

Université de Montréal

**Protection des organes cibles dans l'hypertension à l'aide
d'un antagoniste des récepteurs AT1 (losartan) versus un
beta-bloqueur (atenolol)**

par
Stéphanie Pesant

Département de Pharmacologie
Faculté de Médecine

Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures
en vue de l'obtention du grade de Maîtrise ès Sciences
en Pharmacologie

Août, 2005

©, Stéphanie Pesant, 2005



AVIS

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

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

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

NOTICE

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

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

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

Université de Montréal
Faculté des études supérieures

Ce mémoire intitulé :
Protection des organes cibles dans l'hypertension à l'aide d'un antagoniste des récepteurs
AT1 (losartan) versus un beta-bloqueur (atenolol)

présenté par :
Stéphanie Pesant

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

André De Léan, président-rapporteur
Denis deBlois, directeur de recherche
Pierre Moreau, co-directeur
Daniel Lamontagne, membre du jury

Résumé

L'étude clinique LIFE a récemment démontré que, pour un effet anti-hypertenseur équivalent, le losartan était supérieur à l'atenolol dans la réduction de l'hypertrophie ventriculaire gauche (HVG) et des accidents vasculaires cérébraux (AVC). Afin de mieux définir les effets de ces drogues, l'HVG et les AVC ont été examinés dans un modèle de rat spontanément hypertendu (SHR) recevant du L-NAME, un inhibiteur de la monoxyde d'azote synthase (NOS). Les SHR ont reçu du L-NAME (20 mg/kg/d *p.o.*) ou son véhicule pendant cinq semaines. Après une semaine de L-NAME, les rats ont été randomisés pour recevoir: placebo, losartan (10, 20 ou 30 mg/kg/d *p.o.*) ou atenolol (10 ou 20 mg/kg/d *p.o.*). Une seconde cohorte de rats a été produite afin d'examiner les dommages causés aux organes cibles avant le développement d'AVC cliniques, après une semaine de placebo, losartan (20 mg/kg/d) ou atenolol (20 mg/kg/d). L'administration de L-NAME a augmenté significativement la pression systolique de 39% (à deux semaines vs. véhicule: 168 ± 11 mmHg) et l'HVG de 43% en cinq semaines. Les AVC étaient absents chez les rats du groupe témoin, mais sensiblement augmentés avec l'administration de L-NAME (début des AVC: jour 15; prévalence à cinq semaines: 93%). Le losartan 20 mg et l'atenolol 20 mg ont réduit la pression systolique de façon similaire (de 16% à deux semaines de L-NAME). Toutefois, le losartan 20 mg était plus efficace que l'atenolol 20 mg à réduire l'HVG et les AVC après cinq semaines de L-NAME (début des AVC: > 35 jours et jour 24, respectivement; prévalence à cinq semaines: 0% et 50%, respectivement). Avant l'apparition des AVC cliniques, le losartan 20 mg, mais non l'atenolol 20 mg, a réduit significativement les infarctus du myocarde (de 70% et 21%, respectivement) et le nombre de micro-thrombi cérébraux (de 30% et 15%, respectivement) par rapport au groupe L-NAME. Ce modèle de rat reproduit les résultats essentiels de l'étude LIFE, soit un effet protecteur contre les dommages cardiaques et cérébraux indépendant de la régulation de la pression artérielle.

Mots-clés: Étude LIFE, SHR, L-NAME, losartan, atenolol, AVC, infarctus du myocarde.

Abstract

The LIFE trial recently showed that, at equipotent anti-hypertensive doses, losartan is superior to atenolol in reducing left ventricular hypertrophy (LVH) and stroke in hypertensive patients. To better define the effects of these drugs, we examined LVH, stroke and cerebral micro-infarcts in spontaneously hypertensive rats (SHR) receiving the NO synthase inhibitor L-NAME. SHR received L-NAME (20 mg/kg/d *p.o.*) or its vehicle for up to five weeks. After one week of L-NAME, rats received placebo, losartan (10, 20 or 30 mg/kg/d *p.o.*) or atenolol (10 or 20 mg/kg/d *p.o.*). A subset of rats was used to examine organ damage prior to clinical stroke, after one week of placebo, losartan (20 mg/kg/d) or atenolol (20 mg/kg/d). As compared to vehicle, L-NAME administration increased systolic blood pressure significantly by 39% (at two weeks vs. vehicle: 168 + 11 mmHg) and left ventricular mass by 43% within five weeks. Stroke was absent with vehicle but markedly increased with L-NAME (stroke onset: 15 days; prevalence at five weeks: 93%). Losartan 20 mg and atenolol 20 mg reduced systolic pressure equipotently (by 16% at two weeks of L-NAME). However, losartan 20 mg was significantly more effective than atenolol 20 mg in reducing LVH and stroke over five weeks of L-NAME (stroke onset: >35 days and 24 days, respectively; prevalence at five weeks: 0% and 50%, respectively). Before the onset of clinical stroke, myocardial infarctions and cerebral micro-infarcts were significantly reduced by losartan 20 mg, but not atenolol 20 mg, (myocardial infarctions by 70% and 21% and cerebral micro-infarcts by 30% and 15%, respectively). Consistent with the LIFE study; an equipotent antihypertensive dose of losartan is superior to atenolol in reducing cardiac and cerebral damages.

Keywords: LIFE study, SHR, L-NAME, losartan, atenolol, stroke, myocardial infarction.

Table des matières

Chapitre 1 Introduction.....	1
1.1 L'hypertension artérielle	2
1.1.1 Définition	2
1.1.2 Régulation de la pression artérielle	3
1.1.3 Conséquences de l'hypertension	5
1.2 Accident vasculaire cérébral	5
1.2.1 Définition	5
1.2.2 Types d'AVC	7
1.2.3 Conséquences des AVC	10
1.3 Hypertrophie cardiaque.....	11
1.3.1 Définition	11
1.3.2 Types d'hypertrophie cardiaque.....	14
1.3.3 Conséquences de l'hypertrophie cardiaque.....	15
1.4 Traitements anti-hypertenseurs	16
1.4.1 Les diurétiques	17
1.4.2 Les antagonistes β -adrénergiques	17
1.4.3 Les bloqueurs des canaux calciques.....	19
1.4.4 Les inhibiteurs de l'enzyme de conversion.....	20
1.4.5 Les antagonistes des récepteurs AT1	21
1.5 Étude LIFE	23
1.5.1 Les buts de l'étude	23
1.5.2 Les participants et les points-limites	24
1.5.3 Les résultats.....	25
1.5.4 La sous-étude LIFE	29
1.6 Modèle de rat afin de reproduire les conditions clés de l'étude LIFE	30
1.6.1 Le monoxyde d'azote et la pression artérielle.....	30
1.6.2 Le L-NAME, un inhibiteur de la monoxyde d'azote synthase	32

1.6.3 Le modèle de rat SHR recevant du L-NAME.....	34
Chapitre 2 But et Hypothèses	37
Chapitre 3 Méthodologie	38
3.1 Animaux et traitements	38
3.2 Histologie.....	39
3.3 Mesures du nombre de cellules musculaires lisses aortiques.....	41
3.4 Mesures des paramètres hémodynamiques	41
3.5 Propriétés mécaniques de l'artère cérébrale moyenne.....	42
3.6 Statistiques	42
Chapitre 4 Résultats.....	43
4.1 L-NAME increases cerebral vascular micro-infarcts prior to stroke in SHR: enhanced protection with losartan versus atenolol.....	43
4.1.1 Abstract	44
4.1.2 Introduction.....	46
4.1.3 Methods.....	48
4.1.4 Results	52
4.1.5 Discussion	55
4.1.6 References	59
4.2 Résultats préliminaires.....	71
Chapitre 5 Discussion	73
Chapitre 6 Conclusion	82
Chapitre 7 Bibliographie	83

Liste des tableaux

Chapitre 4. Résultats

Table I Morphometric quantification in the aortic media of SHR receiving L-NAME (20mg/kg/d) for a period of 2 to 5 weeks and a period of 2 weeks	70
Tableau I Paramètres hémodynamiques des SHR recevant du L-NAME (20mg/kg/d), propriétés mécaniques de l'artère cérébrale moyenne et nombre de micro-thrombi cérébraux.....	72

Liste des figures

Chapitre 1. Introduction

Figure 1.1 Schéma des deux principaux systèmes régulant la pression artérielle	3
Figure 1.2 Représentation schématique des différents types d'AVC	7
Figure 1.3 Représentation schématique des quatre causes principales de l'HVG.....	12
Figure 1.4 Représentation schématique du remodelage cardiaque.....	14
Figure 1.5 Structure chimique de l'atenolol	18
Figure 1.6 Structure chimique du losartan et de ses métabolites	22
Figure 1.7 Pression artérielle des patients tout au long de l'étude LIFE	24
Figure 1.8 Points-limites primaires et évènements d'AVC au cours de l'étude LIFE	27
Figure 1.9 Pourcentage d'HVG chez les patients de l'étude LIFE	27
Figure 1.10 Représentation schématique de la production du monoxyde d'azote	31
Figure 1.11 Structure chimique du L-NAME	33

Chapitre 4. Résultats

Figure 1 Systolic blood pressure in SHR control and SHR receiving L-NAME (20 mg/kg/d) at week 0 and 2 of the study.....	63
Figure 2 LVH in SHR receiving L-NAME (20 mg/kg/d)	64
Figure 3 Percentage of cardiac area showing myocardial infarctions in SHR receiving L-NAME for 2 weeks (20mg/kg/d).....	65
Figure 4 Percentage of stroke events in SHR receiving L-NAME (20 mg/kg/d) for a period of 2 to 5 weeks.....	66
Figure 5 Kaplan Meier stroke event curves in SHR receiving L-NAME (20 mg/kg/d)	67
Figure 6 Cerebral damage measure: co-localisation of cerebral micro-infarcts and antithrombin III	68
Figure 7 Cerebral micro-infarcts in SHR receiving L-NAME (20mg/kg/d)	69

Liste des abréviations

- ACE : enzyme de conversion de l'angiotensine
ADN : acide désoxyribonucléique
ARA : antagoniste des récepteurs AT1 de l'angiotensine II
ARN : acide ribonucléique
AVC : accident vasculaire cérébral
bpm : battements cardiaques par minute
COX : cyclooxygénase
eNOS : monoxyde d'azote synthase endothéliale
GMPc : 3'5'-guanosine monophosphate cyclique
HSI : hypertension systolique isolée
HVG: hypertrophie ventriculaire gauche
IL-1 β : interleukin-1 β
iNOS : monoxyde d'azote synthase inductible
i.m.: intra-musculaire
i.p.: intra-péritonéale
LIFE: Losartan Intervention For Endpoint reduction in hypertension
L-NAME: N^G-nitro-L-arginine-méthylester
L-NMMA: N^G-monométhyle-L-arginine
L-NNA: N^G-nitro-L-arginine
NADPH: nicotinamide adénine dinucléotide phosphate
NF- κ B : nuclear factor- κ B
nNOS: monoxyde d'azote synthase neuronale
NO: monoxyde d'azote
NOS: monoxyde d'azote synthase
PBS : tampon phosphate
p.o. : per os

ROS: reactive oxygen species

SHR: rat spontanément hypertendu

SHRSP: rat spontanément hypertendu stroke-prone

TNF- α : tumor necrosis factor- α

*À tous ceux qui m'ont appuyée au cours de
mes études.*

Remerciements

En premier lieu, je voudrais remercier mon directeur de recherche, Docteur Denis deBlois, pour m'avoir permis d'étudier et d'évoluer dans son laboratoire. Dr deBlois m'a guidée avec intelligence au cours de mes études et mes recherches de maîtrise. Il a été pour moi d'une aide précieuse. Je voudrais aussi remercier mon co-directeur de recherche, Docteur Pierre Moreau, pour m'avoir accueillie dans son laboratoire le temps de quelques expériences et pour m'avoir aidée dans mes recherches.

Ensuite, je souhaite remercier tous les membres du laboratoire du Docteur deBlois qui m'ont appuyée dans la réalisation de mon projet de recherche. Merci plus particulièrement à Taben, Annik, David, Khadija et Caroline pour m'avoir enseigné énormément de choses ou tout simplement écoutée et conseillée.

J'aimerais également remercier ma famille qui m'a supportée tout au long de mes études. Ma mère, mon père, mon frère et ma sœur ont su m'encourager, tous à leur manière, dans les moments les plus difficiles. Je vous dois ma réussite.

Finalement, je voudrais remercier mon copain Matthieu pour tout le support qu'il m'a offert durant ma maîtrise. Il a su me transmettre sa persévérance et son amour pour la science. Merci de m'avoir poussée à me surpasser.

ACCORDS DES COAUTEURS

A) Déclaration des coauteurs d'un article

1. Identification de l'étudiant et du programme

Stéphanie Pesant (Code Permanent : [REDACTED])
2-520-1-0 Pharmacologie (M.Sc.)

2. Description de l'article

**Stéphanie Pesant, Taben Hale, David Duguay, Luis Robles Bokun,
Pierre Moreau and Denis deBlois (2006)**

L-NAME increases cerebral vascular micro-infarcts prior to stroke in SHR:
enhanced protection with losartan versus atenolol. *Stroke*. (Soumis)

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

À titre de coauteur de l'article identifié ci-dessus, je suis d'accord pour que Stéphanie Pesant inclus cet article dans son mémoire de maîtrise qui a pour titre « Protection des organes cibles dans l'hypertension à l'aide d'un antagoniste des récepteurs AT1 (losartan) versus un beta-bloqueur (atenolol) »

Taben Hale
Coauteur

[REDACTED]
Signature

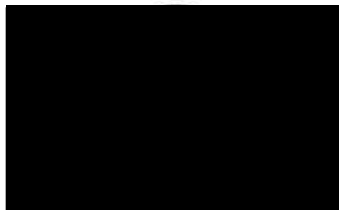
10/01/2006
Date

David Duguay
Coauteur

[REDACTED]
Signature

10/01/2006
Date

Luis Robles Bokun
Coauteur



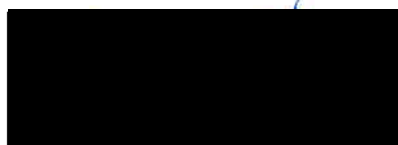
10/01/2006
Date

Pierre Moreau
Coauteur



10/01/2006
Date

Denis deBlois
Coauteur



10/01/2006
Date

Signature

AUTORISATION DE L'ÉDITEUR

B) Permission de l'éditeur de la revue

1. Identification de la revue

Stroke

2. Identification de l'éditeur

Lippincott Williams & Wilkins

3. Identification de l'article

**Stéphanie Pesant, Taben Hale, David Duguay, Luis Robles Bokun,
Pierre Moreau and Denis deBlois**

L-NAME increases cerebral vascular micro-infarcts prior to stroke in SHR:
enhanced protection with losartan versus atenolol.

L'autorisation de l'éditeur sera donnée lors de l'acceptation de l'article.

IMPLICATION DES COAUTEURS

- Taben Hale : Implication dans les manipulations et chirurgies animales;
- David Duguay : Implication dans les manipulations et chirurgies animales;
- Luis Robles Bokun : Implication dans le comptage des infarctus du myocarde;
- Pierre Moreau : Co-directeur de recherche;
- Denis deBlois : Directeur de recherche.

Chapitre 1

Introduction

L'hypertension artérielle est un facteur de risque majeur dans la mortalité et la morbidité cardiovasculaire. Il a récemment été démontré dans l'étude LIFE (Losartan Intervention For Endpoint reduction in hypertension) que, pour un effet anti-hypertenseur équivalent, le losartan, un antagoniste des récepteurs AT1 de l'angiotensine II, est supérieur à l'atenolol, un β -bloqueur, dans la réduction de l'hypertrophie ventriculaire gauche et des accidents vasculaires cérébraux. De plus, dans une sous-étude de l'étude LIFE les patients souffrant d'hypertension systolique isolée ont bénéficié d'une augmentation de la protection cardiovasculaire avec le losartan, comparativement à l'atenolol. Toutefois, les mécanismes de ces observations cliniques sont très peu connus.

Afin d'étudier ces mécanismes, nous utiliserons un modèle de rat spontanément hypertendu (SHR) recevant un inhibiteur de la monoxyde d'azote synthase (NOS), le L-NAME. L'administration chronique de L-NAME aux SHR cause le remodelage vasculaire, altère la vasomotricité dans les petites artères et provoque des dommages cérébraux. Ce modèle montre en quelques semaines des complications sévères telles le développement de l'hypertrophie cardiaque ainsi qu'une augmentation de l'incidence des accidents vasculaires cérébraux.

Notre étude vise donc à élucider les mécanismes responsables de cette protection, soit la réduction de l'hypertrophie ventriculaire gauche et de l'incidence des accidents vasculaires cérébraux, dans un modèle de rat traité au losartan, comparativement à l'atenolol.

1.1 L'hypertension artérielle

1.1.1 Définition

L'hypertension artérielle est une maladie chronique très répandue dans le monde qui mène souvent à des complications cardiovasculaires. Dans les pays industrialisés, l'hypertension affecte de 25 à 35% des adultes. La pression artérielle se définit par la pression exercée par le sang contre les parois des artères. Elle est directement proportionnelle au produit du débit cardiaque et de la résistance vasculaire périphérique. Par convention, l'hypertension artérielle correspond à une pression artérielle soutenue égale ou supérieure à 140/90 mmHg. Plus de 90% des patients hypertendus souffrent d'hypertension dite essentielle. Cette forme d'hypertension survient sans cause connue. L'hypertension systolique isolée (HSI) quant à elle se manifeste principalement chez les personnes de 60 ans et plus et correspond à une pression systolique égale ou supérieure à 140 mmHg, mais à une pression diastolique inférieure à 90 mmHg. Le développement de l'HSI apparaît donc avec l'âge et s'explique par une augmentation de la rigidité des grosses artères (van Zwieten, 2001; Staessen, 2003).

L'élévation de la pression artérielle est habituellement causée par une combinaison d'anormalités. Des études épidémiologiques ont démontré que l'hypertension artérielle avait pour facteurs de risque la génétique, le stress, la sédentarité, certains facteurs environnementaux et l'alimentation. De plus, la pression systolique augmente avec l'âge. Le mode de vie occidental contribue à environ 80% des cas d'hypertension artérielle; le surplus de poids, le stress, l'inactivité physique, la consommation élevée d'alcool ainsi que la diète riche en sel, en gras saturé, en sucre et pauvre en fruits et légumes sont tous des facteurs de risque modifiables de l'hypertension artérielle (Beilin, 2004). La génétique influence la pression artérielle, toutefois, les gènes impliqués sont encore très peu connus de nos jours. L'étude de familles hypertensives permet de dire que la génétique peut provoquer une hypertension modérée à sévère. Il faut cependant tenir compte de l'interaction entre les facteurs génétiques et environnementaux (Vikrant, 2001).

1.1.2 Régulation de la pression artérielle

La pression artérielle est régulée par deux principaux systèmes qui se chevauchent : les baroréflexes contrôlés par le système nerveux sympathique et le rein en partie via le système rénine-angiotensine-aldostérone. (Figure 1.1)

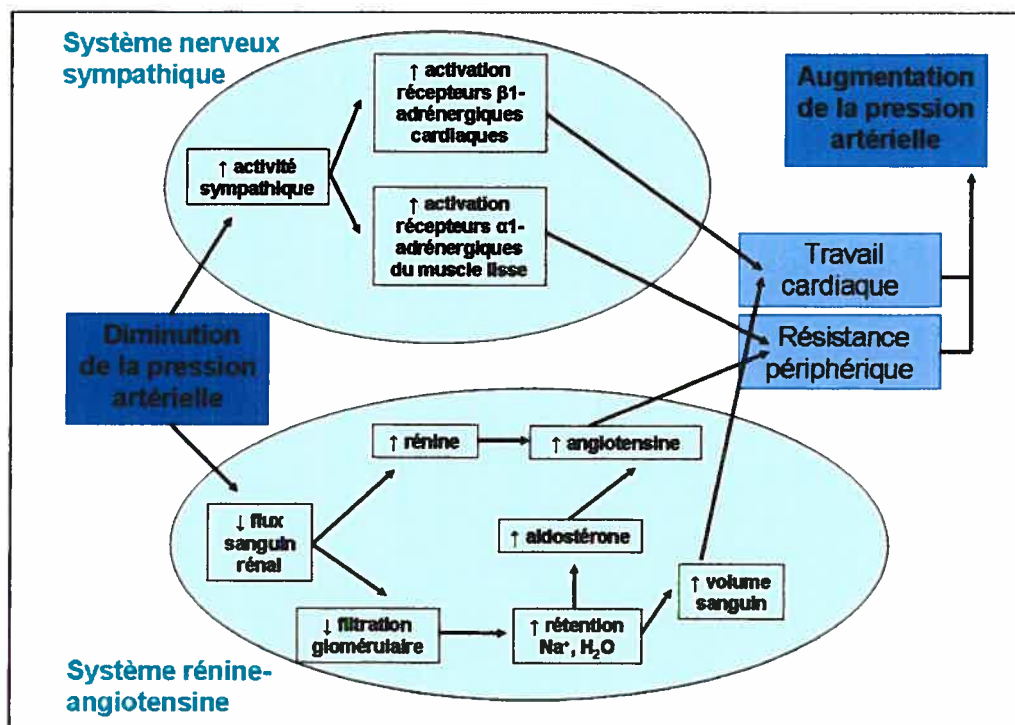


Figure 1.1 Schéma des deux principaux systèmes régulant la pression artérielle. Le système nerveux sympathique et le système rénine-angiotensine se chevauchent dans la régulation de la pression artérielle.

