different experimental conditions.

Discussion

ANG II mediates its growth-promoting effects through different signaling pathways (36). In the present study we targeted two of these signaling pathways, MAPK and PI3K. Specific inhibitors of PI3K and MEK inhibited ANG II-induced DNA incorporation in VSMCs derived from mesenteric resistance vessels (data not shown). Similar effects were previously observed in aortic VSMCs from normotensive and hypertensive rats and on human resistance and conduit vessels (10,12,36,40). In this study, a putative endogenous (15d-PGJ₂) and an exogenous PPAR- γ activator (rosiglitazone) significantly reduced ANG II effects on DNA and protein synthesis, and cell proliferation. PPAR- γ activation negatively modulated ANG II stimulatory effects on PI3K/Akt signaling pathways through inhibition of SHIP2 activity. Furthermore, these events were associated with inhibition of the translational modulator 4E-BP1, resulting in reduced cell growth.

Law *et al.* (20) demonstrated nuclear PPAR- γ 1 and PPAR- γ 2 expression in rat and human aortic VSMC and that PPAR- γ 1 expression was greater than PPAR- γ 2 in nonadipose tissues, such as VSMCs. In the present study, nuclear PPAR- γ 1 expression increased under rosiglitazone, whereas the PPAR- γ 2 expression was unaltered, while the active form of PPAR- γ in the nucleus of VSMCs after rosiglitazone treatment was increased. The specificity of the interaction of PPAR- γ with its PPRE was confirmed by supershift, mutant competition, and cold competition assays. VSMC PPAR- α and PPAR- β expression and nuclear binding to the PPRE domain was unaltered by rosiglitazone treatment (data not shown), demonstrating that rosiglitazone acts as a specific PPAR- γ activator, as also demonstrated elsewhere (5).

Growth factor-mediated activation of PI3K leads to the generation of phosphatidylinositol 3,4-bisphosphate [PI(3,4)P₂] and phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate [PI(3,4,5)P₃], which recruits inactive Akt from the cytosol to the plasma membrane via pleckstrin homology domain binding. Akt is then sequentially phosphorylated at Thr308 and Ser473 by 3-phosphoinositide-dependent kinase-1 and -2, respectively, which activate the kinase

(3,25,33). Activated Akt is proposed to regulate many downstream proteins such as insulin receptor substrate 1, the mammalian target of rapamycin (mTOR) and 4E-BP1. Akt is also implicated in cell metabolism, survival, and growth and thus could potentially play a crucial role in vascular remodeling. Dugourd *et al.* (8) demonstrated that ANG II-induced proliferation was mediated by activation of PI3K and its downstream protein Akt in rat aortic VSMC. Similarly, we demonstrated that ANG II induced Akt activation without change in protein expression in mesenteric VSMC, which was significantly inhibited by 24-h treatment with 15d-PGJ₂ or rosiglitazone.

4E-BP1 is an important translation and cell growth regulator. In the nonphosphorylated form, it binds and segregates eIF4E, the mRNA 5' cap-binding protein, which plays a role in the recruitment of ribosomal subunits and other complexes to initiate proteins synthesis (21). Insulin and ANG II (via the AT₁ receptor) induce activation of the PI3K/Akt/mTOR pathway and phosphorylate 4E-BP1, which, in turn, dissociates from eIF4E (2, 16). Here we demonstrate for the first time that rosiglitazone inhibits acute stimulatory effects on 4E-BP1 in VSMCs from resistance arteries, thus blocking translation initiation. Furthermore, 24-h ANG II treatment maintains 4E-BP1 activation and translational activity in VSMC that was inhibited by PPAR- γ activator. These data suggest important antihypertrophic effects of rosiglitazone by altering protein synthesis through 4E-BP1, which correlate with the reduced Akt activity, thus demonstrating an important pathway by which PPAR- γ activator may reduce ANG II-induced cell growth effects.

The AT₁ receptor can activate many signaling pathways in different cell types, including MAPK. Once ERK 1/2 are activated, they translocate into the nucleus where they regulate several transcription factors involved in cellular growth and differentiation (30). In conduit vessels, the PPAR- γ activator troglitazone reduced ANG II-induced ERK 1/2 activation (12,15). In the present study we found that PPAR- γ activation exerted similar effects on VSMCs derived from resistance arteries. Although 15d-PGJ₂ treatment inhibited ANG II-induced ERK 1/2 tyrosine/threonine phosphorylation more rapidly than rosiglitazone treatment, both these agonists blocked cell growth. Furthermore, it is possible that 15d-

PGI₂ interferes with other signaling pathways that are linked to ERK 1/2 activation, thus causing a more rapid alteration in ANG II stimulatory effects.

Most of the known functional effects of ANG II on VSMCs are mediated by AT₁ receptors (9,36). Takeda *et al.* (34) showed a significant decrease of AT₁ mRNA after 6 h treatment with PPAR- γ activators troglitazone and pioglitazone, with return to basal levels after 12–24 h in VSMCs (34). In resistance artery VSMCs, the present study showed that 24 h rosiglitazone treatment had no effect on ANG II receptor expression, whereas AT₁-dependent MAPK and PI3K/Akt/4E-BP1 activation were downregulated. ANG II-activated signaling molecules are regulated by various kinases and phosphatases. We demonstrated for the first time that the lipid phosphatase SHIP2 is activated by ANG II. Activation of SHIP2 hydrolyzes the PI3K product PI(3,4,5)P₃ to PI(3,4)P₂, which is the main lipid necessary for Akt activation and recruitment to the cell membrane (11,18,28). Here we show that ANG II stimulation significantly increased SHIP2 phosphorylation, an effect that was prevented by rosiglitazone. Furthermore, rosiglitazone alone significantly reduced SHIP2 activity, suggesting an ANG II-independent inhibitory effect. This raises the possibility that rosiglitazone may interfere directly with SHIP2 activity. However, it is noteworthy that 10 μ mol/l rosiglitazone alone did not decrease cell growth, even if SHIP2 activity was reduced. It has been demonstrated that crosstalk between ANG II and insulin inhibits signaling pathways, leading to insulin resistance and vascular pathologies such as atherosclerosis (4,32,38). Furthermore, Hori *et al.* (17) demonstrated that SHIP2 expression was increased in insulin-resistant diabetic *db/db* mice compared with controls. Taken together, this suggests that rosiglitazone could exert its effect on insulin sensitivity in part through the inhibition of ANG II-induced SHIP2 activity.

In conclusion, although the precise mechanism of action of PPAR- γ activators on ANG II-induced signaling is not yet completely clear, we demonstrate that PPAR- γ activators have potent negative effects on ANG II-mediated cell growth by interfering with PI3K/Akt signaling pathway. This occurs through inhibition of SHIP2 activity, which would reduce

the bioactive phospholipids produced by PI3K that stimulate Akt, and by the inhibition of 4E-BP1, which would have an effect further downstream to inhibit protein synthesis and cell growth. These data provide new insights into potential beneficial effects of PPAR- γ activators in the prevention or treatment of cardiovascular disease and hypertension. Although further experiments are needed to clarify rosiglitazone inhibitory effects on ANG II-induced SHIP2 activation and its regulatory effects on PI3K phospholipid synthesis, downregulation of these pathways by PPAR- γ activators could contribute to prevention or regression of vascular remodeling in hypertensive and diabetic patients.

Grants

This work was supported by grant 13570 (to E. L. Schiffrin) and a Group Grant to the Multidisciplinary Research Group on Hypertension, both from the Canadian Institutes of Health Research (CIHR). K. Benkirane was supported by a CIHR doctoral studentship.

Aknowledgements

We are grateful to Suzanne Diébold and André Turgeon for excellent technical assistance.

References

1. Berger J and Moller DE. The mechanisms of action of PPARs. *Annu Rev Med* 53: 409-435, 2002.
2. Bhandari BK, Feliens D, Duraisamy S, Stewart JL, Gingras AC, Abboud HE, Choudhury GG, Sonenberg N and Kasinath BS. Insulin regulation of protein translation repressor 4E-BP1, an eIF4E-binding protein, in renal epithelial cells. *Kidney Int* 59: 866-875, 2001.
3. Cantley LC. The phosphoinositide 3-kinase pathway. *Science* 296: 1655-1657, 2002.
4. Cooper ME. The role of the renin-angiotensin-aldosterone system in diabetes and its vascular complications. *Am J Hypertens* 17: 16S-20S, 2004.
5. Desvergne B and Wahli W. Peroxisome proliferator-activated receptors: nuclear control of metabolism. *Endocr Rev* 20: 649-688, 1999.
6. Diep QN, El Mabrouk M, Cohn JS, Endemann D, Amiri F, Viridis A, Neves MF and Schiffrin EL. Structure, endothelial function, cell growth, and inflammation in blood vessels of angiotensin II-infused rats: role of peroxisome proliferator-activated receptor- γ . *Circulation* 105: 2296-2302, 2002.
7. Diep QN and Schiffrin EL. Increased expression of peroxisome proliferator-activated receptor- α and - γ in blood vessels of spontaneously hypertensive rats. *Hypertension* 38: 249-254, 2001.
8. Dugourd C, Gervais M, Corvol P and Monnot C. Akt is a major downstream target of PI3-kinase involved in angiotensin II-induced proliferation. *Hypertension* 41: 882-890, 2003.
9. Dzau VJ, Mukoyama M and Pratt RE. Molecular biology of angiotensin receptors: target for drug research? *J Hypertens (Suppl)* 12: S1-S5, 1994.

10. El Mabrouk M, Touyz RM and Schiffrin EL. Differential ANG II-induced growth activation pathways in mesenteric artery smooth muscle cells from SHR. *Am J Physiol* 281: H30-H39, 2001.
11. Franke TF, Kaplan DR, Cantley LC and Toker A. Direct regulation of the Akt proto-oncogene product by phosphatidylinositol-3,4-bisphosphate. *Science* 275: 665-668, 1997.
12. Fukuda N, Hu WY, Teng J, Chikara S, Nakayama M, Kishioka H and Kanmatsuse K. Troglitazone inhibits growth and improves insulin signaling by suppression of angiotensin II action in vascular smooth muscle cells from spontaneously hypertensive rats. *Atherosclerosis* 163: 229-239, 2002.
13. Gilde AJ, van der Lee KA, Willemsen PH, Chinetti G, van der Leij FR, van der Vusse GJ, Staels B and van Bilsen M. Peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) α and PPAR β/δ , but not PPAR γ , modulate the expression of genes involved in cardiac lipid metabolism. *Circ Res* 92: 518-524, 2003.
14. Goetze S, Kim S, Xi XP, Graf K, Yang DC, Fleck E, Meehan WP, Hsueh WA and Law RE. Troglitazone inhibits mitogenic signaling by insulin in vascular smooth muscle cells. *J Cardiovasc Pharmacol* 35: 749-757, 2000.
15. Goetze S, Xi XP, Graf K, Fleck E, Hsueh WA and Law RE. Troglitazone inhibits angiotensin II-induced extracellular signal-regulated kinase 1/2 nuclear translocation and activation in vascular smooth muscle cells. *FEBS Lett* 452: 277-282, 1999.
16. Hafizi S, Wang X, Chester AH, Yacoub MH and Proud CG. ANG II activates effectors of mTOR via PI3-K signaling in human coronary smooth muscle cells. *Am J Physiol* 287: H1232-H1238, 2004.
17. Hori H, Sasaoka T, Ishihara H, Wada T, Murakami S, Ishiki M and Kobayashi M. Association of SH2-containing inositol phosphatase 2 with the insulin resistance of diabetic db/db mice. *Diabetes* 51: 2387-2394, 2002.

18. Klippel A, Kavanaugh WM, Pot D and Williams LT. A specific product of phosphatidylinositol 3-kinase directly activates the protein kinase Akt through its pleckstrin homology domain. *Mol Cell Biol* 17: 338-344, 1997.
19. Kotchen TA, Reddy S and Zhang HY. Increasing insulin sensitivity lowers blood pressure in the fructose-fed rat. *Am J Hypertens* 10: 1020-1026, 1997.
20. Law RE, Goetze S, Xi XP, Jackson S, Kawano Y, Demer L, Fishbein MC, Meehan WP and Hsueh WA. Expression and function of PPAR γ in rat and human vascular smooth muscle cells. *Circulation* 101: 1311-1318, 2000.
21. Lekmine F, Uddin S, Sassano A, Parmar S, Brachmann SM, Majchrzak B, Sonenberg N, Hay N, Fish EN and Platanius LC. Activation of the p70 S6 kinase and phosphorylation of the 4E-BP1 repressor of mRNA translation by type I interferons. *J Biol Chem* 278: 27772-27780, 2003.
22. Loviscach M, Rehman N, Carter L, Mudaliar S, Mohadeen P, Ciaraldi TP, Veerkamp JH and Henry RR. Distribution of peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs) in human skeletal muscle and adipose tissue: relation to insulin action. *Diabetologia* 43: 304-311, 2000.
23. Motley ED, Eguchi K, Gardner C, Hicks AL, Reynolds CM, Frank GD, Mifune M, Ohba M and Eguchi S. Insulin-induced Akt activation is inhibited by angiotensin II in the vasculature through protein kinase C- α . *Hypertension* 41: 775-780, 2003.
24. Ogihara T, Rakugi H, Ikegami H, Mikami H and Masuo K. Enhancement of insulin sensitivity by troglitazone lowers blood pressure in diabetic hypertensives. *Am J Hypertens* 8: 316-320, 1995.
25. Oudit GY, Sun H, Kerfant BG, Crackower MA, Penninger JM and Backx PH. The role of phosphoinositide-3 kinase and PTEN in cardiovascular physiology and disease. *J Mol Cell Cardiol* 37: 449-471, 2004.
26. Raskin P, Rendell M, Riddle MC, Dole JF, Freed MI and Rosenstock J. A randomized trial of rosiglitazone therapy in patients with inadequately controlled insulin-treated type 2 diabetes. *Diabetes Care* 24: 1226-1232, 2001.

27. Sasaoka T, Fukui K, Wada T, Murakami S, Kawahara J, Ishihara H, Funaki M, Asano T and Kobayashi M. Inhibition of endogenous SHIP2 ameliorates insulin resistance caused by chronic insulin treatment in 3T3-L1 adipocytes. *Diabetologia* 48: 336-344, 2005.
28. Scheid MP, Huber M, Damen JE, Hughes M, Kang V, Neilsen P, Prestwich GD, Krystal G and Duronio V. Phosphatidylinositol (3,4,5)P₃ is essential but not sufficient for protein kinase B (PKB) activation; phosphatidylinositol (3,4)P₂ is required for PKB phosphorylation at Ser-473: studies using cells from SH2-containing inositol-5-phosphatase knockout mice. *J Biol Chem* 277: 9027-9035, 2002.
29. Schiffrin EL, Amiri F, Benkirane K, Iglarz M and Diep QN. Peroxisome proliferator-activated receptors: vascular and cardiac effects in hypertension. *Hypertension* 42: 664-668, 2003.
30. Seger R and Krebs EG. The MAPK signaling cascade. *FASEB J* 9: 726-735, 1995.
31. Senthil D, Faulkner JL, Choudhury GG, Abboud HE and Kasinath BS. Angiotensin II inhibits insulin-stimulated phosphorylation of eukaryotic initiation factor 4E-binding protein-1 in proximal tubular epithelial cells. *Biochem J* 360: 87-95, 2001.
32. Sharma AM and Chetty VT. Obesity, hypertension and insulin resistance. *Acta Diabetol* 42 (Suppl) 1: S3-S8, 2005.
33. Shiojima I and Walsh K. Role of Akt signaling in vascular homeostasis and angiogenesis. *Circ Res* 90: 1243-1250, 2002.
34. Takeda K, Ichiki T, Tokunou T, Funakoshi Y, Iino N, Hirano K, Kanaide H and Takeshita A. Peroxisome proliferator-activated receptor γ activators downregulate angiotensin II type 1 receptor in vascular smooth muscle cells. *Circulation* 102: 1834-1839, 2000.
35. Tontonoz P, Nagy L, Alvarez JG, Thomazy VA and Evans RM. PPAR γ promotes monocyte/macrophage differentiation and uptake of oxidized LDL. *Cell* 93: 241-252, 1998.

36. Touyz RM, Deng LY, He G, Wu XH and Schiffrin EL. Angiotensin II stimulates DNA and protein synthesis in vascular smooth muscle cells from human arteries: role of extracellular signal-regulated kinases. *J Hypertens* 17: 907-916, 1999.
37. Touyz RM, He G, Wu XH, Park JB, Mabrouk ME and Schiffrin EL. Src is an important mediator of extracellular signal-regulated kinase 1/2-dependent growth signaling by angiotensin II in smooth muscle cells from resistance arteries of hypertensive patients. *Hypertension* 38: 56-64, 2001.
38. Velloso LA, Folli F, Sun XJ, White MF, Saad MJ and Kahn CR. Cross-talk between the insulin and angiotensin signaling systems. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93: 12490-12495, 1996.
39. Willson TM, Brown PJ, Sternbach DD and Henke BR. The PPARs: from orphan receptors to drug discovery. *J Med Chem* 43: 527-550, 2000.
40. Xi XP, Graf K, Goetze S, Fleck E, Hsueh WA and Law RE. Central role of the MAPK pathway in ang II-mediated DNA synthesis and migration in rat vascular smooth muscle cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 19: 73-82, 1999.

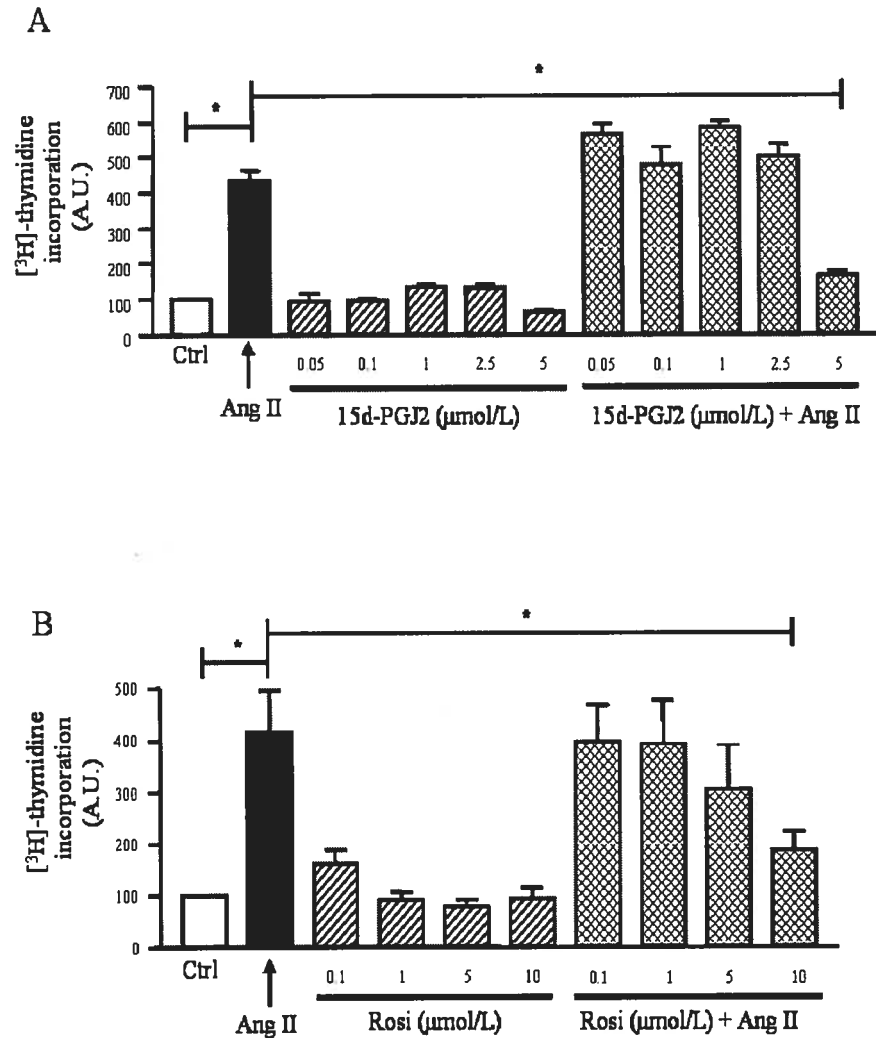


Figure II-1: Peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR)- γ activators inhibit vascular smooth muscle cell (VSMC) growth. A–B: VSMC growth after 24 h control (Ctrl; open bars), ANG II (black bars), rosiglitazone (Rosi) or 15d-PGJ₂ (hatched), or cotreatment of ANG II + rosiglitazone or ANG II + 15-deoxy- $\Delta^{12,14}$ -prostaglandin J₂ (15d-PGJ₂; checkered). Results are means \pm SE ($n = 3-8$). * $P < 0.001$. Results are expressed as arbitrary units (AU), which represent relative counts/min of [³H]thymidine.

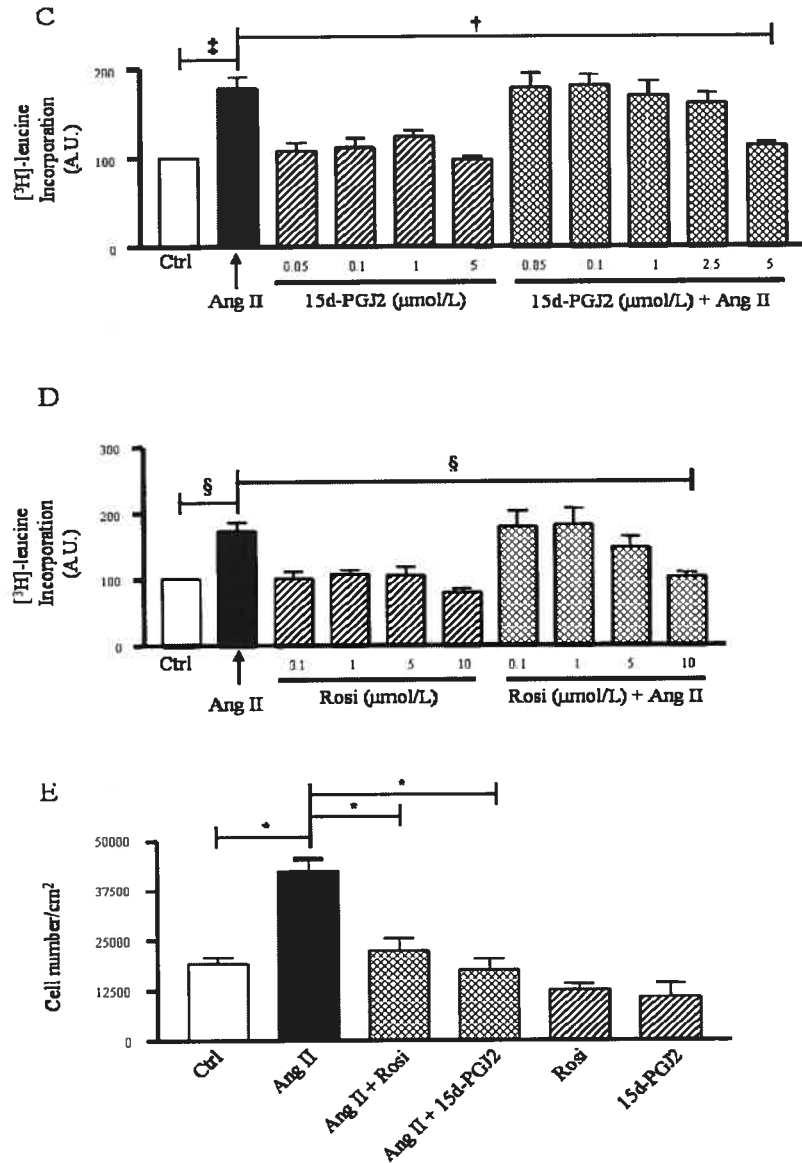


Figure II-1 : Peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR)- γ activators inhibit vascular smooth muscle cell (VSMC) growth. C–E: VSMC growth after 24 h control (Ctrl; open bars), ANG II (black bars), rosiglitazone (Rosi) or 15d-PGJ₂ (hatched), or cotreatment of ANG II + rosiglitazone or ANG II + 15-deoxy- $\Delta^{12,14}$ -prostaglandin J₂ (15d-PGJ₂; checkered). Results are means \pm SE ($n = 3-8$). * $P < 0.001$; † $P < 0.01$; ‡ $P < 0.001$; § $P < 0.05$. Results are expressed as arbitrary units (AU), which represent relative counts/min of [³H]leucine incorporation.

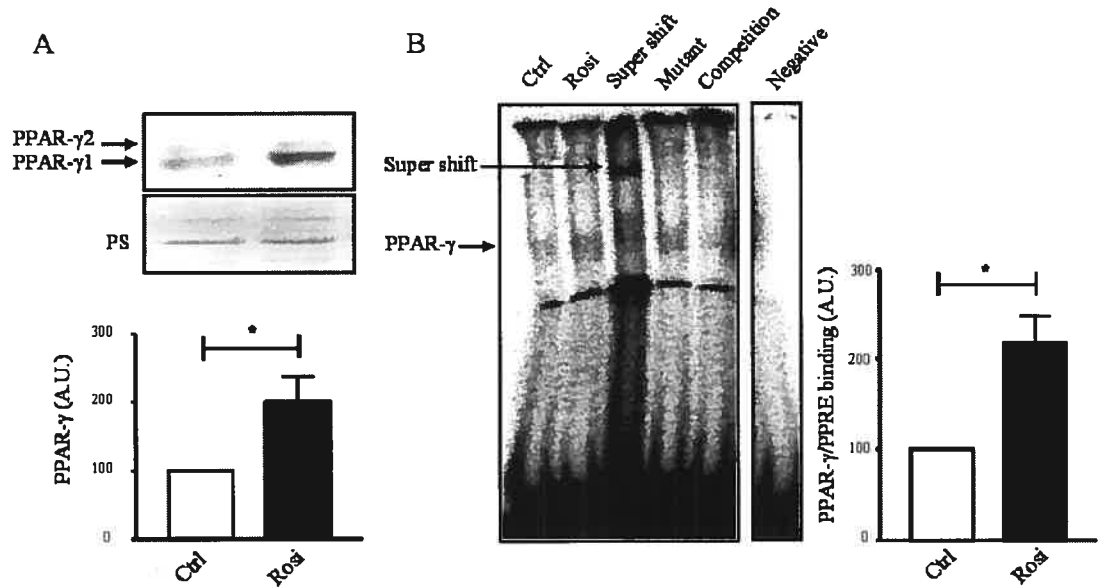


Figure II-2 : Effect of ANG II on PPAR- γ expression and activity. *A, top*: immunoblots of nuclear PPAR- γ expression in VSMCs after 24 h in control (*left*) and after treatment with rosiglitazone (*right*). *A, bottom*: results are means \pm SE ($n = 5$). *B*: representative PPAR- γ activation by electrophoretic mobility shift assay (EMSA) in VSMCs treated for 24 h with rosiglitazone. Results are means \pm SE ($n = 5$). * $P < 0.01$ vs. control. Results are expressed as AU, which represent the ratio of the protein of interest/Ponceau S (PS) to correct for sample loading. The most intense band stained by Ponceau S in each lane (~ 50 kDa) was used for ratio calculation. PPRE, PPAR-response element.

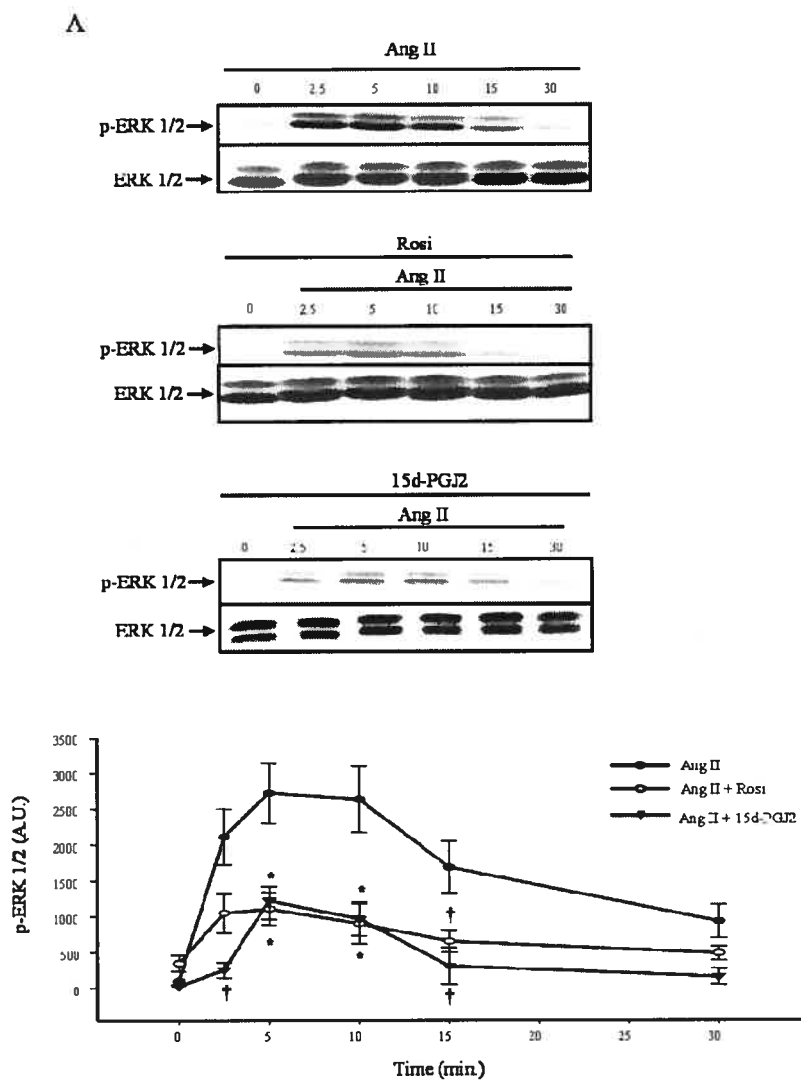


Figure II-3 : Effect of PPAR- γ activators on ANG II signaling pathways. *Top*: immunoblots of ERK 1/2 phosphorylation (p-ERK 1/2) and expression (ERK 1/2) (A). *Bottom*: results are ERK 1/2 phosphorylation (A) and represent means \pm SE ($n = 5$). ●, VSMCs treated with ANG II; ○, VSMCs treated with ANG II + rosiglitazone; ▼, VSMCs treated with ANG II \pm 15d-PGJ₂. * $P < 0.05$, † $P < 0.01$ vs. ANG II. Results are expressed as AU, which represent the ratio of the protein phosphorylation/protein expression.

B

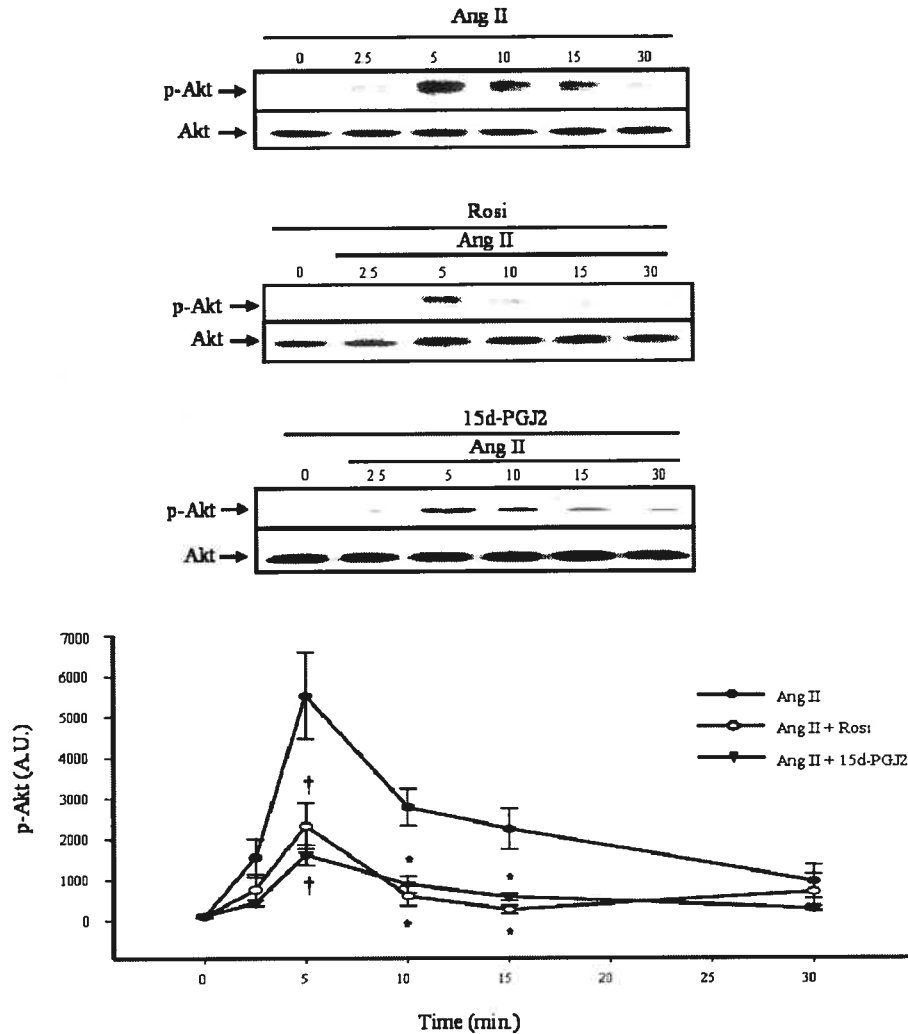


Figure II-3: Effect of PPAR- γ activators on ANG II signaling pathways. *Top*: immunoblots of Akt phosphorylation (p-Akt) and Akt expression (B). *Bottom*: results are Akt phosphorylation (B) and represent means \pm SE ($n = 5$). ●, VSMCs treated with ANG II; ○, VSMCs treated with ANG II + rosiglitazone; ▼, VSMCs treated with ANG II \pm 15d-PGJ₂. * $P < 0.05$, † $P < 0.01$ vs. ANG II. Results are expressed as AU, which represent the ratio of the protein phosphorylation/protein expression.

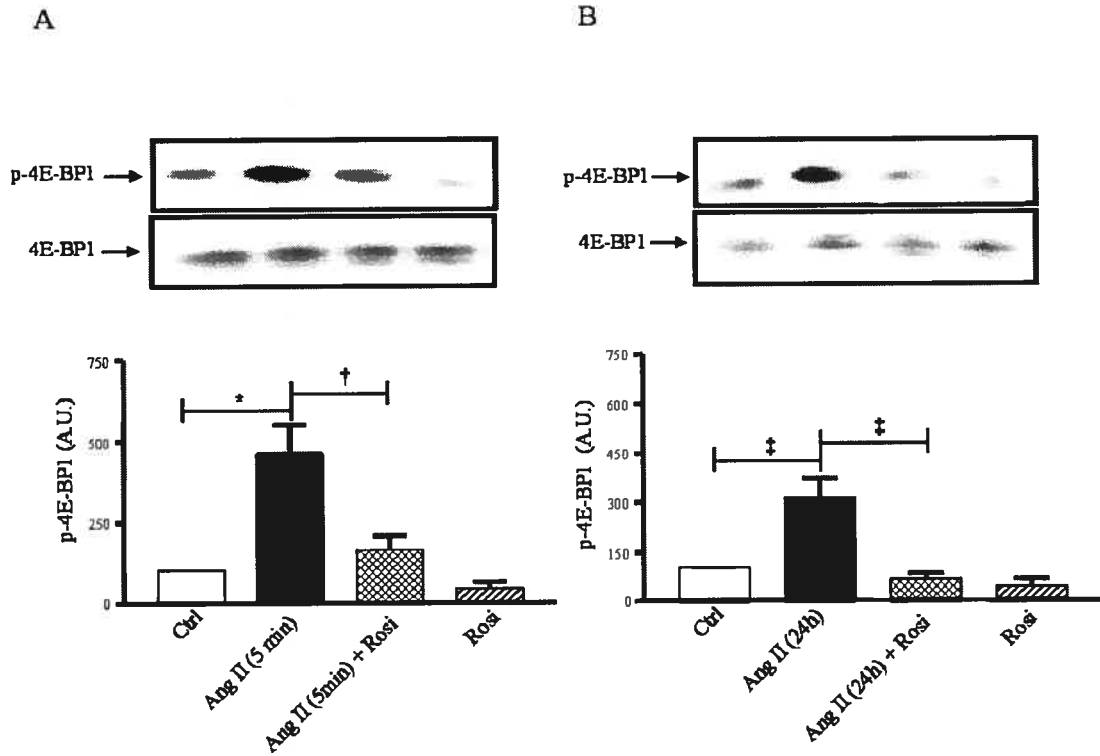


Figure II-4 : Acute and chronic effect of rosiglitazone on 4E-binding protein 1 (4E-BP1). A and B: immunoblots of 4E-BP1 phosphorylation (p-4E-BP1) and 4E-BP1 expression. Lanes for p-4E-BP1 correspond to bars below (left to right): 4E-BP1 phosphorylation (control; open bars) treated for 5 min (A) or 24 h (B) with ANG II without (black bars) or with rosiglitazone (hatched) or treated with rosiglitazone alone (checkered). Results are means \pm SE ($n = 4$). * $P < 0.001$; † $P < 0.01$; ‡ $P < 0.001$.

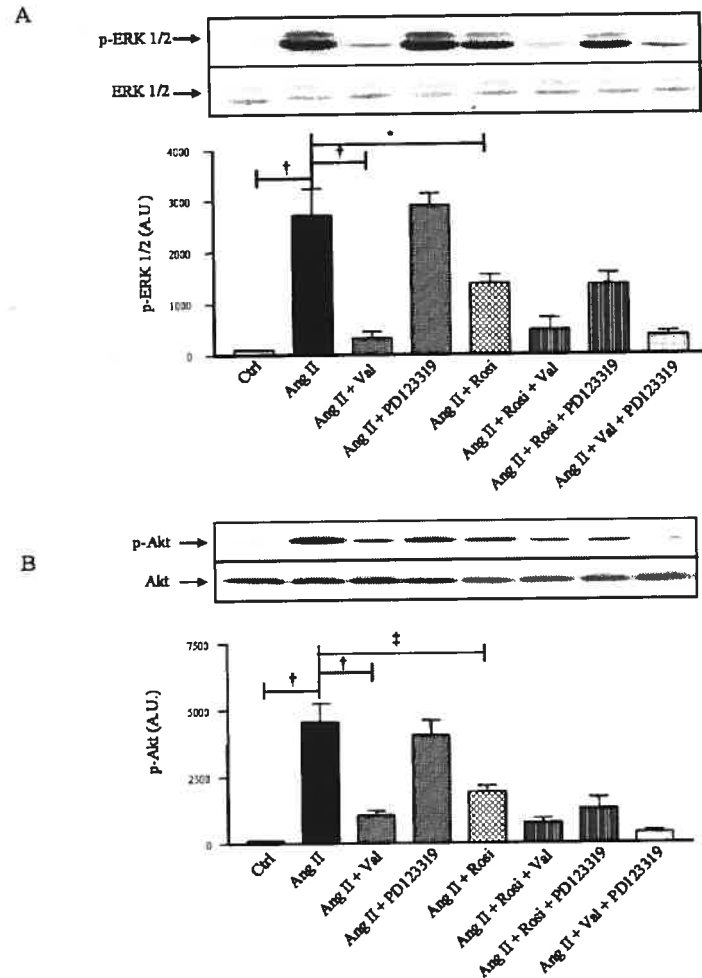


Figure II-5 : Rosiglitazone effect on AT₁ receptor signaling. Immunoblots of p-ERK 1/2 and ERK 1/2 (A) or p-Akt and Akt (B). Immunoblot lanes for p-ERK 1/2 (A) or p-Akt (B), respectively, correspond to bars below (left to right): ERK 1/2 or Akt phosphorylation (open bars); 5 min ANG II treated without (black bars) or with valsartan or PD-123319 (light gray bars); 24-h rosiglitazone-pretreated cells with ANG II (checkered) with valsartan or PD-123319 (horizontally hatched bars); ANG II-treated cells with valsartan and PD-123319 (cross-hatched bars). Results are means \pm SE ($n = 3$). * $P < 0.05$; † $P < 0.001$; ‡ $P < 0.01$.

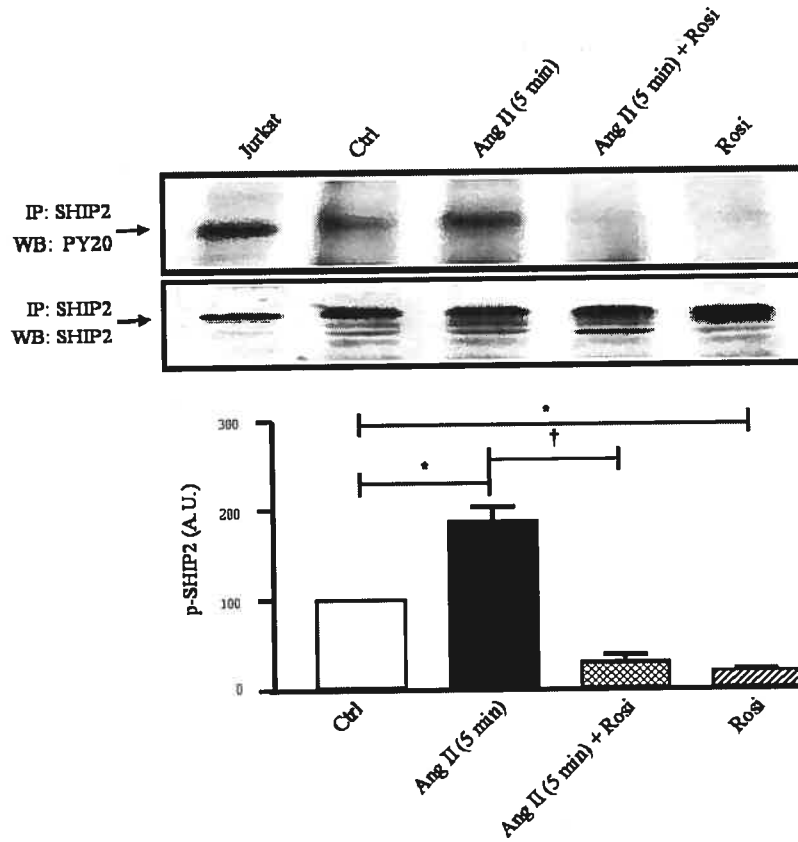


Figure II-6 : Rosiglitazone effect on SHIP2. *Top*: immunoblots of Src homology 2-containing inositol phosphatase 2 (SHIP2) phosphorylation and expression. *Bottom*: SHIP2 phosphorylation (p-SHIP2) (control; open bar) with 5 min ANG II (black bar); 24-h rosiglitazone treated cells (hatched) with ANG II (checkered). Results are means \pm SE ($n = 4$). * $P < 0.01$; † $P < 0.001$. Unstimulated Jurkat cell lysate was used as a positive control. WB, Western blot; IP, immunoprecipitate; PY20, anti-phosphotyrosine.

CHAPITRE III: Article 2

Contribution personnelle dans cette étude :

- Le prélèvement des tissus
- L'extraction et le dosage des protéines tissulaires
- La mise au point des expériences de cette étude
- La rédaction de l'article
- Les réponses aux commentaires des arbitres qui ont évalué cet article

**Peroxisome Proliferator-Activated Receptor γ Regulates Angiotensin II-
Stimulated Phosphatidylinositol 3-Kinase and Mitogen-Activated Protein
Kinase in Blood Vessels *In Vivo***

Benkirane, Karim; Viel, Émilie C.; Amiri, Farhad; Schiffrin, Ernesto L.

From the Multidisciplinary Research Group on Hypertension, Clinical Research Institute of
Montreal, Montreal, Quebec, Canada.

Article publié dans

Hypertension

(47:102-108, 2006)

Abstract

Angiotensin (Ang) II is implicated in hypertension, vascular remodeling, and insulin resistance. Peroxisome Proliferator-Activated Receptor (PPAR) γ activators increase insulin sensitivity and improve Ang II-induced vascular remodeling. We evaluated the effects of the PPAR- γ activator rosiglitazone on Ang II signaling in aorta and mesenteric arteries. Rats received Ang II by subcutaneous infusion and/or rosiglitazone *per os* for 7 days. Blood pressure rise in Ang II-infused rats was attenuated by rosiglitazone. Ang II significantly increased Ang II type 1 receptor expression in the mesenteric arteries ($P < 0.001$), whereas that of the aorta was decreased ($P < 0.05$), changes which were reversed by rosiglitazone. Akt activity was increased by Ang II and returned to basal levels under rosiglitazone in both vascular beds. However, Ang II-induced extracellular signal-regulated kinase 1/2 activity increased in aorta but not in mesenteric vessels ($P < 0.001$), where 4E-binding protein 1 activity was significantly increased by Ang II and inhibited by PPAR- γ activation. In response to Ang II, Src homology (SH) 2-containing inositol phosphatase 2 activity was increased ($P < 0.05$) in both vascular beds. In conclusion, PPAR- γ activator rosiglitazone attenuated Ang II-induced blood pressure elevation and intracellular signaling on aorta and mesenteric vessels. There was differential inhibition of Ang II type 1 receptor receptors/phosphatidylinositol 3-kinase/Akt and extracellular signal-regulated kinase 1/2 in both vessels. Effects of PPAR- γ activators on these pathways could contribute to regression of vascular remodeling in models of hypertension and diabetes and, accordingly, in hypertensive diabetic patients.

Introduction

Peroxisome Proliferator-Activated Receptors (PPARs) are ligand-activated transcription factors belonging to the nuclear receptor superfamily (1). Three PPAR isoforms have been cloned: PPAR- α , PPAR- β/δ , and PPAR- γ . PPARs bind to PPAR-response elements and regulate many genes with effects on lipid metabolism and carbohydrate metabolism, endothelial function, inflammation, and thrombosis (2-6). Insulin-sensitizing thiazolidinediones (TZDs) or glitazones are PPAR- γ synthetic ligands and have been proposed as therapeutic candidates in cardiovascular disease (4,7). They are potent inhibitors of monocyte chemotaxis, cell growth, and migration of vascular smooth muscle cells (VSMCs) and reduce vascular inflammation and vasoconstriction,(4,8) thereby modulating vascular structure and function. Vascular remodeling in hypertension, which involves a pathophysiological adaptation of the vascular wall, comprises several processes, including VSMC contraction and migration, growth and apoptosis, extracellular matrix deposition, and inflammation (9,10). Angiotensin (Ang) II plays a role in vascular remodeling through the G-protein-coupled Ang type 1 (AT₁) and AT₂ receptors (10). Multiple growth-promoting signaling pathways are activated by Ang II through AT₁ receptors, such as phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K/p85 α) and extracellular signal-regulated kinase (ERK) 1/2 (10,11) PI3K/p85 α mediates its effects through Src homology (SH) 2-containing inositol phosphatase 2 (SHIP2), Akt, 3-phosphoinositide-dependent kinase, 4E-binding protein (BP)1, and p70 S6 kinase (12,13). Ang II-mediated activation of the regulatory subunit of the PI3K, p85 α , links the p110 catalytic subunit to downstream tyrosine phosphorylated proteins and leads to the generation of phosphatidylinositol (PI)-3,4, 5-P₃,(14,15) which then activates the lipid phosphatase SHIP2. SHIP hydrolyzes the PI3K product PI(3,4,5)P₃ to PI(3,4)P₂, the primary lipid necessary for Akt activation,(14,16,17) which also requires phosphorylation by 3-phosphoinositide-dependent kinase-1 or -2 (18,19) Akt is implicated in cell metabolism, survival, and growth and is ultimately involved in vascular remodeling. Ang II-induced cell growth is mediated via PI3K activation and its downstream protein Akt in rat aortic VSMCs (20). 4E-BP1 is an

important cell growth regulator modulated by Akt (21). In the nonphosphorylated form, 4E-BP1 binds and segregates eukaryotic initiation factor 4E-binding protein 1, the mRNA 5' cap-binding protein that participates in ribosomal subunit recruitment of other complexes in protein synthesis initiation (12). Mitogenic effects of Ang II occur also in large measure through ERK1/2, which, on nuclear translocation, regulate transcription factors involved in cell growth and differentiation (22). PPAR- γ activators have been shown *in vitro* to inhibit Ang II-induced ERK1/2 and to modulate Ang II receptors in aortic VSMCs (4,23–25). We demonstrated previously that PPAR- γ activators decreased blood pressure (BP) and cell growth and improved endothelial dysfunction in mesenteric resistance arteries from Ang II-infused rats,(4) thus suggesting that PPAR- γ could contribute to the regulation of different vascular genes in hypertension. The *in vivo* mechanisms whereby PPAR- γ activators affect Ang II signaling in the vasculature remain unclear. Here, we questioned whether Ang II-induced PI3K and MAPK activation and some of their distal signaling pathways in aorta and mesenteric arteries could be inhibited *in vivo* by the PPAR- γ activator rosiglitazone.

Methods

Animal experiments

The study was conducted according to recommendations from the Animal Care Committee of the Clinical Research Institute of Montreal and the Canadian Council of Animal Care. Male Sprague-Dawley rats (250 g, Charles River), were divided in 6 groups: control, Ang II, Ang II+rosiglitazone, Ang II+hydralazine, rosiglitazone, and hydralazine. Ang II animals were infused with Ile⁵-Ang II (Calbiochem, 120 ng/kg per minute SC) via osmotic minipumps for 7 days. Rosiglitazone (5 mg/kg day) was mixed with food and hydralazine, used to evaluate the effect of BP lowering, was given in drinking water (25 mg/kg day). Before the end of the study, systolic BP (SBP) was measured by the tail-cuff method. Rats were killed humanely. Defatted aorta and mesenteric arteries were snap frozen and stored at -80°C until analysis.

Electrophoretic Mobility Shift Assay for PPAR- γ

Frozen tissues were homogenized, suspended in a PBS buffer (containing Na_3VO_4 1 mmol/L, pepstatin A 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$, leupeptin 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$, aprotinin 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$, and PMSF 1 mmol/L) and centrifuged (4000g, 4 minutes at 4°C) as described previously (4). The pellet was resuspended and lysed into cytoplasmic and nuclear fractions using a Pierce NE-PER kit. Protein concentration was determined with a BioRad D_c kit (BioRad Laboratories). VSMC PPAR- γ activity was detected using the Nushift kit (Active Motif). Wild-type oligonucleotides 5'-GGA $\text{ACTAGGTCAAAGGTCATCCCCT}$ -3' and mutant oligonucleotides 5'-GGA $\text{ACTAGAA} \underline{\text{CAAAAGAA}} \underline{\text{CATCCCCT}}$ -3' were used in a competition assay, whereas supershift was performed using PPAR- γ antibody from Active Motif.

Western Blot Analysis

Extracted protein was loaded on 10% SDS-PAGE and transferred onto nitrocellulose membranes, which were then blocked and incubated with specific antibodies: AT₁, PPAR- γ (Santa Cruz Biotechnology), PI3K-p85 α (UpState), phospho- (Thr308 and Ser473) and nonphospho-specific Akt, 4E-BP1, and ERK1/2 (Cell Signaling). Membranes were subsequently washed, incubated with specific secondary horseradish peroxidase-conjugated antibodies, and revealed with BM chemiluminescence blotting substrate (Roche Diagnostics). Thereafter, band intensity was measured by ImageQuant 5.0 software (Molecular Dynamics).

Immunoprecipitation

Vessels were lysed, and 500 μg of total protein extract was immunoprecipitated with SHIP2 (UpState) antibody and then incubated with protein G Plus-Agarose (Calbiochem). Thereafter, Western blotting was carried out as mentioned above, and membranes were incubated with the anti-phosphotyrosine (PY20, BD Transduction Laboratories) antibody

for activity measurement and then stripped and reblotted with SHIP2 antibody for total protein.

Data Analysis

Values are mean \pm SEM. Differences were evaluated by 1-way ANOVA, followed by Tukey-Kramer's post-hoc test. $P<0.05$ was considered significant.

Results

Physiological Parameters

Ang II significantly increased SBP ($P<0.001$ versus controls), which was significantly attenuated by both rosiglitazone and hydralazine ($P<0.001$). Neither rosiglitazone nor hydralazine alone affected SBP. The body weight of rats was unaltered during the study (Table I, available online at <http://hyper.ahajournals.org>).

Vascular PPAR- γ Expression and Activity

Rosiglitazone treatment significantly increased mesenteric artery PPAR- γ expression ($P<0.01$ versus controls) and activity ($P<0.05$) in Ang II-infused rats, whereas rosiglitazone alone increased PPAR- γ expression only ($P<0.05$; Figure 1 A). Ang II elicited a trend to a reduction of PPAR- γ expression and activity in mesenteric arteries, although this did not achieve statistical significance. Hydralazine did not affect either of these parameters (Figure 1B).

Vascular Effects of Rosiglitazone on AT₁ Expression and Signaling

Ang II induced a 7-fold increase in AT₁ expression of mesenteric arteries ($P<0.001$), which was significantly downregulated by rosiglitazone (Figure 2 A). In aorta, Ang II downregulated AT₁ expression ($P<0.05$), which was upregulated 4-fold ($P<0.01$) by rosiglitazone cotreatment (Figure 2B). Ang II increased Akt activity in both mesenteric arteries and aorta 10-fold ($P<0.001$) and 3-fold ($P<0.01$), respectively. Both changes were inhibited by rosiglitazone cotreatment, whereas rosiglitazone alone induced a 5-fold

increase in mesenteric artery but not aortic Akt activity (Figure 3). Neither Ang II nor rosiglitazone altered aortic or mesenteric artery basal expression of Akt or p85 α (Figure 3). Ang II-induced Akt activity was unaffected by hydralazine. In mesenteric arteries, but not in aorta, Ang II induced a 2-fold increase ($P<0.01$) in 4E-BP1 activity, which was significantly inhibited ($P<0.01$) by cotreatment with rosiglitazone (Figure 4). Neither Ang II nor rosiglitazone altered vascular 4E-BP1 expression. In both vascular beds, Ang II induced a 2-fold increase ($P<0.01$) in SHIP2 activity, which was unaffected by rosiglitazone (Figure 5). Neither Ang II nor rosiglitazone altered SHIP2 expression in aorta or mesenteric arteries. ERK1/2 expression increased ($P<0.05$) in mesenteric arteries after Ang II infusion and was reduced by rosiglitazone cotreatment (3-fold; $P<0.05$; Figure 6 A), but ERK1/2 activity was unaffected (Figure 6B). Neither Ang II nor rosiglitazone altered ERK1/2 expression in aorta (Figure 6C), whereas ERK 1/2 activity was significantly increased by Ang II ($P<0.001$) and significantly inhibited by rosiglitazone cotreatment ($P<0.01$). Rosiglitazone administered alone increased ($P<0.001$) ERK1/2 activity in aorta 10-fold (Figure 6D), whereas hydralazine decreased Ang II-induced ERK1/2 phosphorylation ($P<0.05$).

Discussion

The present study demonstrates for the first time that rosiglitazone treatment in Ang II-infused rats differentially modulates PI3K and MAPK signaling in a conduit vessel, aorta, and in mesenteric vessels. We and others have shown previously that in models of experimental hypertension, TZDs are antihypertensive and reverse structural, functional, and molecular changes in blood vessels (4,26,27). The mechanisms of these potentially beneficial cardiovascular effects are in part clarified in the present study. PPAR- γ activation negatively modulated Ang II-induced growth-promoting intracellular signaling pathways, such as MAPK and PI3K, and their target protein, such as 4E-BP1. Furthermore, we demonstrated that chronic Ang II treatment increased the activity of a phosphatase linked to Akt activation, SHIP2, in both mesenteric vessels and aorta. Although rosiglitazone alone

did not alter AT₁ receptor expression, rosiglitazone cotreatment in Ang II–infused rats returned AT₁ receptor expression to basal levels in both aorta and mesenteric vessels. This suggests that PPAR- γ activation regulates AT₁ receptor expression. Our findings extend those of Takeda *et al* (23) and Sugawara *et al*,(28) who demonstrated that 24-hour treatment with rosiglitazone returned VSMC AT₁ receptor expression back to basal levels compared with 6 to 12 hours of rosiglitazone treatment. Similarly, we observed that 24-hour PPAR- γ activation in vitro did not alter VSMC AT₁ receptor expression (29). Nonetheless, we have demonstrated differential AT₁ expression in aorta compared with mesenteric vessels from Ang II–infused rats. Consequently, this may result in a differential regulation of Ang II signaling pathways in these vascular beds. Rosiglitazone-induced mesenteric artery AT₁ receptor downregulation may represent a mechanism whereby PPAR- γ activation may inhibit vascular remodeling induced by Ang II. This could support previously documented beneficial effects of PPAR- γ on vascular remodeling (4). Conversely, rosiglitazone-induced upregulation of AT₁ in aorta may be a compensatory mechanism to the effects of Ang II on AT₁ expression. On binding to the AT₁ receptor, Ang II activates multiple signaling pathways, such as PI3K and MAPK, that participate in cell growth and vascular remodeling (30). We demonstrated that 7-day Ang II infusion induced DNA synthesis in mesenteric arteries that were inhibited by PPAR γ activators,(4) whereas others have shown that infusion of Ang II for 24 hours induced protein synthesis in both aorta and mesenteric arteries through activation of PI3K/p85 α and MAPK (31) We also demonstrated that p85 α subunit expression in the vasculature was unaltered after 7-day Ang II or rosiglitazone treatment, in contrast to reports in human adipocytes that PPAR- γ activation increased p85 α protein expression (32). Because blood vessels and adipose tissue have different metabolic activities, differential PI3K protein regulation may occur. Ang II–increased vascular Akt activation was inhibited by rosiglitazone treatment, similar to our in vitro studies (29). Neither Ang II nor rosiglitazone affected vascular Akt expression, whereas rosiglitazone treatment alone increased Akt phosphorylation in mesenteric arteries but not in aorta. Because PPAR- γ activation has direct effects on

adipocyte differentiation and lipid storage,(33) underlying mesenteric fat could activate different tyrosine kinase receptors, thereby increasing PI3K/Akt signaling. Indeed, recent evidence suggests that the periadventitial fat may regulate vascular function in a paracrine fashion (34). Regulation of the MAPK signaling pathway was differentially modulated by Ang II and PPAR- γ activation in mesenteric vessels and aorta. Chronic Ang II infusion increased ERK 1/2 activity in the aorta but not in mesenteric arteries, which extends previous observations by Daigle *et al* (31). However, others found that ERK 1/2 activity increased after acute *ex vivo* stimulation of Ang II in pressurized mesenteric resistance vessels (35). Basal ERK 1/2 activity was greater in mesenteric vessels compared with that of aorta, which may be an expression of the heterogeneity of the 2 vascular territories. It is noteworthy that the combined effects of BP elevation and Ang II increased ERK 1/2 activity in aorta to the level found in mesenteric arteries. Based on the different functions of these vessels (conductance versus resistance), Ang II may regulate ERK 1/2 differentially. Cotreatment with hydralazine partially inhibited Ang II-induced ERK 1/2 activation in the aorta, suggesting that this effect may be BP dependent. Alternatively, this finding could be attributed to a direct effect of hydralazine, for example, as an antioxidant,(36) which has been shown to inhibit MAPK activation (37). In support of this, we reported previously that hydralazine decreased ROS generation in the aorta but not in mesenteric arteries (38). We also found that rosiglitazone administration alone tended to increase ERK 1/2 activity in conduit vessels, while at the same time it abrogated Ang II-induced ERK 1/2 in mesenteric arteries, again indicative of differential regulation in these 2 vascular beds. Mesenteric artery VSMC growth in response to Ang II treatment appears to be regulated through an ERK 1/2-independent pathway (31). Because different transcription factors, such as nuclear factor κ B, AP-1, and Sp1, can be activated by Ang II,(4,28,39) it is possible that chronic Ang II treatment may increase these transcription factors, which are implicated by ERK 1/2 gene expression regulation without altering ERK 1/2 activity. Moreover, increased activity of SHIP2 phosphatase in mesenteric arteries occurred after Ang II and rosiglitazone treatment. In support of this, we demonstrated *in vitro* that both Ang II and rosiglitazone

regulate phosphatase activity in VSMCs derived from mesenteric arteries (29). We have shown here for the first time that the phosphorylation of 4E-BP1, which is an important cell growth regulator, was increased by Ang II in mesenteric arteries but not in aorta and that this increase was prevented by rosiglitazone. This extends previous *in vitro* observations that acute stimulation of aortic VSMC with Ang II increased activation of 4E-BP1, associated with cell growth,(40) found also in mesenteric VSMC (29). The beneficial effects of PPAR- γ activation on Ang II-induced vascular remodeling could be partially mediated through inhibition of 4E-BP1. Furthermore, the activation of 4E-BP1 in mesenteric arteries could be associated with vascular remodeling, which is not observed in aorta (41). This suggests that PPAR- γ can exert an inhibitory effect on vascular remodeling in type 2 diabetic and hypertensive patients, because type 2 diabetic patients exhibit significant remodeling of small arteries compared with nondiabetic normotensive patients (42). It is well known that cell growth is under the control of many kinases and phosphatases. Here we demonstrated for the first time that chronic Ang II-increased SHIP2 activity was associated with vascular Akt activation. This extends in an *in vivo* paradigm our previous *in vitro* findings showing that acute Ang II stimulation of mesenteric VSMC increased SHIP2/Akt activation and that both could be inhibited by rosiglitazone cotreatment (29). Although an acute stimulation with Ang II increased SHIP2 activity, chronic cotreatment with rosiglitazone did not reduce this effect, which suggests that the inhibitory effect of rosiglitazone on Ang II-induced cell growth and vascular remodeling through SHIP2 may be important in the acute stimulatory phase.

In conclusion, although the precise mechanism of action of the PPAR- γ activator rosiglitazone on chronic Ang II-induced PI3K and MAPK signaling remains elusive, we have demonstrated that this agent has potent modulatory effects on aorta and mesenteric vessels by the inhibition of PI3K/Akt/4E-BP1 and ERK1/2 signaling pathways. These data provide new insights into potential beneficial effects of TZDs in the prevention or treatment of cardiovascular disease and hypertension.

Perspectives

Although additional investigation is required to elucidate the effects of rosiglitazone on vascular AT₁ receptor regulation under chronic Ang II treatment, PPAR- γ regulation of PI3K and MAPK may represent an important link between molecular dysfunction and hypertensive and diabetic vascular disease. Consequently, regulation of these pathways by PPAR- γ activators could contribute to regression of vascular remodeling in hypertensive and diabetic models, and, accordingly, in diabetic hypertensive patients.

Acknowledgments

This work was supported by grant 13570 (to E.L.S.) and a Group Grant to the Multidisciplinary Research Group on Hypertension, both from the Canadian Institutes of Health Research (CIHR). K.B. and E.C.V. were supported by CIHR doctoral studentships. We are grateful to Suzanne Diébold and André Turgeon for their excellent technical assistance.

References

1. Willson TM, Brown PJ, Sternbach DD, Henke BR. The PPARs: from orphan receptors to drug discovery. *J Med Chem.* 2000;43:527-550.
2. Desvergne B, Wahli W. Peroxisome proliferator-activated receptors: nuclear control of metabolism. *Endocr Rev.* 1999;20:649-688.
3. Schoonjans K, Staels B, Auwerx J. Role of the peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) in mediating the effects of fibrates and fatty acids on gene expression. *J Lipid Res.* 1996;37:907-925.
4. Diep QN, El Mabrouk M, Cohn JS, Endemann D, Amiri F, Viridis A, Neves MF, Schiffrin EL. Structure, endothelial function, cell growth, and inflammation in blood

- vessels of angiotensin II-infused rats: role of peroxisome proliferator-activated receptor- γ . *Circulation*. 2002;105:2296-2302.
5. Diep QN, Amiri F, Touyz RM, Cohn JS, Endemann D, Neves MF, Schiffrin EL. PPAR α activator effects on Ang II-induced vascular oxidative stress and inflammation. *Hypertension*. 2002;40:866-871.
 6. Fruchart JC. Peroxisome proliferator-activated receptor- α activation and high-density lipoprotein metabolism. *Am J Cardiol*. 2001;88:24N-29N.
 7. Ishibashi M, Egashira K, Hiasa K, Inoue S, Ni W, Zhao Q, Usui M, Kitamoto S, Ichiki T, Takeshita A. Antiinflammatory and antiarteriosclerotic effects of pioglitazone. *Hypertension*. 2002;40:687-693.
 8. Berger J, Moller DE. The mechanisms of action of PPARs. *Annu Rev Med*. 2002;53:409-435.
 9. Dzau VJ, Mukoyama M, Pratt RE. Molecular biology of angiotensin receptors: target for drug research? *J Hypertens*. 1994;12 (Suppl):S1-S5.
 10. Touyz RM, Deng LY, He G, Wu XH, Schiffrin EL. Angiotensin II stimulates DNA and protein synthesis in vascular smooth muscle cells from human arteries: role of extracellular signal-regulated kinases. *J Hypertens*. 1999;17:907-916.
 11. El Mabrouk M, Touyz RM, Schiffrin EL. Differential ANG II-induced growth activation pathways in mesenteric artery smooth muscle cells from SHR. *Am J Physiol*. 2001;281:H30-H39.
 12. Lekmine F, Uddin S, Sassano A, Parmar S, Brachmann SM, Majchrzak B, Sonenberg N, Hay N, Fish EN, Platanias LC. Activation of the p70 S6 kinase and phosphorylation of the 4E-BP1 repressor of mRNA translation by type I interferons. *J Biol Chem*. 2003;278:27772-27780.
 13. Feliers D, Duraisamy S, Barnes JL, Ghosh-Choudhury G, Kasinath BS. Translational regulation of vascular endothelial growth factor expression in renal epithelial cells by angiotensin II. *Am J Physiol*. 2005;288:F521-F529.

14. Franke TF, Kaplan DR, Cantley LC, Toker A. Direct regulation of the Akt proto-oncogene product by phosphatidylinositol-3,4-bisphosphate. *Science*. 1997;275:665-668.
15. Shepherd PR, Nave BT, O'Rahilly S. The role of phosphoinositide 3-kinase in insulin signalling. *J Mol Endocrinol*. 1996;17:175-184.
16. Klippel A, Kavanaugh WM, Pot D, Williams LT. A specific product of phosphatidylinositol 3-kinase directly activates the protein kinase Akt through its pleckstrin homology domain. *Mol Cell Biol*. 1997;17:338-344.
17. Scheid MP, Huber M, Damen JE, Hughes M, Kang V, Neilsen P, Prestwich GD, Krystal G, Duronio V. Phosphatidylinositol (3,4,5)P₃ is essential but not sufficient for protein kinase B (PKB) activation; phosphatidylinositol (3,4)P₂ is required for PKB phosphorylation at Ser-473: studies using cells from SH2-containing inositol-5-phosphatase knockout mice. *J Biol Chem*. 2002;277:9027-9035.
18. Cantley LC. The phosphoinositide 3-kinase pathway. *Science*. 2002;296:1655-1657.
19. Shiojima I, Walsh K. Role of Akt signaling in vascular homeostasis and angiogenesis. *Circ Res*. 2002;90:1243-1250.
20. Dugourd C, Gervais M, Corvol P, Monnot C. Akt is a major downstream target of PI3-kinase involved in angiotensin II-induced proliferation. *Hypertension*. 2003;41:882-890.
21. Pham FH, Sugden PH, Clerk A. Regulation of protein kinase B and 4E-BP1 by oxidative stress in cardiac myocytes. *Circ Res*. 2000;86:1252-1258.
22. Seger R, Krebs EG. The MAPK signaling cascade. *FASEB J*. 1995;9:726-735.
23. Takeda K, Ichiki T, Tokunou T, Funakoshi Y, Iino N, Hirano K, Kanaide H, Takeshita A. Peroxisome proliferator-activated receptor γ activators downregulate angiotensin II type 1 receptor in vascular smooth muscle cells. *Circulation*. 2000;102:1834-1839.

24. Goetze S, Xi XP, Graf K, Fleck E, Hsueh WA, Law RE. Troglitazone inhibits angiotensin II-induced extracellular signal-regulated kinase 1/2 nuclear translocation and activation in vascular smooth muscle cells. *FEBS Lett.* 1999;452:277-282.
25. Fukuda N, Hu WY, Teng J, Chikara S, Nakayama M, Kishioka H, Kanmatsuse K. Troglitazone inhibits growth and improves insulin signaling by suppression of angiotensin II action in vascular smooth muscle cells from spontaneously hypertensive rats. *Atherosclerosis.* 2002;163:229-239.
26. Ryan MJ, Didion SP, Mathur S, Faraci FM, Sigmund CD. PPAR(γ) agonist rosiglitazone improves vascular function and lowers blood pressure in hypertensive transgenic mice. *Hypertension.* 2004;43:661-666.
27. Iglarz M, Touyz RM, Amiri F, Lavoie MF, Diep QN, Schiffrin EL. Effect of peroxisome proliferator-activated receptor- α and - γ activators on vascular remodeling in endothelin-dependent hypertension. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2003;23:45-51.
28. Sugawara A, Takeuchi K, Uruno A, Ikeda Y, Arima S, Kudo M, Sato K, Taniyama Y, Ito S. Transcriptional suppression of type 1 angiotensin II receptor gene expression by peroxisome proliferator-activated receptor- γ in vascular smooth muscle cells. *Endocrinology.* 2001;142:3125-3134.
29. Benkirane K, Amiri F, Diep Q, El Mabrouk M, Schiffrin EL. PPAR-inhibits angiotensin II-induced cell growth via SHIP2 and 4E-BP1. *Am J Physiol.* 2005;DOI, 10.1152/ajpheart.00662.2005.
30. Touyz RM, Schiffrin EL. Signal transduction mechanisms mediating the physiological and pathophysiological actions of angiotensin II in vascular smooth muscle cells. *Pharmacol Rev.* 2000;52:639-672.
31. Daigle C, Martens FM, Girardot D, Dao HH, Touyz RM, Moreau P. Signaling of angiotensin II-induced vascular protein synthesis in conduit and resistance arteries *in vivo*. *BMC Cardiovasc Disord.* 2004;4:6.

32. Rieusset J, Chambrier C, Bouzakri K, Dusserre E, Auwerx J, Riou JP, Laville M, Vidal H. The expression of the p85 α subunit of phosphatidylinositol 3-kinase is induced by activation of the peroxisome proliferator-activated receptor γ in human adipocytes. *Diabetologia*. 2001;44:544-554.
33. Tontonoz P, Hu E, Spiegelman BM. Stimulation of adipogenesis in fibroblasts by PPAR γ 2, a lipid-activated transcription factor. *Cell*. 1994;79:1147-1156.
34. Verlohren S, Dubrovskaja G, Tsang SY, Essin K, Luft FC, Huang Y, Gollasch M. Visceral periaortic adipose tissue regulates arterial tone of mesenteric arteries. *Hypertension*. 2004;44:271-276.
35. Matrougui K, Eskildsen-Helmond YE, Fiebeler A, Henrion D, Levy BI, Tedgui A, Mulvany MJ. Angiotensin II stimulates extracellular signal-regulated kinase activity in intact pressurized rat mesenteric resistance arteries. *Hypertension*. 2000;36:617-621.
36. Munzel T, Kurz S, Rajagopalan S, Thoenes M, Berrington WR, Thompson JA, Freeman BA, Harrison DG. Hydralazine prevents nitroglycerin tolerance by inhibiting activation of a membrane-bound NADH oxidase. A new action for an old drug. *J Clin Invest*. 1996;98:1465-1470.
37. Laplante MA, Wu R, El Midaoui A, de Champlain J. NAD(P)H oxidase activation by angiotensin II is dependent on p42/44 ERK-MAPK pathway activation in rat's vascular smooth muscle cells. *J Hypertens*. 2003;21:927-936.
38. Pu Q, Neves MF, Viridis A, Touyz RM, Schiffrin EL. Endothelin antagonism on aldosterone-induced oxidative stress and vascular remodeling. *Hypertension*. 2003;42:49-55.
39. Suzuki Y, Ruiz-Ortega M, Lorenzo O, Ruperez M, Esteban V, Egidio J. Inflammation and angiotensin II. *Int J Biochem Cell Biol*. 2003;35:881-900.
40. Yamakawa T, Tanaka S, Kamei J, Kadonosono K, Okuda K. Phosphatidylinositol 3-kinase in angiotensin II-induced hypertrophy of vascular smooth muscle cells. *Eur J Pharmacol*. 2003;478:39-46.

41. Brassard P, Amiri F, Schiffrin EL. Combined angiotensin II type 1 and type 2 receptor blockade on vascular remodeling and matrix metalloproteinases in resistance arteries. *Hypertension*. 2005;46:598-606.
42. Endemann DH, Pu Q, De Ciuceis C, Savoia C, Viridis A, Neves MF, Touyz RM, Schiffrin EL. Persistent remodeling of resistance arteries in type 2 diabetic patients on antihypertensive treatment. *Hypertension*. 2004;43:399-404.

Parameters	Ctrl	Ang II	Ang II +	Ang II +	Rosi	Hyd
			Rosi	Hyd		
Body weight (g)	272 ± 4	281 ± 3	275 ± 4	278 ± 2	273 ± 4	271 ± 4
SBP (mmHg)	112 ± 1	158 ± 3*	137 ± 3†	110 ± 4‡	115 ± 1	108 ± 3

Table III-1 : Body weight and systolic blood pressure. Results are mean ± SEM (n=6). * $P < 0.001$ vs. Ctrl, † $P < 0.001$ vs. Ctrl and Ang II, ‡ $P < 0.001$ vs. Ang II. Ctrl, control, Rosi, rosiglitazone; Hyd, hydralazine; SBP, systolic blood pressure.

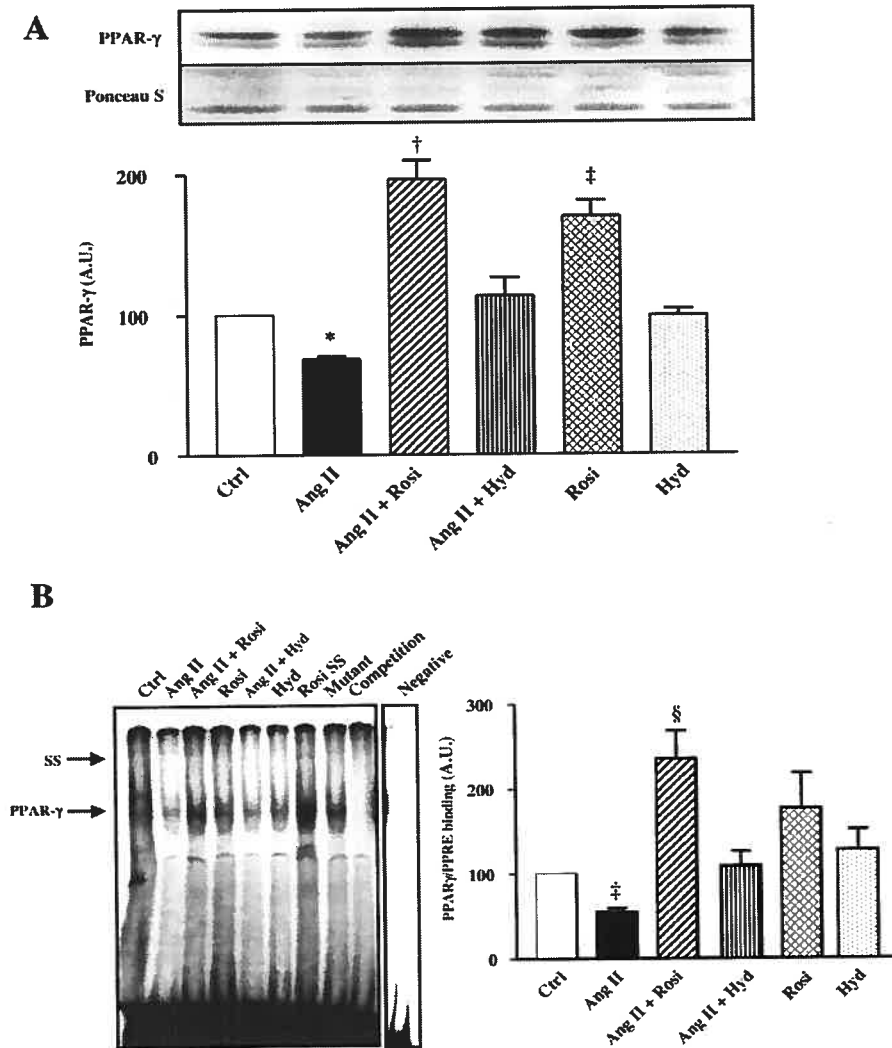


Figure III-1 : Rosiglitazone effect on vascular PPAR- γ expression and activity. (A) Top: representative immunoblots of total PPAR- γ expression in mesenteric arteries and Ponceau S staining. Bottom: results are mean \pm SEM (n=5), expressed as arbitrary units (A.U.), which represent the ratio of the protein of interest/Ponceau S. (B) Left: representative PPAR- γ activation by electrophoretic mobility shift assay in mesenteric arteries, where SS represents supershift. Right: results are mean \pm SEM (n=5). Control (Ctrl, white), Ang II (black), Ang II+rosiglitazone (Rosi, hatched), Ang II+hydralazine (Hyd, vertical), rosiglitazone (checkered), hydralazine (dotted). * P <0.001 vs Ang II+Rosi, † P <0.01 vs Ctrl, ‡ P <0.05 vs Ctrl, § P <0.01 vs Ctrl and Ang II.

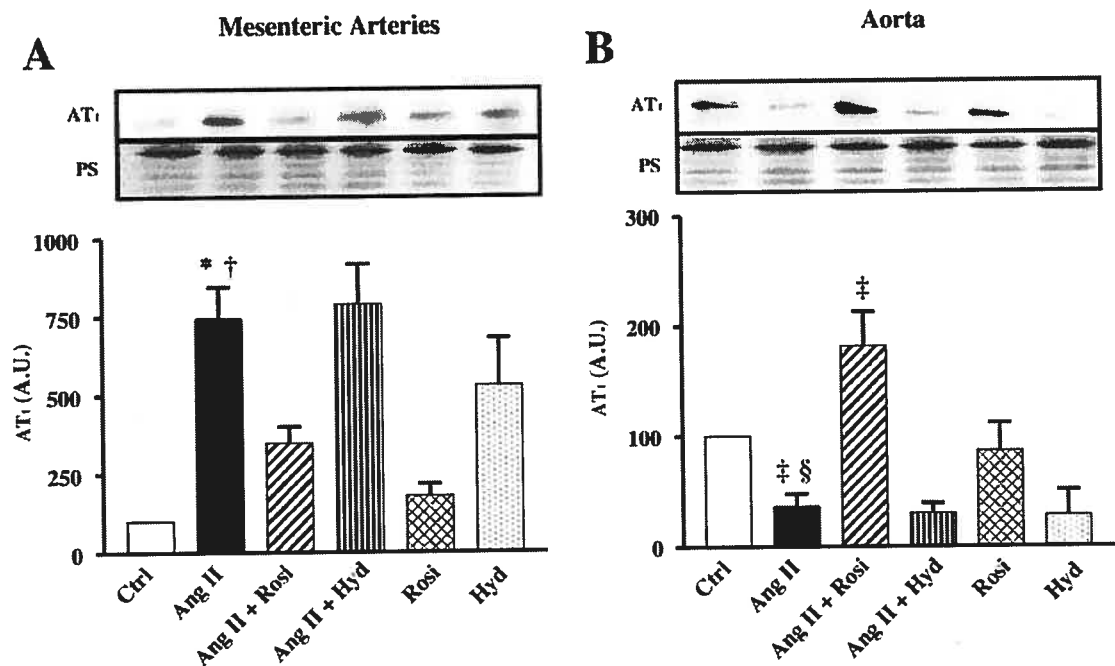


Figure III-2 : Effect of rosiglitazone on vascular AT₁ receptor expression. (A and B) Top: representative immunoblots of total mesenteric artery and aorta AT₁ expression. Bottom: results are mean±SEM (n=5), expressed as arbitrary units (A.U.), which represent ratio of the protein of interest/Ponceau S. Control (Ctrl, white), Ang II (black), Ang II+rosiglitazone (Rosi, hatched), Ang II+hydralazine (Hyd, vertical), rosiglitazone (checkered), hydralazine (dotted). * $P < 0.05$ vs Ang II+Rosi, † $P < 0.001$ vs Ctrl, ‡ $P < 0.05$ vs Ctrl, § $P < 0.01$ vs Ang II+Rosi.