Le système nerveux sympathique est responsable de la régulation rapide de la pression artérielle. Une diminution soudaine de la pression sanguine est détectée par les

baroréflexes du système nerveux sympathique, situés dans l'aorte et les carotides, provoquant alors une activation neuronale qui augmente l'influx sympathique et diminue l'influx parasympathique. Ces changements d'influx nerveux se transigent principalement via les récepteurs β_1 -adrénergiques cardiaques et les récepteurs α_1 -adrénergiques des vaisseaux sanguins. L'activation des baroréflexes provoque donc une augmentation de la contractilité et du débit cardiaque ainsi qu'une vasoconstriction artérielle, ce qui entraîne une augmentation compensatoire de la pression artérielle. Le système rénine-angiotensine-aldostérone quant à lui est responsable du contrôle à long terme de la pression artérielle en modifiant le volume sanguin. La réduction de la pression artérielle est initiée par la relâche de la rénine des cellules juxtaglomérulaires du rein. Les principaux stimuli provoquant la relâche de la rénine sont la diminution du flux sanguin rénal, l'excès de sodium dans le tubule distal rénal et la stimulation directe du système sympathique via les récepteurs β_1 -adrénergiques situés dans l'appareil juxtaglomérulaire du rein. La rénine convertit alors l'angiotensinogène en angiotensine I qui est à son tour clivée par l'enzyme de conversion de l'angiotensine (ACE) afin de libérer l'angiotensine II. L'angiotensine II est un puissant vasoconstricteur et altère la balance de sel et d'eau en stimulant la libération de l'aldostérone. Finalement, cette dernière agit au niveau du tubule distal rénal en augmentant la rétention d'eau et de sel au dépend d'une perte de potassium. L'angiotensine II et l'aldostérone provoquent ensemble une vasoconstriction et une augmentation du volume sanguin, ce qui augmente la pression artérielle (Katzung, 2001).

D'autres médiateurs peptidiques engendrent un changement de la pression artérielle. En effet, les peptides natriurétiques de l'oreillette (ANP), du cerveau (BNP) et de type C (CNP), appartiennent à une famille de polypeptides endogènes possédant des effets anti-hypertenseurs. Les peptides ANP et BNP sont générés lors d'augmentation de pression artérielle par les cardiomyocytes de l'oreillette et des ventricules respectivement (deBold, 1985; Luchner, 1998). Les récepteurs de l'ANP et du BNP sont couplés à la guanylate cyclase et, lorsque activés, génèrent du GMPc (le récepteur de CNP quant à lui ne possède pas de domaine intracellulaire et ne génère donc pas de GMPc). Cette augmentation de

GMPc entraîne une réduction du calcium intracellulaire ainsi qu'une activation des kinases dépendantes du GMPc. Ces kinases provoquent la phosphorylation de la chaîne légère de myosine et, par le fait même, une relaxation des cellules musculaires lisses (Brenner, 1990) provoquant ainsi une diminution de la pression artérielle. L'ANP et le BNP sont donc des antagonistes fonctionnels du système rénine-angiotensine en provoquant son inhibition, en augmentant la diurèse et en réduisant la pression artérielle (Mukoyama, 1991; Awazu, 1993).

1.1.3 Conséquences de l'hypertension

L'hypertension artérielle est un facteur de risque important des maladies cardiovasculaires, incluant les accidents vasculaires cérébraux et les maladies rénales (Vikrant, 2001). En effet, l'hypertension cause des lésions vasculaires et des dommages aux organes cibles. L'énumération exhaustive des complications est longue : hémorragies intracérébrales et subarachnoïdes, accidents vasculaires cérébraux thrombotiques, maladies cardiaques ischémiques, insuffisance cardiaque, arythmie, mort subite, insuffisance rénale, anévrisme aortique, maladies vasculaires périphériques, etc. Cependant, les principales complications de l'hypertension artérielle sont les maladies cardiaques ischémiques, qui sont deux fois plus fréquentes chez les hypertendus que les normo-tendus, et les accidents vasculaires cérébraux. Ces conséquences sont encore plus fréquentes si l'hypertension est accompagnée d'hypercholestérolémie et de tabagisme.

1.2 Accident vasculaire cérébral

1.2.1 Définition

Les accidents vasculaires cérébraux (AVC) sont la troisième cause de mortalité au monde, après l'infarctus du myocarde et le cancer. Chaque année, 30,9 millions d'individus

subissent un AVC mondialement. Un AVC survient à toutes les 53 secondes et un décès suite à un AVC survient à toutes les 3,1 minutes. Le plus gros fardeau de cette maladie, à part la mort, est assurément le taux élevé de dysfonction physique et mentale.

La définition simplifiée d'un AVC est une soudaine interruption du flux sanguin dans une partie du cerveau. Cet arrêt de la circulation sanguine est causé soit par un blocage d'une artère cérébrale ou par l'éclatement d'un vaisseau cérébral provoquant une hémorragie dans le cerveau (Warlow, 2003).

Les facteurs de risque des AVC sont nombreux, compte tenu de l'hétérogénéité de la pathologie. Certains facteurs de risque sont dus à une condition médicale telle l'hypertension artérielle, les accidents ischémiques transitoires, le diabète et les maladies cardiovasculaires comme par exemple la fibrillation auriculaire. D'autres facteurs de risque sont contrôlables et sont des choix de vie; le tabagisme, l'obésité, l'hypercholestérolémie, l'inactivité physique, l'excès d'alcool et les drogues. Finalement, certains facteurs de risque ne sont pas modifiables; l'âge, le sexe, l'hérédité et l'ethnicité. Bien que très complexe, le facteur génétique de cette pathologie est connu depuis le début des années 1990. Plus récemment, le groupe de Dominiczak et coll. a associé le gène PDE4D aux AVC (Dominiczak, 2003).

Toutefois, le facteur de risque modifiable le plus important menant aux AVC est l'hypertension artérielle. Plusieurs évidences montrent qu'une hypertension prolongée augmente sensiblement le risque d'AVC fatals et non-fatals. En effet, l'hypertension jouerait un rôle dans environ 70% des cas d'AVC. Plusieurs analyses observationnelles ont révélé que le risque de développer un AVC était positivement associé à la pression artérielle à partir de 115 mmHg de pression systolique et de 70 mmHg de pression diastolique. Il a été prouvé que réduire la pression artérielle chez les patients hypertendus permet de diminuer de 35 à 45% le risque d'AVC ischémiques et hémorragiques. Cependant, la pression systolique est un facteur de risque plus sensible que la pression diastolique (Mancia, 2004).

1.2.2 Types d'AVC

Il existe deux types pathologiques d'AVC : ischémique et hémorragique. Le principal type d'AVC est le type ischémique qui représente environ 80% des cas. Les AVC ischémiques sont divisés en quatre catégories : les AVC thrombotiques, emboliques, lacunaires et les autres types d'AVC ischémiques. Quant aux AVC hémorragiques, ils comptent pour environ 20% des cas et sont divisés en deux catégories : les AVC intracérébraux et subarachnoïdes (Dominiczak, 2003; Warlow, 2003). (Figure 1.2)

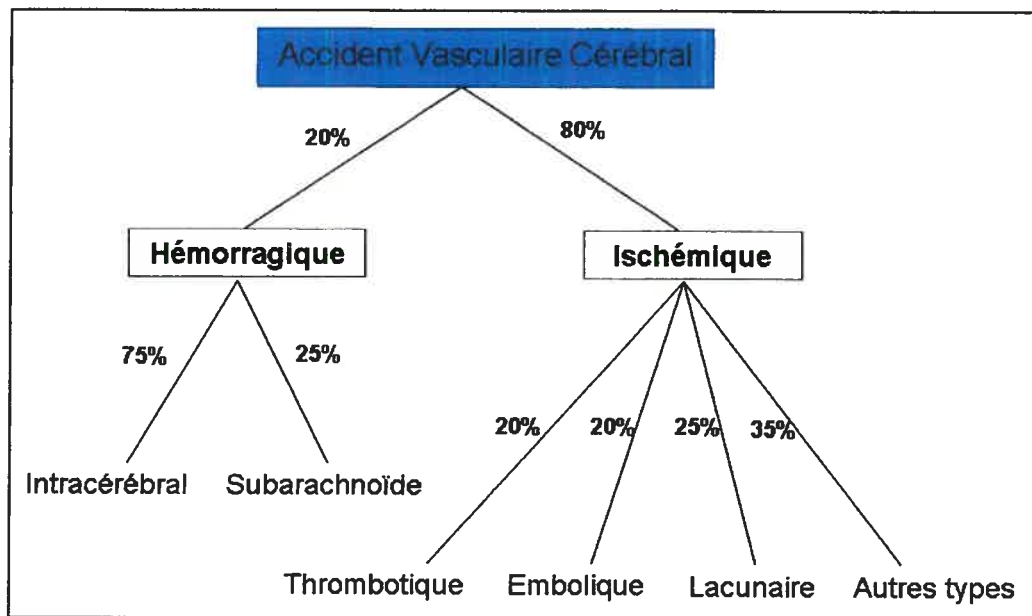


Figure 1.2 Représentation schématique des différents types d'AVC. Les deux types pathologiques d'AVC sont l'AVC hémorragique et ischémique.

Les AVC ischémiques sont causés par le blocage d'une artère cérébrale principale. Il se produit alors une hypoperfusion, une hypoxie et les neurones privés de sang et

d'oxygène meurent après quelques minutes. Ce blocage est le résultat de différentes maladies, dont la fibrillation auriculaire et l'athérosclérose entre autres. Les AVC ischémiques sont subdivisés selon la cause ou le lieu du blocage. Les AVC thrombotiques et emboliques surviennent dans environ 20% chacun des cas d'AVC ischémiques. L'athérosclérose est un dépôt graduel de cholestérol dans les artères cérébrales, qui mène à la formation d'une plaque athéromateuse et diminue alors la lumière du vaisseau. De plus, la présence de cette plaque crée un tourbillon de flux sanguin dans la région de la sténose. Cette turbulence peut causer la rupture de la plaque et l'activation de la coagulation sanguine. Un caillot sanguin est alors en mesure de bloquer l'artère cérébrale dans laquelle la plaque a été formée (thrombose) ou bien se détacher d'une paroi vasculaire en dehors du cerveau pour ensuite bloquer une artère près du cerveau (embolie). La moitié des AVC emboliques sont causés par la fibrillation auriculaire tandis que le reste des cas sont causés par différentes pathologies comme par exemple la dysfonction ventriculaire gauche suite à un infarctus du myocarde ou à une insuffisance cardiaque. Ces caillots proviennent donc, le plus souvent, d'une lésion athérosclérotique de l'arche aortique, d'une artère carotide ou d'une artère vertébrale (Warlow, 2003). Les AVC lacunaires quant à eux, aussi appelés lésions des petits vaisseaux, se manifestent dans environ 25% des cas d'AVC ischémiques. Ce type d'AVC touche les petites artères cérébrales pénétrantes sans embranchement qui proviennent directement de grosses artères cérébrales (artère cérébrale moyenne, artère cérébrale antérieure, artère cérébrale postérieure, artère basilaire, etc.) et qui ont habituellement un diamètre plus petit que 500 μm . La taille des infarctus lacunaires est donc très petite, soit de 2 à 20 mm de diamètre. La petite taille de ces artères et leur position proximale les prédisposent au développement de micro-athéromes et de lipohyalinoses. Le mécanisme le plus fréquent est sans doute celui des micro-athéromes qui occluent l'orifice d'une petite artère cérébrale pénétrante. Ce phénomène est similaire pathologiquement aux AVC ischémiques se produisant dans les plus grosses artères cérébrales. Le second mécanisme, la lipohyalinose, se produit lorsque qu'une artère cérébrale subie des lésions vasculaires destructives caractérisées par la perte de son

architecture normale bien souvent en présence d'hypertension et de diabète. La pression élevée cause des dommages aux cellules endothéliales, ce qui entraîne par la suite une augmentation de la perméabilité de la barrière hémato-encéphalique. Cette atteinte permet la fuite de certaines substances toxiques dans le tissu périvasculaire. Les cellules vasculaires endommagées sont remplacées par des fibres de collagène qui diminuent l'élasticité du vaisseau sanguin et réduisent sa lumière. Cette sténose du vaisseau active alors la cascade de coagulation et mène ultérieurement à une thrombose (Lammie, 2000; Wardlaw, 2005). Finalement, 35% des AVC ischémiques sont causés par d'autres pathologies moins fréquentes telles les coagulopathies, les vasculites, les thromboses veineuses, etc.

Les AVC hémorragiques sont divisés en deux catégories selon le lieu de l'hémorragie; les AVC hémorragiques intracérébraux et subarachnoïdes. L'AVC hémorragique intracérébral survient lorsque un vaisseau sanguin cérébral endommagé éclate, ce qui provoque une hémorragie à l'intérieur du cerveau. Le sang répandu dans le cerveau provoque une soudaine augmentation de la pression et endommage les cellules cérébrales environnantes. Ce type d'AVC survient normalement dans des parties très sélectives du cerveau (ganglions de la base, cervelet, cortex). La cause principale de cette hémorragie cérébrale est l'hypertension artérielle. D'autres causes moins fréquentes existent telles les traumatismes, les infections, les tumeurs et les anomalies des vaisseaux sanguins. L'AVC hémorragique subarachnoïde, moins fréquent, survient dans seulement environ 25% des cas d'AVC hémorragiques. Il se manifeste lorsqu'il y a rupture d'un vaisseau sanguin autour du cerveau. L'espace subarachnoïde se remplit alors de sang, causant ainsi une énorme pression sur le cerveau. Ce type d'AVC est causé principalement par une anomalie des artères cérébrales, situées à la base du cerveau, couramment appelée anévrisme cérébral et caractérisée par une dilatation anormale de la paroi d'une artère cérébrale. Sous la pression sanguine, la paroi s'amincit, se dilate et forme une poche remplie de sang qui peut éclater et provoquer ce type d'AVC. La cause des anévrismes n'est pas vraiment connue; ceux-ci pourraient apparaître durant l'enfance et grossir petit à

petit. Toutefois, l'hypertension artérielle et l'angiopathie amyloïde auraient un rôle à jouer dans ce type de pathologie. Les conséquences de ce types d'AVC sont proportionnelles au volume sanguin; une hémorragie de plus de 60 ml de sang est bien souvent fatale, peu importe sa localisation (Warlow, 2003).

1.2.3 Conséquences des AVC

Les conséquences des AVC chez les patients sont nombreuses et dévastatrices. Les AVC sont responsables de la mort de quatre millions de personnes par année mondialement. Quant aux survivants d'un AVC, ils subissent bien souvent des handicaps physiques, des dépressions et des dysfonctions cognitives qui affectent le fonctionnement de leur vie quotidienne ainsi que leur qualité de vie. Plusieurs patients ayant subi un AVC développent au moins un de ces problèmes : dépression, troubles de la vision, paralysie d'un ou plusieurs membres, dysphasie, déficit moteur, ataxie, etc. L'incidence de dépression suite à un AVC est très élevée, soit de 18 à 50%. De plus, ceux qui survivent à un premier AVC ont beaucoup plus de chance d'en subir un deuxième (une chance sur six) (Mancia, 2004).

Puisque les traitements disponibles suite à un évènement d'AVC sont rares et peu efficaces, il est primordial de concentrer nos efforts sur la prévention des AVC. La prévention primaire consiste à identifier et modifier les facteurs de risque menant aux AVC dans le but de réduire la morbidité et la mortalité liées à cette maladie. L'optimisation du mode de vie des patients est nécessaire. La perte de poids, la restriction à l'alcool, l'activité physique régulière et l'arrêt du tabagisme sont tous des changements qui devraient être fortement encouragés. Les antihypertenseurs, les statines, les thérapies anti-plaquettaires sont tous des traitements pharmacologiques qui diminuent le risque relatif d'AVC. Évidemment, le contrôle de la pression artérielle est capital puisque l'hypertension est le facteur de risque le plus important. Le bénéfice relatif d'une diminution d'un mmHg est le même quelle que soit la pression artérielle de départ. De plus, les bénéfices des traitements

anti-hypertenseurs sur l'apparition des AVC se font sentir très rapidement, c'est-à-dire dans les trois années suivant le début de la thérapie. Il est donc impératif de traiter l'hypertension artérielle et d'atteindre la pression cible, en dessous de 140/90 mmHg, pour prévenir les évènements d'AVC (Ezekowitz, 2003).

1.3 Hypertrophie cardiaque

1.3.1 Définition

L'hypertrophie ventriculaire gauche (HVG) est la réponse du cœur à une multitude de stimuli biomécaniques, hémodynamiques et hormonaux. Le cœur s'adapte physiologiquement à une augmentation de la demande et du travail en augmentant sa masse par l'initiation d'une réponse hypertrophique. L'hypertrophie cardiaque est donc une balance entre des caractéristiques adaptatives et des changements biochimiques et structuraux qui peuvent s'avérer délétères. Ce phénomène adaptatif peut être approprié pour maintenir temporairement les fonctions du cœur, mais la capacité à maintenir de telles performances sera dépassée ultérieurement. Cette augmentation de la masse cardiaque survient en réponse à une augmentation de la charge cardiaque provoquée soit par une surcharge de volume ou une surcharge de pression. De façon plus détaillée, une augmentation du stress sur la paroi ventriculaire gauche stimule l'hypertrophie des cardiomyocytes ainsi que la formation de collagène et de fibroblastes; des changements géométriques, structuraux et de composition se produisent. Le cœur hypertrophié est donc disproportionné comparativement au cœur normal, puisqu'il y a une augmentation du tissu fibreux par rapport au tissu myocardique. De plus, des neurohormones telles l'angiotensine II, l'aldostérone, l'endothéline-1 et la noradrénaline sont fréquemment recrutées suite à l'augmentation de la charge cardiaque. Ces molécules initient alors des signaux potentiellement toxiques pour le cœur (de Simone, 2002; Pokharel, 2003).

À la base, l'hypertrophie cardiaque reflète l'adaptation physiologique du cœur face à une augmentation du travail demandé suite à une activité physique intense. Toutefois, l'HVG décrit souvent une condition pathologique en réponse à des stimuli intrinsèques (cardiomyopathie) ou extrinsèques (hypertension). L'hypertrophie cardiaque peut aussi être le résultat du remodelage suivant un infarctus du myocarde. (Figure 1.3)

La principale cause mécanique de l'hypertrophie cardiaque est l'augmentation de la tension sur la paroi ventriculaire gauche. La pression artérielle est le plus puissant déterminant de la masse du ventricule gauche; un tiers à un demi des patients hypertendus développent de l'hypertrophie cardiaque. Toutefois, plusieurs autres facteurs de risque hémodynamiques et non-hémodynamiques jouent un rôle important dans l'initiation et le maintien de l'HVG. La pression sanguine, la surcharge de volume sanguin, la structure artérielle et la viscosité sanguine sont tous des facteurs hémodynamiques entraînant l'HVG. Les facteurs non-hémodynamiques importants dans le développement de l'hypertrophie cardiaque sont l'influence du système nerveux sympathique et du système rénine-angiotensine ainsi que certains facteurs génétiques. Le rôle du système nerveux sympathique dans l'HVG est basé sur le fait que la noradrénaline induit l'hypertrophie des cardiomyocytes. De plus, de récentes études ont démontré une augmentation de l'HVG suite à une activation du système nerveux sympathique cardiaque. Quant au système rénine-angiotensine, l'aldostérone et l'angiotensine II sont fortement liées au développement de l'HVG. En effet, l'angiotensine II est reconnue pour promouvoir la croissance des cardiomyocytes et l'aldostérone, pour augmenter le contenu en collagène et stimuler la croissance des fibroblastes.