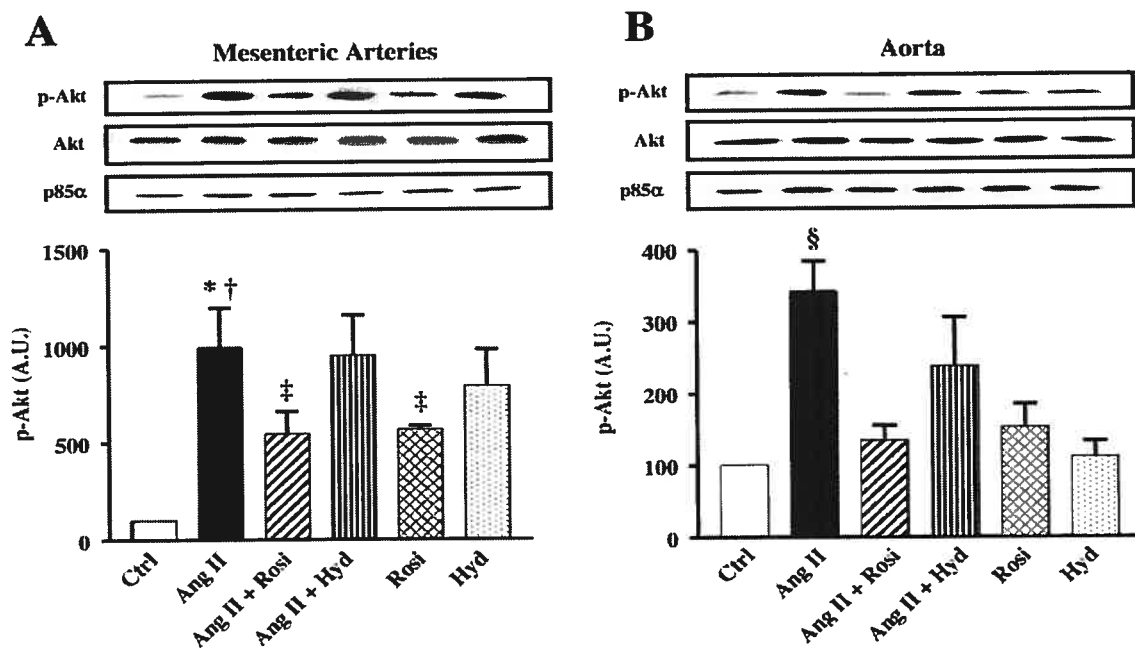


Figure III-3 : Vascular effect of rosiglitazone on PI3K/p85 α /Akt signaling. (A and B) Top: representative immunoblots of mesenteric artery Akt phosphorylation (p-Akt) and expression (Akt), and PI3K p85 α expression. Bottom: results are mean \pm SEM (n=5) expressed as arbitrary units (A.U.), which represent ratio of phosphorylated/nonphosphorylated protein. Control (Ctrl, white), Ang II (black), Ang II+rosiglitazone (Rosi, hatched), Ang II+hydralazine (Hyd, vertical), rosiglitazone (checkered), hydralazine (dotted). * P <0.05 vs Ang II+Rosi, † P <0.001 vs Ctrl, ‡ P <0.05 vs Ctrl, § P <0.01 vs Ctrl or Ang II+Rosi.

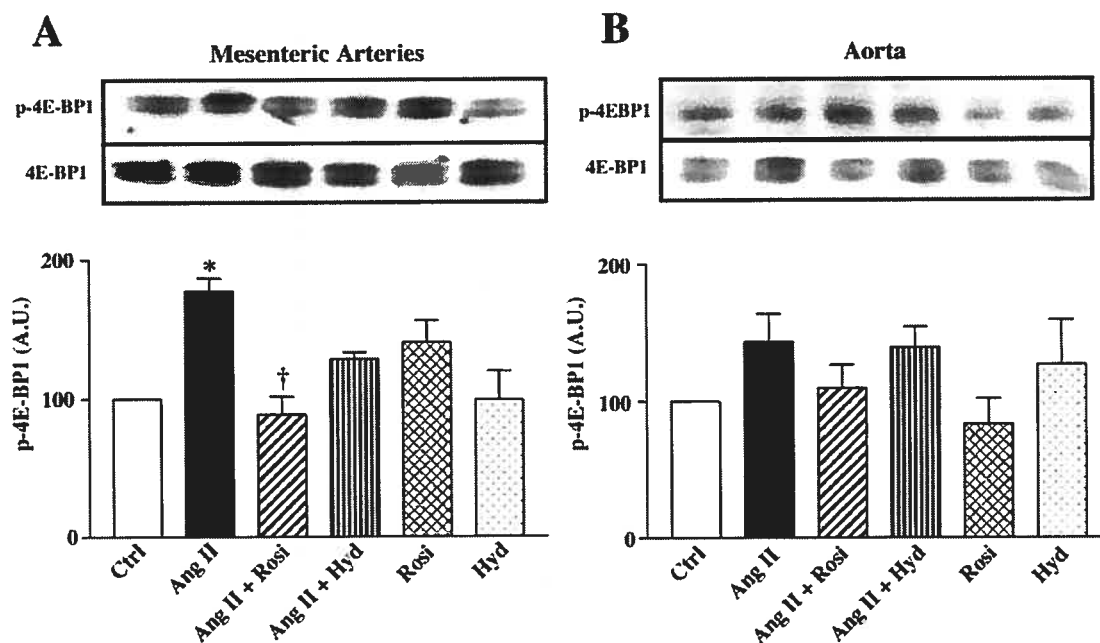


Figure III-4 : Vascular effect of rosiglitazone on 4E-BP1 activation. (A and B) Top: representative immunoblots of mesenteric artery and aorta 4E-BP1 phosphorylation (p-4E-BP1) and expression (4E-BP1). Bottom: results are mean \pm SEM (n=4), expressed as arbitrary units (A.U.), which represent ratio of phosphorylated/nonphosphorylated protein. Control (Ctrl, white), Ang II (black), Ang II rosiglitazone (Rosi, hatched), Ang II+hydralazine (Hyd, vertical), rosiglitazone (checkered), hydralazine (dotted). * P <0.01 vs Ctrl, † P <0.01 vs Ang II.

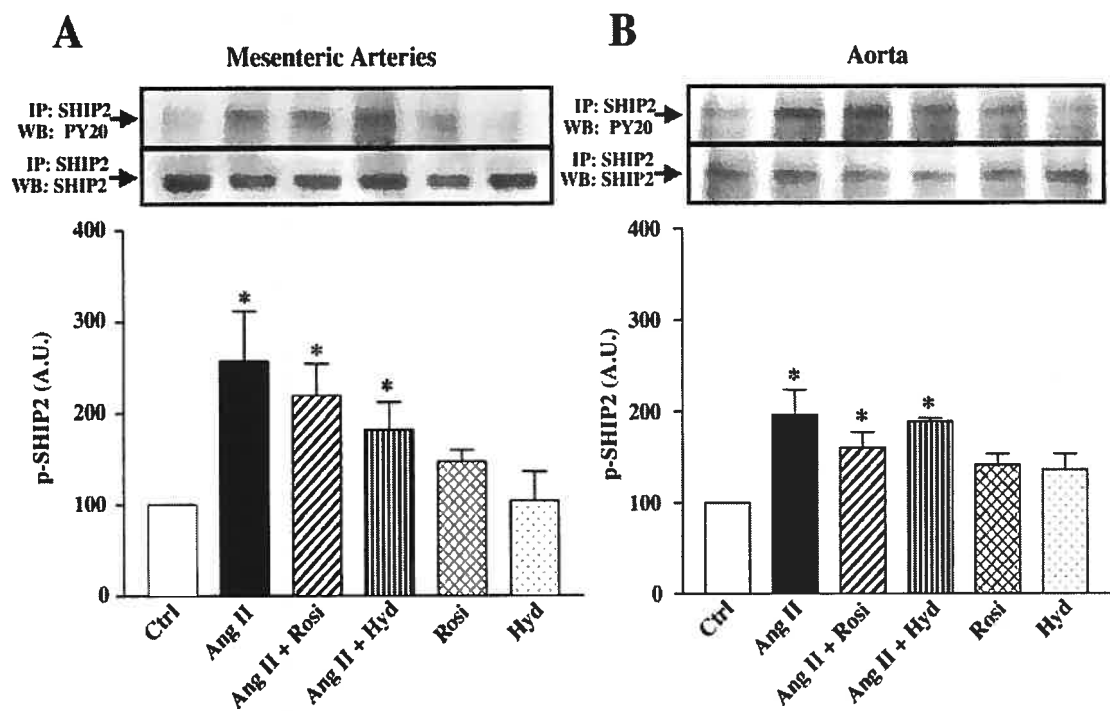


Figure III-5 : Vascular effect of rosiglitazone on SHIP2 activation. (A and B) Top: representative immunoblots of mesenteric artery and aorta SHIP2 phosphorylation (p-SHIP2) and expression, where IP and WB represent immunoprecipitation and Western blotting, respectively. Bottom: results are mean \pm SEM (n=4), expressed as arbitrary units (A.U.), which represent ratio of phosphorylated/nonphosphorylated protein. Control (Ctrl, white), Ang II (black), Ang II+rosiglitazone (Rosi, hatched), Ang II+hydralazine (Hyd, vertical), rosiglitazone (checkered), hydralazine (dotted). * P <0.05 vs Ctrl.

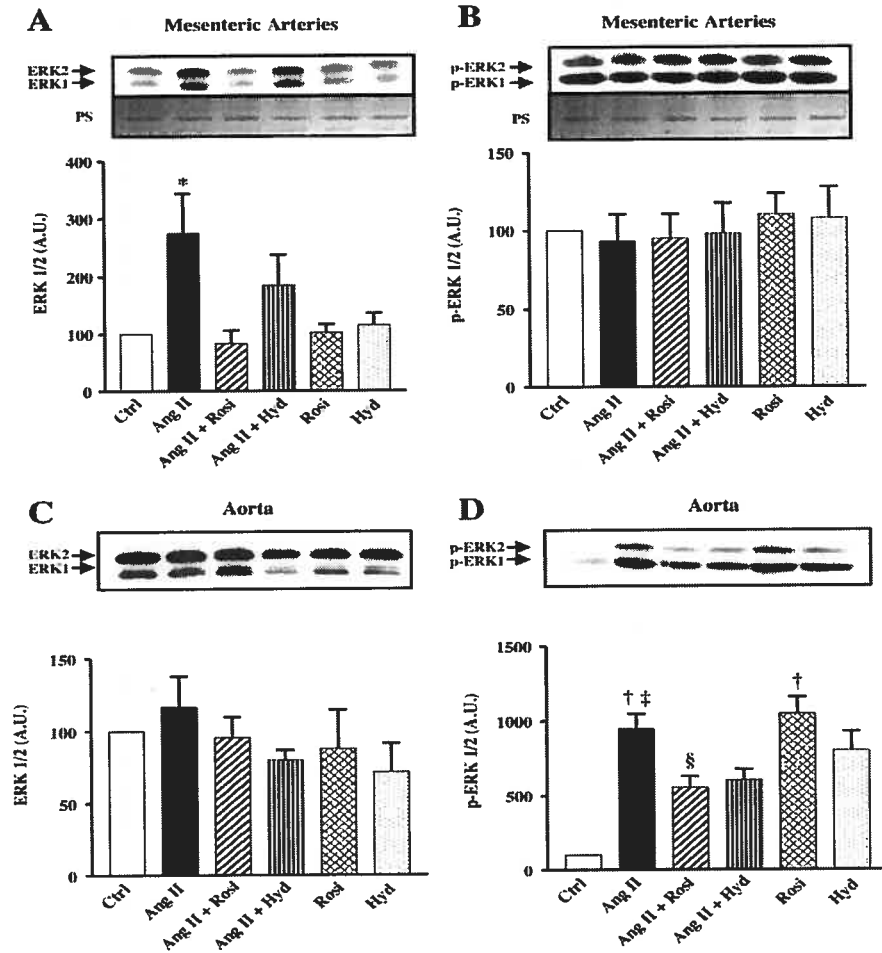


Figure III-6 : Effect of rosiglitazone on MAPK signaling pathway. Top: representative immunoblots of ERK 1/2 expression in mesenteric artery (A) and aorta (C) and activity (p-ERK 1/2) in mesentery (B) and aorta (D). Bottom (A and B): results are mean±SEM (n=5), expressed as arbitrary units (A.U.), which represent the ratio of the protein of interest/Ponceau S (PS) to correct for sample loading. The most intense band stained by Ponceau S in each lane (~37 kDa) was used for ratio calculation. Bottom (C and D): results are mean±SEM (n=5), expressed in arbitrary units (A.U.) as ratio of phosphorylated/nonphosphorylated protein. Control (Ctrl, white), Ang II (black), Ang II+rosiglitazone (Rosi, hatched), Ang II+hydralazine (Hyd, vertical), rosiglitazone (checkered), hydralazine (dotted). * $P < 0.05$ vs Ctrl and Ang II+Rosi. † $P < 0.05$ vs Ang II+Rosi and Ang II+Hyd, ‡ $P < 0.001$ vs Ctrl, § $P < 0.01$ vs Ctrl.

CHAPITRE IV: Article 3

Contribution personnelle dans cette étude :

- L'extraction et le dosage des protéines tissulaires
- La mise au point des expériences d'immunobuvardage

Long-term effects of the PPAR γ activator pioglitazone on cardiac inflammation in stroke-prone spontaneously hypertensive rats

Quy N Diep, Farhad Amiri*, Karim Benkirane*, Pierre Paradis,
Ernesto L Schiffrin.

Multidisciplinary Research Group on Hypertension Clinical Research Institute of Montreal,
University of Montreal Montreal, Quebec, Canada

* These authors contributed equally

Article publié dans
Canadian Journal of Physiology and Pharmacology
(82:976-985, 2004)

Abstract

We investigated the long-term effects of the thiazolidinedione PPAR γ activator pioglitazone on cardiac inflammation in stroke-prone spontaneously hypertensive rats (SHRSP), a model of malignant of hypertension. Six-week-old SHRSP were treated with pioglitazone (10 mg/kg/day p.o.) for 20 weeks. The rise in systolic blood pressure (SBP) in SHRSP was only transiently and slightly attenuated by pioglitazone ($p < 0.05$). Cardiac hypertrophy was little affected by pioglitazone treatment, and there was only a reduction of subepicardial interstitial fibrosis. On the other hand, left ventricular NF κ B and AP-1 binding activities, and the expression of TNF α and of the adhesion molecule PECAM, were significantly decreased by pioglitazone treatment. Expression of the pro-apoptotic proteins p53 and bax was significantly increased by pioglitazone. Thus, pioglitazone attenuated cardiac inflammation in SHRSP with little effect on BP or cardiac hypertrophy. PPAR γ activation may play a preventive cardiovascular role by offsetting the cardiac inflammatory response as demonstrated in this genetic malignant model of hypertension.

Introduction

Hypertension is a major risk factor for the development of cardiac hypertrophy and heart failure (Kannel *et al.* 1972). The stroke-prone spontaneously hypertensive rat (SHRSP) is a model of malignant genetic hypertension that develops cardiac hypertrophy with age (Yamori *et al.* 1976). The transition from compensated cardiac hypertrophy to heart failure is accompanied by changes in cardiac function associated with alter active and passive mechanical properties of myocardial tissue, changes which are affected by processes that include collagen deposition and re-expression of cardiac fetal genes such as atrial natriuretic factor (ANF). Re-expression of cardiac fetal genes is associated with an inflammatory reaction that may contribute to the progression of cardiac remodeling (Hunter and Chien 1999). This inflammatory process is associated with activation of NF κ B and AP-1 (nuclear factor κ B and activator protein-1, respectively), an increase in adhesion molecules such as intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1), vascular cell adhesion

molecule-1 (VCAM-1), and platelet endothelial cell adhesion molecule (PECAM), and the induction of proinflammatory cytokines such as tumor necrosis factor α (TNF α) and proinflammatory proteins such as cyclooxygenase 2 (COX-2).

The thiazolidinedione insulin sensitizer pioglitazone is a high-affinity ligand for the Peroxisome Proliferator-Activated Receptor (PPAR)- γ , which is a ligand-activated transcription factor of the nuclear hormone receptor super family (Lehmann *et al.* 1995). There are 3 isoforms of PPAR: α , β/δ , and γ . PPAR α plays an important role by inhibiting cardiac hypertrophy (Barger *et al.* 2000), whereas PPAR γ activators influence growth and inflammation in the vasculature (Diep *et al.* 2002; Hsueh and Law 2001). Recent in vitro and in vivo experimental studies have suggested a role for PPAR γ as an inhibitor of cardiac hypertrophy (Asakawa *et al.* 2002; Yamamoto *et al.* 2001). In addition, PPAR γ improves left ventricular diastolic function, decreases collagen accumulation in diabetic rats (Tsuji *et al.* 2001; Zhu *et al.* 2000), and protects myocardium from ischemic injury (Sidell *et al.* 2002). In diabetes there is evidence that the PPAR γ activator glitazones may reduce the concentration of markers of inflammation (Haffner *et al.* 2002), suggesting an anti-inflammatory effect that may be of clinical relevance.

Clinical reports have recently warned that glitazones may lead to development or exacerbation of congestive heart failure (Benbow *et al.* 2001; Yamamoto *et al.* 2001). The controversy between the clinical and experimental data suggests opposing effects of PPAR γ on cardiac inflammation and function. In addition, long-term effects of PPAR γ activators on cardiac hypertrophy in hypertension have not been investigated. There is evidence that, in contrast to PPAR α , which is abundant in cardiomyocytes, PPAR γ may be scarce in myocardial cells (Kelly 2003). However, inflammatory cells have abundant functional PPAR γ (Ricote *et al.* 1998), and thus treatment with glitazones may favorably affect the inflammatory response in the heart independently of effects on cardiomyocytes (Dandona *et al.* 2001; Chaudhuri *et al.* 2004). Cardiac remodeling may thus be modulated by PPAR γ despite the fact that these nuclear receptors may not be abundant in cardiomyocytes. We proposed that PPAR γ may play a role in offsetting hypertension-induced inflammatory

responses, which may affect remodeling of the heart in genetic hypertension. We therefore investigated the long-term effects of pioglitazone, a PPAR γ agonist, on cardiac hypertrophy and inflammation in SHRSP.

Methods

Animal experiments

The study was approved by the Animal Care Committee of the Clinical Research Institute of Montreal and performed according to the guidelines of the Canadian Council for Animal Care. Six-week-old male SHRSP (n = 16) bred in-house were randomized to no treatment (n = 8) or treatment with pioglitazone (10 mg/kg per day mixed with food, n = 8) for 20 weeks. Systolic blood pressure (SBP) was measured in conscious, restrained, warmed rats by the tail-cuff method every 2 weeks. After 20 weeks of treatment, rats were killed by decapitation. The heart was immediately excised; the left ventricle (LV) and right ventricle (RV) weights were determined. A portion of the LV was fixed in 10% buffered formalin solution and later embedded in paraffin. Coronal sections (5 μ m thick) obtained from the equator of the LV were prepared for immunohistochemical analysis. Another portion of the LV was immediately snap-frozen and kept at -80 °C for RNA and protein extraction.

Echocardiography

Rats were anesthetized with inhaled isoflurane (1.5%)/oxygen (300 mL/min), the chest shaved, and 2-dimensional guided M-mode echocardiography performed using a Hewlett-Packard Sonos 5500 and a 15-MHz linear-array transducer on a warming pad to maintain normothermia. The transducer was placed on the left hemithorax. Excessive pressure on the thorax, which can induce bradycardia, was avoided. Using the 2-dimensional parasternal short-axis imaging plan as guide, a LV M-mode tracing was acquired close to the papillary muscle level with a sweep speed of 150 mm/s. M-mode measurements of the LV end-diastolic internal diameter (LVIDd) the systolic internal diameter (LVIDs) were measured, and end-diastolic interventricular systolic (IVSd) and LV posterior-wall thickness

(LVPWd) were measured using the leading-edge convention of the American Society of Echocardiography. Three to 5 beats were averaged for each measurement. End diastole and systole were determined at the maximal LVIDd and at the peak of LVPW motion, respectively. The percentage of left ventricular fractional shortening (FS) was calculated as: $FS (\%) = [(LVIDd - LVIDs)/LVIDd] \times 100$. LV mass was estimated as described elsewhere (Tanaka *et al.* 1996) with the following formula: $LV \text{ mass (mg)} = [(LVDd + IVSd + LVPWd)^3 - LVDd^3] \times 1.055$, where 1.055 is the density of rat myocardium in mg/mm^3 .

Northern blot analysis for ANF

RNA was extracted from the LV and Northern blotting was performed as previously described (Paradis *et al.* 2000).

Electrophoretic Mobility Shift Assay (EMSA)

EMSA for NF κ B and AP-1 was performed on LV nuclear protein as previously described (Diep *et al.* 2002). Briefly, nuclear protein was incubated with ^{32}P end-labeled double-stranded oligonucleotide containing a NF κ B binding site 5'-AGTTGAGGGGACTTTCCCAGGC-3', or an AP-1 binding site 5'-CGCTTGATGAGTCAGCCGGAA-3' (Promega, Madison, Wis.). NF κ B (p65), c-fos, and c-jun antibodies from Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, Calif.) were used for supershift assays, whereas excess unlabeled oligonucleotide was used in competition assays. The DNA-protein complexes were analyzed on a 4% polyacrylamide gel. Subsequently the gel was dried, and the image was acquired and analyzed using PhosphorImager system (Molecular Dynamics, Sunnyvale, Calif.). PPAR γ activity in the heart was detected using the Nushift(TM) kit (Active Motif, Carlsbad, Calif.). Wild-type oligonucleotides 5'-GGA \underline{A} CTAGGTCAAAGGTCATCCCCT-3' and mutant oligonucleotides 5'-GGA \underline{A} CTAGA \underline{A} CAAAGA \underline{A} CATCCCCT-3' were used in a competition assay. Supershift was performed using PPAR γ antibody from Active Motif.

Collagen quantification

LV collagen was determined as previously described (Pu and Schiffrin 2001).

Immunohistochemical staining for TNF α and ICAM-1 Paraffin-embedded 5 μ m sections of LV were rehydrated and endogenous peroxidase activity was quenched by incubation in 3% hydrogen peroxide. Sections were blocked with goat serum for 30 min, followed by incubation with either anti-rat TNF α (1:30) or anti-rat ICAM-1 antibodies (1:100, Santa Cruz Biotechnology). The detection of the primary antibody was obtained using an avidin-biotin kit (Vector Laboratories, Burlingame, Calif.). The signal was revealed with 3,3'-diaminobenzidine (Sigma, St. Louis, Mo.). The sections were counterstained with hematoxylin and mounted. Negative controls were incubated with non-immune rabbit IgG in place of primary antibody.

Western blotting

Protein was extracted from frozen tissue as previously described (Diep *et al.* 2001) and concentration was determined with the Dc protein assay kit (Biorad, Hercules, Calif.). Samples were separated by electrophoresis on a 10% polyacrylamide gel and transferred onto a nitrocellulose membrane. Membranes were incubated with specific antibody to VCAM-1, PECAM, p53, or Bax (Santa Cruz Biotechnology), COX-2 (Upstate, Lake Placid, N.Y.). Signals were revealed with chemiluminescence and visualized autoradiographically. Membranes were subsequently stripped (Pierce Biotechnology, Rockford, Ill.) and re-probed with β -actin (1:10000, Sigma) to verify equal loading. Optical density of bands was quantified by AlphaEase (Alpha Innotech Corporation, San Leandro, Calif.), normalized to that of β -actin, and expressed in arbitrary units.

Data analysis

Values are presented as mean \pm SD. Body weight (BW) and SBP results were compared by repeated-measures ANOVA followed by Student-Newman-Keuls post-hoc t-test, whereas

all other data was analyzed by Student's t test. A value of $P < 0.05$ was considered significant.

Results

PPAR γ activation

As verified by EMSA, pioglitazone treatment induced activation of PPAR γ in LV of SHRSP-treated animals (Fig. 1).

Body weight, blood pressure, and cardiac mass and dimensions

During the 20 weeks of treatment, BW steadily increased in all animals (Fig. 2a), and was unaffected by pioglitazone treatment. All animals were hypertensive at 6 weeks of age (Fig. 2b). Pioglitazone had only a transient lowering effect on the rise in SBP in SHRSP (at 8-16 weeks of age). Echocardiography showed that LV mass (LVM)/BW ratio was significantly higher in pioglitazone-treated SHRSP at the initial stages of the study (at 8 weeks of age) and tended to decrease at 20 weeks (Fig. 2c). At 20 weeks of age treatment with pioglitazone, LVIDd and LVIDs increased (Figs. 3a and 3b), and IVSd and LVPWd decreased (Figs. 3c and 3d). However, pioglitazone treatment induced no change in FS in SHRSP (Fig. 3e). Pioglitazone treatment in SHRSP only slightly albeit significantly reduced both LVM/BW and RV mass (RVM)/BW determined at necropsy (Figs. 4a and 4b). In agreement with the very mild effects detected both echographically and at necropsy, pioglitazone treatment did not reduce ANF mRNA abundance (Fig. 5).

Cardiac collagen deposition

Interstitial collagen density in the subepicardial LV myocardium was significantly attenuated in SHRSP animals treated with pioglitazone (Fig. 6). However, no difference was observed in the mid-myocardial and subendocardial regions of the LV compared with untreated SHRSP.

Cardiac inflammatory and apoptotic mediators

Activation of transcription factors NF κ B and AP-1, which have been implicated in the regulation of inflammatory mediators, was significantly decreased by pioglitazone treatment (Figs. 7a and 7b). Furthermore, pioglitazone treatment reduced TNF α expression in LV of SHRSP (Fig. 8a). Whereas pioglitazone treatment reduced the expression of LV PECAM (Fig. 8b), it had no effect on LV VCAM-1 and ICAM-1 expression (Fig. 8c and data not shown, respectively). Additionally, pioglitazone treatment reduced LV COX-2 expression in SHRSP (Fig. 8d) and significantly increased the expression of the pro-apoptotic protein bax when compared with untreated SHRSP (Fig. 9a). There was a trend for an increase in p53 expression following pioglitazone treatment that did not achieve statistical significance (Fig. 9b).

Discussion

Studies of the effects of PPAR γ activators on the heart have provided controversial results, such as episodes of congestive heart failure with PPAR γ activator-based treatment (Benbow *et al.* 2001; Woollorton 2002), particularly as shown by differences between some clinical results and experimental data (Asakawa *et al.* 2002; Benbow *et al.* 2001; Sidell *et al.* 2002; Tsuji *et al.* 2001; Woollorton 2002; Yamamoto *et al.* 2001; Yue *et al.* 2001; Zhu *et al.* 2000). On one hand, *in vitro* and *in vivo* experimental studies have demonstrated that activation of PPAR γ inhibits cardiac hypertrophy (Asakawa *et al.* 2002; Yamamoto *et al.* 2001), improves LV diastolic function, decreases collagen accumulation in diabetic rats (Tsuji *et al.* 2001; Zhu *et al.* 2000), and protects myocardium from ischemic injury (Sidell *et al.* 2002). On the other hand, there is evidence that PPAR γ is not very abundant in cardiac cells, which suggests that many of the effects reported on the heart of the PPAR γ activators thiazolidinediones or glitazones, such as pioglitazone or rosiglitazone, may be due to extra-cardiac effects. These may include salt and water retention through insulinsensitizing effects on the kidney, aggravated by the discontinuation of diuretic therapy in diabetic subjects who are at high risk of developing heart failure. Long-term

effects of PPAR γ activators on cardiac hypertrophy and inflammation in hypertensive heart disease have not been investigated. Here we demonstrate that a long-term treatment with pioglitazone, a PPAR γ activator, lowered BP very slightly and transiently, and had very mild effects on the cardiac hypertrophy and interstitial fibrosis in SHRSP. However, there were significant effects on inflammatory mediators such as the transcription factors NK κ B and AP-1, the cytokine TNF α , the proinflammatory protein COX-2, and the adhesion molecule PECAM in the LV, which may impact on the long-term on remodeling of the heart.

Previous studies have suggested that PPAR γ may inhibit development of cardiac hypertrophy (Asakawa *et al.* 2002; Yamamoto *et al.* 2001). The present study suggests that the anti-hypertrophic role of PPAR γ on the heart of SHRSP is mild at best. This was not due to underdosing of pioglitazone, as suggested by the fact that the binding activity of PPAR γ was increased in treated SHRSP. The small magnitude of the effect may be the result of the paucity of PPAR γ in cardiomyocytes, although the abundance of these nuclear receptors may vary in the presence of cardiac hypertrophy. Yamamoto *et al.* (2001) showed that PPAR γ activators inhibit the cardiomyocyte hypertrophy induced by mechanical strain, angiotensin (Ang) II, and phenylephrine. In addition, PPAR γ activators inhibit endothelin-induced cardiac hypertrophy (Sakai *et al.* 2002). Asakawa *et al.* (2002) showed that pioglitazone inhibited myocardial hypertrophy to a lesser degree in heterozygous PPAR γ -deficient than in wild-type mice. In addition, Ang II-induced cardiac hypertrophy and hypertrophic gene expression were attenuated by thiazolidinediones (Asakawa *et al.* 2002). The possibility that the cardiac effects of pioglitazone may result from antagonism of Ang receptor signaling pathways, as we described in the vasculature (Diep *et al.* 2002), remains to be clarified.

PPAR γ signaling could attenuate cardiac remodeling via pathways such as inflammatory responses, which play an important role in the progression of cardiac remodeling and

dysfunction. In macrophages, PPAR γ is involved in the regulation of inflammatory responses by antagonism of transcription factors NF κ B and AP-1 (Ricote *et al.* 1998). Effects of PPAR activation on NF κ B, and the effects of PPAR activation on circulating monocytes in humans with different glitazones have been demonstrated by several studies, giving greater clinical relevance to their antiinflammatory action (Ghanim *et al.* 2001, Mohanty *et al.* 2004). NF κ B, although an important inflammatory mediator, is also required for the hypertrophic response of neonatal rat cardiomyocytes in vitro (Purcell *et al.* 2001). PPAR γ has been suggested to play an important role in vascular growth and inflammation. Indeed, in the present study we demonstrated that activity of NF κ B and AP-1 and the expression of the adhesion molecule PECAM, a downstream target of NF κ B, in the hypertrophic heart of SHRSP, was decreased after pioglitazone treatment, suggesting that pioglitazone may antagonize cardiac remodeling by inhibiting inflammation. Another indicator of inflammation is the pro-inflammatory marker TNF α , which has been shown to be increased in failing myocardium (Takano *et al.* 2000). PPAR γ activation decreased LV TNF α expression in SHRSP. This is in agreement with evidence that PPAR γ activators inhibit TNF α expression at the transcriptional level, in part by preventing NF κ B activity in cardiac myocytes (Jiang *et al.* 1998; Takano *et al.* 2000). The data from this study that showed that pioglitazone reduces cardiac inflammation in SHRSP agrees with clinical data that showed that diabetic patients treated with another glitazone, rosiglitazone, exhibited reduced concentration of inflammatory markers in the circulation (Haffner *et al.* 2002). Additionally, it has been established that Ang II exerts a growth-promoting effect on the vasculature and on the heart (Devlin *et al.* 1995). We recently demonstrated that PPAR γ activation antagonizes vascular growth and inflammation in Ang II-infused rats (Diep *et al.* 2002). Thus, pioglitazone may be exerting a similar effect on mechanisms involved in cardiac hypertrophy and inflammation in SHRSP. A plausible mechanism is the interaction that has been demonstrated with CCAAT/ enhancer-binding protein- δ (C/EBP- δ), which upregulates transcription of various inflammatory cytokines, is present in tandem repeats in the PPAR γ gene promoter and is negatively autoregulated by PPAR γ in the vasculature

(Takata *et al.* 2002). These authors demonstrated that the PPAR γ ligands troglitazone, pioglitazone, and 15-deoxy- $\Delta^{12,14}$ -prostaglandin J2 transcriptionally inhibited interleukin (IL)-1 β -induced IL-6 expression in vascular smooth muscle cells. Thus C/EBP- δ may be negatively autoregulated via activation of PPAR γ , causing subsequent down-regulation of inflammatory responses. Finally, among the different mechanisms involved, apoptosis has been suggested to play an important role in the evolution of cardiac hypertrophy (Hunter and Chien 1999). Apoptosis increases in myocardial hypertrophy and as a result of pressure overload in SHR during aging (Li *et al.* 1997). Pioglitazone may induce apoptosis (Aizawa *et al.* 2001), which could partly explain its effect on cardiac hypertrophy in SHRSP. Indeed, the expression of bax, a pro-apoptotic protein, was increased in the heart of SHRSP treated with pioglitazone in the present study. Since insulin resistance has been implicated in the development of myocardial remodeling (Tsuji *et al.* 2001), pioglitazone may exert anti-fibrotic and anti-inflammatory effects indirectly via its insulin-sensitizing properties, facilitating the phosphoinositide 3-kinase metabolic pathway to the detriment of the mitogen-activated protein kinase hypertrophic pathway, although there is no definitive evidence supporting this possibility (Ghazzi *et al.* 1997). However, Dandona *et al.* (2001) showed that insulin exerted potent anti-inflammatory effects by inhibition of the NF κ B pathway on monocytes, and Chaudhuri *et al.* (2004) demonstrated recently that insulin had anti-inflammatory and pro-fibrinolytic effects in acute ST-segment-elevation myocardial infarction. Another possible mechanism for the anti-inflammatory effects of PPAR γ activation in treated SHRSP rats is the down-regulation of LV COX-2 expression. Other studies have demonstrated that COX-2 expression is suppressed by PPAR γ activation (Inoue *et al.* 2000; Maggi *et al.* 2000; Subbaramaiah *et al.* 2001). Additionally, COX-2 is overexpressed in the myocardium of patients with congestive heart failure (Wong *et al.* 1998) and in mice with cardiac failure (Zhang *et al.* 2003), and in the latter, administration of a selective COX-2 inhibitor, nimesulide, prevented cardiac failure. These data suggest that inhibition of COX-2 may contribute to or participate in anti-inflammatory and anti-fibrotic effects of PPAR γ activation that contribute to reduce cardiac remodeling.

In conclusion, long-term treatment of SHRSP, a model of severe genetic hypertension associated with cardiac hypertrophy, with the PPAR γ activator pioglitazone was associated with slight and transient reduction of BP elevation and a mild reduction of LV hypertrophy and fibrosis, but also with a significant reduction of inflammatory activity in the heart. Our results suggest that treatment with these agents may provide cardiac benefits to diabetic subjects, who are known to be at high cardiovascular risk as a consequence of hypertension, coronary artery disease, and diabetic cardiomyopathy, and this benefit may derive in part from a reduction of cardiac inflammatory responses.

Acknowledgments

This work was supported by grant 13570 (to ELS) and a Group Grant to the Multidisciplinary Research Group on Hypertension, both from the Canadian Institutes of Health Research (CIHR). Dr. Q.N. Diep was supported by a postdoctoral fellowship from CIHR. We are grateful to André Turgeon, Suzanne Diebold, Marie-France Lavoie, Nassim Dali-Youcef, and Ping Yue for their excellent technical assistance.

References

1. Aizawa, Y., Kawabe, J., Hasebe, N., Takehara, N., and Kikuchi K. 2001. Pioglitazone enhances cytokine-induced apoptosis in vascular smooth muscle cells and reduces intimal hyperplasia. *Circulation*. 104: 455-460.
2. Asakawa, M., Takano, H., Nagai, T., Uozumi, H., Hasegawa, H., Kubota, N., Saito, T., Masuda, Y., Kadowaki, T., and Komuro, I. 2002. Peroxisome proliferator-activated receptor γ plays a critical role in inhibition of cardiac hypertrophy in vitro and in vivo. *Circulation*. 105: 1240-1246.