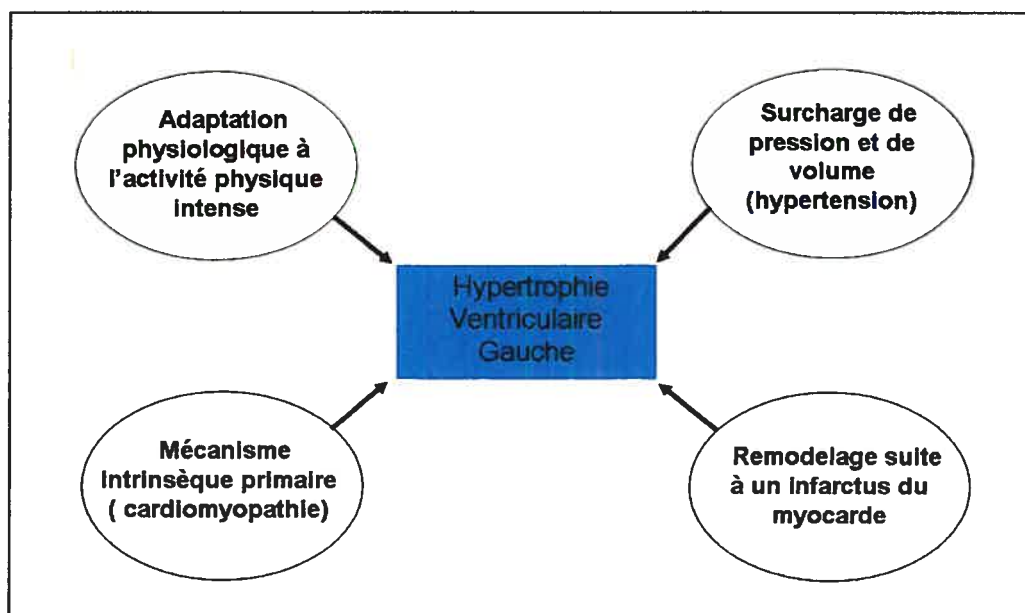


Figure 1.3 Représentation schématisée des quatre causes principales de l'HVG. L'HVG est principalement dû à l'adaptation physiologique, la surcharge de pression, le remodelage ou certaines pathologies.

Finalement, les déterminants démographiques tels que l'âge, le sexe, la race, l'obésité et l'alcool jouent tous un rôle dans le développement de l'hypertrophie cardiaque. La prévalence de l'HVG augmente graduellement avec l'âge et est plus prépondérante chez les hommes que chez les femmes; démontrant le rôle génétique et hormonal dans cette pathologie. En résumé, des influences génétiques ou non ont des répercussions sur des facteurs hémodynamiques et non-hémodynamiques qui provoquent par la suite une stimulation de la synthèse de protéines, qui à leur tour engendrent le développement de l'hypertrophie cardiaque (Kahan, 2005).

1.3.2 Types d'hypertrophie cardiaque

Il existe deux types d'hypertrophie ventriculaire gauche; l'hypertrophie eccentric et concentrique. (Figure 1.4) La relation entre la surcharge de pression et de volume influence le type d'HVG. Lorsque le stimulus principal est une surcharge de volume, il y a alors une augmentation de la pression diastolique et de la tension pariétale. L'assemblage des protéines contractiles se produit alors en série, ce qui résulte en une plus grande augmentation de la longueur que de la largeur des cardiomyocytes. L'hypertrophie eccentric est donc caractérisée par une augmentation de la masse cardiaque, mais d'une épaisseur des parois ventriculaires normale. Lorsque le stimulus principal est une surcharge de pression, l'HVG est reliée à l'augmentation de la pression systolique et de la pression pulsée. L'assemblage des protéines contractiles en parallèle mène alors à l'hypertrophie concentrique, qui est déterminée par une augmentation de la largeur des cardiomyocytes. Ce type hypertrophie est caractérisé par une augmentation de la masse cardiaque et de l'épaisseur des parois ventriculaires. Toutefois, une surcharge de pression peut également provoquer l'eutrophie concentrique du cœur. Ce type de remodelage cardiaque est caractérisé par une diminution de la chambre ventriculaire, une augmentation de l'épaisseur des parois ventriculaires, mais sans changement de la masse cardiaque. Ce type de remodelage a été observé dans certains modèles animaux (Matsubara, 1998; Girardot, 2004) ainsi que chez des patients hypertendus (Bugra, 1998). L'eutrophie concentrique est associé à un meilleur pronostic que l'hypertrophie concentrique ou eccentric (Koren, 1991). (Figure 1.4) L'hypertrophie concentrique est associée à une pression artérielle élevée tandis que l'hypertrophie eccentric, à l'obésité et à une surcharge de volume. De plus, il a été démontré que l'hypertrophie cardiaque concentrique est associée plus fortement aux risques d'évènements cardiovasculaires, que l'hypertrophie eccentric (Jennings, 2002; London, 2003).

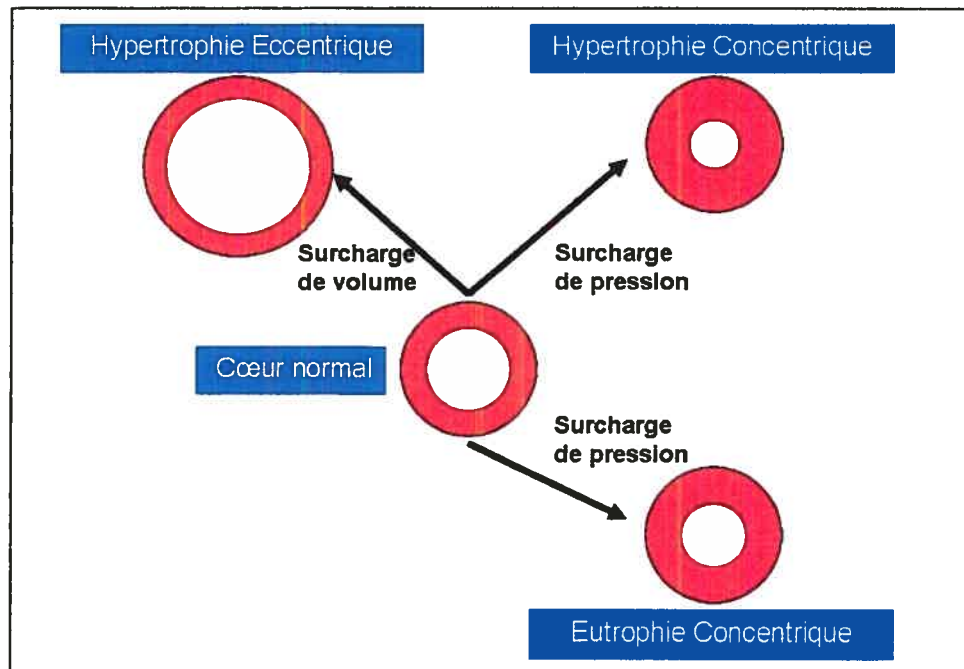


Figure 1.4 Représentation schématique du remodelage cardiaque. L'hypertrophie eccentric est due à la surcharge de volume, tandis que l'hypertrophie concentrique et l'eutrophie concentrique, à la surcharge de pression.

1.3.3 Conséquences de l'hypertrophie cardiaque

L'hypertrophie cardiaque est un facteur de risque indépendant très important dans la morbidité et la mortalité cardiovasculaire ainsi que la mortalité en général, toutes causes confondues. La présence d'HVG augmente de deux à trois fois le risque de subir un évènement cardiovasculaire fatal ou non-fatal tel l'insuffisance cardiaque, les maladies cardiovasculaires, la fibrillation auriculaire, les arythmies ventriculaires et sub-ventriculaires et les accidents vasculaires cérébraux.

1.4 Traitements anti-hypertenseurs

Étant donné que l'HVG est un puissant facteur de risque pour les maladies cardiovasculaires, il est nécessaire de traiter cette condition clinique. Plusieurs agents thérapeutiques ont démontré leur efficacité à entraîner une régression de l'HVG chez les patients hypertendus. Les traitements anti-hypertenseurs réduisent la surcharge hémodynamique du cœur, afin de prévenir et réduire le remodelage cardiaque. Toutefois, les anti-hypertenseurs ne diminuent pas tous l'HVG de façon similaire. Les vasodilatateurs et les diurétiques ont démontré une certaine régression de l'HVG, cependant celle-ci n'est que de l'ordre que de 7% de réduction de la masse ventriculaire gauche. Cette faible réduction est probablement due au fait que les neurohormones joueraient un rôle important dans l'hypertrophie cardiaque. L'observation de l'effet des inhibiteurs de l'enzyme de conversion de l'angiotensine II et des antagonistes du récepteur AT1 de l'angiotensine II sur l'hypertrophie cardiaque supporterait cette hypothèse, puisque ceux-ci seraient plus efficaces à réduire l'HVG que les autres classes d'anti-hypertenseurs. Ils diminueraient d'environ 13% la masse ventriculaire gauche (Pitt, 1998; Pokharel, 2003).

L'objectif principal du traitement de l'hypertension artérielle est la diminution des risques de complications cardiovasculaires qui y sont liés afin de prolonger l'espérance de vie et d'améliorer la qualité de vie. Le fait de réduire la pression systolique de seulement 10 mmHg et la pression diastolique de seulement cinq mmHg diminue grandement le risque d'évènements cardiovasculaires (McInnes, 2005). À ce jour, plusieurs traitements pharmacologiques existent pour traiter l'hypertension. Les diurétiques, les bloqueurs des canaux calciques, les inhibiteurs de l'enzyme de conversion, les antagonistes β -adrénergiques et les antagonistes des récepteurs AT1 sont tous des classes d'agents pharmacologiques efficaces et couramment utilisées dans le traitement de l'hypertension artérielle. Une brève description des mécanismes d'action de ces différentes classes d'anti-

hypertenseurs est présentée dans cette section, en apportant plus de précision sur les deux classes d'agents anti-hypertenseurs utilisées dans cette étude (Staessen, 2003).

1.4.1 Les diurétiques

Les diurétiques, comme l'hydrochlorothiazide, abaissent la pression artérielle principalement en diminuant la rétention d'eau et de sel. Cette diminution du volume sanguin réduit donc le débit cardiaque. Ensuite, à plus long terme (après six à huit semaines), le débit cardiaque revient à la normal tandis que la résistance périphérique diminue. On peut expliquer ce phénomène par la diminution de sodium engendrée par les diurétiques, car cet ion contribuerait à la résistance vasculaire ainsi qu'au changement de pH via l'inhibition de l'anhydrase carbonique. Le sodium augmenterait la rigidité des vaisseaux suite à l'augmentation de l'échange sodium-calcium, augmentant ainsi le calcium intracellulaire. Ces effets seraient donc renversés par une diminution d'apport en sodium et par les diurétiques. Toutefois, certains diurétiques, comme l'indapamide, ont des actions vasodilatatrices directes en plus de leur action diurétique. Dans ce cas, le débit cardiaque demeure inchangé ou augmente très peu à cause de la vasodilatation périphérique. Les diurétiques sont efficaces à diminuer la pression artérielle de 10 à 15 mmHg chez la plupart des patients hypertendus. Cette classe de médicaments est également utilisée dans le traitement contre l'insuffisance cardiaque afin de diminuer la pré-charge cardiaque en réduisant la rétention d'eau et de sels. Cette diminution de pression veineuse entraîne une réduction de l'œdème et de la taille du cœur, engendrant de la sorte une meilleure efficacité cardiaque (Katzung, 2001).

1.4.2 Les antagonistes β -adrénergiques

Les antagonistes β -adrénergiques occupent les récepteurs β -adrénergiques et réduisent ainsi la liaison des catécholamines et autres agonistes β -adrénergiques. Ils réduisent donc la pression artérielle via une modulation du système nerveux sympathique via les récepteurs β_1 -adrénergiques. Ils diminuent le travail cardiaque et inhibent la relâche de la rénine,

provoquant une réduction de la formation de l'angiotensine II et de la sécrétion de l'aldostérone, ce qui entraîne une diminution de la résistance périphérique. Les antagonistes β -adrénergiques sont divisés en deux grandes catégories selon leur sélectivité pour les récepteurs β -adrénergiques. Les premiers β -bloqueurs, appelés non-sélectifs, agissent en antagonisant à la fois les récepteurs β_1 - et β_2 -adrénergiques cardiaques et rénaux (propranolol). Il est à noter que la stimulation des récepteurs β_2 -adrénergiques provoque une vasodilatation. Certains de ces antagonistes β -adrénergiques non-sélectifs bloquent également les récepteurs α -adrénergiques des cellules musculaires lisses (labetalol). Ces antagonistes α -adrénergiques provoquent une diminution de la résistance vasculaire périphérique, causant alors une diminution de la pression artérielle. La deuxième catégorie de β -bloqueurs, appelée β -bloqueurs sélectifs ou de nouvelle génération, agissent spécifiquement aux récepteurs β_1 -adrénergiques (atenolol). Ces derniers sont indiqués pour les patients chez lesquels le blocage des récepteurs β_2 -adrénergiques causerait des effets secondaires (les diabétiques, les asthmatiques, etc.). Même si leur mode d'action exact est mal caractérisé, les antagonistes β -adrénergiques sont souvent utilisés systématiquement dans le traitement de l'hypertension artérielle et de d'autres pathologies (arythmie, angine, etc.) (Katzung, 2001; Mehvar, 2001). De plus, ils sont utilisés pour traiter l'insuffisance cardiaque en réduisant les effets néfastes des hautes concentrations de catécholamine, en augmentant la densité des récepteurs β -adrénergiques, en réduisant le rythme cardiaque, en augmentant les fonctions ventriculaires gauches et en inhibant le remodelage cardiaque (Bristow, 1993; Packer, 1996).

Les premiers antagonistes β -adrénergiques utilisés dans le traitement de l'hypertension ont été mis sur le marché dans les années 1960. L'atenolol est l'antagoniste β -adrénergique utilisé dans les études présentées dans ce mémoire. (Figure 1.5) Cet antagoniste β -adrénergique synthétique est sélectif aux récepteurs β_1 -adrénergiques et est sans activité sympathomimétique intrinsèque (agoniste partiel). L'absorption par voie orale est rapide, mais incomplète, car sa biodisponibilité n'est que de 50%. La concentration maximale de l'atenolol est atteinte de deux à quatre heures après son administration. Ce

médicament est très peu métabolisé par le foie (seulement environ 5%) et est éliminé par voie rénale. La demi-vie de l'atenolol est de six à neuf heures; suite à l'administration d'une dose, l'effet β -bloquant et anti-hypertenseur persiste pour au moins 24 heures. L'atenolol a démontré ses effets β -bloquants chez l'homme et l'animal; diminution de la fréquence cardiaque, du travail cardiaque, de la pression systolique et diastolique et du réflexe de tachycardie orthostatique. Plusieurs études cliniques contrôlées ont démontré que l'atenolol, administré oralement une fois par jour, est un agent anti-hypertenseur efficace, car il provoque une diminution de la pression artérielle pendant 24 heures (Heel, 1979; Kirch, 1982).

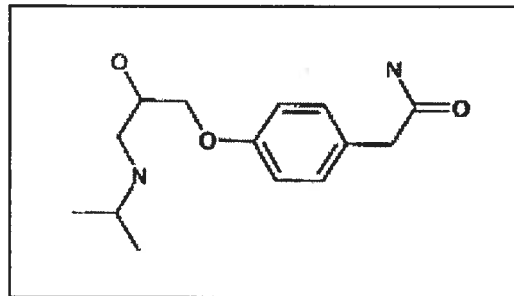


Figure 1.5 Structure chimique de l'atenolol. L'atenolol est l'antagoniste β -adrénergique utilisé au cours des études présentées dans ce mémoire.

1.4.3 Les bloqueurs des canaux calciques

Les bloqueurs des canaux calciques agissent sur la contractilité vasculaire, la contractilité cardiaque et la fréquence cardiaque afin de diminuer la pression artérielle. Ils sont regroupés en trois grandes familles chimiques : diphénylalkylamines, benzothiazépines et dihydropyridines. Ces familles de bloqueurs des canaux calciques ont des structures, des propriétés pharmacocinétiques et des indications cliniques très différentes. Toutefois, elles

sont toutes aussi efficaces à diminuer la pression artérielle. Les différents bloqueurs des canaux calciques démontrent des effets vasodilatateurs ainsi que des effets supprimeurs de la contractilité et de la fréquence cardiaque très variables d'un composé à l'autre. Cependant, le mécanisme d'action anti-hypertenseur est le même pour tous les bloqueurs des canaux calciques; ils inhibent l'influx de calcium dans les cellules du muscle lisse vasculaire (dihydropyridines) et cardiaque (diphénylalkylamines, benzothiazépines). En effet, la concentration intracellulaire de calcium est très importante dans le maintien du tonus des cellules du muscle lisse vasculaire et dans la contraction du myocarde. L'action principale de cette classe d'anti-hypertenseur est de bloquer l'influx de calcium en liant les canaux calciques de type-L du cœur et des cellules du muscle lisse vasculaire coronaire et périphérique, provoquant une vasodilatation et une diminution de l'excitabilité des cellules cardiaques et par le fait même une diminution de la pression artérielle (Katzung, 2001).

1.4.4 Les inhibiteurs de l'enzyme de conversion

Les inhibiteurs de l'enzyme de conversion de l'angiotensine II agissent de plusieurs manières sur le système rénine-angiotensine afin de diminuer la pression artérielle. Leur action principale est de bloquer la conversion de l'angiotensine I en angiotensine II en inhibant de façon compétitive l'enzyme de conversion de l'angiotensine. Cette diminution d'angiotensine II, un puissant vasoconstricteur, provoque alors plusieurs événements qui contribuent tous à diminuer la pression artérielle; une diminution de l'activité du système nerveux sympathique, une vasodilatation des cellules du muscle lisse vasculaire et une diminution de la production de l'aldostérone. De plus, l'inhibition de l'enzyme de conversion de l'angiotensine provoque également l'accumulation de la bradykinine, car cette enzyme est impliquée dans la dégradation de la bradykinine en peptides inactifs. Cette kinine est l'un des plus puissants vasodilatateurs connus en raison, notamment, de sa capacité à libérer du monoxyde d'azote (NO) via l'endothélium. Donc, la vasodilatation périphérique observée est en fait le résultat de la combinaison d'une diminution de la vasoconstriction, suite à la baisse des niveaux d'angiotensine II, et d'une augmentation de

la vasodilatation provoquée par l'augmentation des niveaux de bradykinine. Les inhibiteurs de l'enzyme de conversion de l'angiotensine II sont aussi utilisés dans le traitement de l'insuffisance cardiaque, car ils réduisent la résistance périphérique, donc la post-charge. Ils réduisent également la pré-charge en diminuant la rétention d'eau et de sel et la sécrétion d'aldostérone. Ces médicaments diminueraient aussi l'activité sympathique en réduisant l'angiotensine présynaptique et la relâche de norépinéphrine (Katzung, 2001).

1.4.5 Les antagonistes des récepteurs AT1

Les antagonistes des récepteurs AT1 (ARA) forment une classe récente de médicaments, qui diminue la pression artérielle en bloquant le récepteur de type 1 de l'angiotensine II, l'empêchant donc de s'y lier. L'angiotensine II est responsable de plusieurs phénomènes, incluant l'élévation de la pression artérielle, et produit ses actions via la liaison à l'un ou l'autre des récepteurs membranaires spécifiques, soit AT1 et AT2. Le récepteur AT1 est abondant et est distribué dans les cellules musculaires lisses, le foie, les reins, le cœur, l'aorte, les poumons et les testicules. Plusieurs effets de l'angiotensine II se produisent suite à la liaison au récepteur AT1; la vasoconstriction, la production et la relâche d'aldostérone, l'absorption rénale de sodium, la croissance des cellules cardiaques, la prolifération des cellules du muscle lisse, l'augmentation de l'activité du système nerveux sympathique, la relâche de la vasopressine et l'inhibition de la relâche de la rénine. Pour sa part, le récepteur AT2 est largement exprimé dans les tissus mésenchymateux lors du développement fœtal, mais se retrouve en très petite quantité dans certains tissus adultes tels les reins, la surrénale, le cœur, le cerveau, l'utérus et les ovaires. Ce récepteur aurait des fonctions antiprolifératives et vasodilatatrices. Les ARA se lient donc spécifiquement aux récepteurs AT1, laissant ainsi la possibilité à l'angiotensine II de se lier aux récepteurs AT2, contrairement aux inhibiteurs de l'enzyme de conversion (Contreras, 2003; Appel, 2004). Les antagonistes des récepteurs AT1 sont aussi utilisés pour traiter l'insuffisance cardiaque selon un mécanisme d'action similaire aux inhibiteurs de l'enzyme de conversion de l'angiotensine II (Katzung, 2001).

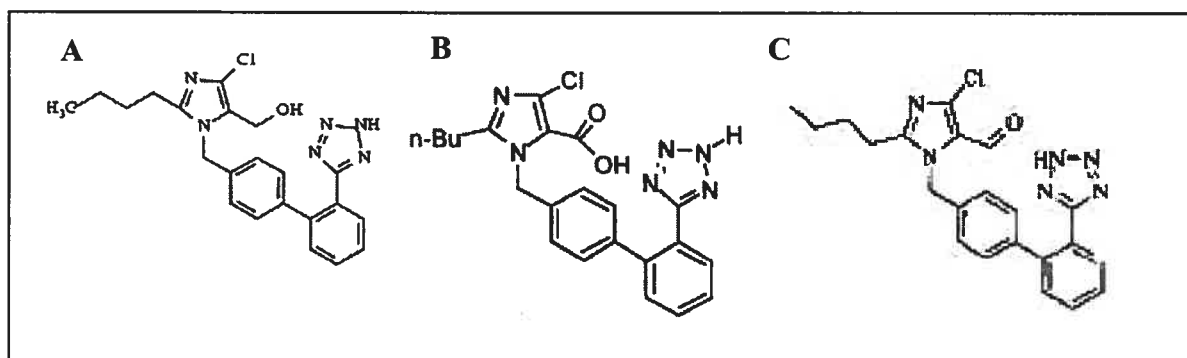


Figure 1.6 Structure chimique du losartan et de ses métabolites. Le losartan est l'ARA utilisé au cours des études présentées dans ce mémoire. a) Losartan, b) EXP 3174 et c) EXP 3179.

Le premier ARA utilisé, au début des années 1970, est l'acétate saralazine, un analogue peptidique non-sélectif de l'angiotensine II. Malgré sa réussite à diminuer la pression artérielle, ce médicament avait une courte durée d'action et devait être perfusé de façon intra-veineuse (Gavras, 1996). Le losartan fut le premier antagoniste sélectif pour le récepteur AT1 à être approuvé dans le traitement de l'hypertension. Ce médicament est non-peptidique, sélectif et est administré oralement. Le losartan est le deuxième anti-hypertenseur employé au cours des études de ce mémoire. Il est un puissant antagoniste compétitif au récepteur de type 1 de l'angiotensine II. Il subit un métabolisme de premier passage important au niveau du cytochrome P₄₅₀. Environnementalement 14% du losartan est converti en métabolite EXP 3174, un acide carboxylique. Ce métabolite actif est de 10 à 40 fois plus puissant que le losartan lui-même. L'activité soutenue de cet anti-hypertenseur est donc attribuée à la longue demi-vie de son métabolite EXP 3174 (six à neuf heures), plutôt qu'à celle du losartan (deux heures). La concentration maximale du losartan est atteinte une heure après son administration, tandis que celui du métabolite EXP 3174 est de 3,5 heures. La concentration du losartan et du EXP 3174 augmente linéairement avec l'augmentation

des doses administrées et la biodisponibilité du losartan est de 33% (McIntyre, 1997). Le losartan produit un autre métabolite, le EXP 3179, qui possède quant à lui des propriétés anti-inflammatoires et anti-thrombotiques (Sadoshima, 2002). (Figure 1.6) Le losartan et son métabolite actif, le EXP 3174, sont très spécifiques au récepteur AT1 et ne se lient à aucun autre récepteur ou canal ionique. L'efficacité du losartan à réduire la pression artérielle chez les patients hypertendus a été démontrée à plusieurs reprises dans des études randomisées. Des études comparatives ont démontré qu'après huit à douze semaines de traitement au losartan, la diminution de pression artérielle est similaire à celle de patients hypertendus traités avec des agents anti-hypertenseurs conventionnels tels les antagonistes β -adrénergiques, les bloqueurs des canaux calciques, les inhibiteurs de l'enzyme de conversion et les diurétiques. De plus, le losartan peut être administré une fois par jour seulement, augmentant la compliance pharmacologique. Finalement, la sécurité du losartan a été évaluée chez plus de 3 300 patients d'études cliniques de phase III; il provoque très peu d'effets indésirables, un taux comparable à celui du placebo. Les effets secondaires les plus communs sont les maux de tête, les infections respiratoires, la toux et la congestion nasale (Gavras, 1996).

1.5 Étude LIFE

1.5.1 Les buts de l'étude

L'étude clinique LIFE (Losartan Intervention For Endpoint reduction in hypertension), parue en mars 2002 dans la revue *The Lancet*, est une étude très importante portant sur la mortalité et la morbidité cardiovasculaire dans l'hypertension artérielle (Dahlof, 2002). Les travaux présentés dans ce mémoire sont basés sur cette étude clinique.

Cette étude a été conçue au début des années 1990 afin d'évaluer si le traitement aux antagonistes des récepteurs AT1 était plus efficace que le traitement aux β -bloqueurs dans la réduction de l'hypertrophie ventriculaire gauche, de la morbidité et mortalité

cardiovasculaire. Les investigateurs de cette étude se sont appuyés sur le fait que les patients hypertendus traités ont toujours plus de risque que les normo-tendus de développer une maladie cardiovasculaire. Ils ont alors posé la question à savoir si cette anomalie pourrait être due soit à un échec à atteindre une pression artérielle normale et/ou à des dommages résiduels aux organes cibles tels l'hypertrophie ventriculaire gauche. Les auteurs ont choisi d'utiliser les β -bloqueurs, car ces anti-hypertenseurs ne réduisent pas totalement le taux de mortalité et de morbidité cardiovasculaire des patients hypertendus. Cette constatation pourrait être due à l'échec des β -bloqueurs à renverser l'hypertrophie ventriculaire gauche, car cette pathologie est un facteur de risque indépendant pour les maladies cardiovasculaires. Le renversement de l'HVG pourrait donc avoir des effets cardiovasculaires bénéfiques et indépendants de la régulation de la pression artérielle. L'angiotensine II est associée au développement de l'HVG; plusieurs évidences suggèrent donc que le blocage de l'angiotensine II pourrait être spécialement efficace à renverser l'HVG. Pour ces raisons, les auteurs ont décidé de comparer les β -bloqueurs aux antagonistes des récepteurs AT1 dans le but d'évaluer s'il y aurait des effets bénéfiques au-delà de la régulation de la pression artérielle. Le losartan, le premier anti-hypertenseur disponible de la classe des antagonistes des récepteurs AT1, a été choisi pour être comparé à l'atenolol, un β -bloqueur couramment utilisé en première ligne dans le traitement de l'hypertension essentielle. La principale hypothèse de cette étude était que l'antagoniste des récepteurs AT1 losartan serait supérieur au β -bloqueur atenolol dans la réduction de la morbidité cardiovasculaire et de la mort chez les patients hypertendus montrant des signes d'HVG.

1.5.2 Les participants et les points-limites

L'étude LIFE est une étude randomisée à double-aveugle avec des groupes parallèles comparant les effets à long terme du losartan et de l'atenolol chez des patients souffrant d'hypertension essentielle et d'HVG. Le point-limite principal est la morbidité et la mortalité cardiovasculaire (mort cardiovasculaire, infarctus du myocarde et accident

vasculaire cérébral). 9193 participants âgés de 55 à 80 ans ont été recrutés dans les pays nordiques (Danemark, Finlande, Islande, Norvège et Suède), au Royaume-Uni ainsi qu'au États-Unis. Les patients étaient tous hypertendus (pression artérielle systolique entre 160-200 mmHg et diastolique entre 95-115 mmHg) et démontraient une HVG par échocardiographie. Les critères d'exclusion comprenaient l'hypertension secondaire, l'infarctus du myocarde ou un accident vasculaire cérébral dans les six mois précédents le début de l'étude, l'angine de poitrine, l'insuffisance cardiaque ou une fraction d'éjection ventriculaire égale ou inférieure à 40%. Les patients étaient assignés aléatoirement à un traitement au losartan ou à l'atenolol après une à deux semaines de traitement au placebo et si leur pression artérielle était dans les critères de sélection. Les patients ont été suivis par des visites régulières pendant une période d'au moins quatre ans et les doses de drogues étaient augmentées afin d'atteindre la pression cible de 140/90 mmHg. L'hydrochlorothiazide était ajoutée dans les deux traitements lorsque la réduction de la pression artérielle était insuffisante.

1.5.3 Les résultats

Tout d'abord, l'analyse des résultats a démontré que la pression artérielle a substantiellement diminué dans les deux groupes de l'étude. (Figure 1.7) Aucune différence significative n'a été constatée entre les deux groupes pour la chute de la pression systolique à la fin de l'étude ou à la dernière visite avant un point-limite ($30,2 \pm 18,5$ mmHg et $29,1 \pm 19,2$ mmHg pour les groupes losartan et atenolol respectivement). La même constatation a été faite pour la pression diastolique ($16,6 \pm 10,1$ mmHg et $16,8 \pm 10,1$ mmHg pour les groupes losartan et atenolol respectivement). La pression cible de 140/90 mmHg a été atteinte par 49% et 46% des patients traités au losartan et à l'atenolol respectivement.

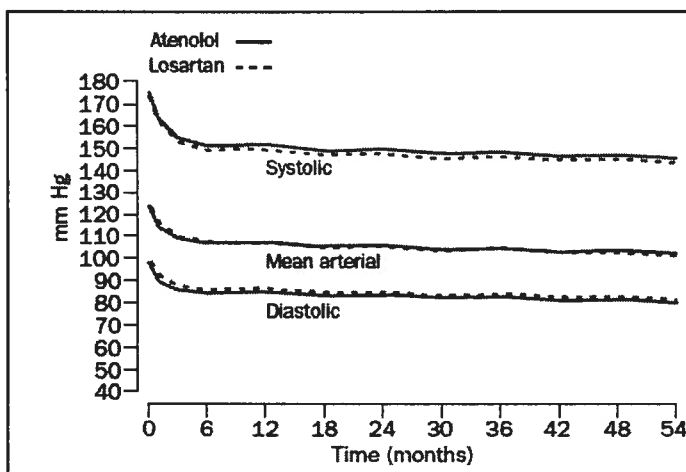


Figure 1.7 Pression artérielle des patients tout au long de l'étude LIFE. Aucune différence de pression systolique, diastolique et moyenne entre les patients traités au losartan et à l'atenolol.

Au cours de l'étude, 1096 patients ont atteint le point-limite primaire. La courbe Kaplan-Meier des point-limites primaires démontre une réduction de 13,0% ($p=0,021$) du risque relatif lors du traitement au losartan, comparativement à l'atenolol. (Figure 1.8a) En analysant les points-limites séparément, soit la mortalité cardiovasculaire, les événements d'infarctus du myocarde et les événements d'accident vasculaire cérébral, on constate que les courbes de mortalité cardiovasculaire et d'infarctus du myocarde ne sont pas différentes significativement. Toutefois, les courbes des événements d'accident vasculaire cérébral (fatal et non-fatal) se séparent assez rapidement et on remarque une diminution significative du risque d'AVC de 24,9% ($p=0,001$) avec le losartan, comparativement à l'atenolol. (Figure 1.8b)

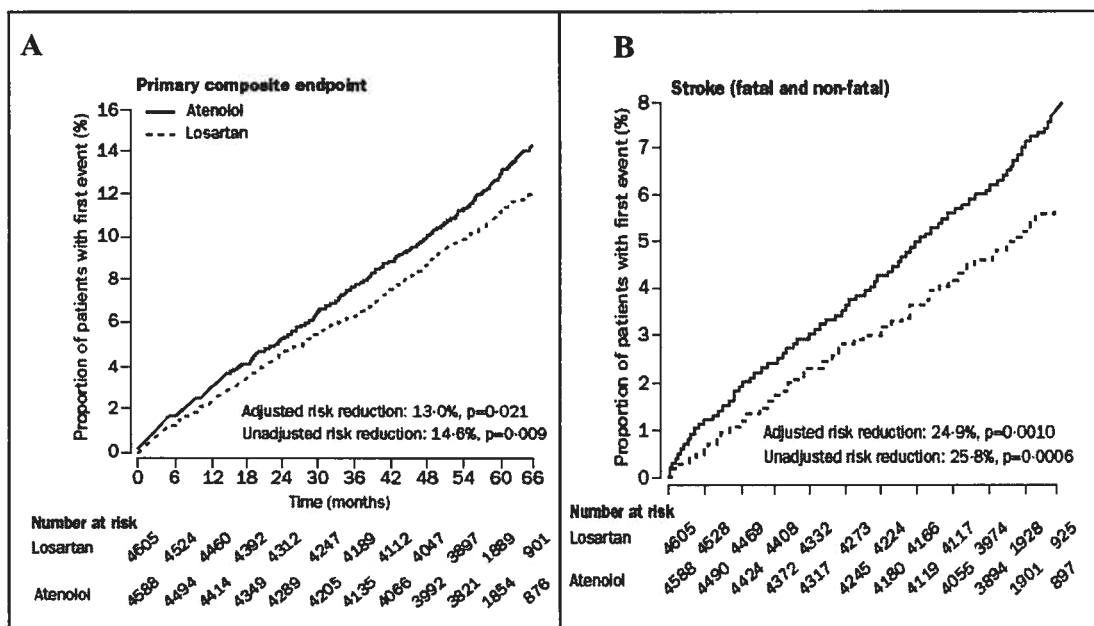


Figure 1.8 Points-limités primaires et évènements d'AVC au cours de l'étude LIFE. a) Réduction de 13% des point-limités primaires et b) de 25% des évènements d'AVC chez les patients traités au losartan, comparativement à l'atenolol.

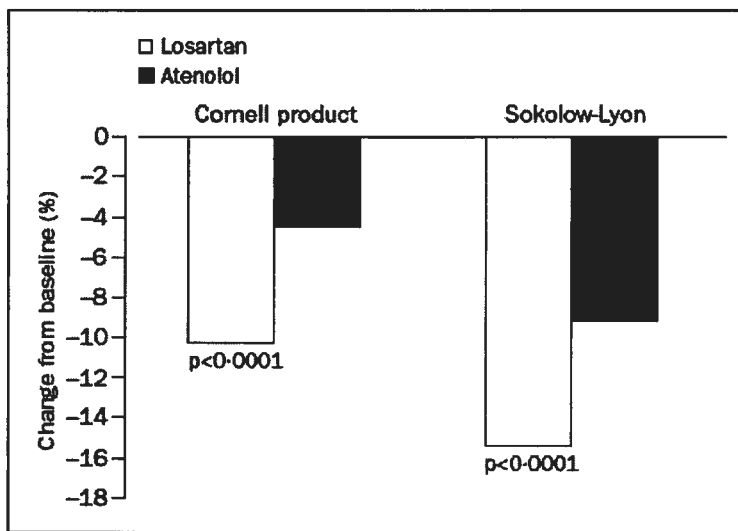


Figure 1.9 Pourcentage d'HVG chez les patients de l'étude LIFE. Réduction de 16% et 9% des indices d'HVG chez les patients traités au losartan, comparativement à l'atenolol.

Finalement, deux indices d'HVG ont été mesurés à la fin de l'étude; le «Cornell voltage-duration product» et le «Sokolow-Lyon voltage». Ces deux indices ont tous deux démontré une réduction significative d'HVG chez les patients traités avec le losartan, comparativement à l'atenolol (Cornell product; diminution d'environ 10% et 4%, Sokolow-Lyon; diminution d'environ 16% et 9%, pour les groupes losartan et atenolol respectivement). (Figure 1.9)

En conclusion, les auteurs affirment que l'antagoniste des récepteurs AT1 losartan, est supérieur au β -bloqueur atenolol, dans la réduction de la fréquence des événements cardiovasculaires (mort cardiovasculaire, AVC et infarctus du myocarde). Cette réduction significative de la morbidité et de la mortalité cardiovasculaire se produit en présence d'une réduction considérable de la pression artérielle systolique et diastolique qui est similaire entre les deux groupes. De plus, le fait d'observer une réduction d'environ 25% des événements d'accidents vasculaires cérébraux avec le losartan est une constatation très importante, car les AVC sont une des causes principales de décès chez les patients hypertendus. Le losartan pourrait donc avoir un effet protecteur contre les AVC, qui serait indépendant de la régulation de la pression artérielle. Les auteurs rapportent également que l'incidence d'évènements d'infarctus du myocarde ne varie pas entre les groupes losartan et atenolol. Cela pourrait être expliqué, selon eux, par le fait que la diminution du rythme cardiaque provoqué par l'atenolol masquerait les effets bénéfiques du losartan sur la vasculature coronaire. En d'autres mots, la diminution du rythme cardiaque aurait un effet délétère et pourrait expliquer en partie les résultats obtenus. Finalement, les investigateurs affirment que le losartan offre une réduction significative de l'HVG, comparativement à l'atenolol. Somme toute, ils concluent qu'il est très probable que la protection cardiovasculaire supérieure observée avec le losartan, comparativement à l'atenolol, soit due à des bénéfices indépendants de la réduction de la pression artérielle.

1.5.4 La sous-étude LIFE

Par ailleurs, une sous-étude de l'étude LIFE s'est penchée sur la cohorte de patients atteints d'hypertension systolique isolée. Cette étude est parue en septembre 2002 (Kjeldsen, 2002). L'hypothèse de cette sous-étude était que le losartan aurait des effets bénéfiques au-delà de la régulation de la pression artérielle, comparativement à l'atenolol, chez les patients souffrant à la fois d'HSI et d'HVG. Les patients étudiés sont les patients de l'étude LIFE qui présentaient une pression systolique entre 160 et 200 mmHg et une pression diastolique en dessous de 90 mmHg. Dans cette sous-étude, 1326 patients ont été randomisés pour recevoir soit du losartan ou de l'atenolol. Les mêmes points-limites que pour l'étude LIFE ont été étudiés (mort cardiovasculaire, infarctus du myocarde et accident vasculaire cérébral).

Tout comme dans l'étude LIFE, la pression artérielle systolique à la fin de l'étude n'était pas significativement différente entre les groupes de l'étude (réduction de 28 ± 9 mmHg et de 28 ± 9 mmHg pour les groupes losartan et atenolol respectivement). L'analyse des points-limites primaires révèle que le losartan diminue les risques de morbidité et mortalité cardiovasculaire de 25% ($p=0,06$) comparativement à l'atenolol. En observant ces points-limites séparément, on constate qu'il n'y a toujours pas de différence significative pour l'incidence des infarctus du myocarde entre les groupes losartan et atenolol. Toutefois, l'analyse des courbes Kaplan-Meier représentant l'incidence des AVC chez ces patients atteints d'HSI révèle que le losartan diminue significativement de 40% ($p=0,02$) ce risque, comparativement à l'atenolol. Finalement, les deux indices d'HVG mesurés à la fin de l'étude (le «Cornell voltage-duration product» et le «Sokolow-Lyon voltage») ont démontré une réduction significative d'hypertrophie cardiaque avec le traitement au losartan, comparativement à l'atenolol ($p=0,001$). En conclusion, les auteurs affirment que dans le sous-groupe de patients atteints d'HSI, le losartan demeure supérieur à l'atenolol pour

prévenir la morbidité et la mortalité cardiovasculaire, plus spécifiquement dans la prévention des évènements d'AVC.

1.6 Modèle de rat afin de reproduire les conditions clés de l'étude LIFE

1.6.1 Le monoxyde d'azote et la pression artérielle

Il est bien établi de nos jours que le tonus vasculaire n'est pas contrôlé que par des influences nerveuses ou hormonales, mais aussi par des facteurs endothéliaux actifs localement. Parmi les plus importants de ces facteurs, on retrouve le monoxyde d'azote (NO). Le NO est généré à partir de son précurseur, la L-arginine, à l'aide d'une enzyme, la monoxyde d'azote synthase (NOS). Cette enzyme est présente sous trois isoformes : les formes constitutives, la NOS endothéliale et la NOS neuronale (eNOS et nNOS), ainsi que la NOS inductible dans les cellules immunitaires (iNOS). L'activation de l'enzyme eNOS, par exemple, dépend de la concentration de l'ion Ca^{2+} dans les cellules endothéliales. Le NO diffuse ensuite à travers l'endothélium dans les cellules du muscle lisse avoisinantes et provoque alors leur relaxation. Cette relaxation cellulaire s'effectue via la guanylate cyclase soluble qui catalyse la formation du second messenger 3'5'-guanosine monophosphate cyclique (GMPc). Le GMPc, à son tour, inhibe le processus de contraction en diminuant la concentration d'ions Ca^{2+} dans les cellules du muscle lisse (Vanhoutte, 2003). (Figure 1.10) La demi-vie du NO est de quelques secondes; il produit donc son action par des mécanismes paracrines et autocrines. Le NO est en résumé une force vasodilatatrice qui maintient un équilibre avec les forces vasoconstrictrices. Le NO jouerait donc un rôle important dans l'hypertension, car il a été démontré que la biodisponibilité basale de NO était altérée chez les patients hypertendus, comparativement aux personnes normo-tendus.

De plus, le NO est également important pour le fonctionnement du système immunitaire, la neurotransmission ainsi que l'agrégation et l'adhésion plaquettaire (Klahr, 2001).