3. Barger, P.M., Brandt, J.M., Leone, T.C., Weinheimer, C.J., and Kelly, D.P. 2000. Deactivation of peroxisome proliferator-activated receptor- α during cardiac hypertrophic growth. *J. Clin. Invest.* 105: 1723-1730.
4. Benbow, A., Stewart, M., and Yoeman, G. 2001. Thiazolidinediones for type 2 diabetes. All glitazones may exacerbate heart failure. *B. M. J.* 322: 236.
5. Chaudhuri, A., Janicke, D., Wilson, M.F., Tripathy, D., Garg, R., Bandyopadhyay, A., Calieri, J., Hoffmeyer, D., Syed, T., Ghanim, H., Aljada, A. and Dandona, P. 2004. Anti-Inflammatory and Profibrinolytic Effect of Insulin in Acute ST-Segment-Elevation Myocardial Infarction. *Circulation.* 109: 849-854.
6. Dandona, P., Aljada, A., Mohanty, P., Ghanim, H., Hamouda, W., Assian, E., and Ahmad, S. 2001. Insulin inhibits intranuclear nuclear factor kappaB and stimulates IkappaB in mononuclear cells in obese subjects: evidence for an anti-inflammatory effect? *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 86: 3257-3265.
7. Devlin, A.M., Gordon, J.F., Davidson, A.O., Clark, J.S., Hamilton, C.A., Morton, J.J., Campbell, A.M., Reid, J.L., and Dominiczak, A.F. 1995. The effects of perindopril on vascular smooth muscle polyploidy in stroke-prone spontaneously hypertensive rats. *J. Hypertens.* 13: 211-218.
8. Diep, Q.N., El Mabrouk, M., Cohn, J.S., Endemann, E., Amiri, F., Viridis, A., Neves, M.F., and Schiffrin, E.L. 2002. Structure, endothelial function, cell growth and inflammation in blood vessels of angiotensin II-infused rats: Role of peroxisome proliferator-activated receptor- γ . *Circulation.* 105: 2296-2302.
9. Diep, Q.N., El Mabrouk, M., Touyz, R.M., and Schiffrin, E.L. 2001. Expression of cell cycle proteins in blood vessels of angiotensin II-infused rats. *Hypertension.* 37: 604-608.
10. Ghanim, H., Garg, R., Aljada, A., Mohanty, P., Kumbkarn, Y., Assian, E., Hamouda, W., and Dandona P. 2001. Suppression of nuclear factor-kappaB and stimulation of inhibitor kappaB by troglitazone: evidence for an anti-inflammatory effect and a

- potential antiatherosclerotic effect in the obese. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 86: 1306-1312.
11. Ghazzi, M.N., Perez, J.E., Antonucci, T.K., Driscoll, J.H., Huang, S.M., Faja, B.W., and Whitcomb, R.W. 1997. Cardiac and glycemic benefits of troglitazone treatment in NIDDM. The troglitazone study group. *Diabetes.* 46: 433-439.
 12. Haffner, S.M., Greenberg, A.S., Weston, W.M., Chen, H., Williams, K., Freed, M.I. 2002. Effect of rosiglitazone treatment on nontraditional markers of cardiovascular disease in patients with type 2 diabetes mellitus. *Circulation.* 106: 679-684.
 13. Hsueh, W.A., and Law, R.E. 2001. PPAR γ and atherosclerosis: effects on cell growth and movement. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 21: 1891-1895.
 14. Hunter, J.J., and Chien, K.R. 1999. Signaling pathways for cardiac hypertrophy and failure. *N. Engl. J. Med.* 341: 1276-1283.
 15. Inoue, H., Tanabe, T., and Umesono, K. 2000. Feedback control of cyclooxygenase-2 expression through PPAR γ . *J. Biol. Chem.* 275: 28028-28032.
 16. Jiang, C., Ting, A.T., and Seed, B. 1998. PPAR γ agonists inhibit production of monocyte inflammatory cytokines. *Nature.* 391: 82-86.
 17. Kannel, W.B., Castelli, W.P., McNamara, P.M., McKee, P.A., and Feinleib, M. 1972. Role of blood pressure in the development of congestive heart failure: the Framingham Study. *N. Engl. J. Med.* 287: 781-787, 1972.
 18. Kelly, D.P. 2003. PPARs of the heart. *Circ. Res.* 92: 482-484.
 19. Lehmann, J.M., Moore, L.B., Smith-Oliver, T.A., Wilkison, W.O., Willson, T.M., and Kliewer, S.A. 1995. An antidiabetic thiazolidinedione is a high affinity ligand for PPAR- γ . *J. Biol. Chem.* 270: 12953-12956.
 20. Li, Z., Bing, O.H., Long, X., Robinson, K.G., and Lakatta EG. 1997. Increased cardiomyocyte apoptosis during the transition to heart failure in the spontaneously hypertensive rat. *Am. J. Physiol.* 272: H2313-H2319.
 21. Maggi, L.B. Jr., Sadeghi, H., Weigand, C., Scarim, A.L., Heitmeier, M.R., and Corbett, J.A. 2000. Anti-inflammatory actions of 15-deoxy- $\Delta^{12,14}$ -prostaglandin J2

- and troglitazone: evidence for heat shock-dependent and -independent inhibition of cytokine-induced inducible nitric oxide synthase expression. *Diabetes*. 49: 346-355.
22. Mohanty, P., Aljada, A., Ghanim, H., Hofmeyer, D., Tripathy, D., Syed, T., Al Haddad, W., Dhindsa, S., and Dandona, P. 2004. Evidence for a Potent Antiinflammatory Effect of Rosiglitazone. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 89: 2728-2735.
 23. Paradis, P., Dali-Youcef, N., Paradis, F.W., Thibault, G., and Nemer, M. 2000. Overexpression of angiotensin II type I receptor in cardiomyocytes induces cardiac hypertrophy and remodeling. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 97: 931-936.
 24. Pu, Q., and Schiffrin, E.L. 2001. Effect of ACE/NEP inhibition on cardiac and vascular collagen in stroke-prone spontaneously hypertensive rats. *Am. J. Hypertens.* 14: 1067-1072.
 25. Purcell, N.H., Tang, G., Yu, C., Mercurio, F., DiDonato, J.A., and Lin, A. 2001. Activation of NF- κ B is required for hypertrophic growth of primary rat neonatal ventricular cardiomyocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 98: 6668-6673.
 26. Ricote, M., Li, A.C., Willson, T.M., Kelly, C.J., and Glass, C.K. 1998. The peroxisome proliferator-activated receptor- γ is a negative regulator of macrophage activation. *Nature*. 391: 79-82.
 27. Sakai, S., Miyauchi, T., Irukayama-Tomobe, Y., Ogata, T., Goto, K., and Yamaguchi, I. 2002. Peroxisome proliferator-activated receptor- γ activators inhibit endothelin-1-related cardiac hypertrophy in rats. *Clin. Sci. (Lond.)* 103(Suppl 48): 16S-20S.
 28. Sidell, R.J., Cole, M.A., Draper, N.J., Desrois, M., Buckingham, R.E., and Clarke, K. 2002. Thiazolidinedione treatment normalizes insulin resistance and ischemic injury in the Zucker fatty rat heart. *Diabetes*. 51: 1110-1117.
 29. Subbaramaiah, K., Lin, D.T., Hart, J.C., and Dannenberg, A.J. 2001. Peroxisome proliferator-activated receptor γ ligands suppress the transcriptional activation of cyclooxygenase-2. Evidence for involvement of activator protein-1 and CREB-binding protein/p300. *J. Biol. Chem.* 276: 12440-12448.

30. Takano, H., Nagai, T., Asakawa, M., Toyozaki, T., Oka, T., Komuro, I., Saito, T., and Masuda, Y. 2000. Peroxisome proliferator-activated receptor activators inhibit lipopolysaccharide-induced tumor necrosis factor- α expression in neonatal rat cardiac myocytes. *Circ. Res.* 87: 596-602.
31. Takata, Y., Kitami, Y., Yang, Z.H., Nakamura, M., Okura, T., and Hiwada, K. 2002. Vascular inflammation is negatively autoregulated by interaction between CCAAT/enhancer-binding protein- δ and peroxisome proliferator-activated receptor- γ . *Circ. Res.* 91: 427-433.
32. Tanaka, N., Dalton, N., Mao, L., Rockman, H.A., Peterson, K.L., Gottshall, K.R., Hunter, J.J., Chien, K.R., and Ross, J., Jr. 1996. Transthoracic echocardiography in models of cardiac disease in the mouse. *Circulation.* 94: 1109-1117.
33. Tsuji, T., Mizushige, K., Noma, T., Murakami, K., Ohmori, K., Miyatake, A., and Kohno, M. 2001. Pioglitazone improves left ventricular diastolic function and decreases collagen accumulation in prediabetic stage of a type II diabetic rat. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 38: 868-874.
34. Woollorton E. 2002. Rosiglitazone (Avandia) and pioglitazone (Actos) and heart failure. *Can. Med. Assoc. J.* 166: 219.
35. Wong, S.C., Fukuchi, M., Melnyk, P., Rodger, I., and Giaid, A. 1998. Induction of cyclooxygenase-2 and activation of nuclear factor- κ B in myocardium of patients with congestive heart failure. *Circulation.* 98: 100-103.
36. Yamamoto, K., Ohki, R., Lee, R.T., Ikeda, U., and Shimada, K. 2001. Peroxisome proliferator-activated receptor γ activators inhibit cardiac hypertrophy in cardiac myocytes. *Circulation.* 104: 1670-1675.
37. Yamori, Y., Horie, R., Sato, M., Handa, H., and Fukasa, M. 1976. Pathogenic similarity of stroke in stroke-prone SHR and humans. *Stroke.* 7: 46-53.
38. Yue, T.L., Chen, J., Bao, W., Narayanan, P.K., Bril, A., Jiang, W., Lysko, P.G., Gu, J.L., Boyce, R., Zimmerman, D.M., Hart, T.K., Buckingham, R.E., and Ohlstein, E.H. 2001. In vivo myocardial protection from ischemia/reperfusion injury by the

- peroxisome proliferator-activated receptor- γ agonist rosiglitazone. *Circulation*. 104: 2588-2594.
39. Zhang, Z., Vezza, R., Plappert, T., McNamara, P., Lawson, J.A., Austin, S., Pratico, D., Sutton, M.S., and FitzGerald, G.A. 2003. COX-2-dependent cardiac failure in Gh/tTG transgenic mice. *Circ. Res.* 92: 1153-1161.
 40. Zhu, P., Lu, L., Xu, Y., and Schwartz, G.G. 2000. Troglitazone improves recovery of left ventricular function after regional ischemia in pigs. *Circulation*. 101: 1165-1171.

Figure 1

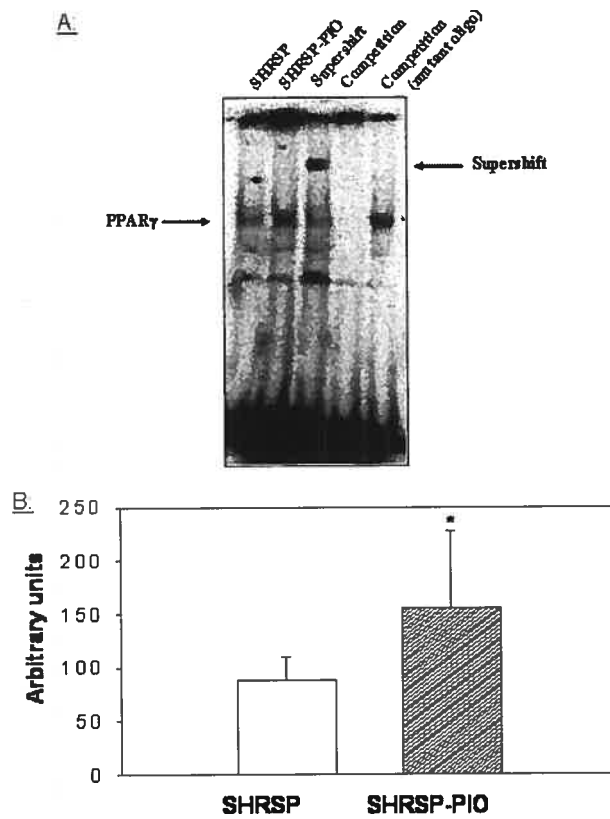


Figure IV-1: PPAR γ activity in the heart of SHRSP. (A) Representative PPAR γ activity by Electrophoretic Mobility Shift Assay (EMSA) in the heart of stroke-prone spontaneously hypertensive rat (SHRSP) \pm pioglitazone after 20 weeks of treatment, at 26 weeks of age. (B) Results are mean \pm SD from 4 rats. *, $P < 0.05$ vs. SHRSP.

Figure 2

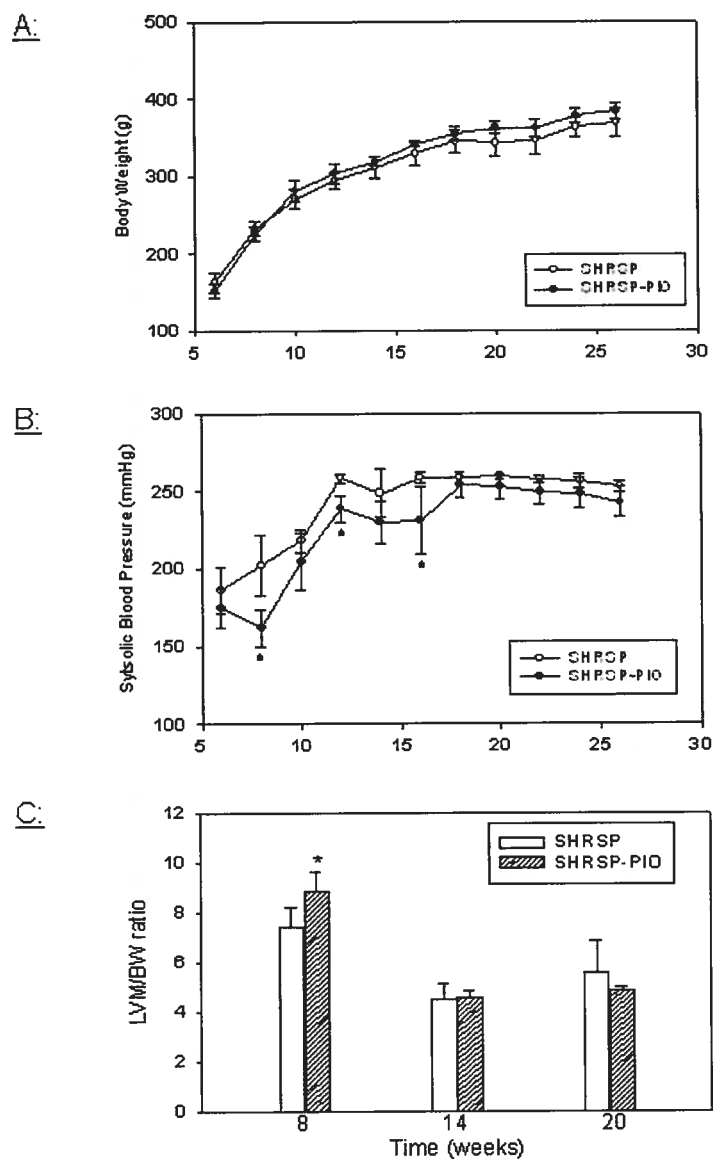


Figure IV-2 : Body weight, systolic blood pressure and left ventricular mass/body of SHRSP. (A) Body weight of SHRSP \pm pioglitazone throughout the experimental period. Results are mean \pm SD (n = 8). (B) Systolic blood pressure (SBP) of SHRSP \pm pioglitazone throughout the experimental period. Results are mean \pm SD (n = 8). *, P < 0.05 vs. SHRSP. (C) Left ventricular mass/body weight (LVM/BW) ratio of SHRSP \pm pioglitazone at various times throughout the experimental period (at 8, 14, and 20 weeks) as determined by echocardiography. Results are mean \pm SD (n = 8). *, P < 0.05 vs. SHRSP.

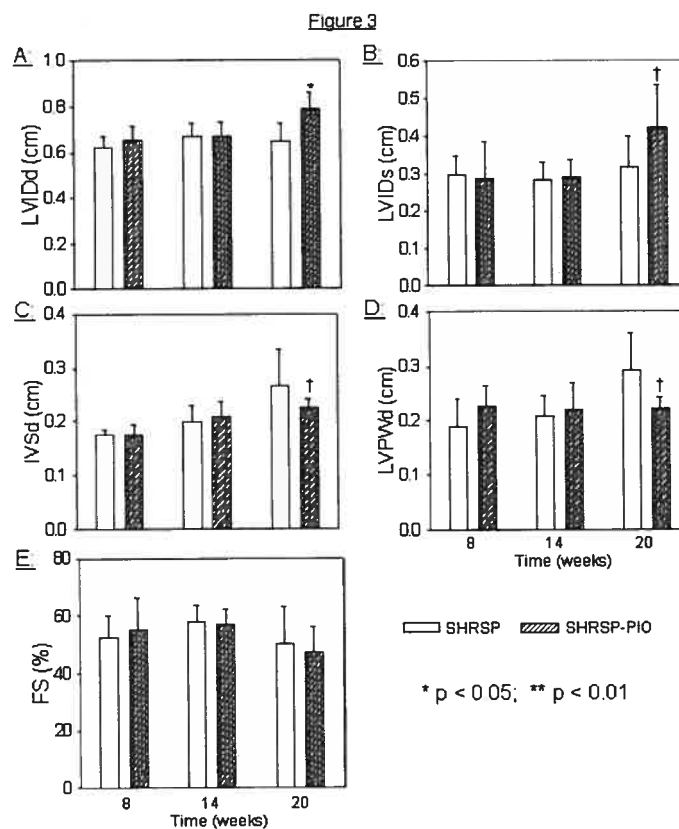


Figure IV-3 : Echocardiography of SHRSP. (A) LV end-diastolic internal diameter (LVIDd) of SHRSP ± pioglitazone at various times throughout the experimental period (at 8, 14, and 20 weeks). Results are mean ± SD (n = 8). *, P < 0.01 vs. SHRSP. (B) LV end-systolic internal diameter (LVIDs) of SHRSP ± pioglitazone at various times throughout the experimental period (at 8, 14, and 20 weeks). Results are mean ± SD (n = 8). †, P < 0.05 vs. SHRSP. (C) End-diastolic interventricular systolic (IVSd) of SHRSP ± pioglitazone at various times throughout the experimental period (at 8, 14, and 20 weeks). Results are mean ± SD (n = 8). †, P < 0.05 vs. SHRSP. (D) LV posterior-wall thickness (LVPWd) of SHRSP ± pioglitazone at various times throughout the experimental period (at 8, 14, and 20 weeks). Results are mean ± SD (n = 8). †, P < 0.05 vs. SHRSP. (E) Fractional shortening (FS) of SHRSP ± pioglitazone at various times throughout the experimental period (at 8, 14, and 20 weeks). Results are mean ± SD (n = 8).

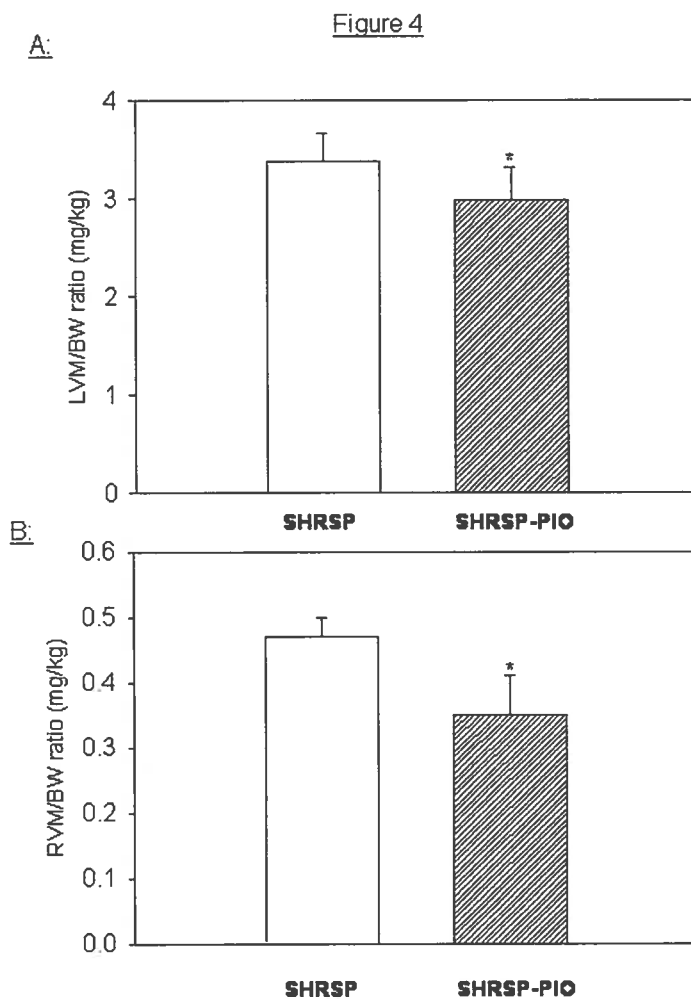


Figure IV-4 : Left and right ventricle mass/body weight ratio of SHRSP. (A) Left ventricle mass/body weight (LVM/BW) ratio of SHRSP \pm pioglitazone after 20 weeks of treatment. Results are mean \pm SD (n = 8). *, P < 0.05 vs. SHRSR (B) Right ventricle mass/body weight (RVM/BW) ratio of SHRSP \pm pioglitazone after 20 weeks of treatment. Results are mean \pm SD (n = 8). *, P < 0.05 vs. SHRSP.

Figure 5

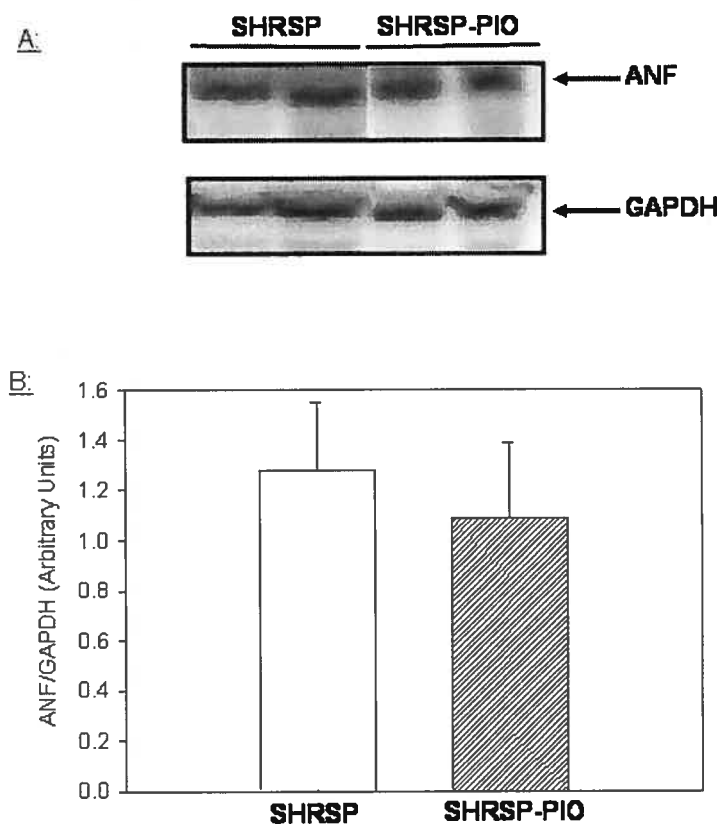


Figure IV-5 : Northern blot of LV atrial natriuretic factor and glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase of SHRSP. (A) Representative Northern blot of LV atrial natriuretic factor (ANF) and glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) of SHRSP \pm pioglitazone after 20 weeks of treatment. (B) Results are mean \pm SD (n = 4).

Figure 6

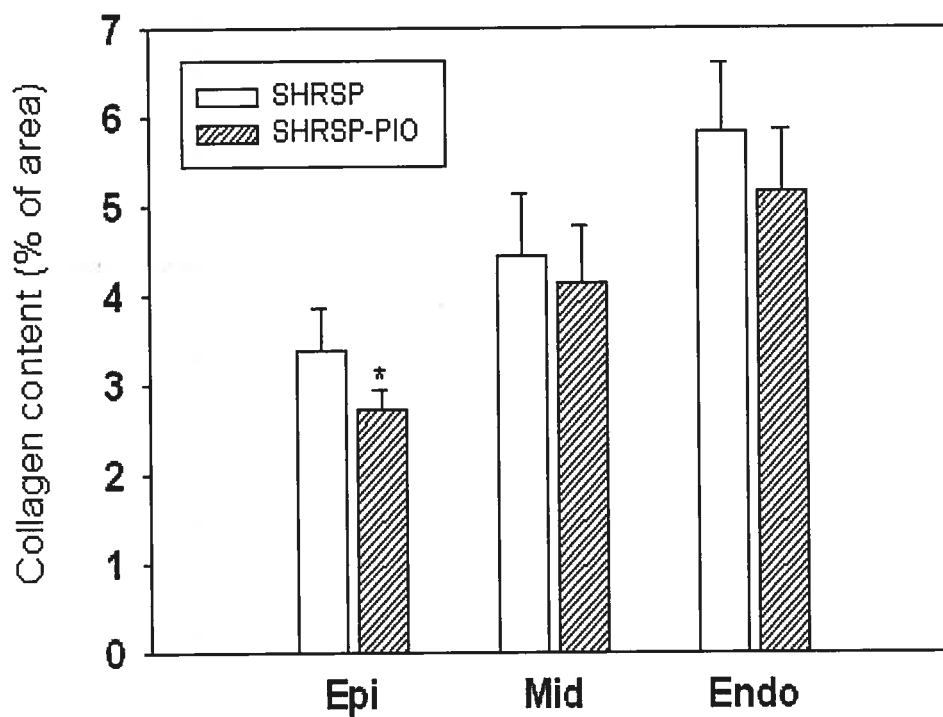


Figure IV-6 : Collagen content in epi-endocardial, mid-myocardial, and endo-epicardial regions of LV myocardium of SHRSP after 20 weeks of treatment. Results are expressed as mean \pm SD (n = 8). *, p < 0.01 vs. SHRSP.

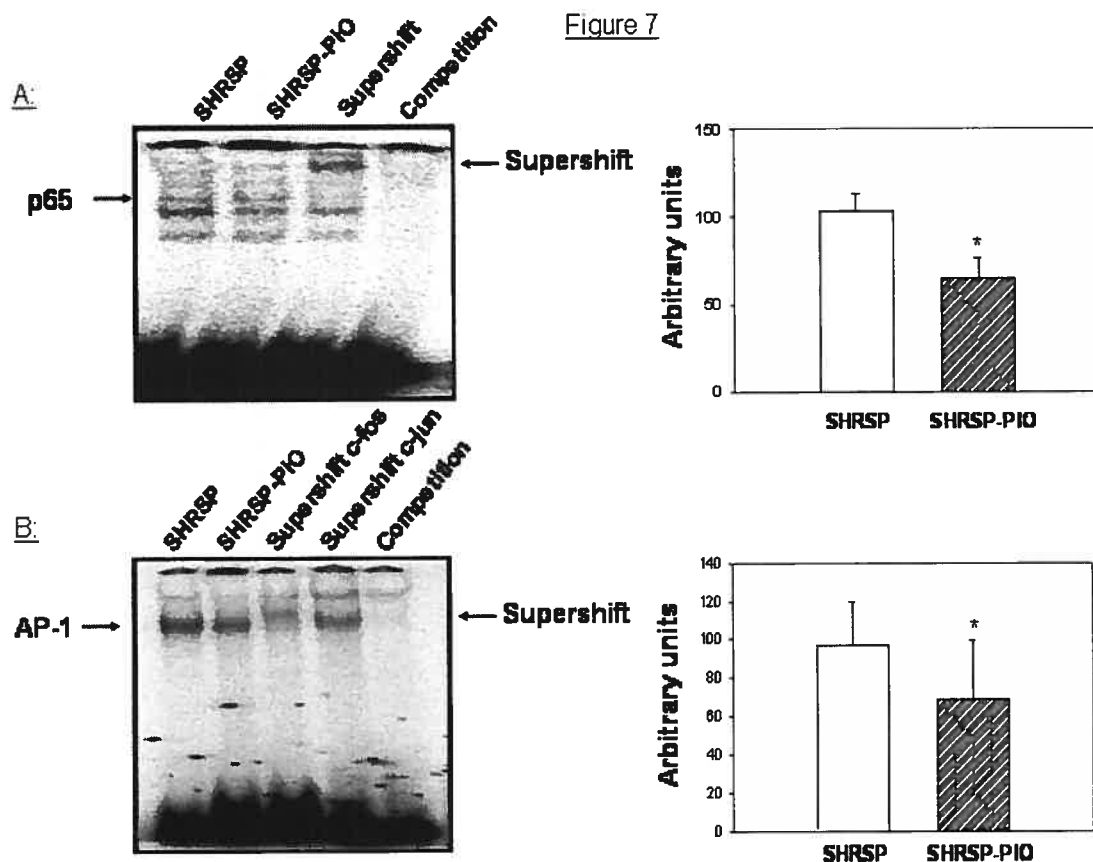


Figure IV-7 : Left ventricule NF κ B and AP-1 activity in SHRSP. (A) Left: Representative LV NF κ B binding activity in SHRSP \pm pioglitazone after 20 weeks of treatment. Right: Results are mean \pm SD (n = 4). *, P < 0.05 vs. SHRSP. (B) Left: Representative LV AP-1 binding activity in SHRSP \pm pioglitazone after 20 weeks of treatment. Right: Results are mean \pm SD (n = 4 rats per group). *, P < 0.05 vs. SHRSP.

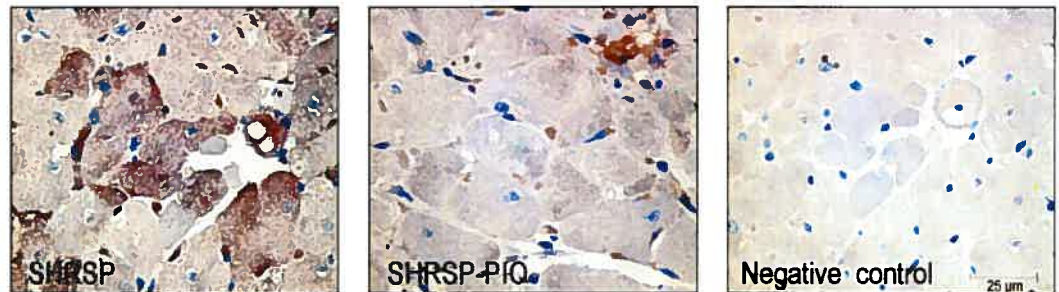
Figure 8A: TNF- α 

Figure IV-8 : Left ventricle expression of TNF α , PECAM, VCAM-1, COX-2 in SHRSP. (A) Representative immunohistochemical staining of TNF α in SHRSP \pm pioglitazone after 20 weeks of treatment. TNF α appears as brown grey, whereas nuclei appear as blue spots. Negative controls were incubated with non-immune rabbit IgG in place of primary antibody. Bar = 25 μ m.

Figure 8

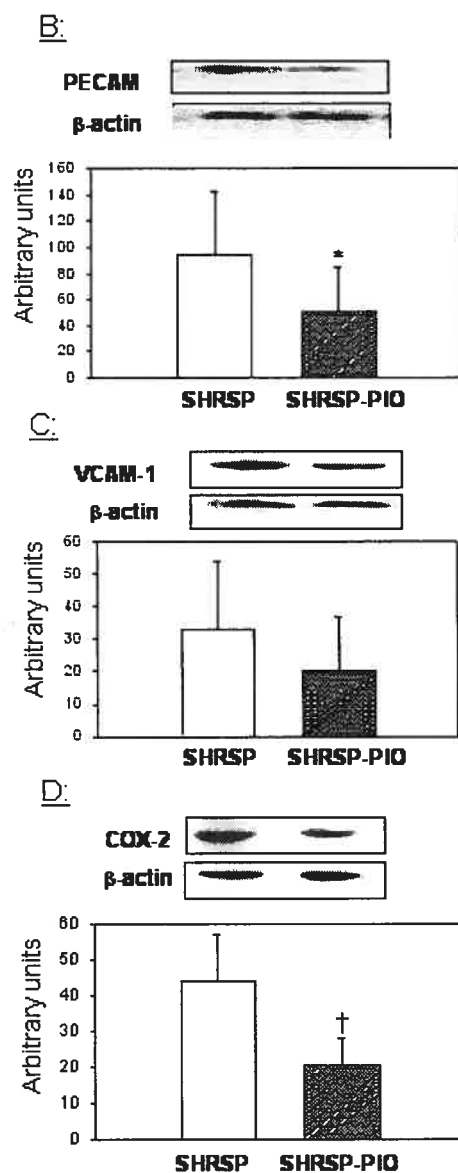


Figure IV-8: Left ventricle expression of $TNF\alpha$, PECAM, VCAM-1, COX-2 in SHRSP. (B) Top: Representative immunoblots of LV PECAM and β -actin in SHRSP \pm pioglitazone after 20 weeks of treatment. Bottom: Results are mean \pm SD (n = 4). *, P < 0.05 vs. SHRSP. (C) Top: Representative immunoblots of LV VCAM-1 and β -actin in SHRSP \pm pioglitazone after 20 weeks of treatment. Bottom: Results are mean \pm SD (n = 4). (D) Top: Representative immunoblots of LV COX-2 and β -actin in SHRSP \pm pioglitazone after 20 weeks of treatment. Bottom: Results are mean \pm SD (n = 4). †, P < 0.01 vs. SHRSP.

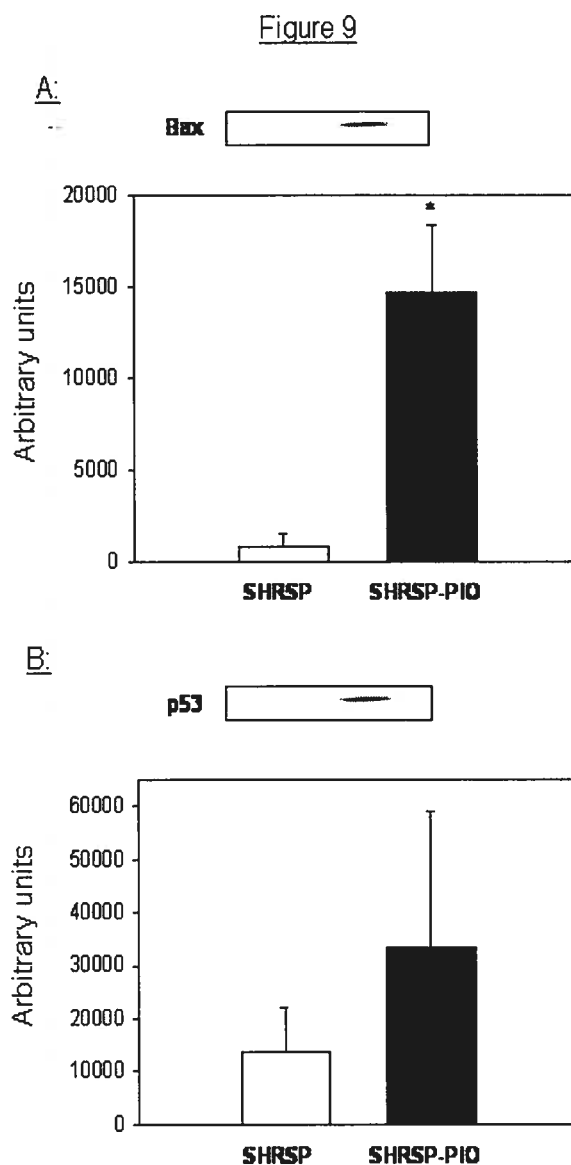


Figure IV-9 : Left ventricle expression of Bax and p53 in SHRSP. (A) Top: Representative immunoblot of LV Bax in SHRSP \pm pioglitazone after 20 weeks of treatment. Bottom: Results are mean \pm SD (n = 3). †, P < 0.01 vs. SHRSP. (B) Top: Representative immunoblot of LV p53 in SHRSP \pm pioglitazone after 20 weeks of treatment. Bottom: Results are mean \pm SD (n = 3). †, P < 0.01 vs. SHRSP.

CHAPITRE V: Discussion et conclusion

12. Discussion

L'Ang II est le principal agent du SRAA et joue un rôle important dans le développement de l'HTA pouvant mener à différentes complications cardiovasculaires comme l'hypertrophie cardiaque, l'insuffisance rénale et cardiaque, la maladie coronaire, l'infarctus du myocarde et des accidents cérébrovasculaires. L'Ang II est impliquée dans plusieurs processus vasculaires comme la contraction, la migration, la croissance et l'apoptose des CMLV ainsi que la déposition de la MEC retrouvée dans les processus de remodelage vasculaire. Il engendre la dysfonction endothéliale en affectant directement les CE et en stimulant la synthèse d'autres agents vasoconstricteurs comme l'ET-1 et favorisant ainsi l'HTA. Aussi, l'Ang II augmente la migration de cellules inflammatoires et stimule la synthèse de plusieurs marqueurs inflammatoires (protéines d'adhésion, cytokines, facteurs de transcription) au niveau vasculaire et cardiaque. L'importance de l'Ang II, dans le développement de ces événements physiologiques et moléculaires, a été démontrée à partir de différents modèles expérimentaux et génétiques d'HTA ainsi que différentes études cliniques qui ont fait usage d'IECA ou d'ARA chez des patients hypertendus. Depuis peu, les TZD ont démontré avoir, en plus de leurs effets insulinosensibilisateurs, des effets inhibiteurs contre les actions stimulatrices de l'Ang II sur la contraction, la croissance et la migration cellulaire ainsi que sur l'inflammation retrouvée dans l'HTA. Par conséquent, la compréhension des mécanismes moléculaires par lesquels les activateurs de PPAR γ affectent les mécanismes activateurs de l'Ang II au niveau vasculaire, contribuera au développement de stratégies pharmacologiques ou même génétiques permettant de diminuer ou prévenir le remodelage vasculaire observé dans l'HTA.

La discussion portera donc sur les effets inhibiteurs des activateurs de PPAR γ sur les différentes voies de signalisation intracellulaire impliquées dans la croissance cellulaire

induite par l'Ang II, particulièrement la voie ERK1/2 et PI3K. Aussi, cette section portera sur la régulation par l'Ang II et les TZD tel que la rosiglitazone sur ces voies de signalisation dans différents types de vaisseaux. Finalement, cette discussion permettra d'approfondir les effets à long terme d'un traitement avec des TZD sur les actions pro-inflammatoires de l'Ang II dans le cœur de rats SHRSP. Cette section se veut aussi une mise en évidence des liens qui existent entre ces différentes études ainsi qu'à l'enrichissement d'études antérieures.

12.1 L'Ang II, ses récepteurs et PPAR γ

L'Ang II induit ses effets par son association avec les récepteurs AT₁ et AT₂. L'activation du récepteur AT₁ est la voie principale menant aux effets activateurs de l'Ang II. Une fois activé, le récepteur AT₁ mène à une cascade d'évènements moléculaires qui favorisent la contraction, la migration et la croissance cellulaire retrouvées dans le remodelage vasculaire et dans l'HTA. La régulation de ce récepteur est, par conséquent, une étape importante pour l'altération des effets activateurs de l'Ang II. De façon intéressante, nos études démontrent des variations d'expression du récepteur AT₁ entre l'aorte et les artères mésentériques de rats infusés à l'Ang II pendant une période de sept jours. Cette première observation suggère des mécanismes différentiels de régulation de ce récepteur selon le type de vaisseau. Ceci n'est pas surprenant si l'on considère leurs différences structurelles et fonctionnelles. Toutefois, les différences entre ces vaisseaux ne sont pas uniques en ce sens qu'une étude récente a démontré une régulation opposée de la synthèse de O₂^{·-} entre l'aorte et les artères mésentériques (289). Effectivement, dans cette étude, l'infusion à l'Ang II chez des souris déficientes pour la SOD extracellulaire a favorisé, dans l'aorte, une diminution de O₂^{·-} intracellulaire et extracellulaire, une augmentation de la production du NO et une vasodilatation dépendante de l'endothélium. Toutefois, dans les artères mésentériques une augmentation de O₂^{·-} et une diminution de vasodilatation dépendante de l'endothélium a été observée. Dans ce même modèle, le

co-traitement avec une TZD, la rosiglitazone, permet de contrebalancer les effets de l'Ang II sur l'expression de ce récepteur. Il est à noter que la rosiglitazone seule n'a aucunement affecté l'expression du récepteur AT₁ dans l'aorte ou les artères mésentériques. Ces évidences proposent PPAR γ comme un facteur régulateur des effets de l'Ang II dans ces vaisseaux. De façon similaire, le traitement *in vitro* à la rosiglitazone seule pendant une période de 24 heures n'a pas affecté l'expression des récepteurs AT₁ et AT₂ dans les CMLV dérivées d'artères mésentériques (annexe, figure 1). Cette étude *in vitro* poursuit les études de Takeda *et coll.* qui ont démontré que le traitement à la troglitazone, pendant une période de 24 heures dans les CMLV aortiques, n'affecte pas l'expression du récepteur AT₁ (290). Cependant, ce TZD a affecté l'expression de l'ARNm et protéique du récepteur AT₁ dans les premières heures du traitement, effet qui s'est estompé de la sixième à la 24^{ème} heure de traitement. Ainsi, l'ensemble de ces faits suggère que les TZD sont des agents qui ont le potentiel de réguler l'expression des récepteurs de l'Ang II en fonction du tissu et du temps de stimulation et par conséquent, de jouer un rôle important dans le remodelage vasculaire induit par l'Ang II. Malgré le fait que quelques données démontrent l'implication des TZD sur la régulation des récepteurs de l'Ang II et sur les effets biologiques leur étant associés, la caractérisation des voies de signalisation de l'Ang II qui en sont affectées nécessite d'être étudiée.