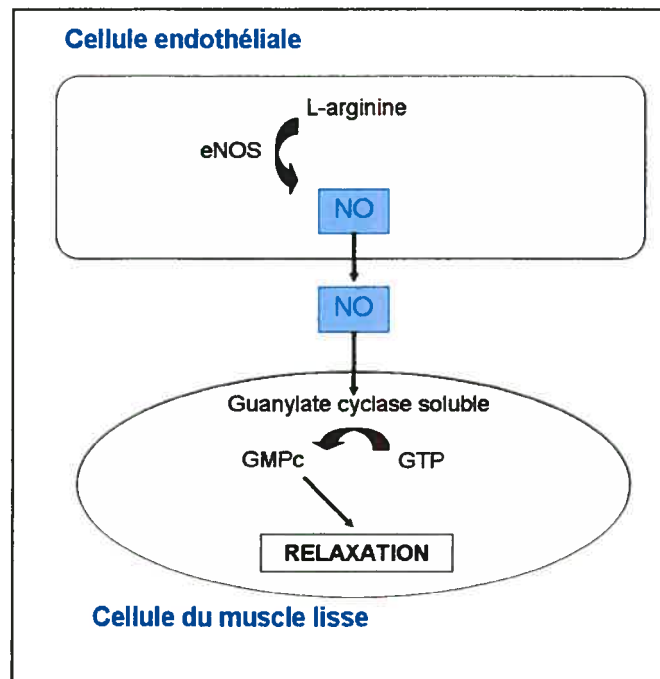


Figure 1.10 Représentation schématique de la production du monoxyde d'azote. Le NO est produit à partir de la L-arginine dans les cellules endothéliales et diffuse ensuite dans les cellules du muscle lisse.

La génération endothéliale de NO a une importance capitale dans le soutien de la vasodilatation des artères telles les artères coronaires, systémiques, mésentériques, pulmonaires et cérébrales. Un déficit dans la production endothéliale de NO provoque une vasoconstriction de ces artères et mène à l'hypertension artérielle. Par ailleurs, le NO produit dans les cellules endothéliales ne diffuse pas que dans les cellules du muscle lisse, mais aussi dans la lumière vasculaire. À cet endroit, le NO a pour rôle d'inhiber l'adhésion des plaquettes sanguines et des leucocytes à l'endothélium. La production endothéliale de

NO est régulée par des stimuli physiques tels les forces de cisaillement exercées sur les parois vasculaires, ainsi que certaines substances endogènes qui activent des récepteurs membranaires (vasopressine, endothéline, sérotonine, thrombine, bradykinine, histamine, etc.) (Vanhoutte, 2003).

La production neuronale de NO joue également un rôle dans l'homéostasie cardiovasculaire par son action neuromodulatrice du système nerveux autonome. Il a été démontré que la nNOS est présente dans certaines parties du cerveau impliquées dans la régulation neurogénique de la pression artérielle. Le NO généré dans ces sites contrôle la pression artérielle en modulant le système sympathique et parasympathique affectant le système cardiovasculaire. Il est donc possible que des anomalies dans la production neuronale de NO soient aussi importantes dans la pathologie de l'hypertension que celles du NO endothélial (Chowdhary, 2001). Le groupe de Pontieri et coll. a démontré que l'activité de la nNOS était diminuée dans la région dorsale du tronc cérébral des rats spontanément hypertendus (Pontieri, 1998). De plus, Cabrera et coll. ont démontré que la stimulation de la nNOS dans le cerveau des rats hypertendus diminuait la pression artérielle de ces rats (Cabrera, 1996). Ces évidences suggèrent donc que les rats génétiquement hypertendus démontrent une activité basale de la nNOS réduite dans les régions du cerveau régulant la pression artérielle. Par contre, les rats hypertendus à l'angiotensine II ou les SHR ont une expression augmentée de nNOS dans les cellules du muscle lisse vasculaire (Boulanger, 1998; Tambascia, 2001). Cette augmentation de nNOS dans les cellules vasculaires non-endothéliales des rats hypertendus est probablement un mécanisme compensatoire, car la fonction endothéliale est altérée dans les artères de ces rats.

1.6.2 Le L-NAME, un inhibiteur de la monoxyde d'azote synthase

Il est possible d'inhiber la NOS en utilisant différents analogues de la L-arginine, comme le N^G-monométhyle-L-arginine (L-NMMA), N^G-nitro-L-arginine (L-NNA) et le N^G-nitro-L-arginine-méthylester (L-NAME) (Chowdhary, 2001). Le L-NAME est

l'inhibiteur de la NOS utilisé au cours des travaux présentés dans ce mémoire. (Figure 1.11) Il bloque à la fois les trois isoformes de la NOS. Le L-NAME donné chroniquement réduit la relâche du GMPc et provoque l'hypertension.

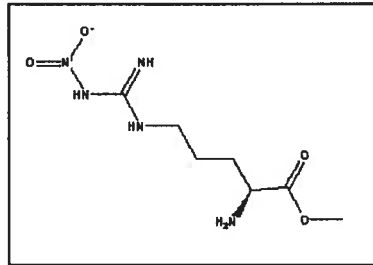


Figure 1.11 Structure chimique du L-NAME. Le L-NAME est un inhibiteur des trois isoformes de la NOS.

L'inhibition de la production du NO produit une vasoconstriction des artères de résistance et une augmentation de la résistance périphérique totale, ce qui provoque l'augmentation de la pression artérielle chez l'homme et l'animal (Fumiko Sekiguchi, 2001). Les souris déficientes en eNOS développent de l'hypertension dès leur naissance. Ceci démontre l'importance du rôle du NO dans le maintien d'une résistance vasculaire appropriée et d'une pression artérielle normale (Leclercq, 2002). Le NO a également un rôle régulateur de la fonction cardiaque. Les trois isoformes de la NOS sont exprimés dans les cardiomyocytes (Kelly, 1996). L'inhibition de la production du NO résulte habituellement en un effet inotrope négatif (bradycardie), car les contractions cardiaques sont soutenues par le NO endogène (Massion, 2003). De plus, l'administration du L-NAME à long terme induit habituellement le développement de l'hypertrophie ventriculaire gauche concentrique (Girardot, 2004). Cette hypertrophie cardiaque est alors associée à une augmentation de la concentration et du contenu en ADN et ARN ainsi qu'à une augmentation du collagène soluble (Bernatova, 2000). Finalement, le NO est un important transmetteur neuronal du système nerveux central et plusieurs neurones le synthétisent. Toutefois, la distribution non-uniforme du NO suggère différents rôles dans le cerveau.

L'administration de L-NAME, inhibe la production du NO neuronal dans le cerveau et induit une hypertension via l'augmentation de l'activation du système nerveux central sympathique (Vapaatalo, 2000). De plus, le NO jouerait un rôle dans la régulation du flux sanguin cérébral et dans l'ischémie cérébrale (Salter, 1995). L'inhibition chronique du NO précipite l'apparition d'AVC chez certaines souches de rats comme les SHR et les SHRSP (stroke-prone spontaneously hypertensive rats) (Ahmad, 1997; Vaskonen, 1997). De plus, il a été démontré que ces AVC précipités chez les SHRSP étaient dépendants du système rénine-angiotensine (Ahmad, 1997).

1.6.3 Le modèle de rat SHR recevant du L-NAME

Le modèle de rat utilisé au cours des études présentées dans ce mémoire est le rat spontanément hypertendu (SHR). Cette souche de rats génétiquement hypertendus a été développée par le groupe de Okamoto (Okamoto, 1969). Elle dérive de la souche Wistar Kyoto à la suite d'un croisement entre un mâle ayant une hypertension modérée et une femelle ayant une hypertension sévère. Ensuite, les frères et les sœurs les plus hypertendus ont été croisés ensemble. Il n'y a pas de différence, du point de vue du phénotype et de l'empreinte génétique, entre ces premières souches de SHR et celles des fournisseurs américains actuels. Cette souche de rats est caractérisée par une hypertension qui se développe à l'âge de sept à quinze semaines. La pression artérielle systolique des SHR de dix semaines est d'environ 171 ± 2 mmHg. La pression systolique de ces rats plafonne à 200 mmHg. Ces animaux répondent bien aux médicaments anti-hypertenseurs, sauf aux diurétiques et aux β -bloqueurs non-sélectifs au récepteur β_1 -adrénergique (deBlois, 1997). Les SHR ont une haute incidence de maladies cardiovasculaires, mais une faible incidence d'accidents vasculaires cérébraux, contrairement aux SHRSP chez lesquels les événements d'AVC sont fréquents et affectés par des facteurs génétiques et environnementaux tels l'hypertension, les changements vasculaires, le métabolisme du sel et la réduction du flux sanguin cérébral. Dans ce modèle de rat, les AVC peuvent être prévenus par des agents anti-hypertenseurs (Yamori, 1975). Les SHR quant à eux démontrent une augmentation de

la résistance vasculaire qui provient probablement d'un désordre dans la régulation centrale de la pression sanguine, ce qui contribue à maintenir l'hypertension artérielle. On y observe également des atteintes rénales génétiques (Smallegange, 2003). Il a été démontré que les SHR présentent une hypertrophie aortique et cardiaque. L'augmentation de la masse et de la rigidité de l'aorte contribue à l'hypertension et est un facteur de risque primaire pour l'hypertrophie ventriculaire gauche. Le remodelage vasculaire, incluant la régression de l'hypertrophie aortique par voie apoptotique, est donc considéré comme une cible thérapeutique. Le groupe de deBlois et coll. a observé que le losartan administré aux SHR, contrairement à l'atenolol, produit une augmentation de l'apoptose des cellules musculaires lisses de l'aorte, donc réduit l'hypertrophie aortique (deBlois, 1997). Comme seuls les ARA induisent la régression de l'hypertrophie aortique chez les SHR, cette modulation pourrait expliquer l'effet protecteur supérieur des ARA sur la régression de l'HVG, comparativement aux β -bloqueurs.

Les SHR offrent donc des conditions spécifiques et uniformes de prédisposition génétique menant à l'hypertension, ce qui permet l'étude des causes, des conséquences et des mécanismes de la pathologie ainsi que la comparaison de l'efficacité de différentes interventions thérapeutiques anti-hypertensives. Afin de reproduire les conditions de l'étude clinique LIFE, nous avons utilisé un modèle de rats SHR auquel nous avons administré un inhibiteur de la synthèse du monoxyde d'azote, le L-NAME, à 20 mg/kg/jour dans l'eau de breuvage durant quelques semaines. Ce modèle de SHR recevant du L-NAME est couramment utilisé dans la littérature dans le but de provoquer une hypertension maligne (Sventek, 1996). Il a été démontré dans plusieurs études que l'administration chronique de L-NAME chez les SHR provoque une augmentation substantielle de la pression artérielle ainsi qu'une augmentation de la résistance vasculaire périphérique et régionale (Varagic, 2000). Plus précisément, Vaskonen et coll. ont démontré que l'administration de L-NAME (20 mg/kg/jour) aux SHR pendant trois semaines provoquait une augmentation de la pression artérielle d'environ 50 à 60 mmHg comparativement à une augmentation de 10 à 20 mmHg chez les SHR témoins du même âge. Ces augmentations de vasoconstriction des

petites artères et de pression artérielle provoquées par le L-NAME chez les SHR sont tout à fait nécessaires dans notre modèle de rats, car les patients de l'étude LIFE démontraient une pression artérielle systolique de base très élevée (174 ± 11 mmHg) ainsi qu'une hypertension systolique isolée provoquée par la rigidité vasculaire avec l'âge. Dans cette même étude, Vaskonen et coll. ont également démontré que le L-NAME, administré chroniquement aux SHR, induit une hypertrophie cardiaque et rénale importante. Cette caractéristique du modèle SHR + L-NAME est aussi bien importante pour notre étude, car les patients de l'étude LIFE démontraient tous des signes d'hypertrophie ventriculaire gauche. De plus, dans cette dernière étude, 19 des 30 rats SHR ayant reçu du L-NAME ont souffert d'accidents vasculaires cérébraux et tous ont subi des infarctus du myocarde et des dommages aux reins (Vaskonen, 1997). Une fois de plus, ce modèle SHR + L-NAME est bien approprié à notre étude, puisque 6,6 % des patients de l'étude LIFE ont subi un AVC. Nous tenterons donc de reproduire dans ce modèle de rats la baisse du taux d'AVC observée dans l'étude LIFE (40%) avec le traitement au losartan, comparativement à l'atenolol. Finalement, d'autres études chez le rat ont démontré que les ARA et les β -bloqueurs protégeaient les rats hypertendus des AVC, mais aucune n'a comparé les deux médicaments dans la même cohorte (Nishimura, 2000; Savitz, 2000).

Chapitre 2

But et Hypothèses

Le but principal de cette étude est de développer un modèle de rat permettant de reproduire les conditions clés de l'étude LIFE, soit une baisse de pression systolique similaire entre le losartan et l'atenolol, une protection supérieure des accidents vasculaires cérébraux et une régression supérieure de l'hypertrophie cardiaque avec le losartan. Par la suite, la deuxième phase de l'étude a pour but de détecter les mécanismes précurseurs des AVC. Une nouvelle cohorte de SHR constituée des doses cibles de losartan et d'atenolol sera produite et les rats seront sacrifiés juste avant le moment de l'apparition des signes cliniques d'AVC. Des analyses fonctionnelles et pathologiques du cerveau, du cœur et de l'aorte de ces animaux seront alors effectuées, dans le but d'évaluer si les dommages causés à ces organes cibles pourraient précéder l'apparition d'AVC.

Nous testerons l'hypothèse que le remodelage thérapeutique de l'aorte est associé à la régression de l'hypertrophie cardiaque dans le modèle de rat SHR + L-NAME traité au losartan, comparativement à l'atenolol.

Ultimement, nous désirons explorer les mécanismes de prévention accrue des accidents vasculaires cérébraux avec le losartan, notamment une modulation du remodelage vasculaire et une inhibition plus efficace de l'inflammation vasculaire cérébrale.

Chapitre 3

Méthodologie

3.1 Animaux et traitements

Des SHR mâles pesant entre 275 et 300g (Charles River, St-Constant, Québec) ont été hébergés 48 heures avant toute manipulation ou administration de drogues. Les rats ont été manipulés selon les procédures du comité local de protection des animaux. Les SHR ont reçu du N^G-nitro-L-arginine-méthylester (L-NAME, 20 mg/kg/jour dans l'eau de breuvage; Sigma) ou son véhicule pour une période de cinq semaines. Après une semaine d'administration de L-NAME, les SHR ont été randomisés pour recevoir un placebo, du losartan (10, 20 ou 30 mg/kg/jour *p.o.*; Merck Frosst) ou de l'atenolol (10 ou 20 mg/kg/jour *p.o.*; Sigma). Une deuxième cohorte de rats a été produite afin d'examiner le développement des micro-thrombi cérébraux avant l'apparition des accidents vasculaires cérébraux. Ces SHR ont reçu du L-NAME (20 mg/kg/jour *p.o.*) ou son véhicule pendant deux semaines et ont été traités, après une semaine d'administration de L-NAME, au placebo, au losartan (20 mg/kg/jour *p.o.*) ou à l'atenolol (20 mg/kg/jour *p.o.*).

La pression artérielle systolique a été mesurée par plethysmographie à chaque semaine avant et pendant les traitements, pour tous les SHR. Les rats ont été préalablement entraînés pour la procédure. Les SHR ont été examinés quotidiennement pour dénombrer les évidences cliniques d'accidents vasculaires cérébraux. La présence de déficit neuronal a été déterminée selon cinq critères : 1) habileté réduite à se relever sur ses pattes à partir d'une position couchée sur le côté, 2) activité réduite et comportement d'exploration réduit, 3) sensibilité aux pattes réduite, 4) paralysie ou diminution d'utilisation d'un membre et 5) habileté réduite à s'agripper à quelque chose avec ses pattes avant lorsque ses pattes arrière ne touchent pas le sol. Les rats ont été euthanasiés dans les 24 heures suivant l'observation de tels déficits.

À la fin des traitements, les SHR ont été pesés et euthanasiés par injection *i.p.* d'un mélange de kétamine (50 mg/kg; MTC Pharmaceuticals), de xylazine (5 mg/kg; Bayer) et d'acépromazine (0,25 mg/kg; Ayerst). Une solution de chlorure de cadmium (100 nM; Sigma) a été injectée dans la veine cave pour induire un arrêt cardiaque en diastole. Les rats ont été perfusés avec de la saline avant le prélèvement des organes. Le cœur, l'aorte thoracique et le cerveau ont été prélevés immédiatement après la mort de l'animal. L'aorte a été nettoyée et mesurée. Le cœur et l'aorte ont été pesés. Des sections du cœur, de l'aorte et du cerveau ont été fixées toute la nuit dans une solution de paraformaldéhyde 4% (Sigma) pour les études histologiques et le reste des organes ont été gelés dans l'azote liquide et conservés à -80°C.

3.2 Histologie

Tous les tissus ont été traités pour l'inclusion à la paraffine. À l'aide d'un microtome, des sections de coeur et de cerveau ont été coupées à cinq μm d'épaisseur et des sections d'aorte ont été coupées à trois μm d'épaisseur. Les sections ont ensuite été chauffées à 46°C pendant 24 heures.

Pour la détection histologique des micro-thrombi cérébraux, des sections frontales de cerveaux ont été colorées à l'hématoxyline-éosine (Sigma). Les cerveaux colorés ont été examinés sous la lumière du microscope à un grossissement de 40X à l'aide d'un microscope Zeiss Axioskop (Carl Zeiss Microscopy, Jena, Germany). Le nombre de micro-thrombi cérébraux a été compté pour toute la surface du cerveau à l'aveugle par un seul observateur. La mesure des surfaces des sections cérébrales a été réalisée en utilisant le programme NIH ImageJ 1.32. Des photos des sections cérébrales ont été prises à un grossissement de 12,5X à l'aide du microscope Zeiss connecté à la caméra digitale SPOT (Diagnostic Instruments inc., Sterling Heights, MI) et à un ordinateur Macintosh G4.

La colocalisation des micro-thrombi cérébraux et de l'antithrombine III a été faite sur coupes consécutives de cerveaux. L'antithrombine III, un inhibiteur de la cascade de coagulation couramment utilisé comme marqueur de micro-thrombi cérébraux, a été révélé par immunohistochimie. Les sections de cerveaux ont été déparaffinées dans le xylène et dans une série de solution d'éthanol, puis lavées dans l'eau nanopure et du tampon phosphate (PBS). Ensuite, les tissus ont été placés dans un tampon citrate (0,01M, pH 6,0) pour une période de 20 minutes à 96°C pour démasquer les épitopes antigéniques. Après des lavages au PBS, l'activité des peroxydases endogènes a été inhibée par un traitement de 10 minutes au peroxyde d'hydrogène 3% dilué dans du PBS (H₂O₂; ACP Chemicals). Les sections ont été lavées au PBS et les protéines non-spécifiques ont été bloquées avec du sérum de chèvre 5% (Sigma) dilué dans du PBS-Tween 20 (0.1%) pour une période de 30 minutes à température pièce. Par la suite, les lames ont été incubées avec l'anticorps primaire polyclonal provenant du lapin anti-humain antithrombine III (1:50, Dako), toute la nuit à 4°C. Après des lavages au PBS, les lames ont été incubées une heure à la température de la pièce avec l'anticorps secondaire biotinylé chèvre anti-lapin (1:200, Dako). Les dilutions finales des anticorps primaire et secondaire ont été faites avec du PBS contenant du sérum de chèvre 1% et du Tween 0,1%. Pour révéler la coloration, un système de streptavidine-peroxydase de raifort (HRP; Dako) couplé au substrat 3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride (DAB; Sigma-Aldrich) a été utilisé. Finalement, les lames ont été légèrement contre-colorées avec l'hématoxyline et déshydratées dans une série de solutions d'éthanol et de xylène. Les lamelles ont été appliquées avec le medium de montage Permout (Fisher). Des contrôles négatifs ont été faits en omettant l'anticorps primaire. La colocalisation du marquage antithrombine III et des micro-thrombi cérébraux a été effectuée sur coupes consécutives de sections cérébrales et des photos de cette colocalisation ont été prises à un grossissement de 400X.

Les évidences d'infarctus du myocarde ont été observées suite à la coloration des sections de cœur au Gomori's one-step trichrome stain kit (Newcomer Supply, Middleton).

Les cœurs colorés ont été examinés sous la lumière du microscope à un grossissement de 40X et le pourcentage de la zone infarctée a été calculé à l'aide d'une grille intégrée dans les oculaires.

Afin de déterminer l'aire de section médiale des aortes, des sections de trois μm d'épaisseur ont été colorées avec l'hématoxyline (Sigma). Des photos des sections d'aorte ont été prises à un grossissement de 40X avec un microscope Zeiss Axioskop connecté à une caméra digitale SPOT et à un ordinateur Macintosh G4. Les mesures des aires de sections ont été faites avec le programme NIH ImageJ 1,32. Trois mesures ont été prises pour chaque aorte afin d'assurer la reproductibilité.