12.2 L'Ang II et la voie ERK1/2

Les voies de signalisation associées aux MAPK ont été grandement étudiées pour leurs implications dans les différents processus physiologiques comme l'hyperplasie et l'hypertrophie cellulaire ainsi que dans l'activation des voies inflammatoires. L'Ang II permet d'activer de façon aiguë et chronique cette voie de signalisation impliquée dans les processus de remodelage vasculaire. En effet, nos études *in vitro* démontrent que la stimulation à l'Ang II, dans les CMLV dérivées d'artères de résistance d'origine mésentérique, permet d'activer la voie ERK1/2 dès les premières minutes. Ceci confirme

nos études antérieures faites sur ce même type de cellules (175,179). De plus, ces résultats vont dans le même sens que ceux obtenus par d'autres groupes qui ont évalué l'activation des ERK1/2 dans les CMLV aortiques (291,292). De façon similaire, chez le rat SD, une infusion chronique d'Ang II pendant une période de 7 jours augmente l'activité des ERK1/2 dans l'aorte. Cependant, l'activité de cette voie de signalisation par l'Ang II n'a pas été observée dans les artères mésentériques. Ces résultats démontrent la régulation différentielle de la voie ERK1/2 par l'Ang II entre une artère de conductance (l'aorte) et une artère de résistance (artère mésentérique) (schéma synthèse, figure V-1).

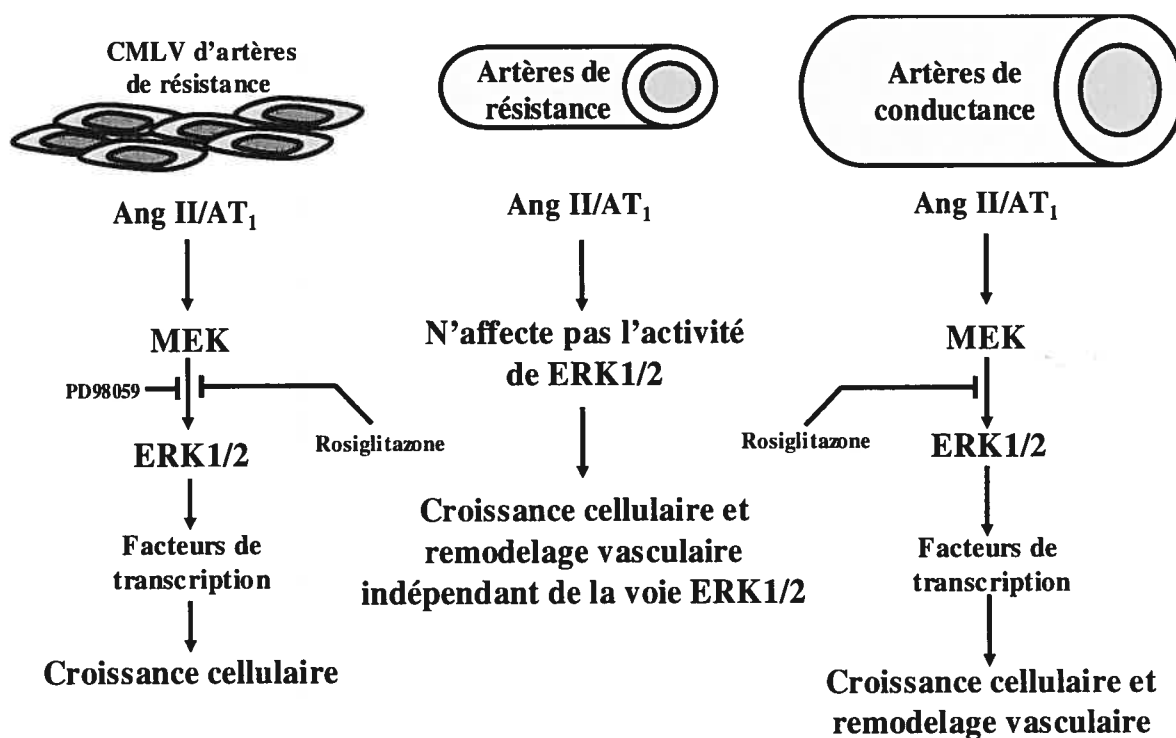


Figure V-1 : Schéma synthèse de nos études sur l'activation de la voie ERK1/2 par l'Ang II et son implication dans les processus menant à la croissance cellulaire et au remodelage vasculaire.

De plus, malgré le fait que les résultats obtenus *in vitro* (CMLV d'artères mésentériques) ne correspondent pas à ceux observés *in vivo* (artères mésentériques), en ce qui concerne la voie ERK1/2, il est juste de croire que la régulation et l'environnement tissulaire retrouvés *in vivo* permettent d'altérer les mécanismes activateurs de l'Ang II sur les CMLV. Dans ce contexte, il a été démontré que le tissu adipeux qui entoure les artères du territoire mésentérique, peut affecter de façon paracrine la fonction vasculaire (293). Ceci est particulièrement plausible si l'on considère que ce tissu contient beaucoup de récepteurs AT₁ (294). Par conséquent, l'activation de plusieurs voies de signalisation de l'Ang II a pu avoir lieu et ainsi permettre la synthèse de plusieurs molécules qui ont pu être libérées et agir de façon paracrine sur les CMLV. Hormis les effets activateurs paracrines des tissus avoisinants, d'autres facteurs stimulants permettent l'activation et/ou la potentialisation des effets de l'Ang II sur ces tissus. En effet, il a été démontré que la stimulation combinée d'Ang II et d'aldostérone sur des CMLV en culture active de façon importante la voie ERK1/2 (295). Cet effet synergique mitogénique de ces deux composantes du SRAA permet d'appuyer le fait que l'inhibition de ce système permettrait d'atténuer le remodelage vasculaire. À ce propos, une étude de notre laboratoire a démontré l'importance de l'aldostérone sur les mécanismes activateurs de l'Ang II sur le remodelage vasculaire. L'inhibition de l'aldostérone par la spironolactone (un antagoniste des récepteurs minéralocorticoïdes) diminue les effets hypertrophiants de l'Ang II dans l'aorte de rats infusés à l'Ang II pour une période de 14 jours (296). Cependant, cette étude ne mentionne pas si la voie des ERK1/2 est impliquée dans les processus menant au remodelage vasculaire dans ce modèle. Toutefois, il est clair que l'activation des voies des MAPK, spécialement celle des ERK1/2, est impliquée dans les processus stimulateurs de l'Ang II menant au remodelage vasculaire. Cela dit, malgré le fait que notre étude *in vivo* ne démontre pas d'alteration sur l'activité des ERK1/2 dans les artères de résistance après un traitement de sept jours à l'Ang II, il est possible d'imaginer qu'une période plus longue d'infusion à l'Ang II puisse altérer la phosphorylation de cette kinase.

12.3 Les activateurs de PPAR γ et la voie ERK1/2

Comme il a été mentionné précédemment, le SRAA est impliqué dans les mécanismes activateurs menant à la croissance cellulaire et au remodelage vasculaire. Nos études ainsi que celles d'autres chercheurs démontrent le rôle stimulateur de l'Ang II dans la croissance cellulaire retrouvée dans les artères mésentériques. En effet, une infusion aiguë d'Ang II pendant une période de 24 heures chez le rat SD induit dans ce tissu, ainsi que dans l'aorte, une augmentation de la synthèse protéique associée à une augmentation de l'activation de la voie ERK1/2 (297). Aussi, l'infusion chronique à l'Ang II pendant une période de sept jours chez le rat SD induit l'augmentation d'expression des protéines cdk4 et cycline D1 en plus d'une augmentation de la synthèse d'ADN (123). Ces événements ont été prévenus par le cotraitement à la rosiglitazone et la pioglitazone (123). Néanmoins, les cibles moléculaires sur lesquelles les activateurs de PPAR γ affectent la croissance cellulaire lors d'une stimulation à l'Ang II n'ont pas été identifiées. Nos études démontrent que la rosiglitazone inhibe les effets activateurs de l'Ang II sur la voie ERK1/2 dans l'aorte de rat SD mais non pas dans les artères mésentériques. De façon intéressante, cette étude démontre aussi que, dans l'aorte, le traitement à la rosiglitazone seule augmente l'activité des ERK1/2 sans en affecter l'expression. Cette réponse physiologique est en corrélation avec les études *in vitro* du Takeda et *coll.* Ceux-ci ont démontré qu'une stimulation aiguë à la PGJ2 ou avec différents TZD sur des CMLV aortiques induit une augmentation de la phosphorylation des ERK1/2. Aussi, l'activation de ces kinases semble être dépendante de la voie PI3K (298). Toutefois, nos études ne démontrent aucune variation d'activité de la protéine ERK1/2 dans les artères mésentériques de rats traités à la rosiglitazone seule. De façon intéressante, nos études *in vitro* appuient cette observation par le fait qu'un prétraitement à la rosiglitazone ou la PGJ2 pour une période de 24 heures n'a pas altéré l'activité des ERK1/2. Le fait que les TZD activent les ERK1/2 dans les CMLV aortiques, *in vitro* et *in vivo*, est en soi un résultat important qui se doit d'être discuté.

12.3.1 L'activation des MAPK par les agonistes des PPAR

Nous avons démontré, *in vivo* mais pas *in vitro*, qu'un traitement chronique à la rosiglitazone a permis d'augmenter l'activité de ERK1/2 dans l'aorte de rats SD. Malgré le fait que ces résultats semblent en opposition avec les effets inhibiteurs de la rosiglitazone sur la voie de signalisation des MAPK, certaines données démontrent l'effet activateur de ce TZD sur ces dernières. Effectivement, une accumulation de données démontre que les agonistes des PPAR ont des effets indépendants de l'activation directe des PPAR et permettent l'activation des protéines MAPK. (tableau V-1).

Ligand	Type cellulaire	MAPK activée	Références
PPARα			
DHA	CMLV mésentériques de rats	p38	(299)
Acide rétinoïque	Adipocytes de rats	ERK1/2, p38	(300)
Acide linoléique	CMLV aortiques de rats	ERK1/2	(301)
PPARγ			
15d-PGJ ₂	Cellules mésengiales humaine	ERK1/2, aucun effet sur p38 ou JNK	(302)
	Astrocytes de rats	ERK1/2, p38 et JNK	(303)
	CMLV aortiques de rats	ERK1/2	(298)
	CMLV mésentérique de rats	Aucun effet sur ERK1/2	*
Ciglitazone	Cellules mésengiales	Aucun effet	(302)
	Astrocytes de rats	ERK1/2, p38 et JNK	(303)
Troglitazone	CMLV aortiques de rats	ERK1/2	(298)
	HepG2 (cellules d'hépatocarcinome)	p38, JNK, aucun effet sur ERK1/2	(304)
	GN4 (cellules épithéliales de foie)	p38, ERK1/2, aucun effet sur JNK	(305)
Pioglitazone	Cœur de rats	ERK1/2	(306)
Rosiglitazone	Adipocytes de rats	ERK1/2, p38	(300)
	Astrocytes de rats	Aucun effet	(303)
	CMLV mésentériques de rats	Aucun effet sur ERK1/2	*

* figure II-3 de cette thèse.

Tableau V-1 : Activation des MAPK par certains ligands des PPAR dans différents types cellulaires.

Plusieurs évidences suggèrent que l'activation des PPAR et des MAPK, par certains activateurs des PPAR sont des événements distincts. Par exemple, tout en activant PPAR γ , la ciglitazone peut activer dans les astrocytes les MAPK (ERK1/2, p38 et JNK) mais la rosiglitazone, un agoniste structurellement similaire, ne parvient pas à induire la phosphorylation de ces kinases dans ce type cellulaire (303). Aussi, dans une lignée cellulaire dépourvue du gène PPAR α , la stimulation avec un agoniste spécifique de PPAR α stimule la synthèse de gènes de façon MAPK (ERK1/2 et p38) dépendante (307). Ainsi, dans nos études, il est raisonnable de croire que certains mécanismes spécifiques indépendants de PPAR γ ont pu être activés dans les cellules qui composent l'aorte et non pas dans celles qui composent les artères mésentériques. Cependant, peu d'information est disponible afin d'expliquer les mécanismes d'activation des MAPK par les activateurs des PPAR. Néanmoins, une étude a démontré que la troglitazone et la ciglitazone permettent d'augmenter la réponse au stress en augmentant la libération de Ca²⁺ en interagissant directement avec le réticulum endoplasmique de cellules souches embryonnaires (308). Ce type de réponse de stress est associé à l'activation des MAPK (JNK et p38). Il est clair que les agonistes de PPAR γ permettent d'induire la libération de Ca²⁺ dans ce type de cellules. Néanmoins, il reste à démontrer si l'activation dépendante des MAPK par les activateurs de PPAR γ nécessite l'implication du Ca²⁺. Dans un contexte se rapprochant de nos études, il est à noter que ce phénomène n'est peut-être pas retrouvé dans les CMLV d'artères de petit calibre qui sont impliquées dans l'HTA. En effet, dans les CMLV, la libération de Ca²⁺ favorise la contraction cellulaire et par conséquent, la contraction vasculaire. Nos études appuient des données déjà publiées qui démontrent que le traitement pendant sept jours avec différents TZD n'affecte pas la PA de rat (123). Néanmoins, il est aussi probable que les activateurs de PPAR γ puissent activer la libération de Ca²⁺ dans les CE et ainsi favoriser la libération du facteur hyperpolarisant dépendant de l'endothélium. Ceci aurait comme conséquence de favoriser la vasodilatation. Malgré tout, si l'activation des MAPK/Ca²⁺ par des agonistes de PPAR γ survenait dans les CMLV d'artères de résistances, les effets activateurs de ces derniers sur la contractilité cellulaire pourraient être diminués par la

libération d'agents vasodilatateurs de source endothéliale suite à l'activation de la voie MAPK/Ca²⁺ des CE. Ainsi, il y aurait un mécanisme régulateur contraction/vasodilatation entre ces deux types cellulaires soumis aux mêmes agonistes du récepteur PPAR γ . À la lumière de ces spéculations, il est possible que la somme de ces évènements représente, en partie, nos résultats obtenus sur la PA des rats étudiés. En effet, nos études démontrent que le traitement pendant sept jours avec différents TZD n'affecte pas la PA de rat. Cela dit, un autre mécanisme d'activation des MAPK par les ligands des PPAR γ a été proposé. En effet, Gardner *et coll.* ont démontré que des activateurs de PPAR γ permettent l'activation des ERK1/2 via la phosphorylation du récepteur EGFR. Leurs études ont démontré que l'activation du récepteur EGFR dépend de l'activation de Src et de DRO par les activateurs de PPAR γ (305). Ainsi, dans notre étude, ce type d'évènement pourrait aussi être retrouvé et ainsi expliquer l'augmentation d'activité des ERK1/2 dans l'aorte de rats SD chroniquement traités à la rosiglitazone. À la lumière de ces évidences, ils seraient cohérent de croire que les activateurs de PPAR γ puissent réguler la croissance et la migration cellulaire observée dans le remodelage vasculaire indépendamment de l'Ang II. Ceci relève toutefois de la spéculation, car aucune étude n'a démontré, *in vivo*, l'implication des activateurs de PPAR γ sur l'activation des ERK1/2 dans le remodelage vasculaire en absence du SRA. Néanmoins, chez le rat SD normotendu, le traitement avec des activateurs de PPAR γ n'altèrent pas la croissance cellulaire ou la synthèse de MEC d'artères mésentériques ou aortiques. Dans ce même modèle animal, l'activation de PPAR α dans le cœur ne semble pas favoriser le remodelage cardiaque, mais inhibe ce phénomène chez un rat infusé à l'Ang II (123,230). Cela dit, l'implication des activateurs de PPAR γ sur l'activation des MAPK est un domaine fort intéressant qui se doit d'être approfondi, considérant leur importance et leur utilisation dans le domaine clinique.

12.3.2 La régulation des PPAR par les MAPK

Un autre aspect important dans la régulation de la voie PPAR/MAPK est l'implication des MAPK dans la régulation de l'activité des PPAR. Nos données démontrent une diminution significative de l'activité de PPAR γ et une tendance de diminution d'expression de ce récepteur dans les artères mésentériques de rats infusés à l'Ang II pendant une période de sept jours. Néanmoins, dans notre étude, nous n'avons pas approfondi ce phénomène considérant notre hypothèse. Cela dit, plusieurs évidences démontrent l'importance des MAPK dans le contrôle de l'activité transcriptionnelle des PPAR. De façon intéressante, certaines études démontrent que l'activation des ERK1/2 et p38 permet de phosphoryler directement PPAR α et augmente, par conséquent, son activité transcriptionnelle (309,310). Ces mêmes MAPK ont l'effet inverse en diminuant l'activité transcriptionnelle de PPAR γ suite à la phosphorylation de ce récepteur (311,312). Ceci suggère que les activateurs des PPAR permettent l'activation directe des PPAR mais contribuent aussi à réguler indirectement l'activité de ces facteurs de transcription en activant les voies de certaines protéines kinases. Il est logique de croire, en se basant sur la section précédente, que ce type de régulation peut varier en fonction des agonistes des PPAR ainsi qu'en fonction des tissus cibles. Ce phénomène d'activation indirecte ne semble pas être limité aux PPAR car d'autres récepteurs nucléaires peuvent être régulés par les MAPK. Ceci est particulièrement vrai pour le récepteur aux œstrogènes (ER). En effet, une étude a démontré qu'en plus de son potentiel pour activer le récepteur ER, l'œstrogène permet d'activer la voie des MAPK et certains co-activateurs, amplifiant ainsi l'activité transcriptionnelle des récepteurs ER (313). Dans nos études, il est fort probable qu'une boucle d'activation/inhibition des PPAR se déroule suite à l'activation des MAPK par l'Ang II ou d'autres facteurs stimulants comme l'aldostérone et l'ET-1. Néanmoins, dans notre seconde étude, la baisse d'activité de PPAR γ par l'Ang II pourrait être une conséquence indépendante de la voie ERK1/2. Ceci est appuyé par le fait que l'activité des ERK1/2 a été inchangée dans les artères mésentériques de rats infusés à l'Ang II. Par

conséquent, il est possible que les voies MAPK/p38/JNK puissent être responsables de ces observations.

12.4 Les activateurs de PPAR γ et la voie de la PI3K

La voie de signalisation PI3K est une voie clé dans différents processus de régulation cellulaire. Plusieurs molécules comme l'Ang II, l'ET-1, l'insuline, le PDGF ou l'EGF, activent cette voie de signalisation dans plusieurs types cellulaires. Dans nos études, nous avons évalué les effets inhibiteurs d'activateurs de PPAR γ sur la voie PI3K/Akt stimulée par l'Ang II. Nos études *in vitro* corrélaient partiellement avec nos données obtenues *in vivo* en ce qui concerne l'activation de cette voie de signalisation par l'Ang II et son inhibition par un cotraitement avec des activateurs de PPAR γ . En effet, une stimulation aiguë ou chronique à l'Ang II favorise l'activation de la PI3K/Akt, le tout étant associée à une augmentation de la croissance cellulaire (schéma synthèse, figure V-2).

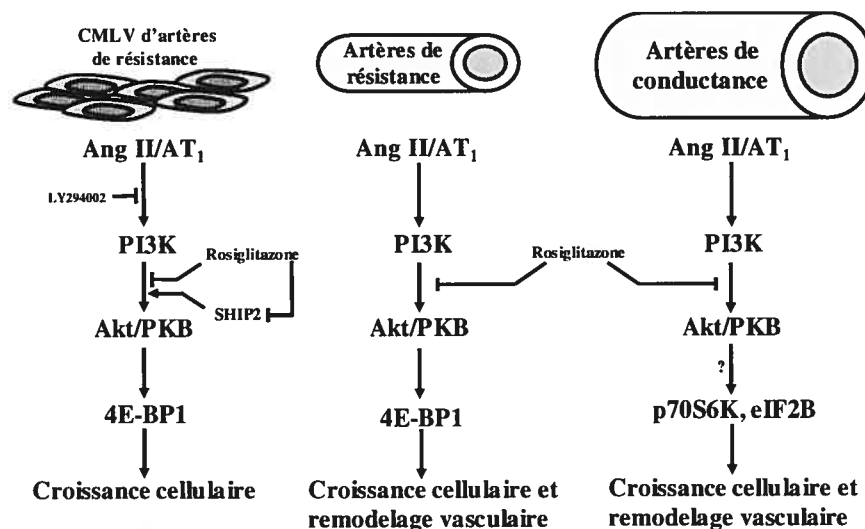


Figure V-2 : Schéma synthèse de nos études sur l'activation de la voie PI3K par l'Ang II et son implication dans les processus menant à la croissance cellulaire et au remodelage vasculaire.

Dans ces différentes études, la rosiglitazone a permis de prévenir l'activation de la voie PI3K par l'Ang II. Néanmoins, le traitement à la rosiglitazone seule a semblé avoir un potentiel activateur sur cette voie de signalisation. Effectivement, dans les artères mésentériques de rats traités à la rosiglitazone seule, une augmentation de la phosphorylation de cette protéine a été observée tandis que dans l'aorte, aucune variation n'a été détectée. Par contre, dans les CMLV d'origine mésentérique, la stimulation à la rosiglitazone n'a pas induit la phosphorylation d'Akt/PKB. Par conséquent, ce type de phénomène démontre encore une fois les mécanismes différentiels stimulateurs d'activateurs de PPAR γ en fonction du traitement et du type vasculaire. Ce phénomène activateur de TZD sur la voie de signalisation PI3K/Akt/PKB n'est pas nouveau. Une étude a effectivement démontré l'effet d'activateurs de PPAR γ (pioglitazone, troglitazone et 15d-PGJ2) sur l'activation de la PI3K/Akt/PKB dans les CMLV d'aortes en culture. Toutefois, cette étude *in vitro* réalisée par Takeda *et coll.* ne démontre pas les mêmes résultats que les nôtres (298). D'une part, dans notre étude *in vitro*, nous n'avons pas observé la phosphorylation d'Akt/PKB dans les CMLV dérivées d'artères mésentériques. Aussi, dans notre étude faite chez les rats traités uniquement à la rosiglitazone, aucune altération de la phosphorylation d'Akt/PKB n'a été observée dans l'aorte. D'autre part, nous avons observé une augmentation de celle-ci dans les artères mésentériques de ces mêmes rats. Avec les informations précédentes, nous pouvons tout d'abord mentionner que les TZD utilisés entre leur étude et la nôtre n'étaient pas les mêmes et que les temps de stimulation étaient aussi différents. Effectivement, Takeda *et coll.* ont stimulé leurs cellules sur une courte période de temps (15 minutes) et ont ensuite mesuré les effets des agonistes de PPAR γ sur l'activation d'Akt/PKB (298). Ainsi, il est inexacte d'affirmer, à partir de nos conditions *in vitro*, que les mécanismes stimulateurs des activateurs de PPAR γ ne puissent survenir. Il est probable qu'une stimulation rapide avec des TZD puisse activer la voie PI3K/Akt/PKB dans nos cellules. Mais le fait reste que dans notre étude, une stimulation de 24 heures avec des agonistes de PPAR γ (rosiglitazone et 15d-PGJ2) n'a pas affecté l'activation de la voie

PI3K/Akt/PKB. Par conséquent, nos études sont assez différentes de celles de Takeda *et coll.* À la lumière de ces informations, le tout suggère une régulation temporelle des agonistes de PPAR γ . Effectivement, il est probable que les protéines kinases (MAPK et Akt/PKB) puissent être régulées par des vagues d'activation. Ainsi, nous pouvons suggérer que dans notre étude sur des cellules en culture, le sommet d'activation de PPAR γ /Akt/PKB ait été franchit et, par conséquent, nous n'avons pas été en mesure d'observer une altération d'activité pour ces derniers. Cette hypothèse peut aussi s'appliquer pour l'activation d'Akt/PKB dans l'aorte. Toutefois, le tout n'explique pas l'activation d'Akt/PKB dans les artères mésentériques. Une explication raisonnable serait que les artères mésentériques aient une fonction différente de celle de l'aorte et que l'environnement tissulaire de ces vaisseaux soit également différent. Il est à noter que le gras mésentérique est une source riche en PPAR γ et que l'activation de ces derniers pourrait permettre la synthèse d'agents capables d'activer, de façon paracrine, la voie de signalisation PI3K des cellules qui composent les artères mésentériques.

12.5 Les activateurs de PPAR γ et la croissance cellulaire associée à la voie de la PI3K et des MAPK

Comme il a été mentionné tout au long de cette thèse, l'Ang II permet d'induire la croissance cellulaire en activant les voies de signalisation MAPK et PI3K. Dans notre étude, ce phénomène a été démontré par l'utilisation d'un inhibiteur spécifique de la MEK (PD98059) et un inhibiteur réversible de la sous-unité catalytique p110 de la PI3K (LY294002) (annexe, figures 2 et 3). Le tout nous a permis de démontrer le rôle majeur de la voie des ERK1/2 et PI3K dans la croissance de CMLV dérivés d'artères mésentériques. Ces études confirment des études antérieures réalisées dans notre laboratoire (179,314). En analysant ces études d'incorporation de thymidine tritiée, il est intéressant d'observer que l'inhibition de la voie des ERK1/2 ou celle de la PI3K, inhibe complètement la synthèse d'ADN dans les CMLV. Ce résultat nous permet de suggérer qu'une voie de signalisation

est en amont de l'autre. Ceci est appuyé par le fait qu'une étude, réalisée dans notre laboratoire, a démontré que l'inhibition de la PI3K dans des CMLV stimulées à l'Ang II, inhibe la phosphorylation des ERK1/2 (179). Par conséquent, il est possible que l'inhibition de la voie de signalisation de la PI3K par les activateurs de PPAR γ puisse atténuer l'activation de la voie ERK1/2. Appliquée à nos résultats, ce type d'hypothèse pourrait expliquer la régulation à la baisse de la voie ERK1/2 dans l'aorte. Le fait que ce phénomène ne soit pas observé dans les artères mésentériques, nous permet, encore une fois, de proposer une régulation différente des activateurs de PPAR γ et des voies de signalisation PI3K et MAPK dans l'aorte et les artères mésentériques. Nos études démontrent clairement que l'inhibition de ces voies de signalisation par des agonistes de PPAR γ est associée à une diminution de la croissance cellulaire stimulée par l'Ang II.

12.5.1 Les activateurs de PPAR γ , la croissance cellulaire et la protéine régulatrice 4E-BP1

La synthèse protéique est une étape majeure dans la régulation et la progression de la croissance cellulaire. Comme il a été mentionné, l'Ang II favorise la croissance cellulaire via l'activation de différentes voies de signalisation comme la voie MAPK ou PI3K. Nous avons aussi démontré un chevauchement de ces voies de signalisation (179). Celles-ci sont impliquées dans les processus de synthèse protéique (179,297,314). Entre autres, l'activation de ces protéines kinases permet de phosphoryler la protéine de ségrégation 4E-BP1 afin de libérer et d'activer le facteur d'initiation de la traduction eIF4E (196,315). L'activation de ce facteur d'initiation peut aussi être augmentée par différentes MAPK (p38, ERK1/2 et JNK) afin de stimuler la synthèse protéique (222). Nos études faites sur des CMLV d'artères mésentériques ont démontré l'importance de l'Ang II sur la phosphorylation de la protéine 4E-BP1 associée à la croissance cellulaire. De plus, une augmentation de la phosphorylation de 4E-BP1 a été observée dans les artères

mésentériques de rats infusés à l'Ang II pendant une période de sept jours. Toutefois, aucune variation n'a été observée dans l'aorte de ces mêmes rats. Malgré le fait que l'Ang II favorise la croissance cellulaire et le remodelage tissulaire de l'aorte, il est juste de mentionner que d'autres voies de synthèse protéique peuvent s'imposer. Il est probable que dans ce vaisseau, une voie de signalisation alternative comme celle de la p70S6K ou de l'eIF2E soit plus importante pour induire les processus de synthèse protéique et de croissance cellulaire. En effet, il a été démontré dans des cellules aortiques en culture, que les voies ERK1/2 et PI3K/Akt/PKB étaient nécessaires pour activer la protéine p70S6K impliquée dans la synthèse protéique (220). Ainsi, il est possible que dans les artères mésentériques de rats infusés à l'Ang II, le manque d'activité des ERK1/2 puisse affecter la synthèse protéique dépendante de la voie p70S6K et, par conséquent, stimuler principalement la voie 4E-BP1 qui n'est pas dépendante des ERK1/2. De plus, ceci permettrait aussi d'expliquer le faible niveau de phosphorylation de la 4E-BP1 dans l'aorte des rats infusés à l'Ang II. Effectivement, dans ce vaisseau, l'activité des voies ERK1/2 et PI3K est fortement induite. Le tout permettrait ainsi de stimuler majoritairement la voie p70S6K au détriment de celle associée à la 4E-BP1. L'utilisation d'un activateur de PPAR γ a démontré, dans nos études, son potentiel comme agent inhibiteur de la croissance cellulaire, en inhibant la protéine 4E-BP1 (schéma synthèse, figure V-3). Malgré le fait que ces nouveaux résultats permettent de suggérer différentes voies d'activation sur la croissance cellulaire, d'autres études seront nécessaires afin de décortiquer les composantes majeures dans ces processus vasculaires. Ceci est particulièrement vrai, si l'on considère le fait qu'aucune autre étude n'a démontré l'implication des activateurs de PPAR γ sur ces voies de signalisation.

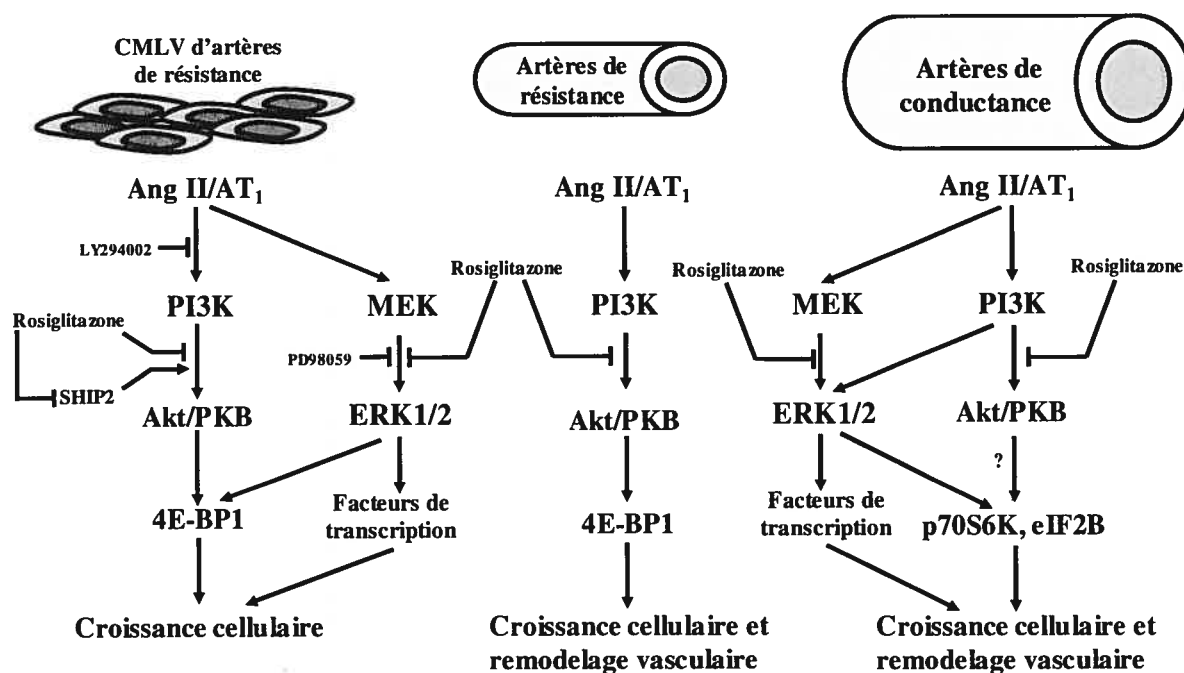


Figure V-3 : Schéma synthèse de nos études sur les effets inhibiteurs de PPAR γ sur l'activation des voies de signalisation des ERK1/2 et PI3K par l'Ang II dans la croissance cellulaire.

12.6 PPAR γ et la résistance à l'insuline dans l'HTA

En clinique, les TZD sont utilisés chez les patients diabétiques résistants à l'insuline afin d'augmenter leur sensibilité à celle-ci. Ces agents pharmacologiques, qui ne sont pas utilisés comme traitement pour corriger ou prévenir l'HTA, ont toutefois des effets bénéfiques autres qu'améliorer la réponse à l'insuline. En effet, les TZD ont plusieurs propriétés anti-inflammatoires (section 10.4) et permettent de diminuer la croissance cellulaire et le remodelage vasculaire observé dans l'HTA (123). Chez le rat insulino-résistant SHR, ainsi que chez des patients diabétiques de type 2, un remodelage hypertrophique important des artères de résistance est observé (316,317). L'utilisation

d'activateurs de PPAR γ chez ces sujets permettrait possiblement de diminuer ce remodelage vasculaire. Chez le rat DOCA-sel, nous avons démontré que le traitement à la rosiglitazone permet de prévenir le remodelage hypertrophique des artères de résistance. Néanmoins, les voies de signalisation par lesquelles la rosiglitazone induit ses effets inhibiteurs, dans ce modèle, n'ont pas été évaluées (280). Comme nous l'avons mentionné, la voie de signalisation PI3K/Akt/PKB est impliquée dans la croissance cellulaire et la synthèse de MEC retrouvée dans le remodelage tissulaire (318,319). De plus, cette voie de signalisation est aussi impliquée dans le métabolisme du glucose induit par l'insuline. Certaines études démontrent l'importance d'isoformes spécifiques d'Akt/PKB dans ces différents processus intracellulaires. Ces données ont été démontrées à partir de modèles de souris invalidés pour ces gènes. D'une part, certaines études ont démontré l'importance de l'isoforme Akt-1/PKB α dans la croissance cellulaire. Effectivement, des souris invalidées pour le gène d'Akt-1/PKB α sont phénotypiquement très petites avec une augmentation de l'apoptose cellulaire. Néanmoins, ces souris ont une tolérance normale au glucose et ne présentent aucune forme d'hyperinsulinémie ou d'hyperglycémie (320,321). D'autre part, des souris invalidées pour le gène d'Akt-2/PKB β ne présentent aucune anomalie de croissance, mais ont une résistance à l'insuline caractérisée par une hyperinsulinémie et une hyperglycémie (322). Ces évidences démontrent l'importance de ces différentes isoformes d'Akt/PKB dans la régulation cellulaire. Malheureusement, nos études ne discriminent pas les différentes isoformes d'Akt/PKB. Par conséquent, il est probable que l'Ang II puisse avoir des effets importants sur la régulation de ces isoformes. De façon spéculative, l'Ang II permettrait de stimuler l'activation d'Akt-1/PKB α impliquée dans la croissance cellulaire et d'inhiber l'activation d'Akt-2/PKB β qui est impliquée dans le métabolisme du glucose. Certaines études démontrent que l'activation des voies de signalisation de l'Ang II, médiée par le récepteur AT $_1$, favorise l'inhibition des voies de signalisation de l'insuline. En effet, l'activation du récepteur AT $_1$ permet de réguler le récepteur de l'insuline en favorisant la phosphorylation de ce dernier sur ses résidus sérines. Aussi, l'activation du récepteur AT $_1$ favorise la phosphorylation du substrat du récepteur de l'insuline (IRS-1) et de la

PI3K/p85 α sur leurs résidus sérines, empêchant ainsi leurs associations (323,324). L'Ang II permet d'inhiber la mobilisation du glucose en inhibant la synthèse et la translocation du transporteur GLUT4 (324). Mais aucune évidence précise ne démontre l'effet de l'Ang II sur la voie de signalisation du récepteur à l'insuline/IRS-1/Akt-2. Dans nos études, nous avons mesuré l'ensemble des isoformes d'Akt/PKB. Cependant, nos études *in vivo* et *in vitro* ne peuvent confirmer l'effet précis de l'Ang II sur l'activation ou l'inhibition des différentes protéines Akt/PKB. Néanmoins, l'Ang II semble stimuler la protéine Akt-1/PKB α dans les CMLV (325). Ceci suit l'idée que l'Ang II et la protéine Akt-1/PKB α soient impliquées dans les processus de croissance cellulaire. Dans nos études, le traitement à la rosiglitazone a diminué les effets activateurs de l'Ang II sur l'activité d'Akt/PKB. Il est probable que la rosiglitazone ait inhibé l'activation de la protéine Akt-1/PKB α par l'Ang II. Toutefois, dans notre étude *in vivo*, le traitement chronique à la rosiglitazone seule a augmenté l'activité d'Akt/PKB dans les artères mésentériques de rats SD. Ceci pourrait suggérer une augmentation de l'activité d'Akt-2/PKB β suite à une augmentation d'activité des voies de signalisation de l'insuline. En effet, le traitement à la rosiglitazone stimule la synthèse et l'activité du récepteur à l'insuline et du transporteur GLUT4 sans toutefois provoquer une hypoglycémie (326,327). Il serait probable que cette activation d'Akt-2/PKB β puisse être impliquée dans les processus de vasodilatation dépendante de l'endothélium. Malgré le fait que nos études ne discriminent pas les effets individuels des isoformes d'Akt/PKB, l'ensemble de ces données démontre l'importance de celles-ci dans la résistance à l'insuline et l'HTA. Toutefois, plusieurs études supplémentaires devront être réalisées afin de valider ces spéculations.

12.6.1 La phosphatase SHIP2 et la régulation de l'activité de l'Ang II

L'Ang II et l'insuline permettent l'activation de la voie PI3K/Akt/PKB qui joue un rôle important dans les processus cellulaires. En effet, ces deux peptides activent leurs

récepteurs et permettent de stimuler différentes voies de signalisation intracellulaire. Tel que mentionné, différentes isoformes d'Akt/PKB peuvent être impliquées dans différentes fonctions cellulaires. Néanmoins, les mécanismes moléculaires qui permettent d'activer spécifiquement ces différentes isoformes sont encore méconnus. L'un des rôles importants de la PI3K est de produire le $PI(3,4,5)P_3$ à partir du $PI(4,5)P_2$. Toutefois, la phosphatase SHIP2 permet de transformer le $PI(3,4,5)P_3$ en $PI(3,4)P_2$ et ainsi réguler leurs concentrations intracellulaire. De façon générale, ces phospholipides sont importants pour le recrutement et l'activation de la PDK et des différentes protéines Akt/PKB à la membrane cytoplasmique. Néanmoins, certaines études ont démontré que la principale source de phospholipide nécessaire pour l'activation de la protéine Akt-1/ $PKB\alpha$ est le produit de la SHIP2; le $PI(3,4)P_2$ (328,329). Dans nos études, nous avons démontré qu'une stimulation aiguë ou chronique à l'Ang II augmente la phosphorylation de résidus tyrosine de la SHIP2. Sans toutefois démontré l'activité directe de cette enzyme en mesurant son substrat, nous avons considéré la SHIP2 phosphorylée comme étant la forme active. Certaines évidences démontrent que la phosphorylation des résidus tyrosine de SHIP2 est associée à l'activation de cette dernière et est impliquée dans l'adhésion cellulaire, le remodelage du cytosquelette ainsi que dans la migration cellulaire (330). Cela dit, il est a priori possible que l'activation de SHIP2 ait augmenté la concentration de $PI(3,4)P_2$ à partir du $PI(3,4,5)P_3$. Ainsi, la stimulation à l'Ang II aurait permis de favoriser une grande production de $PI(3,4)P_2$ et d'augmenter l'activité d'Akt/PKB. D'une part, l'Ang II favoriserait l'augmentation de l'activité de la PI3K, ce qui permettrait d'augmenter la concentration en $PI(3,4,5)P_3$ et, d'autre part, l'Ang II favoriserait l'activation de la SHIP2 afin de transformer ce $PI(3,4,5)P_3$ en phospholipide nécessaire pour le recrutement et l'activation d'Akt-1/ $PKB\alpha$. Cela dit, nos résultats ont démontré que le prétraitement à la rosiglitazone a permis de prévenir l'activation de SHIP2 par l'Ang II dans les CMLV. Cependant, le cotraitement à la rosiglitazone chez les rats infusés à l'Ang II n'a pas atténué l'activité de SHIP2. Ces données nous permettent donc de suggérer un effet préventif aigu

de la rosiglitazone sur la phosphorylation de SHIP2 ainsi que sur la stimulation de la croissance cellulaire dans les CMLV (schéma synthèse, figure V-3).

Plusieurs études ont démontré l'implication de la SHIP2 dans le développement de la résistance à l'insuline. Une mutation dans ce gène contribue au développement du diabète de type 2 chez le rat et chez l'humain (331). Aussi, chez les souris hétérozygotes pour le gène de SHIP2, une augmentation de la clairance du glucose plasmatique est observée lorsque comparée à celle des souris de type sauvage. Cependant, les souris invalidées pour ce gène ont une hypersensibilité à l'insuline et meurent quelques heures après la naissance (332). Par conséquent, la régulation de cette phosphatase joue un rôle important sur les voies de signalisation de l'insuline et, plus spécifiquement, sur la voie PI3K/Akt/PKB. Cela dit, contrairement à la protéine Akt-1/PKB α qui est dépendante du PI(3,4)P₂, certaines données démontrent que l'activation de la protéine Akt-2/PKB β est dépendante du PI(3,4,5)P₃ plutôt que du PI(3,4)P₂ lors de stimulation à l'insuline (333). Par conséquent, nous pouvons suggérer une nouvelle voie de signalisation par laquelle l'Ang II pourrait induire ces effets inhibiteurs sur les voies de signalisation de l'insuline (schéma proposé, figure V-4). Tout d'abord, l'Ang II permettrait de favoriser la croissance cellulaire en stimulant Akt-1/PKB α par une augmentation de la production de PI(3,4)P₂ via l'activation de la PI3K et de la SHIP2, puis inhiberait le métabolisme du glucose en diminuant, entre autres, la concentration de PI(3,4,5)P₃ nécessaire pour l'activation de la protéine Akt-2/PKB β .

En résumé, les patients diabétiques de type 2 ont une prévalence plus élevée au développement de l'HTA. Chez ces patients, l'Ang II inhibe probablement l'effet vasodilatateur de l'insuline en affectant ses voies de signalisation, particulièrement la voie IRS-1/Akt-2/GLUT4. Cette voie de signalisation est principalement contrôlée par la SHIP2 et les phosphatidylinositols membranaires. Nos études ont démontré que l'Ang II peut affecter la protéine SHIP2 qui est impliquée dans la régulation de certains

phosphatidylinositols importants pour la régulation des kinases Akt/PKB. Aussi, nous avons démontré que la rosiglitazone peut inhiber les effets activateurs de l'Ang II sur la phosphatase SHIP2 dans les CMLV d'artères mésentériques. Malgré le fait que nous n'avons pas étudié les mécanismes précis, ces évidences proposent des cibles moléculaires intéressantes et importantes pour le développement d'agents permettant 1) de diminuer la croissance cellulaire observée dans le remodelage vasculaire et 2) de sensibiliser les voies de signalisation de l'insuline chez les patients diabétiques et hypertendus.

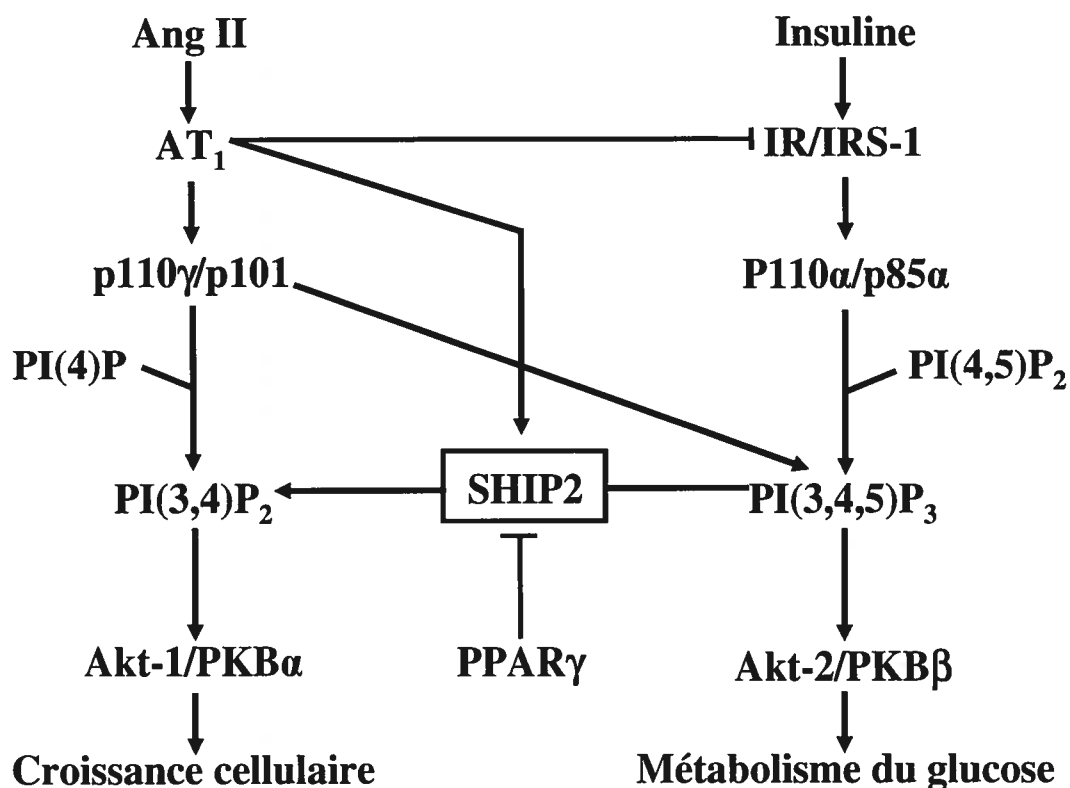


Figure V-4 : Effets régulateurs de l'Ang II, via les voies de signalisation PI3K/Akt, sur la croissance cellulaire et le métabolisme du glucose dans les CMLV.

12.7 PPAR γ dans le remodelage et l'inflammation cardiaque

L'une des conséquences importantes du remodelage des artères de résistance est l'augmentation d'événements cardiaques comme le remodelage et l'inflammation du cœur pouvant mener à la dysfonction et l'insuffisance cardiaque. Les patients diabétiques de type 2 ont une prévalence plus élevée de maladies cardiovasculaires. Ces patients développent généralement une hypertrophie du cœur pouvant mener à une dysfonction et à l'insuffisance cardiaque. En effet, les patients diabétiques résistants à l'insuline ont une prévalence trois à cinq fois plus importante que les patients non-diabétiques au développement d'insuffisance cardiaque (334). Malgré le fait que certaines études démontrent que les TZD peuvent avoir des effets néfastes sur le cœur (chapitre I, section 10.4), un nombre considérable de données démontre les effets positifs d'activateurs de PPAR γ sur le myocarde (254). Dans notre dernière étude, nous avons analysé, chez le rat SHRSP, les effets à long terme d'un traitement à la pioglitazone sur l'inflammation et le remodelage cardiaque. Plusieurs études démontrent que le SRAA est augmenté chez les rats SHRSP et que ce système joue un rôle important dans les processus menant à l'inflammation, au remodelage et à la dysfonction cardiaque (335,336). Nos données démontrent que le traitement prolongé à la pioglitazone permet de diminuer l'inflammation et l'hypertrophie du cœur chez les rats SHRSP.

12.7.1 Les activateurs de PPAR γ dans le remodelage cardiaque

Plusieurs processus sont impliqués dans le remodelage cardiaque. En plus de l'altération du contenu en MEC, de la croissance et de la différenciation cellulaire retrouvées dans le remodelage cardiaque, l'apoptose est aussi un mécanisme important menant aux modifications de l'architecture du cœur. Dans le cœur, les cardiomyocytes, qui sont des cellules différenciées, contribuent approximativement à 70% de la masse cardiaque

et représentent environ 30% du nombre total de cellules ventriculaires. Cependant, les fibroblastes cardiaques, pour leur part, représentent approximativement 70% du nombre total de cellules du cœur et ce nombre est augmenté lors de maladies cardiaques (337). Dans le cœur, le SRAA augmente la croissance des cardiomyocytes (hypertrophie cellulaire) et des fibroblastes (hyperplasie cellulaire) le tout étant associé à une augmentation de la fibrose (337). D'une part, notre étude démontre que le traitement à la pioglitazone a diminué la synthèse de collagène et d'autre part, qu'il a augmenté l'expression de la protéine pro-apoptotique Bax dans le cœur de rats SHRSP.

En premier lieu, la pioglitazone a permis d'inhiber la synthèse de collagène uniquement au niveau subépicardique des rats SHRSP. Tout d'abord, il faut mentionner que les cardiomyocytes expriment un niveau très faible de récepteurs PPAR γ (338). Cependant, notre groupe, ainsi que d'autres, a démontré l'expression importante de PPAR γ dans les fibroblastes et au niveau vasculaire (254,282). Aussi, il est important de mentionner que les vaisseaux coronaires sont en quantité plus abondante dans la tunique externe du cœur (l'épicarde) et moindre dans la tunique interne du cœur (endocarde) (12). Il est donc probable qu'une quantité plus importante de récepteurs PPAR γ se retrouve du côté épocardique du cœur plutôt que du côté endocardique du cœur. Ainsi, la partie épocardique aurait bénéficié significativement des effets protecteurs de l'activation de PPAR γ comparativement aux autres tuniques du cœur (schéma proposé, figure V-5). Nos données sont appuyées par celles de Tsuji *et coll.* qui ont démontré l'effet inhibiteur de la pioglitazone sur la synthèse de collagène et de DRO dans le cœur de rats diabétiques de type 2 lorsque comparé à leur contrôle (339). Dans le même ordre d'idées, les effets inhibiteurs de la pioglitazone sur la synthèse de collagène de type I ont aussi démontré dans les fibroblastes cardiaques. Effectivement, Chen *et coll.* ont démontré que la pioglitazone permet d'inhiber la synthèse de collagène et de MMP-1, dans les fibroblastes cardiaques, suite à une stimulation à l'Ang II (282). Il faut cependant noter que cette étude a été réalisée *in vitro* et qu'il est probable que chez l'animal, l'environnement cardiaque puisse jouer un

rôle important sur la réponse des fibroblastes cardiaques. Par conséquent, notre étude ne peut affirmer si la réduction de collagène observée est une conséquence directe de l'effet inhibiteur de la pioglitazone sur les fibroblastes cardiaques.

En second lieu, la pioglitazone a augmenté la synthèse de Bax dans le ventricule gauche du cœur des rats SHRSP, suggérant une augmentation de l'apoptose cellulaire. Comme nous l'avons mentionné, le SRAA induit la croissance des fibroblastes cardiaques et favorise le développement de l'hypertrophie du cœur. Par conséquent, l'activation de PPAR γ dans ce type cellulaire, aurait pu induire le processus d'apoptose, caractérisé par une augmentation de protéines Bax et ainsi, contrebalancer l'hypertrophie des cardiomyocytes observée dans les processus de remodelage cardiaque. Il est possible que l'augmentation de Bax soit due à l'apoptose des cellules inflammatoires retrouvées dans le cœur des rats SHRSP traités à la pioglitazone. En effet, il a été démontré que les cellules inflammatoires sont riches en récepteurs PPAR γ fonctionnels (340). En l'occurrence, il est probable que l'activation de PPAR γ dans ces cellules favorise l'apoptose de ces dernières; le tout étant caractérisé par une augmentation de l'expression de Bax. Ce type de raisonnement peut être appuyé par le fait que l'activation de PPAR α ou PPAR γ provoque l'apoptose des macrophages stimulés par le TNF α (341). Ainsi, les mécanismes inflammatoires jouent un rôle important dans les étapes qui mènent au remodelage vasculaire et cardiaque, le tout représentant des cibles intéressantes qui nécessitent d'être approfondies. Dans notre étude chez les rats SHRSP, le traitement à long terme à la pioglitazone aurait contrebalancé les effets stimulateurs du SRAA sur le remodelage cardiaque en inhibant la synthèse de collagène et en favorisant l'apoptose des fibroblastes cardiaques et des cellules inflammatoires.

12.7.2 Les activateurs de PPAR γ dans l'inflammation cardiaque

Comme nous l'avons précédemment mentionné, le SRAA favorise en plus de la croissance cellulaire, les processus inflammatoires. Dans notre étude, le traitement à long

terme à la pioglitazone a diminué, dans le cœur des rats SHRSP, plusieurs marqueurs inflammatoires comme les facteurs de transcriptions NFκB et AP-1, la cytokine TNFα, la protéine d'adhésion PECAM et la protéine inflammatoire COX-2. Malgré le fait que certaines données démontrent l'implication des MAPK et de la PI3K dans l'activation de ces voies inflammatoires, nous n'avons pas mesuré l'implication de celles-ci dans les processus inflammatoires dans le cœur des rats SHRSP. Il a été démontré que l'activation du facteur de transcription NFκB favorise l'hypertrophie ventriculaire et que son inhibition, par des co-activateurs de PPARγ, diminue ses effets trophiques dans le tissu cardiaque (342,343). Néanmoins, NFκB favorise aussi la transcription de plusieurs autres marqueurs inflammatoires comme les cytokines et les protéines d'adhésion. L'augmentation de ces marqueurs inflammatoires favorise, entre autres, le recrutement de cellules inflammatoires et l'infiltration de ces dernières à travers les vaisseaux coronaires (344). De plus, ces cellules favorisent la production de cytokines qui stimulent le recrutement d'autres cellules inflammatoires qui, à leur tour, permettent de stimuler la différenciation et la croissance des cellules vasculaires et cardiaques. Toutefois, le traitement à la pioglitazone a diminué l'activité du facteur de transcription NFκB et par conséquent, l'inhibition de certaines voies de signalisation impliquées dans l'inflammation et le remodelage du cœur. L'augmentation de la protéine d'adhésion PECAM, qui favorise l'attachement des plaquettes sanguines au niveau de l'endothélium, a aussi été inhibée par le traitement à la pioglitazone. Il est probable que cet événement soit une conséquence de l'inhibition des facteurs de transcription NFκB et AP-1. En effet, il a été rapporté qu'il existe un site de liaison fonctionnel pour NFκB dans le promoteur de PECAM (345). Par conséquent, ce raisonnement peut aussi s'appliquer pour les marqueurs inflammatoires COX-2 et TNFα (346,347). Dans le cœur normal, la cytokine pro-inflammatoire TNFα n'est pas constitutivement exprimée et l'augmentation d'expression de ce facteur peut se produire en réponse à différents troubles cardiaques (348,349). Plusieurs conséquences découlent de cette augmentation de TNFα. Effectivement, dans ces circonstances le TNFα active, via les voies MAPK ou PI3K/Akt, la protéine NFκB impliquée dans la transcription de gènes pro-

inflammatoires et de gènes impliqués dans la croissance cellulaire (350). De plus, le TNF α favorise le remodelage cardiaque en augmentant la synthèse de différents types de collagène (type I et III) et l'expression du récepteur AT $_1$ (350). Ainsi, nos données associées à celles d'autres laboratoires démontrent le rôle majeur de cette cytokine dans la progression du remodelage cardiaque. Étant donné la diminution d'expression du TNF α par un traitement prolongé à la pioglitazone chez les rats SHRSP, nous pouvons suggérer la pioglitazone comme un agent permettant de prévenir la progression d'évènements cardiaques. Cela dit, malgré une diminution de l'hypertrophie cardiaque chez les rats SHRSP, nos résultats ne démontrent aucune amélioration de la fonction cardiaque pendant le traitement prolongé à la pioglitazone. Toutefois, il est possible qu'un traitement plus long puisse permettre d'améliorer la fonction cardiaque chez ce modèle de rat diabétique développant une HTA sévère. En conclusion, nos résultats ont démontré les effets bénéfiques, pour le cœur, d'un traitement prolongé avec un agoniste de PPAR γ chez les rats SHRSP. Ainsi, ces données nous permettent de supposer que cet agent pourrait avoir des effets favorables chez des patients diabétiques reconnus pour avoir un risque élevé d'évènements cardiovasculaires comme l'HTA, les maladies coronariennes et les cardiomyopathies. Cette prévention serait basée sur le potentiel de la pioglitazone à inhiber la croissance cellulaire, l'inflammation et le remodelage cardiaque.

Zone endocardique :

- ↓ Nb de vaisseaux sanguins
- ↓ PPAR γ
- ↑ Cellules inflammatoires
- ↑ NF κ B, AP-1, PECAM, TNF α , COX-2
- ↑ Collagène
- ↑ Hypertrophie

Zone épicardique :

- ↑ Nb de vaisseaux sanguins
- ↑ PPAR γ
- ↑ Bax
- ↓ Cellules inflammatoires
- ↓ NF κ B, AP-1, PECAM, TNF α , COX-2
- ↓ Collagène
- ↓ Hypertrophie

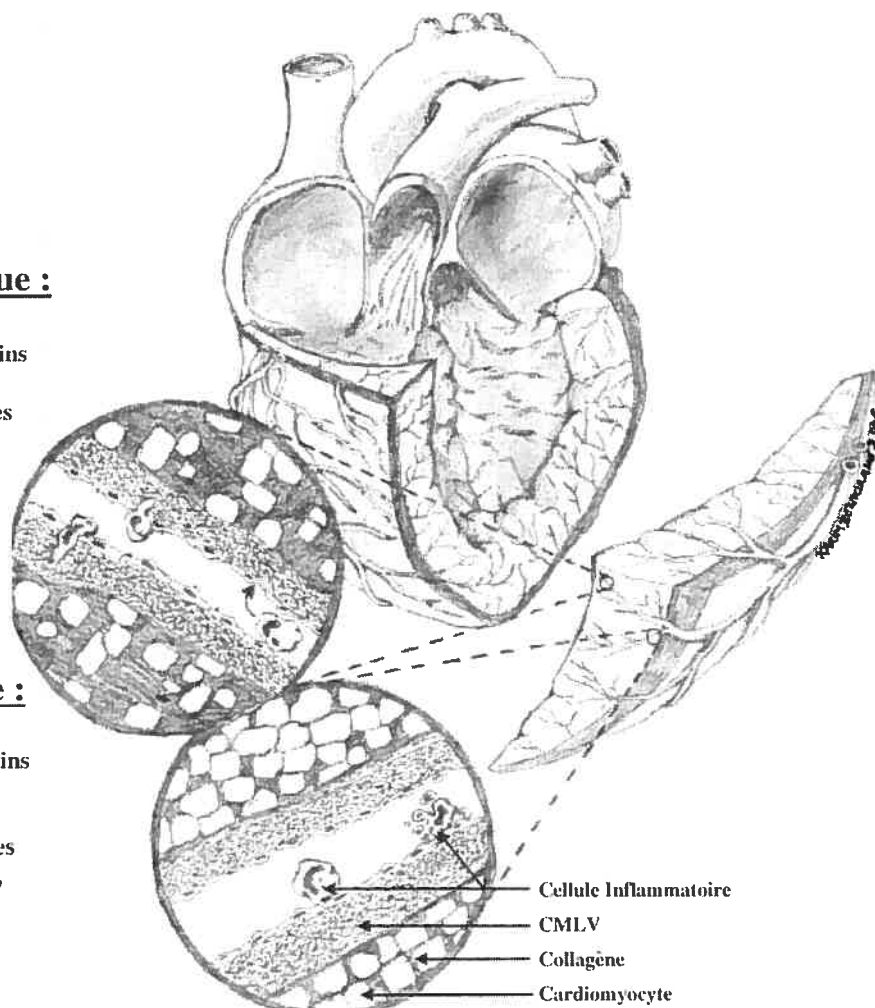


Figure V-5 : Schéma proposé représentant l'effet inhibiteur de PPAR γ sur le remodelage et l'inflammation cardiaque dans le cœur de rats SHRSP traités à long terme à la pioglitazone.

13. Conclusion

L'Ang II est considérée comme le principal agent actif peptidique du SRAA et elle joue un rôle majeur sur le système cardiovasculaire. Malgré le fait que ce peptide favorise l'augmentation de la PA, il régule aussi plusieurs mécanismes moléculaires comme l'accumulation de la MEC, l'inflammation, la migration, la croissance, l'apoptose et la différenciation cellulaire. De plus, l'Ang II joue un rôle important dans la résistance à l'insuline en inhibant les voies de signalisation de cette hormone. Ainsi, l'Ang II joue un rôle important dans les processus de remodelage vasculaire et cardiaque particulièrement chez les patients diabétiques de types 2 et les patients hypertendus. Les TZD, qui sont des activateurs de PPAR γ , sensibilisent les voies de signalisation de l'insuline. Nos résultats ont aussi démontré les effets bénéfiques de ces agonistes sur l'inhibition de certaines voies de signalisation de l'Ang II (PI3K et MAPK) dans différentes artères de rats SD. Suite à un traitement chronique de sept jours, la rosiglitazone a régulé à la baisse la voie de signalisation de la PI3K dans l'aorte et les artères mésentériques de rats infusés à l'Ang II. Néanmoins, cet activateur de PPAR γ a uniquement diminué les effets activateurs de l'Ang II sur la voie de signalisation ERK1/2 dans l'aorte. Aussi, la rosiglitazone a diminué la croissance cellulaire induite par l'Ang II dans les artères mésentériques. À partir de CMLV dérivée de ces artères, la stimulation chronique à l'Ang II favorise la croissance cellulaire, effet qui a été inhibé par un cotraitement avec des activateurs de PPAR γ . Plus précisément, cette augmentation de croissance cellulaire a été induite via les voies AT $_1$ /PI3K et AT $_1$ /ERK1/2. De plus, l'augmentation de l'activité de la 4E-BP1 (un marqueur de la croissance cellulaire), par la stimulation à l'Ang II, a été inhibée par le prétraitement à la rosiglitazone. Nos études ont aussi démontré l'implication de la phosphatase SHIP2 dans la cascade activatrice de l'Ang II, effet qui a pu être inhibée par un traitement aigu à la rosiglitazone dans les CMLV d'artères mésentériques. Cependant, lors d'un traitement chronique, la rosiglitazone n'a pas été en mesure d'altérer l'activité de la SHIP2 dans les artères de conductance et de résistance de rats infusés à l'Ang II (schéma synthèse, figure

V-3). Finalement, nous avons démontré que dans le cœur de rats génétiquement hypertendus et résistants à l'insuline (SHRSP), un traitement de longue durée à la pioglitazone a amélioré l'hypertrophie et diminué l'inflammation cardiaque. Malgré le fait que la pioglitazone a inhibé, d'une part, le dépôt de collagène dans l'épicarde du cœur et d'autre part, différents marqueurs inflammatoires (NF κ B, AP-1, TNF α , PECAM, COX-2), nous n'avons pas évalué les mécanismes moléculaires précis de cette régulation par la pioglitazone. De façon générale, malgré les effets inhibiteurs de PPAR γ dans nos conditions expérimentales, nous ne pouvons affirmer si les effets observés sont directement associés à une activation transcriptionnelle de PPAR γ ou à une interaction non génomique avec différentes protéines cellulaires. Aussi, il est possible que certaines des observations rapportées dans nos études soient associées à une interaction des agonistes de PPAR γ avec d'autres protéines cellulaires, phénomène ayant été rapporté par différents chercheurs. Aussi, Par conséquent, plusieurs autres études devront être établies afin de comprendre les mécanismes moléculaires par lesquels les activateurs de PPAR γ inhibent les effets activateurs de l'Ang II sur la croissance vasculaire et cardiaque, plus particulièrement chez les patients hypertendus et diabétiques résistants à l'insuline où les événements cardiovasculaires sont amplifiés.

14. Limites de nos études

Les études de notre laboratoire, ainsi que celles d'autres chercheurs, ont démontré des effets différents des activateurs de PPAR γ sur les voies de signalisation MAPK et PI3K. Certaines études ont démontré un rôle potentiel de ces agonistes sur l'induction d'évènements moléculaires qui sont indépendants du facteur de transcription PPAR γ . Dans nos études *in vivo*, nous avons observé des effets activateurs de la rosiglitazone sur les voies de signalisation ERK1/2 et PI3K. Cela dit, nous ne pouvons affirmer si ces effets sont dépendants ou indépendants de l'activation du récepteur PPAR γ . Une autre étape limitante

est le fait que dans nos études *in vitro*, les conditions expérimentales ne représentent pas les conditions physiologiques de nos études *in vivo*. En effet, la PA joue un rôle important dans l'induction d'évènements cardiovasculaire et ce paramètre physiologique n'est pas présent dans nos études *in vitro*. De plus, dans ces conditions expérimentales, l'organisation cellulaire dans les boîtes de Pétri est peu représentatif de ce qui est observé physiologiquement. L'utilisation d'une matrice sur gel dans ces boîtes de Pétri permettrait d'améliorer l'environnement spatial et, par conséquent, les conditions expérimentales. Aussi, une limite importante est le fait que différents facteurs stimulateurs comme l'ET-1, l'aldostérone, la vasopressine et les catécholamines sont présents dans nos études *in vivo*, mais ne le sont pas dans celles *in vitro*. Cette limite expérimentale est importante du fait que l'activation de différentes voies de signalisation par ces multiples activateurs permet d'altérer de façon importante la fonction cellulaire. Finalement, un aspect important est le fait que les concentrations des activateurs utilisés dans les études *in vitro* ne correspondent pas à celles observées physiologiquement chez le rat. Par conséquent, il est probable que certains résultats observés *in vitro* ne représentent pas intégralement ce qui se déroule dans un modèle animal. Cela dit, il est incontestable que pour répondre aux hypothèses proposées, une approche réductionniste est nécessaire. Il est donc inévitable que plusieurs contraintes expérimentales puissent intervenir.

15. Perspectives

Les activateurs de PPAR jouent un rôle important dans la régulation des gènes du système cardiovasculaire. Ceci est confirmé par le fait qu'ils permettent de réguler le métabolisme des lipides et du glucose, ils contrôlent la croissance cellulaire de plusieurs tissus (adipeux, vasculaires, cardiaques), ainsi que de réguler les mécanismes inflammatoires et les fonctions vasculaires et cardiaques. Ces différents effets sont associés à une activation directe des récepteurs PPAR et indirects, en régulant différentes voies de signalisation intracellulaire comme la voie PI3K et MAPK. Malgré le fait que les agonistes

des PPAR semblent jouer un rôle important dans l'activation de ces différentes kinases, peu d'études ont examiné les mécanismes activateurs non génomiques de ces protéines kinases par les activateurs de PPAR. Nos études démontrent l'activation de ces voies de signalisation lors de stimulations par des activateurs de PPAR γ . Par conséquent, des études plus approfondies devront être réalisées afin de décortiquer les effets activateurs directs sur PPAR γ et indirects, sur les voies PI3K et MAPK dans les artères de résistance et de conductance. À ceci devront s'ajouter des études mécanistiques sur les CMLV en culture. Dans ces conditions, différentes techniques s'offrent à nous : l'évaluation de l'activité transcriptionnelle de PPAR γ par l'intermédiaire de gènes rapporteurs, l'inhibition de l'expression de PPAR γ à l'aide de siRNA (*small interfering RNA*) ou bien par l'expression de dominants négatifs pour le gène de PPAR γ . Aussi, nous pourrions utiliser un système Cre/Lox afin d'invalider spécifiquement, dans un tissu, l'expression du gène PPAR γ .

Nos données ont démontré l'implication de l'Ang II dans le contrôle de l'activité de la phosphatase SHIP2, celle-ci étant impliquée dans le développement de la résistance à l'insuline et dans la dysfonction du métabolisme du glucose. Néanmoins, nous n'avons pas démontré les mécanismes menant à l'activation de SHIP2 par l'Ang II et son inhibition par des activateurs de PPAR γ . Étant donné qu'aucun inhibiteur sélectif de SHIP2 n'est disponible, l'inhibition de cette phosphatase par des techniques de siRNA ou de dominant négatif permettra de démontrer, si le cas s'applique, son implication dans la croissance cellulaire. Aussi, des études plus approfondies sur la régulation des différentes isoformes d'Akt/PKB par l'Ang II et les activateurs de PPAR γ devront être effectuées. Ceci nous permettra de démontrer l'implication de ces différentes isoformes dans la croissance cellulaire retrouvée dans le remodelage vasculaire.

Le traitement à long terme à la pioglitazone chez les rats SHRSP nous a démontré le potentiel de cet activateur comme agent anti-inflammatoire et comme inhibiteur du

remodelage cardiaque. Néanmoins, certaines données démontrent le faible niveau d'expression de PPAR γ dans les cellules cardiaques. Par conséquent, des études approfondies sur les mécanismes inhibiteurs de PPAR γ dans le cœur se doivent d'être établies. Finalement, afin de déterminer si les PPAR γ de source coronarienne sont impliqués dans les effets cardiobénéfiques observés chez les rats SHRSP, nous pourrions utiliser une approche par siRNA *in vivo* afin d'invalider spécifiquement, dans les vaisseaux coronariens, l'expression du gène PPAR γ . Ainsi, ce type de modèle expérimental nous permettra d'évaluer lors de traitement à long terme, l'implication directe ou indirecte des activateurs de PPAR γ ainsi que l'implication de ce facteur de transcription dans le cœur de rats exhibant une hypertension sévère.

Bibliographie

1. Boguski MS: Biosequence exegesis. *Science* 286:453-455, 1999
2. Bremner AD: Antihypertensive medication and quality of life--silent treatment of a silent killer? *Cardiovasc Drugs Ther* 16:353-364, 2002
3. Ambler SK, Brown RD: Genetic determinants of blood pressure regulation. *J Cardiovasc Nurs* 13:59-77, 1999
4. Staessen JA, Wang J, Bianchi G, Birkenhager WH: Essential hypertension. *Lancet* 361:1629-1641, 2003
5. Lillie-Blanton M, Parsons PE, Gayle H, Dievler A: Racial differences in health: not just black and white, but shades of gray. *Annu Rev Public Health* 17:411-448, 1996
6. Hall WD: Resistant hypertension, secondary hypertension, and hypertensive crises. *Cardiol Clin* 20:281-289, 2002
7. Fischer T, Schobel HP, Frank H, Andreae M, Schneider KT, Heusser K: Pregnancy-induced sympathetic overactivity: a precursor of preeclampsia. *Eur J Clin Invest* 34:443-448, 2004
8. Whitworth JA: 2003 World Health Organization (WHO)/International Society of Hypertension (ISH) statement on management of hypertension. *J Hypertens* 21:1983-1992, 2003
9. Davis MJ, Ferrer PN, Gore RW: Vascular anatomy and hydrostatic pressure profile in the hamster cheek pouch. *Am J Physiol* 250:H291-H303, 1986
10. Schiffrin EL: Vascular changes in hypertension in response to drug treatment: Effects of angiotensin receptor blockers. *Can J Cardiol* 18 (Suppl A):15A-18A, 2002
11. Schiffrin EL: Reactivity of small blood vessels in hypertension: relation with structural changes. State of the art lecture. *Hypertension* 19 (Suppl 2):II1-II9, 1992
12. Guyton AC, Hall JE: *Textbook of Medical Physiology*. Saunders 11th edition, 2005
13. Baumbach GL, Heistad DD: Remodeling of cerebral arterioles in chronic hypertension. *Hypertension* 13:968-972, 1989

14. Mulvany MJ: A reduced elastic modulus of vascular wall components in hypertension? *Hypertension* 20:7-9, 1992
15. Heagerty AM, Aalkjaer C, Bund SJ, Korsgaard N, Mulvany MJ: Small artery structure in hypertension. Dual processes of remodeling and growth. *Hypertension* 21:391-397, 1993
16. Mulvany MJ, Baumbach GL, Aalkjaer C, Heagerty AM, Korsgaard N, Schiffrin EL, Heistad DD: Vascular remodeling. *Hypertension* 28:505-506, 1996
17. Schiffrin EL: Endothelin: role in experimental hypertension. *J Cardiovasc Pharmacol* 35 (Suppl 2):S33-S35, 2000
18. Rossi GP, Cavallin M, Belloni AS, Mazzocchi G, Nussdorfer GG, Pessina AC, Sartore S: Aortic smooth muscle cell phenotypic modulation and fibrillar collagen deposition in angiotensin II-dependent hypertension. *Cardiovasc Res* 55:178-189, 2002
19. Touyz RM, He G, El Mabrouk M, Schiffrin EL: p38 Map kinase regulates vascular smooth muscle cell collagen synthesis by angiotensin II in SHR but not in WKY. *Hypertension* 37:574-580, 2001
20. Bakker EN, Buus CL, VanBavel E, Mulvany MJ: Activation of resistance arteries with endothelin-1: from vasoconstriction to functional adaptation and remodeling. *J Vasc Res* 41:174-182, 2004
21. Brassard P, Amiri F, Schiffrin EL: Combined angiotensin II type 1 and type 2 receptor blockade on vascular remodeling and matrix metalloproteinases in resistance arteries. *Hypertension* 46:598-606, 2005
22. Schiffrin EL: Remodeling of resistance arteries in human hypertension: effects of cilazapril, an angiotensin-I-converting enzyme inhibitor. *Cardiology* 86 (Suppl 1):S16-S22, 1995
23. Erami C, Zhang H, Tanoue A, Tsujimoto G, Thomas SA, Faber JE: Adrenergic catecholamine trophic activity contributes to flow-mediated arterial remodeling. *Am J Physiol* 289:H744-H753, 2005
24. Intengan HD, Schiffrin EL: Vascular remodeling in hypertension: roles of apoptosis, inflammation, and fibrosis. *Hypertension* 38:581-587, 2001
25. Goldblatt H, Lynch J, Hanzal R, Summerville WW: Studies on experimental hypertension: The production of persistent elevation of systolic blood pressure by means of renal ischemia. *J Exp Med* 59:347-379, 1934

26. Bergamini TM, Bernard JD, Mavroudis C, Backer CL, Muster AJ, Richardson JD: Coarctation of the abdominal aorta. *Ann Vasc Surg* 9:352-356, 1995
27. Streeten DH, Anderson GH: Secondary hypertension. An overview of its causes and management. *Drugs* 43:805-819, 1992
28. Schiffrin EL, Touyz RM: From bedside to bench to bedside: role of renin-angiotensin-aldosterone system in remodeling of resistance arteries in hypertension. *Am J Physiol* 287:H435-H446, 2004
29. Dobrian AD, Schriver SD, Prewitt RL: Role of angiotensin II and free radicals in blood pressure regulation in a rat model of renal hypertension. *Hypertension* 38:361-366, 2001
30. Murphy WR, Coleman TG, Smith TL, Stanek KA: Effects of graded renal artery constriction on blood pressure, renal artery pressure, and plasma renin activity in Goldblatt hypertension. *Hypertension* 6:68-74, 1984
31. Korsgaard N, Mulvany MJ: Cellular hypertrophy in mesenteric resistance vessels from renal hypertensive rats. *Hypertension* 12:162-167, 1988
32. Lever AF, Lyall F, Morton JJ, Folkow B: Angiotensin II, vascular structure and blood pressure. *Kidney Int* 37 (Suppl):S51-S55, 1992
33. Li JS, Touyz RM, Schiffrin EL: Effects of AT₁ and AT₂ angiotensin receptor antagonists in angiotensin II-infused rats. *Hypertension* 31:487-492, 1998
34. Levy BI, Benessiano J, Henrion D, Caputo L, Heymes C, Duriez M, Poitevin P, Samuel JL: Chronic blockade of AT₂-subtype receptors prevents the effect of angiotensin II on the rat vascular structure. *J Clin Invest* 98:418-425, 1996
35. Edgley A, Kett M, Anderson W: 'Slow pressor' hypertension from low-dose chronic angiotensin II infusion. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 28:1035-1039, 2001
36. Iglarz M, Touyz RM, Viel EC, Paradis P, Amiri F, Diep QN, Schiffrin EL: Peroxisome proliferator-activated receptor- α and receptor- γ activators prevent cardiac fibrosis in mineralocorticoid-dependent hypertension. *Hypertension* 42:737-743, 2003
37. Lawler JE, Sanders BJ, Chen YF, Nagahama S, Oparil S: Hypertension produced by a high sodium diet in the borderline hypertensive rat (BHR). *Clin Exp Hypertens A* 9:1713-1731, 1987

38. Lariviere R, Thibault G, Schiffrin EL: Increased endothelin-1 content in blood vessels of deoxycorticosterone acetate-salt hypertensive but not in spontaneously hypertensive rats. *Hypertension* 21:294-300, 1993
39. Pinto YM, Paul M, Ganten D: Lessons from rat models of hypertension: from Goldblatt to genetic engineering. *Cardiovasc Res* 39:77-88, 1998
40. Larouche I, Schiffrin EL: Cardiac microvasculature in DOCA-salt hypertensive rats: effect of endothelin ET_A receptor antagonism. *Hypertension* 34:795-801, 1999
41. Ammarguella F, Larouche I, Schiffrin EL: Myocardial fibrosis in DOCA-salt hypertensive rats: effect of endothelin ET_A receptor antagonism. *Circulation* 103:319-324, 2001
42. Schiffrin EL, Lariviere R, Li JS, Sventek P: Enhanced expression of the endothelin-1 gene in blood vessels of DOCA-salt hypertensive rats: correlation with vascular structure. *J Vasc Res* 33:235-248, 1996
43. Dahl LK, Heine M, Tassinari L: Effects of chronic excess salt ingestion. Further demonstration that genetic factors influence the development of hypertension: evidence from experimental hypertension due to cortisone and to adrenal regeneration. *J Exp Med* 122:533-545, 1965
44. Saruta T: Mechanism of glucocorticoid-induced hypertension. *Hypertens Res* 19:1-8, 1996
45. Skrabal F, Hamberger L, Ledochowski M: Inherited salt sensitivity in normotensive humans as a cause of essential hypertension: a new concept. *J Cardiovasc Pharmacol* 6 (Suppl 1):S215-S223, 1984
46. Dahl LK: Salt and hypertension. *Am J Clin Nutr* 25:231-244, 1972
47. Kobayashi N, Higashi T, Hara K, Shirataki H, Matsuoka H: Effects of imidapril on NOS expression and myocardial remodelling in failing heart of Dahl salt-sensitive hypertensive rats. *Cardiovasc Res* 44:518-526, 1999
48. Zeng ZH, Luo BH, Gao YJ, Su CJ, He CC, Yi JJ, Li N, Lee RM: Control of vascular changes by renin-angiotensin-aldosterone system in salt-sensitive hypertension. *Eur J Pharmacol* 503:129-133, 2004
49. Intengan HD, Schiffrin EL: Mechanical properties of mesenteric resistance arteries from Dahl salt-resistant and salt-sensitive rats: role of endothelin-1. *J Hypertens* 16:1907-1912, 1998