3.3 Mesures du nombre de cellules musculaires lisses aortiques

Le nombre de cellules musculaires lisses par unité de surface dans l'aorte a été déterminé à partir de la méthode du dissecteur en trois dimensions, une procédure quantitative indépendante de l'orientation, de la forme et de la grosseur des noyaux. Trois sections consécutives d'aorte ont été colorées avec l'hématoxyline (Sigma) et observées sous la lumière du microscope. Le calcul du nombre de cellules par unité de surface du vaisseau a été fait tel que décrit précédemment (deBlois, 1997).

3.4 Mesures des paramètres hémodynamiques

À la fin des traitements, après deux semaines de L-NAME, certains rats ont été anesthésiés au pentobarbital (65 mg/kg *i.p.*) et un cathéter de polyéthylène PE50 a été inséré dans l'arche aortique par l'artère carotide gauche. Un autre cathéter PE50 a été inséré dans l'aorte abdominale distale par l'artère fémorale gauche. Les cathéters ont été connectés à un transducteur de pression pour permettre la mesure de la pression artérielle systolique et diastolique ainsi que les battements cardiaques. La pression pulsée a été calculée à partir de ces mesures. L'onde de pouls a été enregistrée à une vitesse de 500Hz.

À la fin des mesures hémodynamiques et après la mort de l'animal, la distance entre les extrémités des deux cathéters a été mesurée. La vitesse de l'onde de pouls a été calculée en divisant la distance de propagation par le temps de propagation (m/sec). Au moins 10 mesures normales et consécutives ont été individuellement analysées et la moyenne a été calculée.

3.5 Propriétés mécaniques de l'artère cérébrale moyenne

Suite à la mort de l'animal, l'artère cérébrale moyenne a été isolée par dissection sous microscope dans une solution de Krebs. L'artère a ensuite été montée et attachée à deux canules de verre dans une chambre de vaisseaux. L'artère a été perfusée à l'intérieur et à l'extérieur de la lumière avec une solution de Krebs sans calcium. L'image de la chambre de vaisseaux a été amplifiée par un microscope et transmise à un moniteur et un analyseur de dimension vidéo permettant la mesure des diamètres interne, externe et médiale. Les artères ont été équilibrées pendant 30 minutes dans une solution de Krebs sans calcium afin de prévenir le tonus myogénique. La pression de perfusion a été augmentée de 0 mmHg à 80 mmHg par tranche de 20 mmHg. La structure vasculaire a été enregistrée à toutes les pressions. Toutefois, les données de pression ont été analysées à 20 mmHg, puisqu'à partir de 40 mmHg la distinction entre la média et l'adventis n'était plus visible.


3.6 Statistiques

Les données sont exprimées en moyenne \pm l'erreur type (S.E.M.). Les données de pression artérielle ont été analysées avec le test t de Student en comparant la semaine 0 et la semaine 2 pour chacun des groupes. Les courbes d'évènement d'accidents vasculaires cérébraux Kaplan-Meier ont été analysées avec le test χ^2 . Tous les autres résultats ont été analysés avec un test t Student ou une analyse de variance (ANOVA) suivi d'une correction de Bonferroni pour les multiples comparaisons. Le seuil de signification a été établi lorsque $P < 0,05$.

ACCORDS DES COAUTEURS

A) Déclaration des coauteurs d'un article

1. Identification de l'étudiant et du programme

Stéphanie Pesant (Code Permanent : 
2-520-1-0 Pharmacologie (M.Sc.)

2. Description de l'article

**Stéphanie Pesant, Taben Hale, David Duguay, Luis Robles Bokun,
Pierre Moreau and Denis deBlois (2006)**

L-NAME increases cerebral vascular micro-infarcts prior to stroke in SHR:
enhanced protection with losartan versus atenolol. *Stroke*. (Soumis)

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

À titre de coauteur de l'article identifié ci-dessus, je suis d'accord pour que
Stéphanie Pesant inclus cet article dans son mémoire de maîtrise qui a pour titre
« Protection des organes cibles dans l'hypertension à l'aide d'un antagoniste
des récepteurs AT1 (losartan) versus un beta-bloqueur (atenolol) »

Taben Hale
Coauteur


Signature

10/01/2006
Date

David Duguay
Coauteur


Signature

10/01/2006
Date

Luis Robles Bokun
Coauteur



10/01/2006
Date

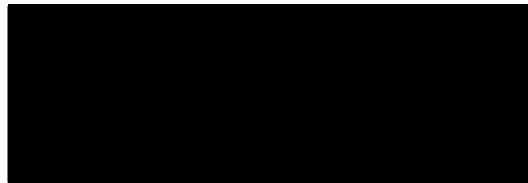
Pierre Moreau
Coauteur



Signature

10/01/2006
Date

Denis deBlois
Coauteur



Signature

10/01/2006
Date

AUTORISATION DE L'ÉDITEUR

B) Permission de l'éditeur de la revue

1. Identification de la revue

Stroke

2. Identification de l'éditeur

Lippincott Williams & Wilkins

3. Identification de l'article

**Stéphanie Pesant, Taben Hale, David Duguay, Luis Robles Bokun,
Pierre Moreau and Denis deBlois**

L-NAME increases cerebral vascular micro-infarcts prior to stroke in SHR:
enhanced protection with losartan versus atenolol.

L'autorisation de l'éditeur sera donnée lors de l'acceptation de l'article.

IMPLICATION DES COAUTEURS

- Taben Hale : Implication dans les manipulations et chirurgies animales;
- David Duguay : Implication dans les manipulations et chirurgies animales;
- Luis Robles Bokun : Implication dans le comptage des infarctus du myocarde;
- Pierre Moreau : Co-directeur de recherche;
- Denis deBlois : Directeur de recherche.

Chapitre 4

Résultats

4.1 L-NAME increases cerebral vascular micro-infarcts prior to stroke in SHR: enhanced protection with losartan versus atenolol

Stéphanie Pesant^a, Taben Hale^a, David Duguay^a, Luis Robles Bokun^a, Pierre Moreau^b and Denis deBlois^a

^aDepartment of Pharmacology, Faculty of Medicine and ^bFaculty of Pharmacy, University of Montreal, Montreal, Canada.

Correspondence to Denis deBlois, Department of Pharmacology, Faculty of Medicine, University of Montreal, 2900, boul. Édouard-Montpetit, Montreal, Quebec, Canada, H3T 1J4.

Soumis à *Stroke*

4.1.1 Abstract

Objective The LIFE trial recently showed that, at equipotent anti-hypertensive doses, losartan is superior to atenolol in reducing left ventricular hypertrophy (LVH) and stroke in hypertensive patients. To better define the underlying mechanisms, we examined the effects of these drugs on LVH, stroke and cerebral micro-infarcts in spontaneously hypertensive rats (SHR) receiving the NO synthase inhibitor L-NAME.

Design and Methods SHR received L-NAME (20 mg/kg/d p.o.) or its vehicle for up to five weeks. After one week of L-NAME, rats received placebo, losartan (10, 20 or 30 mg/kg/d p.o.) or atenolol (10 or 20 mg/kg/d p.o.). A subset of rats was used to examine L-NAME-induced cerebral micro-infarct development prior to stroke (development of motor or sensory deficits) after one week of placebo, losartan (20 mg/kg/d p.o.) or atenolol (20 mg/kg/d p.o.). Cerebral vascular micro-infarcts were assessed histologically in hematoxylin-eosin stained brain coronal sections. Blood pressure was measured by tail cuff plethysmography.

Results As compared to vehicle, L-NAME administration increased systolic blood pressure significantly by 39% (at two weeks vs. vehicle: 168 ± 11 mmHg) and left ventricular mass by 43% within five weeks. Stroke was absent with vehicle but markedly increased with L-NAME (stroke onset: 15 days; prevalence at five weeks: 93%). Losartan (20 mg/kg/d) and atenolol (20 mg/kg/d) reduced systolic pressure equipotently (by 16% at two weeks of L-NAME). In contrast, losartan was significantly more effective than atenolol in reducing LVH and stroke over five weeks of L-NAME (stroke onset: >35 days and 24 days, respectively; prevalence at five weeks: 0% and 50%, respectively). Protection against stroke was equivalent with atenolol 10 and 20 mg/kg/d, suggesting a weaker maximal protective effect with atenolol. Cerebral vascular micro-infarcts were increased 2-fold within five weeks of L-NAME, an effect that was completely prevented by losartan 20 mg/kg/d but only partially by atenolol 20 mg/kg/d. After two weeks of L-NAME

administration, myocardial infarcts were evident in all SHR. Losartan 20 mg/kg/d, but not atenolol 20 mg/kg/d, significantly reduced the percentage of the infarcted area (by 70% and 20%, respectively). Cerebral vascular micro-infarcts were already increased by 2-fold before the onset of stroke (at 2 weeks of L-NAME) and this was significantly reduced with losartan 20 mg/kg/d, but not atenolol 20 mg/kg/d (by 30% and 15%, respectively).

Conclusions Consistent with the LIFE study; an equipotent antihypertensive dose of losartan is superior to atenolol in reducing LVH and cerebral damage in L-NAME SHR. The enhanced protection with losartan may involve reduced cerebral vascular micro-infarct formation preceding stroke.

4.1.2 Introduction

Hypertension is a major risk factor for cardiovascular morbidity and mortality. Recently, the LIFE trial (Losartan Intervention For Endpoint reduction in hypertension) showed that, at equipotent anti-hypertensive doses, losartan was superior to atenolol in reducing LVH and stroke in hypertensive patients (Dahlof, 2002). A sub-study of LIFE performed with isolated systolic hypertensive patients showed a 40% reduction in stroke with losartan treatment, compared to Atenolol (Kjeldsen, 2002). Although stroke is the third most common cause of death worldwide and a major disability burden (Warlow, 2003), the underlying mechanisms responsible for the clinical observations of the LIFE study remain poorly defined.

The spontaneously hypertensive rat (SHR) is a commonly studied, genetic model of primary hypertension. Administration of the nitric oxide synthase inhibitor N^G-nitro-L-arginine-methylester (L-NAME) to SHR is known to produce a dramatic increase in blood pressure (Varagic, 2000). Moreover, chronic administration of L-NAME to these rats results in malignant hypertension, stroke and cardiac hypertrophy (Vaskonen, 1997; Meneses, 1998; Reaves, 2003; Olzinski, 2005). The characteristics of SHR receiving L-NAME are similar to patients with cardiac hypertrophy and increased risk for brain and renal damages.

Recently, several studies showed that silent brain infarcts increase strongly and independently stroke risks in the general population. Moreover, these asymptomatic strokes are present numerous years before the onset of symptomatic stroke (Vermeer, 2003, Bernick, 2001 #189). Whether these early cerebral lesions are affected by current anti-hypertensive treatments remains to be determined.

The present study compared target organ protection offered by losartan or atenolol treatment in SHR receiving L-NAME. The principal objective was to develop a model reproducing key end-points of the LIFE clinical trial and allowing the investigation of silent brain infarct development before the onset of symptomatic strokes. To achieve this aim, it was critical that losartan and atenolol produced a similar decrease in blood pressure in order to examine the effects of these drugs on LVH, myocardial infarctions, aortic hypertrophy, brain damages and strokes in order to better characterize the underlying mechanisms.

4.1.3 Methods

Animal treatments and surgical procedures

Male SHR weighing between 275 and 300g (Charles River, St-Constant, Quebec) were housed 48 hours before any manipulation or drug administration. All procedures were in accordance with the Canadian Council on Animal Care, and the guidelines of the Institutional Committee for the Protection of Animals (Hotel Dieu, Montreal). SHR received N^G-nitro-L-arginine-methylester (L-NAME, 20 mg/kg/day in the drinking water; Sigma) or its vehicle for up to five weeks. After one week of L-NAME, rats were randomized to receive placebo, losartan (10-20-30 mg/kg/day *p.o.*; Merck Frosst) or atenolol (10-20 mg/kg/day *p.o.*; Sigma). A subset of rats was used to examine L-NAME-induced cerebral micro-infarct development prior to stroke (development of motor or sensory deficits) after one week of placebo, losartan (20 mg/kg/day *p.o.*) or atenolol (20 mg/kg/day *p.o.*)

Systolic arterial pressure was measured by tail-cuff plethysmography for each rat before the beginning of L-NAME administration and weekly after. Rats were previously trained for the procedure. SHR were examined each day during treatment for clinical evidence of stroke. The presence of neurological deficit was defined based on the following five criteria: 1) reduced ability to flip over from the side to the paws, 2) reduced activity and exploratory behavior, 3) reduced sensitivity to the paws following pressure between fingers, 4) paralysis or reduced use of one or more limbs, and 5) rat showed reduced ability to grip and hang with its front paws. Euthanasia was performed on rats within the 24 hours following the observation of one of these neurological deficits.

At the end of the treatments, SHR were weighed and anesthetized with an *i.p.* injection of a mixture containing ketamine (50 mg/kg; MTC Pharmaceuticals), xylazine (5

mg/kg; Bayer) and acepromazine (0.25 mg/kg; Ayerst). A cadmium chloride solution (100 nM; Sigma) was injected in the vena cava to induce diastolic cardiac arrest. Rats were perfused with saline prior to excision of the heart, the thoracic aorta and the brain. The thoracic aorta was cleaned and the length was measured. The heart and the aorta were weighed. Segments in the middle of the heart, the aorta and the brain were fixed overnight for histological studies in 4% paraformaldéhyde in PBS (Sigma). The distal segments of the organs were snap frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C.

Histological studies

For histological assessment of cerebral vascular micro-infarcts, brain coronal sections (5 µm) were stained with hematoxylin-eosin (Sigma). The stained brains were examined under light microscopy at a 40X magnification with a Zeiss Axioskop microscope (Carl Zeiss Microscopy, Jena, Germany) and the number of cerebral micro-infarcts was counted in the whole brain section by a single observer, blind to all treatment protocols. Area measurements of the brain sections were made using NIH ImageJ 1.32 program. Pictures of the brain sections were taken at a 12.5X magnification with the Zeiss microscope connected to a SPOT Digital Camera (Diagnostic Instruments inc., Sterling Heights, MI) and a Macintosh G4 computer.

Co-localisation of the micro-infarcts and antithrombin III was made on consecutive brain sections. Antithrombin III, an inhibitor of the coagulation cascade frequently used as a marker of cerebral micro-infarct, was revealed by immunohistochemistry. Brain sections were dewaxed in xylene and taken through a series of ethanols to water and phosphate buffered saline (PBS). The tissues were placed in a citrate buffer (0.01M, pH6.0) for 20 minutes at 96°C to facilitate antigen retrieval. Following washes in PBS, endogenous peroxidase activity was quenched by incubation in 3% hydrogen peroxide (ACP Chemicals) in PBS for 10 minutes. Sections were then washed in PBS and blocked with 5%

goat serum (Sigma) in PBS-Tween 20 (0.1%) for 30 minutes at room temperature. The slides were incubated overnight at 4°C with the polyclonal rabbit anti-human antithrombin III antibody (1:50, Dako). The slides were then washed in PBS and incubated for one hour at room temperature with biotinylated goat anti-rabbit secondary antibody (1:200, Dako). Final dilutions of primary and secondary antibodies were made with PBS containing 1% goat serum and 0.1% Tween. A streptavidin-horseradish peroxidase system (HRP; Dako) with the substrate 3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride (DAB; Sigma-Aldrich) was used to develop the stain. The slides were then lightly counterstained with hematoxylin, dehydrated in ethanols and cleared in xylene. Coverslips were applied with Permount mounting medium (Fisher). Appropriate negative controls were performed by omitting the primary antibody. Co-localisation of the antithrombin III staining and the cerebral micro-infarcts were made on consecutive brain sections and pictures were taken at a 400X magnification.

Evidence of myocardial infarction was shown by Gomori's one-step trichrome staining (Newcomer Supply, Middleton) of the heart sections (5 µm thickness). The stained hearts were examined under light microscopy at a 40X magnification and the percentage of infarcted area was determined.

To determine the medial cross-sectional area (CSA) of the aortas, sections of 3 µm thick were stained with hematoxylin (Sigma). Pictures of arterial sections were taken at a 40X magnification with a Zeiss Axioskop microscope connected to a SPOT Digital Camera and a Macintosh G4 computer. CSA measurements were made using NIH ImageJ 1.32 software.

Determination of Smooth Muscle Cell Number

The smooth muscle cell number per unit length in aorta was determined using the 3 dimensional disector method, a quantification procedure independent of nucleus orientation, shape, or size. Three consecutive aortic cross-sections were stained with

hematoxylin (Sigma) and observed under light microscopy. The calculation of the number of cells per unit vessel length was performed as we previously described (deBlois, 1997).

Statistical Analyses

Data are expressed as mean \pm standard error of the mean (S.E.M.). The blood pressure data was analyzed by Student *t* test to compare week 0 and week 2 for each group. The Kaplan-Meier stroke event curves were analyzed by chi-square test (χ^2 test). All the other results were analyzed by Student *t* test or one-way analysis of variance (ANOVA) with Bonferroni correction for multiple comparisons. Significance was defined as $P < 0.05$.

4.1.4 Results

Blood Pressure

Because of differential mortality rates between groups (discussed below), we compared the antihypertensive effects of losartan and atenolol after one week of drug treatment (corresponding to week two of the study). At the beginning of the experiment, baseline systolic blood pressure was 185 ± 2 mmHg (n=62). At week two, the increase in systolic blood pressure caused by L-NAME administration (233 ± 5 mmHg; n=8) was reduced significantly by losartan 20 and 30 mg/kg/d (196 ± 11 mmHg; n=14 and 210 ± 14 mmHg; n= 6 respectively) and atenolol 20 mg/kg/d (195 ± 10 mmHg; n= 8) (**Figure 1**).

Heart Analyses

L-NAME administration increased left ventricular mass in SHR (3.55 ± 0.10 mg/g; n=8 and 5.09 ± 0.36 mg/g; n=14, for the control and L-NAME groups respectively). This increased mass was significantly prevented by all of the losartan treatments (10-20-30 mg/kg/d), but not by the atenolol treatments (10-20 mg/kg/d) (**Figure 2**). Myocardial infarcts were evident in all SHR receiving L-NAME for two weeks as compared to control SHR (% of cardiac area: 0.75 ± 0.21 %; n=14 and 7.23 ± 0.82 %; n=14, for the control and L-NAME groups respectively). Losartan-20, but not atenolol-20, significantly reduced the percentage of myocardial infarcts (% of cardiac area: 2.20 ± 0.36 %; n=14 and 5.74 ± 1.21 %; n=14, respectively) (**Figure 3**).

Aortic Analyses

Though not statistically significant, L-NAME administration, for a period of two to five weeks, resulted in 21% increase ($P > 0.05$; $n=13$) in aortic cross-sectional area (**Table D**). At this point, losartan 20 mg/kg/d and atenolol 20 mg/kg/d may have prevented, but not significantly, that increase in aortic hypertrophy (13%; $n=14$ and 13%; $n=7$, respectively). In contrast, after two weeks of L-NAME administration (only one week of losartan and atenolol treatment), L-NAME administration produced a non significant 14% increase ($n=13$) in aortic cross-sectional area and there was no significant difference between L-NAME, losartan (10%) and atenolol (16%) groups. Moreover, the number of smooth muscle cells in the aortas measured after two weeks of L-NAME administration was increased not significantly by 36% in the L-NAME group ($n=5$). We observed that there was a small trend for the losartan-20, but not for the atenolol-20, to decrease the number of smooth muscle cells in the aortas of SHR receiving L-NAME (30%; $n=5$ and 38%; $n=6$, respectively) (**Table D**).

Stroke events

Clinical signs of stroke (as described above) were absent with vehicle but markedly increased with L-NAME administration (stroke onset: 15 days; stroke prevalence at five weeks: 93%). Overall, SHR receiving L-NAME had better protection against stroke events with losartan than atenolol (all doses combined: 19.2% and 42.9% of stroke event respectively, within five weeks) (**Figure 4**). The Kaplan Meier stroke event curves showed that losartan 20 mg/kg/d ($n=14$) had a significantly higher protection against stroke events than atenolol 20 mg/kg/d ($n=8$) over five weeks of L-NAME (stroke onset: >35 days and 24 days, respectively; stroke prevalence at five weeks: 0% and 50%, respectively). The protective effect was significantly proportional to the administered dose for losartan, but not for atenolol; protection was equivalent with atenolol 10 and 20 mg/kg/d. Moreover, no

stroke event occurred in the losartan 20-30 mg/kg/d and the control groups within the 35-day experimental period (**Figure 5**).