50. Hwang IS, Ho H, Hoffman BB, Reaven GM: Fructose-induced insulin resistance and hypertension in rats. *Hypertension* 10:512-516, 1987
51. Cosenzi A, Bernobich E, Bonavita M, Bertola G, Trevisan R, Bellini G: Antihypertensive treatment with enrasentan (SB217242) in an animal model of hypertension and hyperinsulinemia. *J Cardiovasc Pharmacol* 39:488-495, 2002
52. Catena C, Giacchetti G, Novello M, Colussi G, Cavarape A, Sechi LA: Cellular mechanisms of insulin resistance in rats with fructose-induced hypertension. *Am J Hypertens* 16:973-978, 2003
53. Pamies-Andreu E, Fiksen-Olsen M, Rizza RA, Romero JC: High-fructose feeding elicits insulin resistance without hypertension in normal mongrel dogs. *Am J Hypertens* 8:732-738, 1995
54. OKAMOTO K, AOKI K: Development of a strain of spontaneously hypertensive rats. *Jpn Circ J* 27:282-293, 1963
55. OKAMOTO K, Yamamoto K, Morita N, Ohta Y, Chikugo T, Higashizawa T, Suzuki T: Establishment and use of the M strain of stroke-prone spontaneously hypertensive rat. *J Hypertens* 4 (Suppl):S21-S24, 1986
56. Sharifi AM, Li JS, Endemann D, Schiffrin EL: Effects of enalapril and amlodipine on small-artery structure and composition, and on endothelial dysfunction in spontaneously hypertensive rats. *J Hypertens* 16:457-466, 1998
57. Rizzoni D, Porteri E, Bettoni G, Piccoli A, Castellano M, Muiesan ML, Pasini G, Guelfi D, Rosei EA: Effects of candesartan cilexetil and enalapril on structural alterations and endothelial function in small resistance arteries of spontaneously hypertensive rats. *J Cardiovasc Pharmacol* 32:798-806, 1998
58. Intengan HD, Thibault G, Li JS, Schiffrin EL: Resistance artery mechanics, structure, and extracellular components in spontaneously hypertensive rats: effects of angiotensin receptor antagonism and converting enzyme inhibition. *Circulation* 100:2267-2275, 1999
59. Kyselovic J, Morel N, Wibo M, Godfraind T: Prevention of salt-dependent cardiac remodeling and enhanced gene expression in stroke-prone hypertensive rats by the long-acting calcium channel blocker lacidipine. *J Hypertens* 16:1515-1522, 1998
60. Wang H, Smeda JS, Lee RM: Prevention of stroke and preservation of the functions of cerebral arteries by treatment with perindopril in stroke-prone spontaneously hypertensive rats. *Can J Physiol Pharmacol* 76:26-34, 1998

61. Keuneke C, Yacullo R, Sugiura M, Mall G, Metzger R, Ganten D: Converting enzyme inhibitors differentially affect expression of genes of the renin-angiotensin system. *Clin Exp Hypertens* 17:551-574, 1995
62. Intengan HD, Schiffrin EL: Vasopeptidase inhibition has potent effects on blood pressure and resistance arteries in stroke-prone spontaneously hypertensive rats. *Hypertension* 35:1221-1225, 2000
63. Pu Q, Schiffrin EL: Effect of ACE/NEP inhibition on cardiac and vascular collagen in stroke-prone spontaneously hypertensive rats. *Am J Hypertens* 14:1067-1072, 2001
64. Camargo MJ, von Lutterotti N, Campbell WG, Jr., Pecker MS, James GD, Timmermans PB, Laragh JH: Control of blood pressure and end-organ damage in maturing salt-loaded stroke-prone spontaneously hypertensive rats by oral angiotensin II receptor blockade. *J Hypertens* 11:31-40, 1993
65. Abrahamsen CT, Barone FC, Campbell WG, Jr., Nelson AH, Contino LC, Pullen MA, Grygielko ET, Edwards RM, Laping NJ, Brooks DP: The angiotensin type 1 receptor antagonist, eprosartan, attenuates the progression of renal disease in spontaneously hypertensive stroke-prone rats with accelerated hypertension. *J Pharmacol Exp Ther* 301:21-28, 2002
66. Sharifi AM, He G, Touyz RM, Schiffrin EL: Vascular endothelin-1 expression and effect of an endothelin ET_A antagonist on structure and function of small arteries from stroke-prone spontaneously hypertensive rats. *J Cardiovasc Pharmacol* 31 (Suppl 1):S309-S312, 1998
67. Chillon JM, Heistad DD, Baumbach GL: Effects of endothelin receptor inhibition on cerebral arterioles in hypertensive rats. *Hypertension* 27:794-798, 1996
68. Stasch JP, Hirth-Dietrich C, Frobel K, Wegner M: Prolonged endothelin blockade prevents hypertension and cardiac hypertrophy in stroke-prone spontaneously hypertensive rats. *Am J Hypertens* 8:1128-1134, 1995
69. Touyz RM, Turgeon A, Schiffrin EL: Endothelin-A-receptor blockade improves renal function and doubles the lifespan of stroke-prone spontaneously hypertensive rats. *J Cardiovasc Pharmacol* 36 (Suppl 1):S300-S304, 2000
70. Vincent M, Cartier R, Privat P, Benzoni D, Samani NJ, Sassard J: Major cardiovascular risk factors in Lyon hypertensive rats. A correlation analysis in a segregating population. *J Hypertens* 14:469-474, 1996

71. Alonso-Galicia M, Brands MW, Zappe DH, Hall JE: Hypertension in obese Zucker rats. Role of angiotensin II and adrenergic activity. *Hypertension* 28:1047-1054, 1996
72. Imai G, Satoh T, Kumai T, Murao M, Tsuchida H, Shima Y, Ogimoto G, Fujino T, Kobayashi S, Kimura K: Hypertension accelerates diabetic nephropathy in Wistar fatty rats, a model of type 2 diabetes mellitus, via mitogen-activated protein kinase cascades and transforming growth factor-beta1. *Hypertens Res* 26:339-347, 2003
73. da Silva AA, Kuo JJ, Tallam LS, Hall JE: Role of endothelin-1 in blood pressure regulation in a rat model of visceral obesity and hypertension. *Hypertension* 43:383-387, 2004
74. Herrera VL, Shen L, Lopez LV, Didishvili T, Zhang YX, Ruiz-Opazo N: Chlamydia pneumoniae accelerates coronary artery disease progression in transgenic hyperlipidemia-genetic hypertension rat model. *Mol Med* 9:135-142, 2003
75. Kambara A, Holycross BJ, Wung P, Schanbacher B, Ghosh S, McCune SA, Bauer JA, Kwiatkowski P: Combined effects of low-dose oral spironolactone and captopril therapy in a rat model of spontaneous hypertension and heart failure. *J Cardiovasc Pharmacol* 41:830-837, 2003
76. Brown DM, Provoost AP, Daly MJ, Lander ES, Jacob HJ: Renal disease susceptibility and hypertension are under independent genetic control in the fawn-hooded rat. *Nat Genet* 12:44-51, 1996
77. Lifton RP, Gharavi AG, Geller DS: Molecular mechanisms of human hypertension. *Cell* 104:545-556, 2001
78. Kimura S, Mullins JJ, Bunnemann B, Metzger R, Hilgenfeldt U, Zimmermann F, Jacob H, Fuxe K, Ganten D, Kaling M: High blood pressure in transgenic mice carrying the rat angiotensinogen gene. *EMBO J* 11:821-827, 1992
79. Ohkubo H, Kawakami H, Kakehi Y, Takumi T, Arai H, Yokota Y, Iwai M, Tanabe Y, Masu M, Hata J, .: Generation of transgenic mice with elevated blood pressure by introduction of the rat renin and angiotensinogen genes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87:5153-5157, 1990
80. Kim HS, Krege JH, Kluckman KD, Hagan JR, Hodgins JB, Best CF, Jennette JC, Coffman TM, Maeda N, Smithies O: Genetic control of blood pressure and the angiotensinogen locus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92:2735-2739, 1995

81. Krege JH, John SW, Langenbach LL, Hodgin JB, Hagaman JR, Bachman ES, Jennette JC, O'Brien DA, Smithies O: Male-female differences in fertility and blood pressure in ACE-deficient mice. *Nature* 375:146-148, 1995
82. Yanai K, Saito T, Kakinuma Y, Kon Y, Hirota K, Taniguchi-Yanai K, Nishijo N, Shigematsu Y, Horiguchi H, Kasuya Y, Sugiyama F, Yagami K, Murakami K, Fukamizu A: Renin-dependent cardiovascular functions and renin-independent blood-brain barrier functions revealed by renin-deficient mice. *J Biol Chem* 275:5-8, 2000
83. Cervenka L, Horacek V, Vaneckova I, Hubacek JA, Oliverio MI, Coffman TM, Navar LG: Essential role of AT_{1A} receptor in the development of 2K1C hypertension. *Hypertension* 40:735-741, 2002
84. Lajemi M, Labat C, Gautier S, Lacolley P, Safar M, Asmar R, Cambien F, Benetos A: Angiotensin II type 1 receptor-153A/G and 1166A/C gene polymorphisms and increase in aortic stiffness with age in hypertensive subjects. *J Hypertens* 19:407-413, 2001
85. van Geel PP, Pinto YM, Voors AA, Buikema H, Oosterga M, Crijns HJ, van Gilst WH: Angiotensin II type 1 receptor A1166C gene polymorphism is associated with an increased response to angiotensin II in human arteries. *Hypertension* 35:717-721, 2000
86. Paradis P, Dali-Youcef N, Paradis FW, Thibault G, Nemer M: Overexpression of angiotensin II type I receptor in cardiomyocytes induces cardiac hypertrophy and remodeling. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97:931-936, 2000
87. Hoffmann S, Krause T, van Geel PP, Willenbrock R, Pagel I, Pinto YM, Buikema H, van Gilst WH, Lindschau C, Paul M, Inagami T, Ganten D, Urata H: Overexpression of the human angiotensin II type 1 receptor in the rat heart augments load induced cardiac hypertrophy. *J Mol Med* 79:601-608, 2001
88. Le TH, Kim HS, Allen AM, Spurney RF, Smithies O, Coffman TM: Physiological impact of increased expression of the AT₁ angiotensin receptor. *Hypertension* 42:507-514, 2003
89. 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* 104:925-935, 1999

90. Yang Z, Bove CM, French BA, Epstein FH, Berr SS, DiMaria JM, Gibson JJ, Carey RM, Kramer CM: Angiotensin II type 2 receptor overexpression preserves left ventricular function after myocardial infarction. *Circulation* 106:106-111, 2002
91. Oliverio MI, Kim HS, Ito M, Le T, Audoly L, Best CF, Hiller S, Kluckman K, Maeda N, Smithies O, Coffman TM: Reduced growth, abnormal kidney structure, and type 2 (AT₂) angiotensin receptor-mediated blood pressure regulation in mice lacking both AT_{1A} and AT_{1B} receptors for angiotensin II. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95:15496-15501, 1998
92. Tsuchida S, Matsusaka T, Chen X, Okubo S, Niimura F, Nishimura H, Fogo A, Utsunomiya H, Inagami T, Ichikawa I: Murine double nullizygotes of the angiotensin type 1A and 1B receptor genes duplicate severe abnormal phenotypes of angiotensinogen nullizygotes. *J Clin Invest* 101:755-760, 1998
93. Gross V, Milia AF, Plehm R, Inagami T, Luft FC: Long-term blood pressure telemetry in AT₂ receptor-disrupted mice. *J Hypertens* 18:955-961, 2000
94. Schiffrin EL: Vascular endothelin in hypertension. *Vascul Pharmacol* 43:19-29, 2005
95. Sharma P, Hingorani A, Jia H, Hopper R, Brown MJ: Quantitative association between a newly identified molecular variant in the endothelin-2 gene and human essential hypertension. *J Hypertens* 17:1281-1287, 1999
96. Benjafield AV, Katyk K, Morris BJ: Association of EDNRA, but not WNK4 or FKBP1B, polymorphisms with essential hypertension. *Clin Genet* 64:433-438, 2003
97. Lajemi M, Gautier S, Poirier O, Baguet JP, Mimran A, Gosse P, Hanon O, Labat C, Cambien F, Benetos A: Endothelin gene variants and aortic and cardiac structure in never-treated hypertensives. *Am J Hypertens* 14:755-760, 2001
98. Telemaque-Potts S, Kuc RE, Maguire JJ, Ohlstein E, Yanagisawa M, Davenport AP: Elevated systemic levels of endothelin-1 and blood pressure correlate with blunted constrictor responses and downregulation of endothelin(A), but not endothelin(B), receptors in an animal model of hypertension. *Clin Sci (Lond)* 103 (Suppl 48):357S-362S, 2002
99. Berthiaume N, Yanagisawa M, D'Orleans-Juste P: Contribution of endogenous endothelin-1 and endothelin-A-receptors to the hypertensive state of endothelin-B heterozygous (+/-) knockout mice. *J Cardiovasc Pharmacol* 36 (Suppl 1):S72-S74, 2000

100. Amiri F, Virdis A, Neves MF, Iglarz M, Seidah NG, Touyz RM, Reudelhuber TL, Schiffrin EL: Endothelium-restricted overexpression of human endothelin-1 causes vascular remodeling and endothelial dysfunction. *Circulation* 110:2233-2240, 2004
101. Owens GK, Kumar MS, Wamhoff BR: Molecular regulation of vascular smooth muscle cell differentiation in development and disease. *Physiol Rev* 84:767-801, 2004
102. Intengan HD, Schiffrin EL: Structure and mechanical properties of resistance arteries in hypertension: role of adhesion molecules and extracellular matrix determinants. *Hypertension* 36:312-318, 2000
103. Bots ML, Dijk JM, Oren A, Grobbee DE: Carotid intima-media thickness, arterial stiffness and risk of cardiovascular disease: current evidence. *J Hypertens* 20:2317-2325, 2002
104. Schmieder RE: Mechanisms for the clinical benefits of angiotensin II receptor blockers. *Am J Hypertens* 18:720-730, 2005
105. Rosendorff C: The renin-angiotensin system and vascular hypertrophy. *J Am Coll Cardiol* 28:803-812, 1996
106. Nguyen G, Burckle C, Sraer JD: The renin receptor: the facts, the promise and the hope. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 12:51-55, 2003
107. Bralet J, Schwartz JC: Vasopeptidase inhibitors: an emerging class of cardiovascular drugs. *Trends Pharmacol Sci* 22:106-109, 2001
108. Kurdi M, De Mello WC, Booz GW: Working outside the system: an update on the unconventional behavior of the renin-angiotensin system components. *Int J Biochem Cell Biol* 37:1357-1367, 2005
109. Fukuda N, Satoh C, Hu WY, Soma M, Kubo A, Kishioka H, Watanabe Y, Izumi Y, Kanmatsuse K: Production of angiotensin II by homogeneous cultures of vascular smooth muscle cells from spontaneously hypertensive rats. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 19:1210-1217, 1999
110. Guo C, Ju H, Leung D, Massaeli H, Shi M, Rabinovitch M: A novel vascular smooth muscle chymase is upregulated in hypertensive rats. *J Clin Invest* 107:703-715, 2001
111. Ju H, Gros R, You X, Tsang S, Husain M, Rabinovitch M: Conditional and targeted overexpression of vascular chymase causes hypertension in transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98:7469-7474, 2001

112. Oberleithner H, Ludwig T, Riethmuller C, Hillebrand U, Albermann L, Schafer C, Shahin V, Schillers H: Human endothelium: target for aldosterone. *Hypertension* 43:952-956, 2004
113. Ahmad N, Romero DG, Gomez-Sanchez EP, Gomez-Sanchez CE: Do human vascular endothelial cells produce aldosterone? *Endocrinology* 145:3626-3629, 2004
114. Endemann DH, Touyz RM, Iglarz M, Savoia C, Schiffrin EL: Eplerenone prevents salt-induced vascular remodeling and cardiac fibrosis in stroke-prone spontaneously hypertensive rats. *Hypertension* 39:399-404, 2004
115. Iglarz M, Touyz RM, Viel EC, Amiri F, Schiffrin EL: Involvement of oxidative stress in the profibrotic action of aldosterone: interaction with the renin-angiotensin system. *Am J Hypertens* 17:597-603, 2004
116. Ferrario CM, Chappell MC: Novel angiotensin peptides. *Cell Mol Life Sci* 61:2720-2727, 2004
117. Santos RA, Simoes e Silva AC, Maric C, Silva DM, Machado RP, de B, I, Heringer-Walther S, Pinheiro SV, Lopes MT, Bader M, Mendes EP, Lemos VS, Campagnole-Santos MJ, Schultheiss HP, Speth R, Walther T: Angiotensin-(1-7) is an endogenous ligand for the G protein-coupled receptor Mas. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:8258-8263, 2003
118. Bohlen und HO, Walther T, Bader M, Albrecht D: Interaction between Mas and the angiotensin AT₁ receptor in the amygdala. *J Neurophysiol* 83:2012-2021, 2000
119. Reaux-Le GA, Iturrioz X, Fassot C, Claperon C, Roques BP, Llorens-Cortes C: Role of angiotensin III in hypertension. *Curr Hypertens Rep* 7:128-134, 2005
120. Chai SY, Fernando R, Peck G, Ye SY, Mendelsohn FA, Jenkins TA, Albiston AL: The angiotensin IV/AT₄ receptor. *Cell Mol Life Sci* 61:2728-2737, 2004
121. Reudelhuber TL: The renin-angiotensin system: peptides and enzymes beyond angiotensin II. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 14:155-159, 2005
122. Ye S, Zhong H, Duong VN, Campese VM: Losartan reduces central and peripheral sympathetic nerve activity in a rat model of neurogenic hypertension. *Hypertension* 39:1101-1106, 2002
123. Diep QN, El Mabrouk M, Cohn JS, Endemann D, Amiri F, Virdis A, Neves MF, Schiffrin EL: Structure, endothelial function, cell growth, and inflammation in

- blood vessels of angiotensin II-infused rats: role of peroxisome proliferator-activated receptor- γ . *Circulation* 105:2296-2302, 2002
124. Touyz RM, Tabet F, Schiffrin EL: Redox-dependent signalling by angiotensin II and vascular remodelling in hypertension. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 30:860-866, 2003
 125. Goodfriend TL: Angiotensin receptors: history and mysteries. *Am J Hypertens* 13:442-449, 2000
 126. Brown NJ, Kim KS, Chen YQ, Blevins LS, Nadeau JH, Meranze SG, Vaughan DE: Synergistic effect of adrenal steroids and angiotensin II on plasminogen activator inhibitor-1 production. *J Clin Endocrinol Metab* 85:336-344, 2000
 127. Mehta JL, Li DY, Yang H, Raizada MK: Angiotensin II and IV stimulate expression and release of plasminogen activator inhibitor-1 in cultured human coronary artery endothelial cells. *J Cardiovasc Pharmacol* 39:789-794, 2002
 128. Touyz RM, Berry C: Recent advances in angiotensin II signaling. *Braz J Med Biol Res* 35:1001-1015, 2002
 129. Carey RM, Wang ZQ, Siragy HM: Role of the angiotensin type 2 receptor in the regulation of blood pressure and renal function. *Hypertension* 35:155-163, 2000
 130. Miura S, Saku K, Karnik SS: Molecular analysis of the structure and function of the angiotensin II type 1 receptor. *Hypertens Res* 26:937-943, 2003
 131. Kim S, Iwao H: Molecular and cellular mechanisms of angiotensin II-mediated cardiovascular and renal diseases. *Pharmacol Rev* 52:11-34, 2000
 132. Sugaya T, Nishimatsu S, Tanimoto K, Takimoto E, Yamagishi T, Imamura K, Goto S, Imaizumi K, Hisada Y, Otsuka A: Angiotensin II type 1a receptor-deficient mice with hypotension and hyperreninemia. *J Biol Chem* 270:18719-18722, 1995
 133. Shinozaki K, Ayajiki K, Nishio Y, Sugaya T, Kashiwagi A, Okamura T: Evidence for a causal role of the renin-angiotensin system in vascular dysfunction associated with insulin resistance. *Hypertension* 43:255-262, 2004
 134. Oliverio MI, Best CF, Kim HS, Arendshorst WJ, Smithies O, Coffman TM: Angiotensin II responses in AT1A receptor-deficient mice: a role for AT1B receptors in blood pressure regulation. *Am J Physiol* 272:F515-F520, 1997
 135. Schmidt B, Schieffer B: Angiotensin II AT1 receptor antagonists. Clinical implications of active metabolites. *J Med Chem* 46:2261-2270, 2003

136. Sleight P: Angiotensin II and trials of cardiovascular outcomes. *Am J Cardiol* 89:11A-16A, 2002
137. Burnier M: Angiotensin II type 1 receptor blockers. *Circulation* 103:904-912, 2001
138. Schupp M, Janke J, Clasen R, Unger T, Kintscher U: Angiotensin type 1 receptor blockers induce peroxisome proliferator-activated receptor- γ activity. *Circulation* 109:2054-2057, 2004
139. Pershadsingh HA, Kurtz TW: Insulin-sensitizing effects of telmisartan: implications for treating insulin-resistant hypertension and cardiovascular disease. *Diabetes Care* 27:1015, 2004
140. Scheen AJ: Prevention of type 2 diabetes mellitus through inhibition of the Renin-Angiotensin system. *Drugs* 64:2537-2565, 2004
141. AbdAlla S, Lothar H, Langer A, el Faramawy Y, Quitterer U: Factor XIIIa transglutaminase crosslinks AT₁ receptor dimers of monocytes at the onset of atherosclerosis. *Cell* 119:343-354, 2004
142. AbdAlla S, bdel-Baset A, Lothar H, el MA, Quitterer U: Mesangial AT₁/B₂ receptor heterodimers contribute to angiotensin II hyperresponsiveness in experimental hypertension. *J Mol Neurosci* 26:185-192, 2005
143. AbdAlla S, Lothar H, Quitterer U: AT₁-receptor heterodimers show enhanced G-protein activation and altered receptor sequestration. *Nature* 407:94-98, 2000
144. Breitwieser GE: G protein-coupled receptor oligomerization: implications for G protein activation and cell signaling. *Circ Res* 94:17-27, 2004
145. Zeng C, Yang Z, Wang Z, Jones J, Wang X, Altea J, Mangrum AJ, Hopfer U, Sibley DR, Eisner GM, Felder RA, Jose PA: Interaction of angiotensin II type 1 and D₅ dopamine receptors in renal proximal tubule cells. *Hypertension* 45:804-810, 2005
146. Zeng C, Hopfer U, Asico LD, Eisner GM, Felder RA, Jose PA: Altered AT₁ receptor regulation of ET_B receptors in renal proximal tubule cells of spontaneously hypertensive rats. *Hypertension* 46:926-931, 2005
147. Breitwieser GE: G protein-coupled receptor oligomerization: implications for G protein activation and cell signaling. *Circ Res* 94:17-27, 2004

148. Clark CJ, Milligan G, McLellan AR, Connell JM: Guanine nucleotide regulatory protein levels and function in spontaneously hypertensive rat vascular smooth-muscle cells. *Biochim Biophys Acta* 1136:290-296, 1992
149. Siffert W, Roszkopf D, Siffert G, Busch S, Moritz A, Erbel R, Sharma AM, Ritz E, Wichmann HE, Jakobs KH, Horsthemke B: Association of a human G-protein β_3 subunit variant with hypertension. *Nat Genet* 18:45-48, 1998
150. Dong Y: The G protein β_3 subunit polymorphism in human hypertension. *Int J Cardiol* 73:197-198, 2000
151. Touyz RM, Schiffrin EL: Role of calcium influx and intracellular calcium stores in angiotensin II-mediated calcium hyper-responsiveness in smooth muscle from spontaneously hypertensive rats. *J Hypertens* 15:1431-1439, 1997
152. Ushio-Fukai M, Griendling KK, Akers M, Lyons PR, Alexander RW: Temporal dispersion of activation of phospholipase C- β_1 and - γ isoforms by angiotensin II in vascular smooth muscle cells. Role of $\alpha_q/11$, α_{12} , and $\beta \gamma$ G protein subunits. *J Biol Chem* 273:19772-19777, 1998
153. Kosugi T, Osanai T, Kamada T, Nakano T, Okumura K: Phospholipase C activity is enhanced in skin fibroblasts obtained from patients with essential hypertension. *J Hypertens* 21:583-590, 2003
154. Ushio-Fukai M, Alexander RW, Akers M, Lyons PR, Lassegue B, Griendling KK: Angiotensin II receptor coupling to phospholipase D is mediated by the betagamma subunits of heterotrimeric G proteins in vascular smooth muscle cells. *Mol Pharmacol* 55:142-149, 1999
155. Lee MW, Severson DL: Signal transduction in vascular smooth muscle: diacylglycerol second messengers and PKC action. *Am J Physiol* 267:C659-C678, 1994
156. Dixon BS, Sharma RV, Dickerson T, Fortune J: Bradykinin and angiotensin II: activation of protein kinase C in arterial smooth muscle. *Am J Physiol* 266:C1406-C1420, 1994
157. Freeman EJ, Ferrario CM, Tallant EA: Angiotensins differentially activate phospholipase D in vascular smooth muscle cells from spontaneously hypertensive and Wistar-Kyoto rats. *Am J Hypertens* 8:1105-1111, 1995
158. Touyz RM, Schiffrin EL: Increased generation of superoxide by angiotensin II in smooth muscle cells from resistance arteries of hypertensive patients: role of

- phospholipase D-dependent NAD(P)H oxidase-sensitive pathways. *J Hypertens* 19:1245-1254, 2001
159. Touyz RM, Schiffrin EL: Ang II-stimulated superoxide production is mediated via phospholipase D in human vascular smooth muscle cells. *Hypertension* 34:976-982, 1999
 160. Bonventre JV: Phospholipase A2 and signal transduction. *J Am Soc Nephrol* 3:128-150, 1992
 161. Nasjletti A: Arthur C. Corcoran Memorial Lecture. The role of eicosanoids in angiotensin-dependent hypertension. *Hypertension* 31:194-200, 1998
 162. Young W, Mahboubi K, Haider A, Li I, Ferreri NR: Cyclooxygenase-2 is required for tumor necrosis factor- α - and angiotensin II-mediated proliferation of vascular smooth muscle cells. *Circ Res* 86:906-914, 2000
 163. Harris RC, Zhang MZ, Cheng HF: Cyclooxygenase-2 and the renal renin-angiotensin system. *Acta Physiol Scand* 181:543-547, 2004
 164. Sachinidis A, el-Haschimi K, Ko Y, Seul C, Epping P, Vetter H: Carbocyclic thromboxane A2 enhances the angiotensin II-induced DNA synthesis in smooth muscle cells. *Eur J Pharmacol* 307:121-124, 1996
 165. Lefer AM, Lefer DJ: Pharmacology of the endothelium in ischemia-reperfusion and circulatory shock. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 33:71-90, 1993
 166. Pratt PF, Rosolowsky M, Campbell WB: Mediators of arachidonic acid-induced relaxation of bovine coronary artery. *Hypertension* 28:76-82, 1996
 167. Oyekan A, Balazy M, McGiff JC: Renal oxygenases: differential contribution to vasoconstriction induced by ET-1 and ANG II. *Am J Physiol* 273:R293-R300, 1997
 168. Muthalif MM, Karzoun NA, Gaber L, Khandekar Z, Benter IF, Saeed AE, Parmentier JH, Estes A, Malik KU: Angiotensin II-induced hypertension: contribution of Ras GTPase/Mitogen-activated protein kinase and cytochrome P450 metabolites. *Hypertension* 36:604-609, 2000
 169. Ali MS, Sayeski PP, Dirksen LB, Hayzer DJ, Marrero MB, Bernstein KE: Dependence on the motif YIPP for the physical association of Jak2 kinase with the intracellular carboxyl tail of the angiotensin II AT₁ receptor. *J Biol Chem* 272:23382-23388, 1997
 170. Ihle JN: Cytokine receptor signalling. *Nature* 377:591-594, 1995

171. Marrero MB, Schieffer B, Li B, Sun J, Harp JB, Ling BN: Role of Janus kinase/signal transducer and activator of transcription and mitogen-activated protein kinase cascades in angiotensin II- and platelet-derived growth factor-induced vascular smooth muscle cell proliferation. *J Biol Chem* 272:24684-24690, 1997
172. Grote K, Luchtefeld M, Schieffer B: JANUS under stress--role of JAK/STAT signaling pathway in vascular diseases. *Vascular Pharmacol* 43:357-363, 2005
173. Robinson MJ, Cobb MH: Mitogen-activated protein kinase pathways. *Curr Opin Cell Biol* 9:180-186, 1997
174. Touyz RM, He G, Deng LY, Schiffrin EL: Role of extracellular signal-regulated kinases in angiotensin II-stimulated contraction of smooth muscle cells from human resistance arteries. *Circulation* 99:392-399, 1999
175. Touyz RM, He G, El Mabrouk M, Diep Q, Mardigyan V, Schiffrin EL: Differential activation of extracellular signal-regulated protein kinase 1/2 and p38 mitogen activated-protein kinase by AT₁ receptors in vascular smooth muscle cells from Wistar-Kyoto rats and spontaneously hypertensive rats. *J Hypertens* 19:553-559, 2001
176. Pearson G, Robinson F, Beers GT, Xu BE, Karandikar M, Berman K, Cobb MH: Mitogen-activated protein (MAP) kinase pathways: regulation and physiological functions. *Endocr Rev* 22:153-183, 2001
177. Yang SH, Sharrocks AD, Whitmarsh AJ: Transcriptional regulation by the MAP kinase signaling cascades. *Gene* 320:3-21, 2003
178. Fiebeler A, Haller H: Participation of the mineralocorticoid receptor in cardiac and vascular remodeling. *Nephron Physiol* 94:47-50, 2003
179. El Mabrouk M, Touyz RM, Schiffrin EL: Differential ANG II-induced growth activation pathways in mesenteric artery smooth muscle cells from SHR. *Am J Physiol* 281:H30-H39, 2001
180. Kohlstedt K, Busse R, Fleming I: Signaling via the angiotensin-converting enzyme enhances the expression of cyclooxygenase-2 in endothelial cells. *Hypertension* 45:126-132, 2005
181. Kintscher U, Wakino S, Kim S, Fleck E, Hsueh WA, Law RE: Angiotensin II induces migration and Pyk2/paxillin phosphorylation of human monocytes. *Hypertension* 37:587-593, 2001

182. Takahashi H, Takeishi Y, Miyamoto T, Shishido T, Arimoto T, Konta T, Miyashita T, Ito M, Kubota I: Protein kinase C and extracellular signal regulated kinase are involved in cardiac hypertrophy of rats with progressive renal injury. *Eur J Clin Invest* 34:85-93, 2004
183. Malarkey K, McLees A, Paul A, Gould GW, Plevin R: The role of protein kinase C in activation and termination of mitogen-activated protein kinase activity in angiotensin II-stimulated rat aortic smooth-muscle cells. *Cell Signal* 8:123-129, 1996
184. Kim J, Lee YR, Lee CH, Choi WH, Lee CK, Kim J, Bae YM, Cho S, Kim B: Mitogen-activated protein kinase contributes to elevated basal tone in aortic smooth muscle from hypertensive rats. *Eur J Pharmacol* 514:209-215, 2005
185. Rice KM, Kinnard RS, Harris R, Wright GL, Blough ER: Effects of aging on pressure-induced MAPK activation in the rat aorta. *Pflugers Arch* 450:192-199, 2005
186. Matrougui K, Eskildsen-Helmond YE, Fiebeler A, Henrion D, Levy BI, Tedgui A, Mulvany MJ: Angiotensin II stimulates extracellular signal-regulated kinase activity in intact pressurized rat mesenteric resistance arteries. *Hypertension* 36:617-621, 2000
187. McMullen ME, Bryant PW, Glembotski CC, Vincent PA, Pumiglia KM: Activation of p38 has opposing effects on the proliferation and migration of endothelial cells. *J Biol Chem* 280:20995-21003, 2005
188. Ushio-Fukai M, Alexander RW, Akers M, Griendling KK: p38 Mitogen-activated protein kinase is a critical component of the redox-sensitive signaling pathways activated by angiotensin II. Role in vascular smooth muscle cell hypertrophy. *J Biol Chem* 273:15022-15029, 1998
189. Meloche S, Landry J, Huot J, Houle F, Marceau F, Giasson E: p38 MAP kinase pathway regulates angiotensin II-induced contraction of rat vascular smooth muscle. *Am J Physiol* 279:H741-H751, 2000
190. Liao DF, Monia B, Dean N, Berk BC: Protein kinase C-zeta mediates angiotensin II activation of ERK1/2 in vascular smooth muscle cells. *J Biol Chem* 272:6146-6150, 1997
191. Murasawa S, Matsubara H, Mori Y, Masaki H, Tsutsumi Y, Shibasaki Y, Kitabayashi I, Tanaka Y, Fujiyama S, Koyama Y, Fujiyama A, Iba S, Iwasaka T: Angiotensin II initiates tyrosine kinase Pyk2-dependent signalings leading to

- activation of Rac1-mediated c-Jun NH2-terminal kinase. *J Biol Chem* 275:26856-26863, 2000
192. Oudit GY, Sun H, Kerfant BG, Crackower MA, Penninger JM, Backx PH: The role of phosphoinositide-3 kinase and PTEN in cardiovascular physiology and disease. *J Mol Cell Cardiol* 37:449-471, 2004
 193. Anderson KE, Jackson SP: Class I phosphoinositide 3-kinases. *Int J Biochem Cell Biol* 35:1028-1033, 2003
 194. Rocic P, Govindarajan G, Sabri A, Lucchesi PA: A role for PYK2 in regulation of ERK1/2 MAP kinases and PI3-kinase by ANG II in vascular smooth muscle. *Am J Physiol* 280:C90-C99, 2001
 195. Ballou LM, Chattopadhyay M, Li Y, Scarlata S, Lin RZ: $G\alpha_q$ binds to p110 α /p85 α phosphatidylinositol 3-kinase and displaces Ras. *Biochem J* 2005
 196. Hafizi S, Wang X, Chester AH, Yacoub MH, Proud CG: ANG II activates effectors of mTOR via PI3-K signaling in human coronary smooth muscle cells. *Am J Physiol* 287:H1232-H1238, 2004
 197. Budzyn K, Marley PD, Sobey CG: Opposing roles of endothelial and smooth muscle phosphatidylinositol 3-kinase in vasoconstriction: effects of rho-kinase and hypertension. *J Pharmacol Exp Ther* 313:1248-1253, 2005
 198. Crackower MA, Oudit GY, Kozieradzki I, Sarao R, Sun H, Sasaki T, Hirsch E, Suzuki A, Shioi T, Irie-Sasaki J, Sah R, Cheng HY, Rybin VO, Lembo G, Fratta L, Oliveira-dos-Santos AJ, Benovic JL, Kahn CR, Izumo S, Steinberg SF, Wymann MP, Backx PH, Penninger JM: Regulation of myocardial contractility and cell size by distinct PI3K-PTEN signaling pathways. *Cell* 110:737-749, 2002
 199. Lee SR, Yang KS, Kwon J, Lee C, Jeong W, Rhee SG: Reversible inactivation of the tumor suppressor PTEN by H₂O₂. *J Biol Chem* 277:20336-20342, 2002
 200. Kwon J, Lee SR, Yang KS, Ahn Y, Kim YJ, Stadtman ER, Rhee SG: Reversible oxidation and inactivation of the tumor suppressor PTEN in cells stimulated with peptide growth factors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101:16419-16424, 2004
 201. Dyson JM, Kong AM, Wiradjaja F, Astle MV, Gurung R, Mitchell CA: The SH2 domain containing inositol polyphosphate 5-phosphatase-2: SHIP2. *Int J Biochem Cell Biol* 37:2260-2265, 2005

202. Sasaoka T, Kikuchi K, Wada T, Sato A, Hori H, Murakami S, Fukui K, Ishihara H, Aota R, Kimura I, Kobayashi M: Dual role of SRC homology domain 2-containing inositol phosphatase 2 in the regulation of platelet-derived growth factor and insulin-like growth factor I signaling in rat vascular smooth muscle cells. *Endocrinology* 144:4204-4214, 2003
203. Sasaoka T, Wada T, Tsuneki H: Lipid phosphatases as a possible therapeutic target in cases of type 2 diabetes and obesity. *Pharmacol Ther* 2006
204. Dong LQ, Liu F: PDK2: the missing piece in the receptor tyrosine kinase signaling pathway puzzle. *Am J Physiol* 289:E187-E196, 2005
205. Franke TF, Kaplan DR, Cantley LC, Toker A: Direct regulation of the Akt proto-oncogene product by phosphatidylinositol-3,4-bisphosphate. *Science* 275:665-668, 1997
206. Shiojima I, Walsh K: Role of Akt signaling in vascular homeostasis and angiogenesis. *Circ Res* 90:1243-1250, 2002
207. Shioi T, McMullen JR, Kang PM, Douglas PS, Obata T, Franke TF, Cantley LC, Izumo S: Akt/protein kinase B promotes organ growth in transgenic mice. *Mol Cell Biol* 22:2799-2809, 2002
208. Li F, Zhang C, Schaefer S, Estes A, Malik KU: ANG II-induced neointimal growth is mediated via cPLA2- and PLD2-activated Akt in balloon-injured rat carotid artery. *Am J Physiol* 289:H2592-H2601, 2005
209. Ohashi H, Takagi H, Oh H, Suzuma K, Suzuma I, Miyamoto N, Uemura A, Watanabe D, Murakami T, Sugaya T, Fukamizu A, Honda Y: Phosphatidylinositol 3-kinase/Akt regulates angiotensin II-induced inhibition of apoptosis in microvascular endothelial cells by governing survivin expression and suppression of caspase-3 activity. *Circ Res* 94:785-793, 2004
210. Touyz RM: Recent advances in intracellular signalling in hypertension. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 12:165-174, 2003
211. Bastian NR, Hibbs JB, Jr.: Assembly and regulation of NADPH oxidase and nitric oxide synthase. *Curr Opin Immunol* 6:131-139, 1994
212. Rajagopalan S, Kurz S, Munzel T, Tarpey M, Freeman BA, Griending KK, Harrison DG: Angiotensin II-mediated hypertension in the rat increases vascular superoxide production via membrane NADH/NADPH oxidase activation. Contribution to alterations of vasomotor tone. *J Clin Invest* 97:1916-1923, 1996

213. Muijsers RB, Folkerts G, Henricks PA, Sadeghi-Hashjin G, Nijkamp FP: Peroxynitrite: a two-faced metabolite of nitric oxide. *Life Sci* 60:1833-1845, 1997
214. Park JB, Touyz RM, Chen X, Schiffrin EL: Chronic treatment with a superoxide dismutase mimetic prevents vascular remodeling and progression of hypertension in salt-loaded stroke-prone spontaneously hypertensive rats. *Am J Hypertens* 15:78-84, 2002
215. Torrecillas G, Boyano-Adanez MC, Medina J, Parra T, Griera M, Lopez-Ongil S, Arilla E, Rodriguez-Puyol M, Rodriguez-Puyol D: The role of hydrogen peroxide in the contractile response to angiotensin II. *Mol Pharmacol* 59:104-112, 2001
216. Browatzki M, Larsen D, Pfeiffer CA, Gehrke SG, Schmidt J, Kranzhofer A, Katus HA, Kranzhofer R: Angiotensin II stimulates matrix metalloproteinase secretion in human vascular smooth muscle cells via nuclear factor- κ B and activator protein 1 in a redox-sensitive manner. *J Vasc Res* 42:415-423, 2005
217. Saito Y, Berk BC: Transactivation: a novel signaling pathway from angiotensin II to tyrosine kinase receptors. *J Mol Cell Cardiol* 33:3-7, 2001
218. Eguchi S, Dempsey PJ, Frank GD, Motley ED, Inagami T: Activation of MAPKs by angiotensin II in vascular smooth muscle cells. Metalloprotease-dependent EGF receptor activation is required for activation of ERK and p38 MAPK but not for JNK. *J Biol Chem* 276:7957-7962, 2001
219. Eguchi S, Numaguchi K, Iwasaki H, Matsumoto T, Yamakawa T, Utsunomiya H, Motley ED, Kawakatsu H, Owada KM, Hirata Y, Marumo F, Inagami T: Calcium-dependent epidermal growth factor receptor transactivation mediates the angiotensin II-induced mitogen-activated protein kinase activation in vascular smooth muscle cells. *J Biol Chem* 273:8890-8896, 1998
220. Eguchi S, Iwasaki H, Ueno H, Frank GD, Motley ED, Eguchi K, Marumo F, Hirata Y, Inagami T: Intracellular signaling of angiotensin II-induced p70 S6 kinase phosphorylation at Ser411 in vascular smooth muscle cells. Possible requirement of epidermal growth factor receptor, Ras, extracellular signal-regulated kinase, and Akt. *J Biol Chem* 274:36843-36851, 1999
221. Fleurent M, Gingras AC, Sonenberg N, Meloche S: Angiotensin II stimulates phosphorylation of the translational repressor 4E-binding protein 1 by a mitogen-activated protein kinase-independent mechanism. *J Biol Chem* 272:4006-4012, 1997

222. Gingras AC, Raught B, Sonenberg N: eIF4 initiation factors: effectors of mRNA recruitment to ribosomes and regulators of translation. *Annu Rev Biochem* 68:913-963, 1999
223. Diep QN, El Mabrouk M, Touyz RM, Schiffrin EL: Expression of cell cycle proteins in blood vessels of angiotensin II-infused rats: role of AT₁ receptors. *Hypertension* 37:604-608, 2001
224. Roussel MF: Key effectors of signal transduction and G1 progression. *Adv Cancer Res* 74:1-24, 1998
225. Sherr CJ: Cancer cell cycles. *Science* 274:1672-1677, 1996
226. Watanabe G, Lee RJ, Albanese C, Rainey WE, Battle D, Pestell RG: Angiotensin II activation of cyclin D1-dependent kinase activity. *J Biol Chem* 271:22570-22577, 1996
227. Saward L, Zahradka P: Angiotensin II activates phosphatidylinositol 3-kinase in vascular smooth muscle cells. *Circ Res* 81:249-257, 1997
228. Page K, Li J, Wang Y, Kartha S, Pestell RG, Hershenson MB: Regulation of cyclin D1 expression and DNA synthesis by phosphatidylinositol 3-kinase in airway smooth muscle cells. *Am J Respir Cell Mol Biol* 23:436-443, 2000
229. Purcell NH, Tang G, Yu C, Mercurio F, DiDonato JA, Lin A: Activation of NF- κ B is required for hypertrophic growth of primary rat neonatal ventricular cardiomyocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98:6668-6673, 2001
230. Diep QN, Benkirane K, Amiri F, Cohn JS, Endemann D, Schiffrin EL: PPAR α activator fenofibrate inhibits myocardial inflammation and fibrosis in angiotensin II-infused rats. *J Mol Cell Cardiol* 36:295-304, 2004
231. Chen Y, Arrigo AP, Currie RW: Heat shock treatment suppresses angiotensin II-induced activation of NF- κ B pathway and heart inflammation: a role for IKK depletion by heat shock? *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 287:H1104-H1114, 2004
232. Virdis A, Schiffrin EL: Vascular inflammation: a role in vascular disease in hypertension? *Curr Opin Nephrol Hypertens* 12:181-187, 2003
233. Ni W, Kitamoto S, Ishibashi M, Usui M, Inoue S, Hiasa K, Zhao Q, Nishida K, Takeshita A, Egashira K: Monocyte chemoattractant protein-1 is an essential inflammatory mediator in angiotensin II-induced progression of established

- atherosclerosis in hypercholesterolemic mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 24:534-539, 2004
234. Victorino GP, Newton CR, Curran B: Effect of angiotensin II on microvascular permeability. *J Surg Res* 104:77-81, 2002
235. Prasad A, Koh KK, Schenke WH, Mincemoyer R, Csako G, Fleischer TA, Brown M, Selvaggi TA, Quyyumi AA: Role of angiotensin II type 1 receptor in the regulation of cellular adhesion molecules in atherosclerosis. *Am Heart J* 142:248-253, 2001
236. Grafe M, uch-Schwelk W, Zakrzewicz A, Regitz-Zagrosek V, Bartsch P, Graf K, Loebe M, Gaehtgens P, Fleck E: Angiotensin II-induced leukocyte adhesion on human coronary endothelial cells is mediated by E-selectin. *Circ Res* 81:804-811, 1997
237. Pueyo ME, Gonzalez W, Nicoletti A, Savoie F, Arnal JF, Michel JB: Angiotensin II stimulates endothelial vascular cell adhesion molecule-1 via nuclear factor- κ B activation induced by intracellular oxidative stress. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 20:645-651, 2000
238. Cheng ZJ, Vapaatalo H, Mervaala E: Angiotensin II and vascular inflammation. *Med Sci Monit* 11:RA194-RA205, 2005
239. Carey RM: Cardiovascular and renal regulation by the angiotensin type 2 receptor: the AT₂ receptor comes of age. *Hypertension* 45:840-844, 2005
240. Inagami T, Eguchi S, Numaguchi K, Motley ED, Tang H, Matsumoto T, Yamakawa T: Cross-talk between angiotensin II receptors and the tyrosine kinases and phosphatases. *J Am Soc Nephrol* 10 (Suppl 11):S57-S61, 1999
241. Ichiki T, Labosky PA, Shiota C, Okuyama S, Imagawa Y, Fogo A, Niimura F, Ichikawa I, Hogan BL, Inagami T: Effects on blood pressure and exploratory behaviour of mice lacking angiotensin II type-2 receptor. *Nature* 377:748-750, 1995
242. Tanaka M, Tsuchida S, Imai T, Fujii N, Miyazaki H, Ichiki T, Naruse M, Inagami T: Vascular response to angiotensin II is exaggerated through an upregulation of AT₁ receptor in AT₂ knockout mice. *Biochem Biophys Res Commun* 258:194-198, 1999
243. Barber MN, Sampey DB, Widdop RE: AT₂ receptor stimulation enhances antihypertensive effect of AT₁ receptor antagonist in hypertensive rats. *Hypertension* 34:1112-1116, 1999

244. Zhang J, Pratt RE: The AT₂ receptor selectively associates with Gi α 2 and Gi α 3 in the rat fetus. *J Biol Chem* 271:15026-15033, 1996
245. Steckelings UM, Kaschina E, Unger T: The AT₂ receptor--a matter of love and hate. *Peptides* 26:1401-1409, 2005
246. Yamada T, Akishita M, Pollman MJ, Gibbons GH, Dzau VJ, Horiuchi M: Angiotensin II type 2 receptor mediates vascular smooth muscle cell apoptosis and antagonizes angiotensin II type 1 receptor action: an in vitro gene transfer study. *Life Sci* 63:L289-L295, 1998
247. Fukada SY, Tirapelli CR, De Godoy MA, de Oliveira AM: Mechanisms underlying the endothelium-independent relaxation induced by angiotensin II in rat aorta. *J Cardiovasc Pharmacol* 45:136-143, 2005
248. Andresen BT, Shome K, Jackson EK, Romero GG: AT₂ receptors cross talk with AT₁ receptors through a nitric oxide- and RhoA-dependent mechanism resulting in decreased phospholipase D activity. *Am J Physiol* 288:F763-F770, 2005
249. Savoia C, Tabet F, Yao G, Schiffrin EL, Touyz RM: Negative regulation of RhoA/Rho kinase by angiotensin II type 2 receptor in vascular smooth muscle cells: role in angiotensin II-induced vasodilation in stroke-prone spontaneously hypertensive rats. *J Hypertens* 23:1037-1045, 2005
250. Ruiz-Ortega M, Lorenzo O, Ruperez M, Suzuki Y, Egido J: Angiotensin II activates nuclear transcription factor- κ B in aorta of normal rats and in vascular smooth muscle cells of AT₁ knockout mice. *Nephrol Dial Transplant* 16 (Suppl 1):S27-S33, 2001
251. Snow V, Weiss KB, Mottur-Pilson C: The evidence base for tight blood pressure control in the management of type 2 diabetes mellitus. *Ann Intern Med* 138:587-592, 2003
252. Kersten S, Desvergne B, Wahli W: Roles of PPARs in health and disease. *Nature* 405:421-424, 2000
253. Desvergne B, Wahli W: Peroxisome proliferator-activated receptors: nuclear control of metabolism. *Endocr Rev* 20:649-688, 1999
254. Schiffrin EL, Amiri F, Benkirane K, Iglarz M, Diep QN: Peroxisome proliferator-activated receptors: vascular and cardiac effects in hypertension. *Hypertension* 42:664-668, 2003

255. Berger J, Moller DE: The mechanisms of action of PPARs. *Annu Rev Med* 53:409-435, 2002
256. Forman BM, Chen J, Evans RM: Hypolipidemic drugs, polyunsaturated fatty acids, and eicosanoids are ligands for peroxisome proliferator-activated receptors α and δ . *Proc Natl Acad Sci U S A* 94:4312-4317, 1997
257. Moraes LA, Piqueras L, Bishop-Bailey D: Peroxisome proliferator-activated receptors and inflammation. *Pharmacol Ther* 2005
258. Willson TM, Brown PJ, Sternbach DD, Henke BR: The PPARs: from orphan receptors to drug discovery. *J Med Chem* 43:527-550, 2000
259. Lehmann JM, Lenhard JM, Oliver BB, Ringold GM, Kliewer SA: Peroxisome proliferator-activated receptors α and γ are activated by indomethacin and other non-steroidal anti-inflammatory drugs. *J Biol Chem* 272:3406-3410, 1997
260. Motojima K, Passilly P, Peters JM, Gonzalez FJ, Latruffe N: Expression of putative fatty acid transporter genes are regulated by peroxisome proliferator-activated receptor α and γ activators in a tissue- and inducer-specific manner. *J Biol Chem* 273:16710-16714, 1998
261. Yu S, Rao S, Reddy JK: Peroxisome proliferator-activated receptors, fatty acid oxidation, steatohepatitis and hepatocarcinogenesis. *Curr Mol Med* 3:561-572, 2003
262. Vosper H, Khoudoli GA, Graham TL, Palmer CN: Peroxisome proliferator-activated receptor agonists, hyperlipidaemia, and atherosclerosis. *Pharmacol Ther* 95:47-62, 2002
263. Vu-Dac N, Chopin-Delannoy S, Gervois P, Bonnelye E, Martin G, Fruchart JC, Laudet V, Staels B: The nuclear receptors peroxisome proliferator-activated receptor α and Rev-erb α mediate the species-specific regulation of apolipoprotein A-I expression by fibrates. *J Biol Chem* 273:25713-25720, 1998
264. Delerive P, De BK, Besnard S, Vanden BW, Peters JM, Gonzalez FJ, Fruchart JC, Tedgui A, Haegeman G, Staels B: Peroxisome proliferator-activated receptor α negatively regulates the vascular inflammatory gene response by negative cross-talk with transcription factors NF- κ B and AP-1. *J Biol Chem* 274:32048-32054, 1999
265. Staels B, Koenig W, Habib A, Merval R, Lebret M, Torra IP, Delerive P, Fadel A, Chinetti G, Fruchart JC, Najib J, Maclouf J, Tedgui A: Activation of human aortic smooth-muscle cells is inhibited by PPAR α but not by PPAR γ activators. *Nature* 393:790-793, 1998

266. Hu ZW, Kerb R, Shi XY, Wei-Lavery T, Hoffman BB: Angiotensin II increases expression of cyclooxygenase-2: implications for the function of vascular smooth muscle cells. *J Pharmacol Exp Ther* 303:563-573, 2002
267. Diep QN, Amiri F, Touyz RM, Cohn JS, Endemann D, Neves MF, Schiffrin EL: PPAR α activator effects on Ang II-induced vascular oxidative stress and inflammation. *Hypertension* 40:866-871, 2002
268. Leibowitz MD, Fievet C, Hennuyer N, Peinado-Onsurbe J, Duez H, Bergera J, Cullinan CA, Sparrow CP, Baffic J, Berger GD, Santini C, Marquis RW, Tolman RL, Smith RG, Moller DE, Auwerx J: Activation of PPAR δ alters lipid metabolism in db/db mice. *FEBS Lett* 473:333-336, 2000
269. Gilde AJ, van der Lee KA, Willemsen PH, Chinetti G, van der Leij FR, van der Vusse GJ, Staels B, van Bilsen M: Peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) α and PPAR β/δ , but not PPAR γ , modulate the expression of genes involved in cardiac lipid metabolism. *Circ Res* 92:518-524, 2003
270. Lee CH, Chawla A, Urbiztondo N, Liao D, Boisvert WA, Evans RM, Curtiss LK: Transcriptional repression of atherogenic inflammation: modulation by PPAR δ . *Science* 302:453-457, 2003
271. Rival Y, Beneteau N, Taillandier T, Pezet M, Dupont-Passelaigue E, Patoiseau JF, Junquero D, Colpaert FC, Delhon A: PPAR α and PPAR δ activators inhibit cytokine-induced nuclear translocation of NF- κ B and expression of VCAM-1 in EAhy926 endothelial cells. *Eur J Pharmacol* 435:143-151, 2002
272. Martens FM, Visseren FL, Lemay J, de Koning EJ, Rabelink TJ: Metabolic and additional vascular effects of thiazolidinediones. *Drugs* 62:1463-1480, 2002
273. Sidhu JS, Cowan D, Kaski JC: The effects of rosiglitazone, a peroxisome proliferator-activated receptor- γ agonist, on markers of endothelial cell activation, C-reactive protein, and fibrinogen levels in non-diabetic coronary artery disease patients. *J Am Coll Cardiol* 42:1757-1763, 2003
274. Ryan MJ, Didion SP, Mathur S, Faraci FM, Sigmund CD: PPAR γ agonist rosiglitazone improves vascular function and lowers blood pressure in hypertensive transgenic mice. *Hypertension* 43:661-666, 2004
275. Verges B: Clinical interest of PPARs ligands. *Diabetes Metab* 30:7-12, 2004
276. Goldberg RB, Kendall DM, Deeg MA, Buse JB, Zagar AJ, Pinaire JA, Tan MH, Khan MA, Perez AT, Jacober SJ: A comparison of lipid and glycemic effects of

- pioglitazone and rosiglitazone in patients with type 2 diabetes and dyslipidemia. *Diabetes Care* 28:1547-1554, 2005
277. Hsueh WA, Law RE: PPAR γ and atherosclerosis: effects on cell growth and movement. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 21:1891-1895, 2001
278. Sidhu JS, Kaposzta Z, Markus HS, Kaski JC: Effect of rosiglitazone on common carotid intima-media thickness progression in coronary artery disease patients without diabetes mellitus. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 24:930-934, 2004
279. Hwang J, Kleinhenz DJ, Lassegue B, Griendling KK, Dikalov S, Hart CM: Peroxisome proliferator-activated receptor- γ ligands regulate endothelial membrane superoxide production. *Am J Physiol* 288:C899-C905, 2005
280. Iglarz M, Touyz RM, Amiri F, Lavoie MF, Diep QN, Schiffrin EL: Effect of peroxisome proliferator-activated receptor- α and - γ activators on vascular remodeling in endothelin-dependent hypertension. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 23:45-51, 2003
281. Schiffrin EL: Peroxisome proliferator-activated receptors and cardiovascular remodeling. *Am J Physiol* 288:H1037-H1043, 2005
282. Chen K, Chen J, Li D, Zhang X, Mehta JL: Angiotensin II regulation of collagen type I expression in cardiac fibroblasts: modulation by PPAR- γ ligand pioglitazone. *Hypertension* 44:655-661, 2004
283. Barroso I, Gurnell M, Crowley VE, Agostini M, Schwabe JW, Soos MA, Maslen GL, Williams TD, Lewis H, Schafer AJ, Chatterjee VK, O'Rahilly S: Dominant negative mutations in human PPAR γ associated with severe insulin resistance, diabetes mellitus and hypertension. *Nature* 402:880-883, 1999
284. Kota BP, Huang TH, Roufogalis BD: An overview on biological mechanisms of PPARs. *Pharmacol Res* 51:85-94, 2005
285. Saad MF, Greco S, Osei K, Lewin AJ, Edwards C, Nunez M, Reinhardt RR: Ragaglitazar improves glycemic control and lipid profile in type 2 diabetic subjects: a 12-week, double-blind, placebo-controlled dose-ranging study with an open pioglitazone arm. *Diabetes Care* 27:1324-1329, 2004
286. Kurebayashi S, Xu X, Ishii S, Shiraishi M, Kouhara H, Kasayama S: A novel thiazolidinedione MCC-555 down-regulates tumor necrosis factor- α -induced expression of vascular cell adhesion molecule-1 in vascular endothelial cells. *Atherosclerosis* 182:71-77, 2005

287. Hegarty BD, Furler SM, Oakes ND, Kraegen EW, Cooney GJ: Peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) activation induces tissue-specific effects on fatty acid uptake and metabolism *in vivo*--a study using the novel PPAR α/γ agonist tesaglitazar. *Endocrinology* 145:3158-3164, 2004
288. Nissen SE, Wolski K, Topol EJ: Effect of muraglitazar on death and major adverse cardiovascular events in patients with type 2 diabetes mellitus. *JAMA* 294:2581-2586, 2005
289. Gongora MC, Qin Z, Laude K, Kim HW, McCann L, Folz JR, Dikalov S, Fukai T, Harrison DG: Role of extracellular superoxide dismutase in hypertension. *Hypertension* 48:473-481, 2006
290. Takeda K, Ichiki T, Tokunou T, Funakoshi Y, Iino N, Hirano K, Kanaide H, Takeshita A: Peroxisome proliferator-activated receptor γ activators downregulate angiotensin II type 1 receptor in vascular smooth muscle cells. *Circulation* 102:1834-1839, 2000
291. Laplante MA, Wu R, El Midaoui A, de Champlain J: NAD(P)H oxidase activation by angiotensin II is dependent on p42/44 ERK-MAPK pathway activation in rat's vascular smooth muscle cells. *J Hypertens* 21:927-936, 2003
292. Viedt C, Soto U, Krieger-Brauer HI, Fei J, Elsing C, Kubler W, Kreuzer J: Differential activation of mitogen-activated protein kinases in smooth muscle cells by angiotensin II: involvement of p22phox and reactive oxygen species. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 20:940-948, 2000
293. Verlohren S, Dubrovskaja G, Tsang SY, Essin K, Luft FC, Huang Y, Gollasch M: Visceral periadventitial adipose tissue regulates arterial tone of mesenteric arteries. *Hypertension* 44:271-276, 2004
294. De LH, Bonhomme MC, Thibault G, Garcia R: Localization of atrial natriuretic factor receptors in the mesenteric arterial bed. Comparison with angiotensin II and endothelin receptors. *Circ Res* 77:64-72, 1995
295. Min LJ, Mogi M, Li JM, Iwanami J, Iwai M, Horiuchi M: Aldosterone and angiotensin II synergistically induce mitogenic response in vascular smooth muscle cells. *Circ Res* 97:434-442, 2005
296. Neves MF, Amiri F, Viridis A, Diep QN, Schiffrin EL: Role of aldosterone in angiotensin II-induced cardiac and aortic inflammation, fibrosis, and hypertrophy. *Can J Physiol Pharmacol* 83:999-1006, 2005

297. Daigle C, Martens FM, Girardot D, Dao HH, Touyz RM, Moreau P: Signaling of angiotensin II-induced vascular protein synthesis in conduit and resistance arteries in vivo. *BMC Cardiovasc Disord* 4:6, 2004
298. Takeda K, Ichiki T, Tokunou T, Iino N, Takeshita A: 15-Deoxy- Δ 12,14-prostaglandin J2 and thiazolidinediones activate the MEK/ERK pathway through phosphatidylinositol 3-kinase in vascular smooth muscle cells. *J Biol Chem* 276:48950-48955, 2001
299. Diep QN, Touyz RM, Schiffrin EL: Docosahexaenoic acid, a peroxisome proliferator-activated receptor- α ligand, induces apoptosis in vascular smooth muscle cells by stimulation of p38 mitogen-activated protein kinase. *Hypertension* 36:851-855, 2000
300. Teruel T, Hernandez R, Benito M, Lorenzo M: Rosiglitazone and retinoic acid induce uncoupling protein-1 (UCP-1) in a p38 mitogen-activated protein kinase-dependent manner in fetal primary brown adipocytes. *J Biol Chem* 278:263-269, 2003
301. Rao GN, Alexander RW, Runge MS: Linoleic acid and its metabolites, hydroperoxyoctadecadienoic acids, stimulate c-Fos, c-Jun, and c-Myc mRNA expression, mitogen-activated protein kinase activation, and growth in rat aortic smooth muscle cells. *J Clin Invest* 96:842-847, 1995
302. Wilmer WA, Dixon C, Lu L, Hilbelink T, Rovin BH: A cyclopentenone prostaglandin activates mesangial MAP kinase independently of PPAR γ . *Biochem Biophys Res Commun* 281:57-62, 2001
303. Lennon AM, Ramage M, Dessouroux A, Pierre M: MAP kinase cascades are activated in astrocytes and preadipocytes by 15-deoxy- Δ (12-14)-prostaglandin J(2) and the thiazolidinedione ciglitazone through peroxisome proliferator activator receptor γ -independent mechanisms involving reactive oxygenated species. *J Biol Chem* 277:29681-29685, 2002
304. Bae MA, Song BJ: Critical role of c-Jun N-terminal protein kinase activation in troglitazone-induced apoptosis of human HepG2 hepatoma cells. *Mol Pharmacol* 63:401-408, 2003
305. Gardner OS, Shiau CW, Chen CS, Graves LM: Peroxisome proliferator-activated receptor γ -independent activation of p38 MAPK by thiazolidinediones involves calcium/calmodulin-dependent protein kinase II and protein kinase R: correlation with endoplasmic reticulum stress. *J Biol Chem* 280:10109-10118, 2005

306. Wynne AM, Mocanu MM, Yellon DM: Pioglitazone mimics preconditioning in the isolated perfused rat heart: a role for the prosurvival kinases PI3K and P42/44MAPK. *J Cardiovasc Pharmacol* 46:817-822, 2005
307. Pauley CJ, Ledwith BJ, Kaplanski C: Peroxisome proliferators activate growth regulatory pathways largely via peroxisome proliferator-activated receptor α -independent mechanisms. *Cell Signal* 14:351-358, 2002
308. Palakurthi SS, Aktas H, Grubissich LM, Mortensen RM, Halperin JA: Anticancer effects of thiazolidinediones are independent of peroxisome proliferator-activated receptor γ and mediated by inhibition of translation initiation. *Cancer Res* 61:6213-6218, 2001
309. Juge-Aubry CE, Hammar E, Siegrist-Kaiser C, Pernin A, Takeshita A, Chin WW, Burger AG, Meier CA: Regulation of the transcriptional activity of the peroxisome proliferator-activated receptor α by phosphorylation of a ligand-independent trans-activating domain. *J Biol Chem* 274:10505-10510, 1999
310. Barger PM, Browning AC, Garner AN, Kelly DP: p38 mitogen-activated protein kinase activates peroxisome proliferator-activated receptor α : a potential role in the cardiac metabolic stress response. *J Biol Chem* 276:44495-44501, 2001
311. Hu E, Kim JB, Sarraf P, Spiegelman BM: Inhibition of adipogenesis through MAP kinase-mediated phosphorylation of PPAR γ . *Science* 274:2100-2103, 1996
312. Camp HS, Tafuri SR, Leff T: c-Jun N-terminal kinase phosphorylates peroxisome proliferator-activated receptor- γ 1 and negatively regulates its transcriptional activity. *Endocrinology* 140:392-397, 1999
313. Coleman KM, Smith CL: Intracellular signaling pathways: nongenomic actions of estrogens and ligand-independent activation of estrogen receptors. *Front Biosci* 6:D1379-D1391, 2001
314. El Mabrouk M, Diep QN, Benkirane K, Touyz RM, Schiffrin EL: SAM68: a downstream target of angiotensin II signaling in vascular smooth muscle cells in genetic hypertension. *Am J Physiol* 286:H1954-H1962, 2004
315. Herbert TP, Tee AR, Proud CG: The extracellular signal-regulated kinase pathway regulates the phosphorylation of 4E-BP1 at multiple sites. *J Biol Chem* 277:11591-11596, 2002

316. Endemann DH, Pu Q, De Ciuceis C, Savoia C, Viridis A, Neves MF, Touyz RM, Schiffrin EL: Persistent remodeling of resistance arteries in type 2 diabetic patients on antihypertensive treatment. *Hypertension* 43:399-404, 2004
317. Schofield I, Malik R, Izzard A, Austin C, Heagerty A: Vascular structural and functional changes in type 2 diabetes mellitus: evidence for the roles of abnormal myogenic responsiveness and dyslipidemia. *Circulation* 106:3037-3043, 2002
318. Krepinsky JC, Li Y, Chang Y, Liu L, Peng F, Wu D, Tang D, Scholey J, Ingram AJ: Akt mediates mechanical strain-induced collagen production by mesangial cells. *J Am Soc Nephrol* 16:1661-1672, 2005
319. Xin X, Khan ZA, Chen S, Chakrabarti S: Glucose-induced Akt1 activation mediates fibronectin synthesis in endothelial cells. *Diabetologia* 48:2428-2436, 2005
320. Chen WS, Xu PZ, Gottlob K, Chen ML, Sokol K, Shiyanova T, Roninson I, Weng W, Suzuki R, Tobe K, Kadowaki T, Hay N: Growth retardation and increased apoptosis in mice with homozygous disruption of the Akt1 gene. *Genes Dev* 15:2203-2208, 2001
321. Cho H, Thorvaldsen JL, Chu Q, Feng F, Birnbaum MJ: Akt1/PKB α is required for normal growth but dispensable for maintenance of glucose homeostasis in mice. *J Biol Chem* 276:38349-38352, 2001
322. Cho H, Mu J, Kim JK, Thorvaldsen JL, Chu Q, Crenshaw EB, III, Kaestner KH, Bartolomei MS, Shulman GI, Birnbaum MJ: Insulin resistance and a diabetes mellitus-like syndrome in mice lacking the protein kinase Akt2 (PKB β). *Science* 292:1728-1731, 2001
323. Velloso LA, Folli F, Sun XJ, White MF, Saad MJ, Kahn CR: Cross-talk between the insulin and angiotensin signaling systems. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93:12490-12495, 1996
324. Velloso LA, Folli F, Perego L, Saad MJ: The multi-faceted cross-talk between the insulin and angiotensin II signaling systems. *Diabetes Metab Res Rev* 22:98-107, 2006
325. Hixon ML, Muro-Cacho C, Wagner MW, Obejero-Paz C, Millie E, Fujio Y, Kureishi Y, Hassold T, Walsh K, Gualberto A: Akt1/PKB upregulation leads to vascular smooth muscle cell hypertrophy and polyploidization. *J Clin Invest* 106:1011-1020, 2000

326. Raji A, Seely EW, Bekins SA, Williams GH, Simonson DC: Rosiglitazone improves insulin sensitivity and lowers blood pressure in hypertensive patients. *Diabetes Care* 26:172-178, 2003
327. Hernandez R, Teruel T, Lorenzo M: Rosiglitazone produces insulin sensitisation by increasing expression of the insulin receptor and its tyrosine kinase activity in brown adipocytes. *Diabetologia* 46:1618-1628, 2003
328. Klippel A, Kavanaugh WM, Pot D, Williams LT: A specific product of phosphatidylinositol 3-kinase directly activates the protein kinase Akt through its pleckstrin homology domain. *Mol Cell Biol* 17:338-344, 1997
329. Scheid MP, Huber M, Damen JE, Hughes M, Kang V, Neilsen P, Prestwich GD, Krystal G, Duronio V: Phosphatidylinositol (3,4,5)P₃ is essential but not sufficient for protein kinase B (PKB) activation; phosphatidylinositol (3,4)P₂ is required for PKB phosphorylation at Ser-473: studies using cells from SH2-containing inositol-5-phosphatase knockout mice. *J Biol Chem* 277:9027-9035, 2002
330. Prasad N, Topping RS, Decker SJ: Src family tyrosine kinases regulate adhesion-dependent tyrosine phosphorylation of 5'-inositol phosphatase SHIP2 during cell attachment and spreading on collagen I. *J Cell Sci* 115:3807-3815, 2002
331. Marion E, Kaisaki PJ, Pouillon V, Gueydan C, Levy JC, Bodson A, Krzentowski G, Daubresse JC, Mockel J, Behrends J, Servais G, Szpirer C, Krays V, Gauguier D, Schurmans S: The gene INPPL1, encoding the lipid phosphatase SHIP2, is a candidate for type 2 diabetes in rat and man. *Diabetes* 51:2012-2017, 2002
332. Clement S, Krause U, Desmedt F, Tanti JF, Behrends J, Pesesse X, Sasaki T, Penninger J, Doherty M, Malaisse W, Dumont JE, Le Marchand-Brustel Y, Erneux C, Hue L, Schurmans S: The lipid phosphatase SHIP2 controls insulin sensitivity. *Nature* 409:92-97, 2001
333. Blero D, De SF, Pesesse X, Paternotte N, Moreau C, Payrastre B, Erneux C: The SH2 domain containing inositol 5-phosphatase SHIP2 controls phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate levels in CHO-IR cells stimulated by insulin. *Biochem Biophys Res Commun* 282:839-843, 2001
334. Patel C, Wyne KL, McGuire DK: Thiazolidinediones, peripheral oedema and congestive heart failure: what is the evidence? *Diab Vasc Dis Res* 2:61-66, 2005
335. Hubner N, Kreutz R, Takahashi S, Ganten D, Lindpaintner K: Altered angiotensinogen amino acid sequence and plasma angiotensin II levels in

- genetically hypertensive rats. A study on cause and effect. *Hypertension* 26:279-284, 1995
336. Izumi Y, Kim S, Zhan Y, Namba M, Yasumoto H, Iwao H: Important role of angiotensin II-mediated c-Jun NH₂-terminal kinase activation in cardiac hypertrophy in hypertensive rats. *Hypertension* 36:511-516, 2000
 337. deBlois D, Orlov SN, Hamet P: Apoptosis in cardiovascular remodeling--effect of medication. *Cardiovasc Drugs Ther* 15:539-545, 2001
 338. Kelly DP: PPARs of the heart: three is a crowd. *Circ Res* 92:482-484, 2003
 339. Tsuji T, Mizushige K, Noma T, Murakami K, Ohmori K, Miyatake A, Kohno M: Pioglitazone improves left ventricular diastolic function and decreases collagen accumulation in prediabetic stage of a type II diabetic rat. *J Cardiovasc Pharmacol* 38:868-874, 2001
 340. Ricote M, Li AC, Willson TM, Kelly CJ, Glass CK: The peroxisome proliferator-activated receptor- γ is a negative regulator of macrophage activation. *Nature* 391:79-82, 1998
 341. Chinetti G, Griglio S, Antonucci M, Torra IP, Delerive P, Majd Z, Fruchart JC, Chapman J, Najib J, Staels B: Activation of proliferator-activated receptors α and γ induces apoptosis of human monocyte-derived macrophages. *J Biol Chem* 273:25573-25580, 1998
 342. Yamamoto K, Ohki R, Lee RT, Ikeda U, Shimada K: Peroxisome proliferator-activated receptor γ activators inhibit cardiac hypertrophy in cardiac myocytes. *Circulation* 104:1670-1675, 2001
 343. Wang CH, Weisel RD, Liu PP, Fedak PW, Verma S: Glitazones and heart failure: critical appraisal for the clinician. *Circulation* 107:1350-1354, 2003
 344. Frangogiannis NG, Smith CW, Entman ML: The inflammatory response in myocardial infarction. *Cardiovasc Res* 53:31-47, 2002
 345. Botella LM, Puig-Kroger A, Almendro N, Sanchez-Elsner T, Munoz E, Corbi A, Bernabeu C: Identification of a functional NF- κ B site in the platelet endothelial cell adhesion molecule-1 promoter. *J Immunol* 164:1372-1378, 2000
 346. Newton R, Kuitert LM, Bergmann M, Adcock IM, Barnes PJ: Evidence for involvement of NF- κ B in the transcriptional control of COX-2 gene expression by IL-1 β . *Biochem Biophys Res Commun* 237:28-32, 1997

347. Trede NS, Tsytsykova AV, Chatila T, Goldfeld AE, Geha RS: Transcriptional activation of the human TNF- α promoter by superantigen in human monocytic cells: role of NF- κ B. *J Immunol* 155:902-908, 1995
348. Kapadia SR, Oral H, Lee J, Nakano M, Taffet GE, Mann DL: Hemodynamic regulation of tumor necrosis factor- α gene and protein expression in adult feline myocardium. *Circ Res* 81:187-195, 1997
349. Mann DL: Stress-activated cytokines and the heart: from adaptation to maladaptation. *Annu Rev Physiol* 65:81-101, 2003
350. Nian M, Lee P, Khaper N, Liu P: Inflammatory cytokines and postmyocardial infarction remodeling. *Circ Res* 94:1543-1553, 2004

ANNEXE

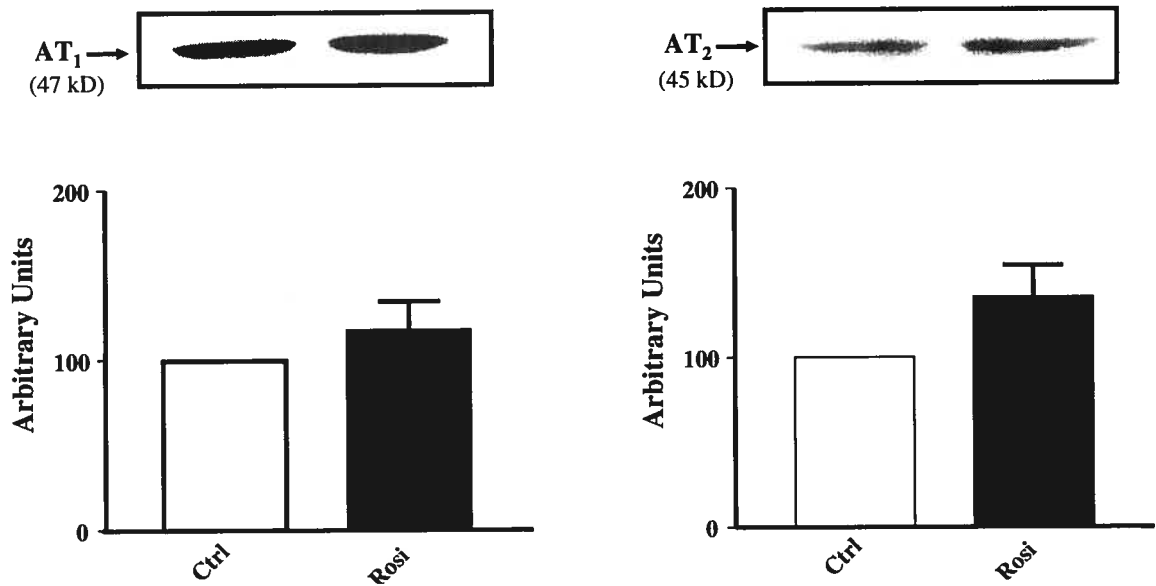


Figure 1 : Expression des récepteurs AT₁ et AT₂ dans les CMLV d'artères mésentériques. Contrôle (Ctrl), CMLV stimulées à la rosiglitazone (Rosi) pendant 24 heures. Les résultats représentent la moyenne \pm SEM (n = 4).

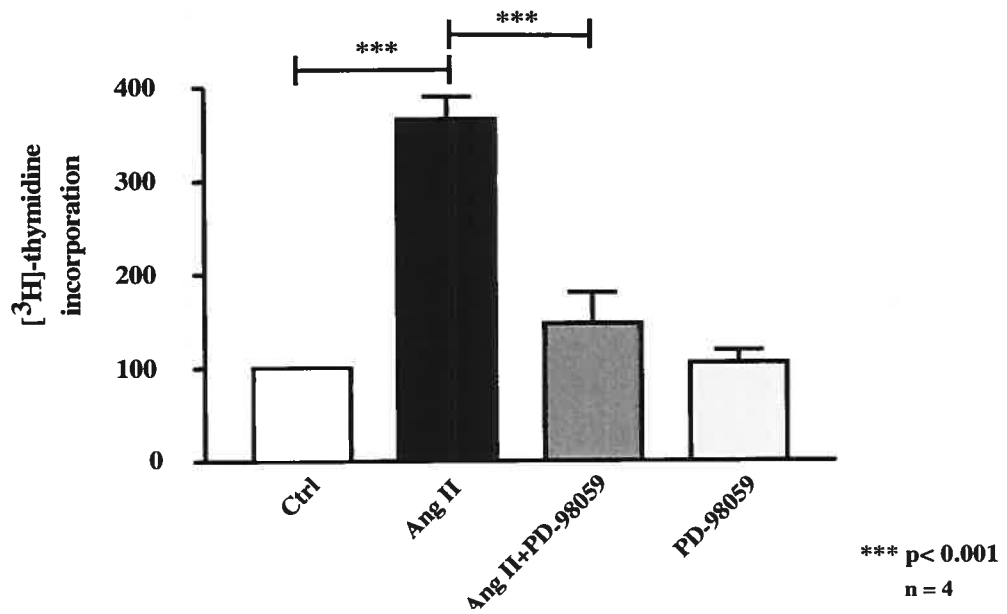


Figure 2 : Implication de la voie MAPK dans la synthèse d'ADN dans les CMLV d'artères mésentériques stimulées à l'Ang II. Les résultats représentent la moyenne \pm SEM (n = 4).

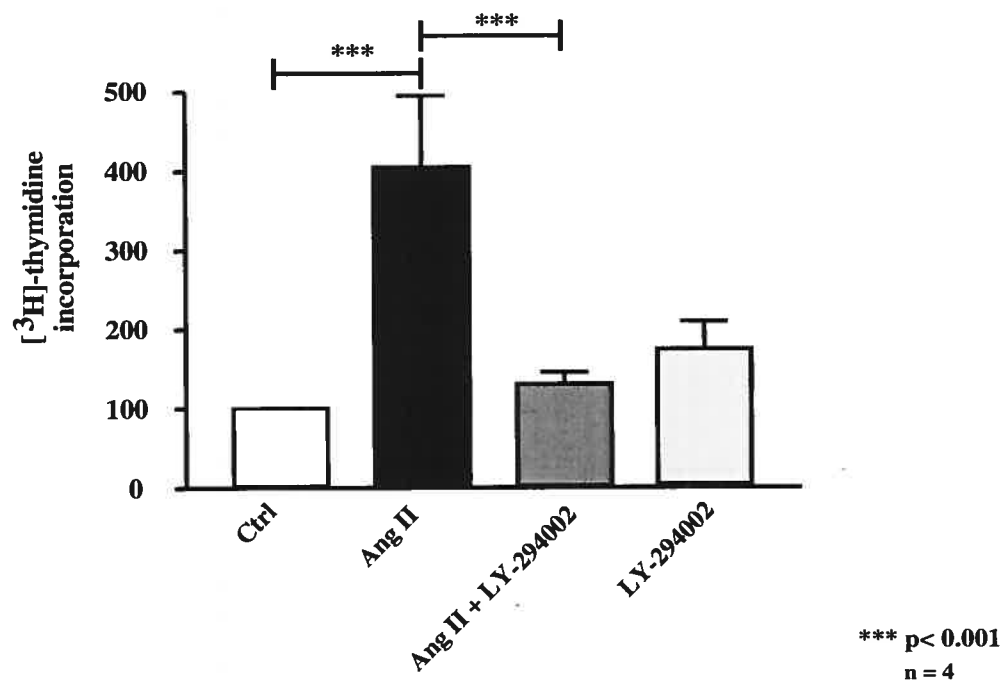


Figure 3 : Implication de la voie PI3K dans la synthèse d'ADN dans les CMLV d'artères mésentériques stimulées à l'Ang II. Les résultats représentent la moyenne \pm SEM (n = 4).