Cerebral micro-infarcts

L-NAME administration induced cerebral micro-infarcts in the brain of SHR, as evidenced by co-localisation of the micro-infarcts and antithrombin III on consecutive brain sections (**Figure 6**). We found evidence that overall brain damage was reduced by losartan 20 mg/kg/d, but not atenolol 20 mg/kg/d. In the survival studies, cerebral micro-infarcts were decreased in the losartan 20mg group but not in the atenolol 20mg group within five weeks of L-NAME administration ($0.64 \pm 0.07 \text{ \#/mm}^2$; n=8 and $1.10 \pm 0.09 \text{ \#/mm}^2$; n=8 respectively vs. $1.71 \pm 0.36 \text{ \#/mm}^2$ for the L-NAME group; n=6) (**Figure 7a**). Interestingly, cerebral micro-infarcts were already increased by 63% after two weeks of L-NAME administration. Thus, before the onset of clinical sign of stroke, cerebral micro-infarcts were also decreased in the losartan 20mg group, but not in the atenolol 20mg group ($0.76 \pm 0.08 \text{ \#/mm}^2$ and $0.93 \pm 0.10 \text{ \#/mm}^2$ respectively vs. $1.10 \pm 0.09 \text{ \#/mm}^2$ for the L-NAME group; n=14) (**Figure 7b**).

4.1.5 Discussion

The overall objective of the present study was to develop a rat model that reproduced key end-points of the LIFE clinical trial. Specifically, a head to head comparison of an angiotensin-II type 1-receptor antagonist (losartan) and a β_1 -adrenergic receptor antagonist (atenolol) was performed, in a rat model of stroke and cardiac hypertrophy. This was done in order to determine cellular and tissue mechanisms of the benefits beyond blood pressure reduction seen in the LIFE study.

For a similar reduction in systolic blood pressure, we showed in the survival study that losartan was superior to atenolol in reducing cardiac hypertrophy and protecting against stroke events (stroke prevalence at five weeks: 0% and 50%, respectively and increase of LVH by 10% and 39%, respectively). These results suggest that critical conditions of the LIFE clinical trial were reproduced for the first time in a SHR receiving L-NAME model. In the second phase of the study, SHR received L-NAME only for a period of two weeks. This period corresponds to the moment prior to the beginning of clinical stroke events. This part of the study was designed to characterize cardiovascular function and tissue pathology alterations leading to increased stroke events. We observed that losartan, but not atenolol, reduced myocardial infarctions and cerebral micro-infarcts caused by L-NAME before the onset of clinical signs of strokes. To our knowledge, this study is the first to report that losartan, but not atenolol, is able to prevent cerebral damages and myocardial infarctions before the onset of clinical stroke events in a rat model of systolic hypertension.

The major difference between our study and the clinical LIFE study is the incidence of myocardial infarctions. In the LIFE trial, around 4% of the patients suffered from myocardial infarctions (Dahlof, 2002). In our rat model, every SHR who received L-

NAME and placebo had myocardial infarctions ($0.75 \pm 0.21\%$ and $7.23 \pm 0.82\%$; infarcted area for the control and L-NAME groups respectively). These results are consistent with the results of Vaskonen et al. who reported that all SHR receiving L-NAME had several myocardial infarctions (Vaskonen, 1997). In our model, only losartan prevented significantly myocardial infarctions, contrary to the LIFE study in which losartan and atenolol demonstrated the same myocardial infarction incidence. These differences could be related to the fact that almost 40% of myocardial infarctions are silent or unrecognized in hypertensive patients (Kannel, 1995). Myocardial infarction incidence observed in the LIFE study is based on clinical evidence. If a routine ECG examination for detection of silent myocardial infarctions had been done, this incidence could be more important and potential differences between the two treatments may have been evident.

We showed that L-NAME administration in SHR increased left ventricular hypertrophy. Induction of cardiac hypertrophy in that rat model was also commonly observed by other investigators (Ono, 1999; de Gasparo, 2002; Olzinski, 2005). Similarly to the LIFE trial, we observed that losartan, but not atenolol, prevented this effect. Losartan could possibly prevent cardiac hypertrophy by initiating therapeutic remodeling in the aorta and reducing the aortic stiffness. Sventek et al. showed that L-NAME induces aortic hypertrophy in SHR (Sventek, 1996). Conversely, we only observed a non significant 21% increase in aortic hypertrophy after L-NAME administration and a trend in reducing this aortic hypertrophy with both losartan and atenolol (increased by only 13% each). Even if these results are not statistically significant, this aortic hypertrophy increase with L-NAME may be biologically significant. The mechanism by which changes in mass occur in aorta and left ventricle with these treatments remains unknown.

In our rat model, almost all SHR receiving L-NAME for a period of five weeks showed some clinical signs of stroke, beginning at day 14. These results are consistent with the study of Vaskonen et al. reporting that approximately 63% of SHR receiving L-NAME at 20 mg/kg/d for 21 days suffered strokes, beginning after 13 days (Vaskonen, 1997).

Furthermore, the group of Blot et al. showed that in Wistar rats receiving L-NAME at 50 mg/kg/d for 11 weeks, 79% of these hypertensive rats had motor dysfunctions (Blot S, 1994). Interestingly, they observed that all of the rats with stroke had spinal cord infarcts either alone or combined with brain lesions. In our study, we shown that losartan provided better protection against stroke in SHR receiving L-NAME, than atenolol. The fact that brain damages were reduced only by losartan before the onset of clinical stroke is very interesting, because the latest clinical outcomes reported that these silent cerebral infarcts strongly and independently increased risk of symptomatic stroke (Bernick, 2001; Vermeer, 2003). Thus, losartan may have a protective effect against stroke by reducing cerebral micro-infarcts.

The underlying mechanisms mediating these protective effects of losartan are currently undetermined. However these changes may be due to antiaggregatory effects, to an interaction between the heart and the brain or to anti-inflammatory properties. Losartan is known to have some antithrombotic actions by blocking platelet aggregation induced by the thromboxane A₂ (TXA₂) analog, U46619, and displaces ligand binding to the TXA₂ receptor (Lopez-Farre, 2001; Sadoshima, 2002). This antiaggregatory effect could perhaps reduce thrombosis formation in the brain. However, Chabielska et al. demonstrated that the antithrombotic activity of losartan in SHR was abolished by L-NAME administration; our rat model could possibly represent another example of this effect (Chabielska, 1998). Interaction between the heart and the brain could represent another mechanism. Other studies demonstrated an association between left ventricular hypertrophy and stroke (Bikkina, 1994; Verdecchia, 2001). Recently, LVH was also associated with asymptomatic cerebral damage in hypertensive patients (Selvetella, 2003). In our rat model, only losartan succeeded in reducing LVH. Thus, cardiac hypertrophy prevention could lead to a reduction in cerebral micro-infarcts. Also, a relationship between myocardial infarctions and brain injuries could possibly be made as we observed the same pattern of protection with losartan and atenolol in these two types of injuries. The last major hypothesis is relating to the anti-inflammatory property of losartan. Losartan demonstrated a decrease in

vascular inflammation markers in patients (Graninger, 2004). This anti-inflammatory property is mostly produced by the EXP3179 metabolite that appears to act as a COX inhibitor (Sadoshima, 2002). Another mechanism is the inflammatory effects of angiotensin II mediated by the AT1 receptor. Angiotensin II is a pro-inflammatory agent involved in endothelial dysfunction of hypertension by activation of inflammatory mediators like nuclear factors, cytokines and adhesion molecules. Recently, a study demonstrated the potent anti-inflammatory effects of the AT1 receptor antagonists in cerebral micro-vessels of SHR. The AT1 receptor antagonists decrease the expression of several inflammatory cytokines (Zhou, 2005). Angiotensin II acting on AT1 receptors is also known to produce pro-inflammatory effects nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADPH) oxidase-mediated reactive oxygen species production in vascular cells. This inflammation is mediated by the AT1 receptor as well as all other pathologic effects of angiotensin II. As demonstrated by clinical studies, AT1 receptor antagonists decrease inflammatory mediator expression, whereas β -blockers have no effect (Schiffrin, 2002). Moreover, a recent study reported that anti-inflammatory effects of AT1 receptor antagonists may be an important mechanism in protecting against ischemia in the brain microvessels of SHR (Ando, 2004). Thus, losartan could possibly reduce cerebral inflammation in the brain of SHR receiving L-NAME, producing a decrease in the number of cerebral micro-infarcts.

In summary, the critical conditions and findings of the LIFE study were reproduced in our SHR receiving L-NAME model. The greater protection of losartan against stroke and cardiac hypertrophy could be dissociated from blood pressure lowering. Losartan, but not atenolol, significantly reduced brain damages and myocardial infarctions caused by L-NAME administration before the onset of clinical signs of stroke. The development of this model may impact on future studies determining mechanisms and potential new treatment strategies for stroke.

4.1.6 References

- Ando H, Zhou J, Macova M, Imboden H, Saavedra JM** (2004). Angiotensin II AT1 receptor blockade reverses pathological hypertrophy and inflammation in brain microvessels of spontaneously hypertensive rats. *Stroke* 35: 1726-31.
- Bernick CM, Kuller LMDD, Dulberg CPMPH, Jr WTLMDMPH, Manolio TMM, Beauchamp NM, Price TM, for the Cardiovascular Health Study Collaborative Research Group** (2001). Silent MRI infarcts and the risk of future stroke: The cardiovascular health study. *Neurology* 57: 1222-1229.
- Bikkina M, Levy D, Evans JC, Larson MG, Benjamin EJ, Wolf PA, Castelli WP** (1994). Left ventricular mass and risk of stroke in an elderly cohort. The Framingham Heart Study. *Jama* 272: 33-6.
- Blot S AJ, Xu Y, Gray F, Michel JB** (1994). Spinal cord infarcts during long-term inhibition of nitric oxide synthase in rats. *Stroke* 25: 1666-1673.
- Chabielska E, Pawlak R, Golatowski J, Rolkowski R, Pawlak D, Buczek W** (1998). Losartan Inhibits Experimental Venous Thrombosis in Spontaneously Hypertensive Rats. *Thrombosis Research* 90: 271-278.
- Dahlof B** (2002). Cardiovascular morbidity and mortality in the Losartan Intervention For Endpoint reduction in hypertension study (LIFE): a randomised trial against atenolol. *The Lancet* 359: 995-1003.
- de Gasparo M, Hess P, Clozel M, Persohn E, Roman D, Germann PG, Clozel JP, Webb RL** (2002). Combination of low-dose valsartan and enalapril improves endothelial dysfunction and coronary reserve in Nomega-nitro-L-arginine methyl ester-treated spontaneously hypertensive rats. *J Cardiovasc Pharmacol* 40: 789-800.
- deBlois D, Tea BS, Than VD, Tremblay J, Hamet P** (1997). Smooth muscle apoptosis during vascular regression in spontaneously hypertensive rats. *Hypertension* 29: 340-9.

- Graninger M, Reiter R, Drucker C, Minar E, Jilma B (2004).** Angiotensin receptor blockade decreases markers of vascular inflammation. *J Cardiovasc Pharmacol* 44: 335-9.
- Kannel WB (1995).** Framingham study insights into hypertensive risk of cardiovascular disease. *Hypertens Res* 18: 181-96.
- Kjeldsen SE, Dahlof B, Devereux RB, Julius S, Aurup P, Edelman J, Beevers G, de Faire U, Fyhrquist F, Ibsen H, Kristianson K, Lederballe-Pedersen O, Lindholm LH, Nieminen MS, Omvik P, Oparil S, Snapinn S, Wedel H, for the LIFE Study Group (2002).** Effects of Losartan on Cardiovascular Morbidity and Mortality in Patients With Isolated Systolic Hypertension and Left Ventricular Hypertrophy: A Losartan Intervention For Endpoint Reduction (LIFE) Substudy. *JAMA* 288: 1491-1498.
- Lopez-Farre A, Sanchez de Miguel L, Monton M, Jimenez A, Lopez-Bloya A, Gomez J, Nunez A, Rico L, Casado S (2001).** Angiotensin II AT1 receptor antagonists and platelet activation. *Nephrol. Dial. Transplant.* 16: 45-49.
- Meneses A, Hong E (1998).** Spontaneously Hypertensive Rats : A Potential Model to Identify Drugs for Treatment of Learning Disorders. *Hypertension* 31: 968-972.
- Olzinski AR, McCafferty TA, Zhao SQ, Behm DJ, Eybye ME, Maniscalco K, Bentley R, Frazier KS, Milliner CM, Mirabile RC, Coatney RW, Willette RN (2005).** Hypertensive target organ damage is attenuated by a p38 MAPK inhibitor: role of systemic blood pressure and endothelial protection. *Cardiovasc Res* 66: 170-8.
- Ono Y, Ono H, Matsuoka H, Fujimori T, Frohlich ED (1999).** Apoptosis, coronary arterial remodeling, and myocardial infarction after nitric oxide inhibition in SHR. *Hypertension* 34: 609-16.
- Reaves PY, Beck CR, Wang HW, Raizada MK, Katovich MJ (2003).** Endothelial-independent prevention of high blood pressure in L-NAME-treated rats by angiotensin II type I receptor antisense gene therapy. *Exp Physiol* 88: 467-73.

- Sadoshima J** (2002). Novel AT1 Receptor-Independent Functions of Losartan. *Circ Res* 90: 754-756.
- Schiffrin EL** (2002). Beyond blood pressure: the endothelium and atherosclerosis progression. *Am J Hypertens* 15: 115S-122S.
- Selvetella G, Notte A, Maffei A, Calistri V, Scamardella V, Frati G, Trimarco B, Colonnese C, Lembo G** (2003). Left Ventricular Hypertrophy Is Associated With Asymptomatic Cerebral Damage in Hypertensive Patients. *Stroke* 34: 1766-1770.
- Sventek P, Li J-S, Grove K, Deschepper CF, Schiffrin EL** (1996). Vascular Structure and Expression of Endothelin-1 Gene in L-NAME-Treated Spontaneously Hypertensive Rats. *Hypertension* 27: 49-55.
- Varagic J, Jerkic M, Jovovic D, Nastic-Miric D, Adanja-Grujic G, Markovic-Lipkovski J, Lackovic V, Radujkovic-Kuburovic G, Kentera D** (2000). Regional hemodynamics after chronic nitric oxide inhibition in spontaneously hypertensive rats. *Am J Med Sci* 320: 171-6.
- Vaskonen T, Mervaala E, Krogerus L, Teravainen TL, Laakso J, Karppanen H, Vapaatalo H** (1997). Cardiovascular effects of chronic inhibition of nitric oxide synthesis and dietary salt in spontaneously hypertensive rats. *Hypertens Res* 20: 183-92.
- Verdecchia P, Porcellati C, Reboldi G, Gattobigio R, Borgioni C, Pearson TA, Ambrosio G** (2001). Left ventricular hypertrophy as an independent predictor of acute cerebrovascular events in essential hypertension. *Circulation* 104: 2039-44.
- Vermeer SE, Hollander M, van Dijk EJ, Hofman A, Koudstaal PJ, Breteler MMB** (2003). Silent Brain Infarcts and White Matter Lesions Increase Stroke Risk in the General Population: The Rotterdam Scan Study. *Stroke* 34: 1126-1129.
- Warlow C, Sudlow C, Dennis M, Wardlaw J, Sandercock P** (2003). Stroke. *The Lancet* 362: 1211-1224.

Zhou J, Ando H, Macova M, Dou J, Saavedra JM (2005). Angiotensin II AT1 receptor blockade abolishes brain microvascular inflammation and heat shock protein responses in hypertensive rats. *J Cereb Blood Flow Metab* 25: 878-86.

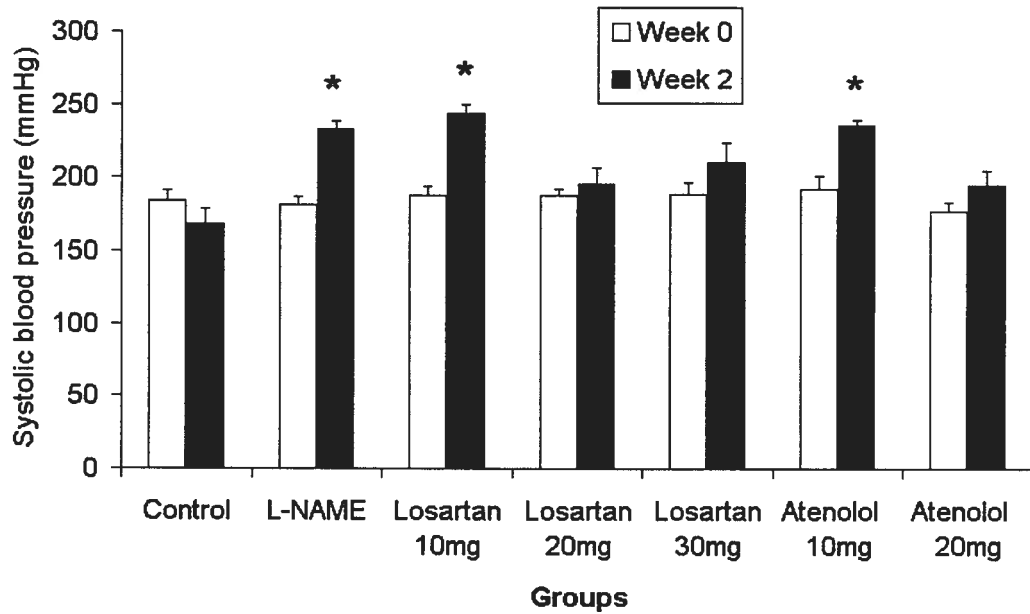


Figure 1 Systolic blood pressure in SHR control and SHR receiving L-NAME (20 mg/kg/d) at week 0 and 2 of the study. Losartan and atenolol were given for one week, one week after starting the L-NAME administration in SHR. Only losartan 20-30mg and atenolol 20mg prevented the increase in systolic blood pressure induced by L-NAME administration (* $P < 0.05$ week 0 vs. week 2 by Student t test, $n=8-14-6-14-6-6-8$ /group).

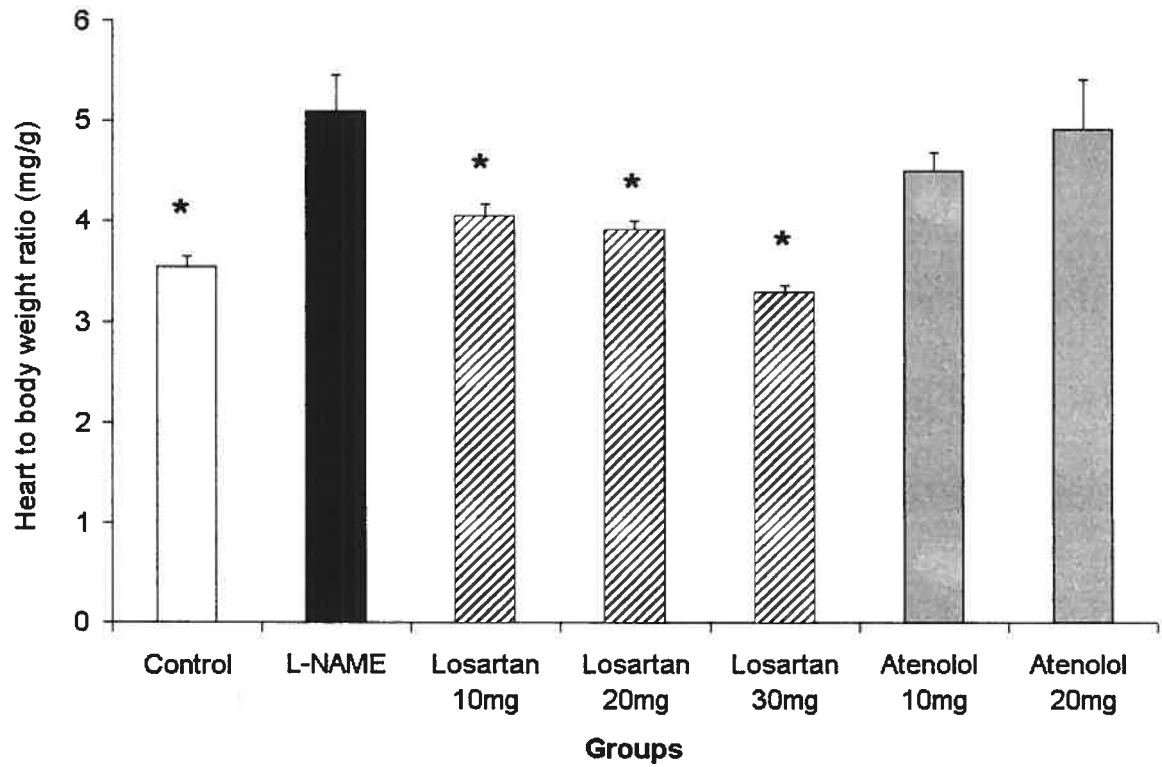


Figure 2 LVH in SHR receiving L-NAME (20 mg/kg/d). LVH was significantly reduced only in rats treated with losartan 10-20-30 mg/kg/d (* $P < 0.05$ vs. L-NAME by ANOVA and Student t test with Bonferroni correction, $n=8-13-6-14-6-6-8$ /group).

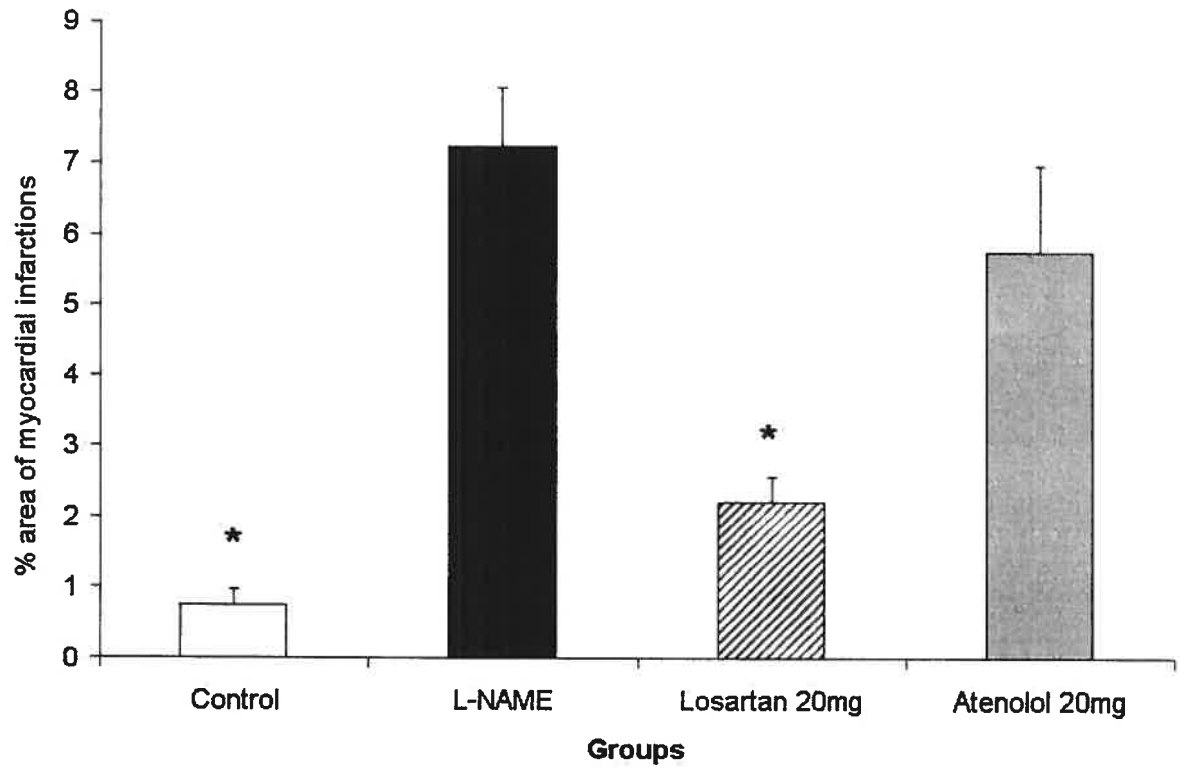


Figure 3 Percentage of cardiac area showing myocardial infarctions in SHR receiving L-NAME for 2 weeks (20 mg/kg/d). Myocardial infarction was significantly reduced in rats treated with losartan 20 mg/kg/d, but not with atenolol 20 mg/kg/d (* $P < 0.05$ vs. L-NAME by ANOVA and Student t test with Bonferroni correction, $n=14$ /group).

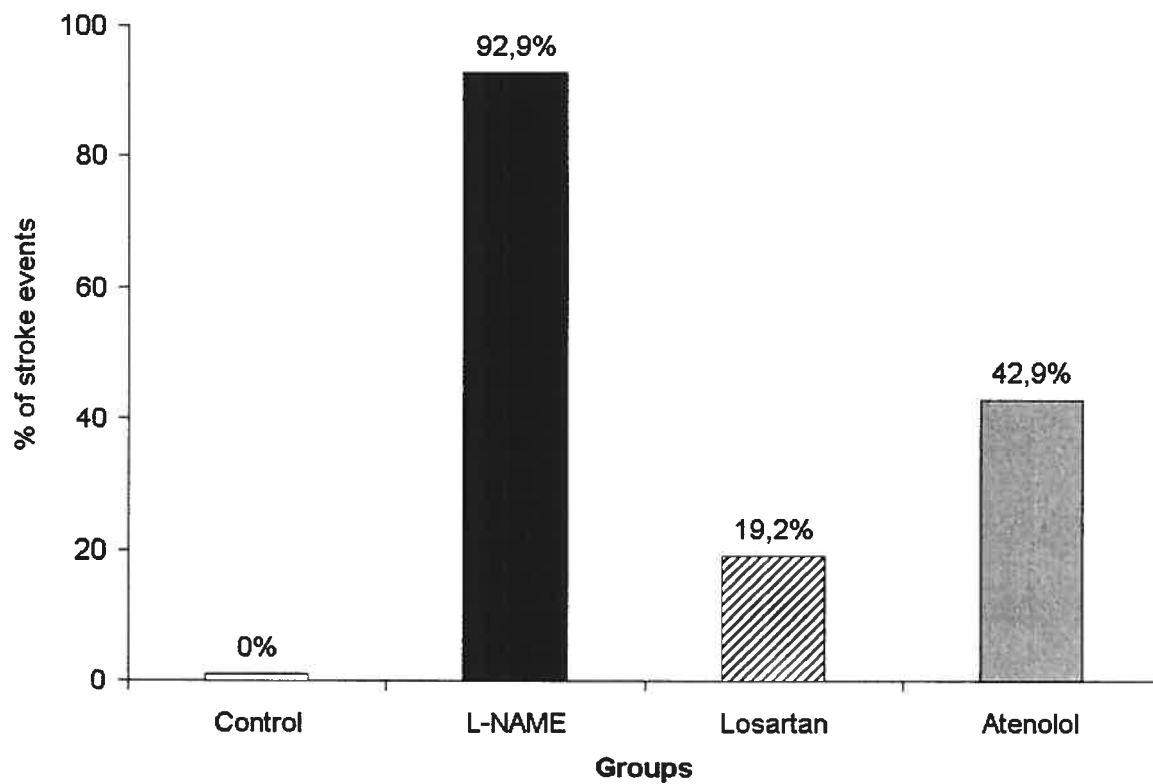


Figure 4 Percentage of stroke events in SHR receiving L-NAME (20 mg/kg/d) for a period of 2 to 5 weeks. Combined effect of 3 doses of losartan provided better protection from stroke than combined effect of 2 doses of atenolol (n=8-14-26-14/group).

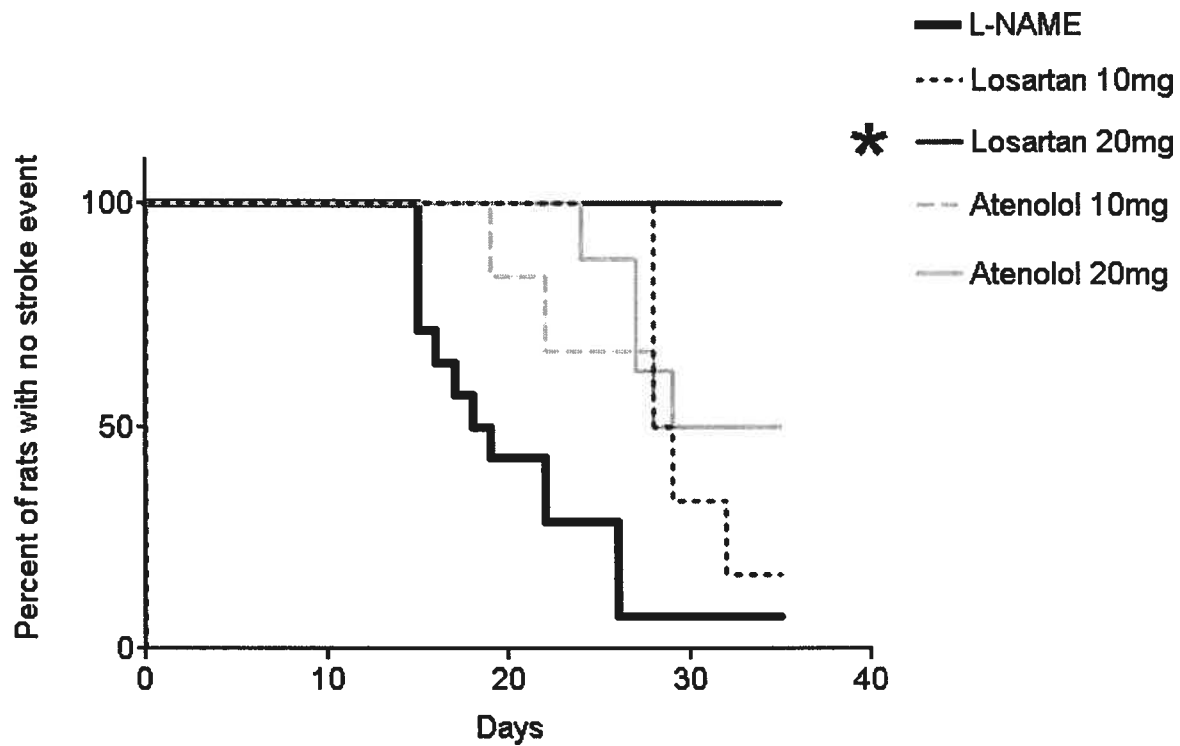


Figure 5 Kaplan Meier stroke event curves in SHR receiving L-NAME (20 mg/kg/d). Stroke events were significantly less frequent in the losartan 20mg group than in the atenolol 20mg group (* $P < 0.05$ losartan 20mg vs. atenolol 20mg by χ^2 test, $n=14-6-14-6-8$).

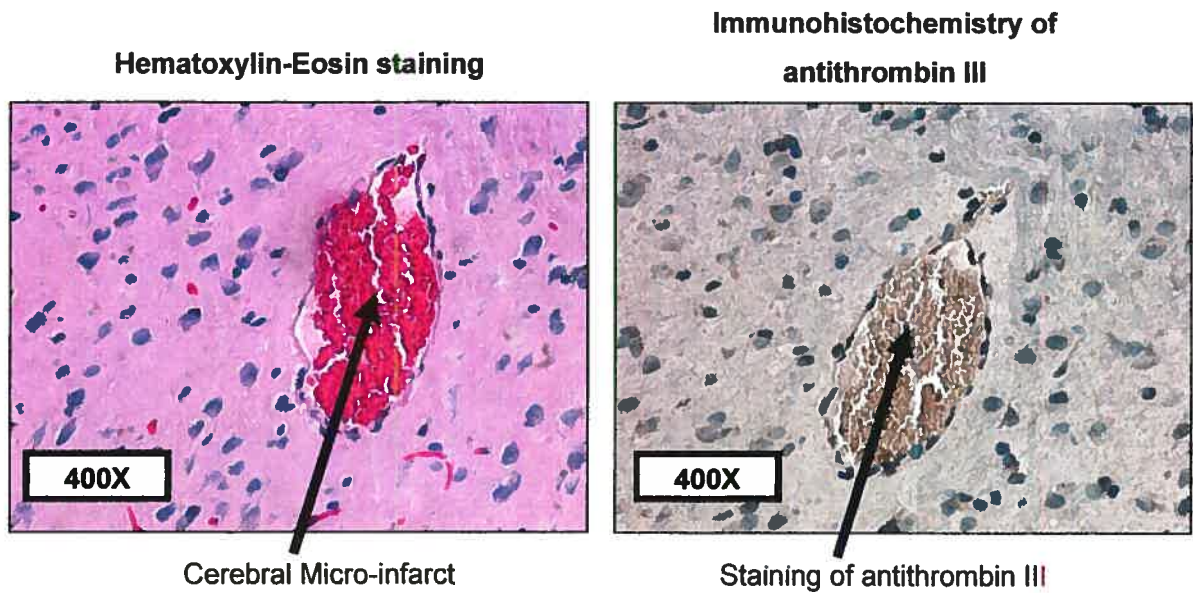


Figure 6 Cerebral damage measure: co-localisation of cerebral micro-infarcts and antithrombin III staining on consecutive brain coronal sections of a SHR receiving L-NAME.

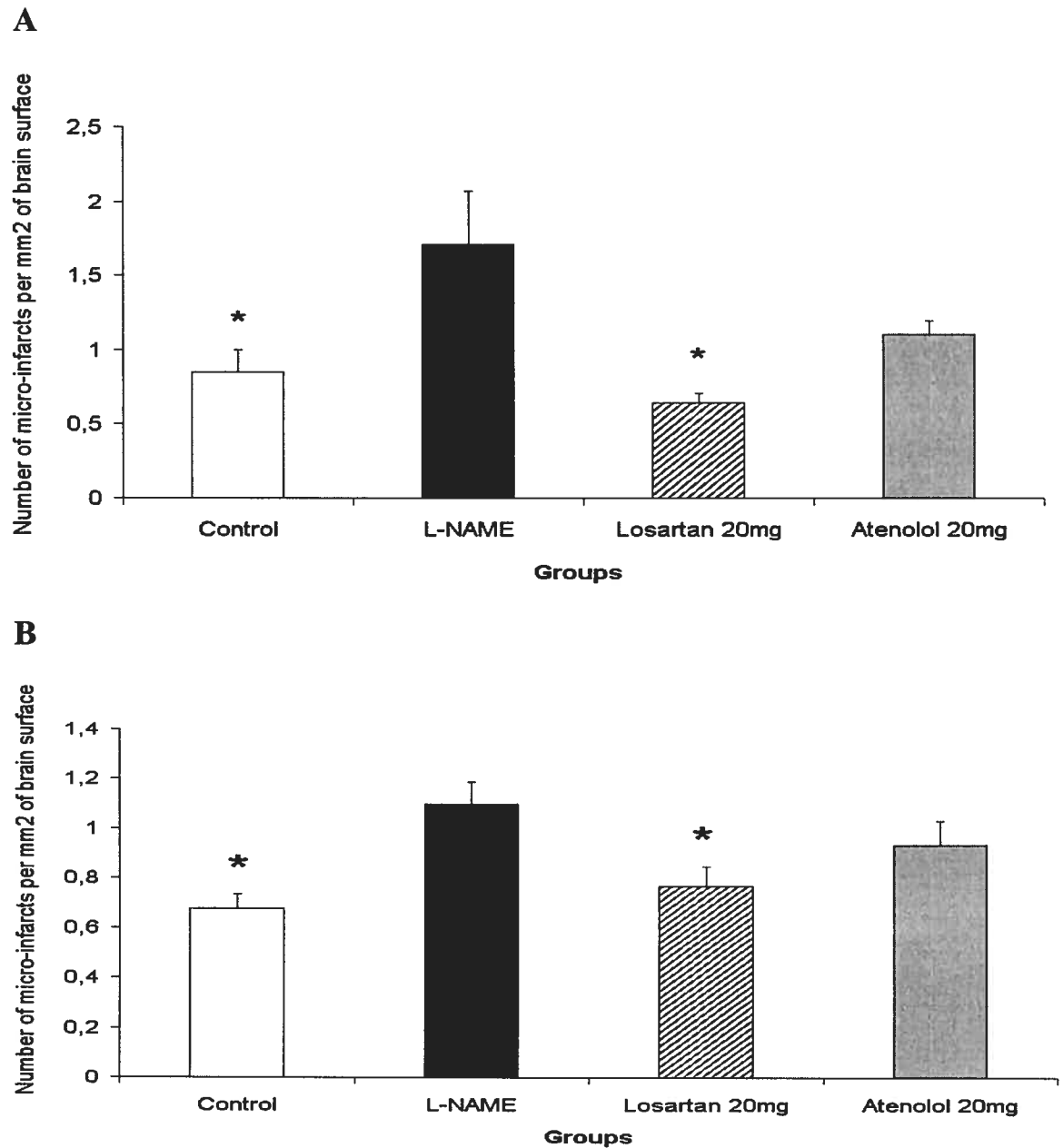


Figure 7 Cerebral micro-infarcts in SHR receiving L-NAME (20mg/kg/d) **A)** after 2 to 5 weeks of L-NAME (n=7-6-8-8/group); **B)** after 2 weeks of L-NAME. Cerebral micro-infarcts were significantly reduced only in SHR treated with losartan 20mg and not atenolol 20mg, even before the onset of clinical signs of strokes (n=14/group) (* $P < 0.05$ vs. L-NAME by ANOVA and Student *t* test with Bonferroni correction).

Groups	Control	L-NAME	Losartan 20mg	Atenolol 20mg
L-NAME administration				
2-5 weeks				
Measurements on cross sections				
- Medial cross-sectional area (mm ²)	0.52 ± 0.03	0.63 ± 0.04	0.59 ± 0.02	0.59 ± 0.05
2 weeks				
Measurements on cross sections				
- Medial cross-sectional area (mm ²)	0.50 ± 0.02	0.57 ± 0.02	0.55 ± 0.01	0.58 ± 0.02
Measurements on dissectors				
- No. of cells/μm of aorta	87.07 ± 0.67	118.60 ± 11.81	113.01 ± 13.61	120.17 ± 21.31

Table I Morphometric quantification in the aortic media of SHR receiving L-NAME (20mg/kg/d) for a period of 2 to 5 weeks (n=7-13-14-7/group) and a period of 2 weeks (n=13/group for CSA and n=5-5-5-6 for no. of cells). Anti-hypertensive treatments were started one week after L-NAME administration in SHR.

4.2 Résultats préliminaires

Paramètres hémodynamiques et structure de l'artère cérébrale moyenne

La pression des SHR sous anesthésie a été mesurée au niveau de l'artère fémorale et de l'artère carotide. Dans les deux cas, l'administration de L-NAME a produit une augmentation non-significative de la pression systolique d'environ 25 mmHg. Au jour 14 de l'étude (après deux semaines de L-NAME et une semaine d'anti-hypertenseurs), les traitements au losartan et à l'atenolol n'ont pas su freiner la hausse de pression artérielle provoquée par le L-NAME. Toutefois, nous n'avons observé aucune différence entre les pressions artérielles des rats traités au losartan et à l'atenolol. Nous avons constaté que la fréquence cardiaque a été diminuée significativement que pour les rats traités à l'atenolol, comparativement aux rats L-NAME (battements cardiaques par minute, 274 ± 16 bpm et 335 ± 11 bpm; n=10, respectivement). La vitesse de l'onde pouls a été augmentée significativement de 25% par l'administration de L-NAME, tandis que le losartan et l'atenolol l'ont augmentée de façon non-significative de 9% et 16% respectivement, par rapport aux rats du groupe témoin (n=10). Finalement, aucune différence significative n'a été observée pour les propriétés mécaniques de l'artère cérébrale moyenne. Il est à noter que l'administration de L-NAME a provoqué une diminution non-significative de 17% du ratio média sur lumière et que les traitements au losartan et à l'atenolol quant à eux ont provoqué chacun une diminution non-significative de 20%, par rapport aux rats du groupe témoin. **(Tableau I)**

	Témoin	L-NAME	Losartan 20mg	Atenolol 20mg
Artère fémorale				
PAD (mmHg)	153 ± 7 *	182 ± 6	175 ± 5	179 ± 6
PAS (mmHg)	213 ± 11	237 ± 9	253 ± 11	247 ± 11
PP (mmHg)	59 ± 6	55 ± 4	78 ± 7 *	63 ± 5
Artère carotide				
PAD (mmHg)	157 ± 7 *	188 ± 6	183 ± 7	185 ± 8
PAS (mmHg)	214 ± 10	240 ± 9	253 ± 12	253 ± 13
PP (mmHg)	57 ± 4	52 ± 6	69 ± 7	68 ± 6
Battements cardiaques (bpm)				
	337 ± 8	335 ± 11	319 ± 10	274 ± 16 *
Vitesse de l'onde de pouls (ms)				
	9,7 ± 0,6 *	12,1 ± 0,5	10,6 ± 0,4	11,3 ± 0,6
Artère cérébrale moyenne				
DI (µm)	154 ± 9	155 ± 6	156 ± 4	168 ± 6
Media (µm)	26,5 ± 1,5	23,2 ± 1,4	22,3 ± 2,3	23,6 ± 2,5
Media/lumière (%)	18,1 ± 1,8	15,1 ± 0,8	14,5 ± 1,6	14,4 ± 1,8
DE (µm)	209 ± 8	203 ± 7	204 ± 5	220 ± 5
Micro-thrombi cérébraux (#/mm ²)				
	0,74 ± 0,02	1,07 ± 0,17	0,74 ± 0,09	0,92 ± 0,08

PAD, pression artérielle diastolique; PAS, pression artérielle systolique; bpm, battement par minute; PP, pression pulsée; DI, diamètre interne; DE, diamètre externe; #/mm², nombre de micro-thrombi par mm² de surface de cerveau.

Tableau I Paramètres hémodynamiques des SHR recevant du L-NAME (20mg/kg/d), propriétés mécaniques de l'artère cérébrale moyenne et nombre de micro-thrombi cérébraux (* P < 0,05 vs. L-NAME par une ANOVA et un test *t* de Student suivi d'une correction de Bonferroni, n=10/groupe pour les paramètres hémodynamiques et n=4/groupe pour les micro-thrombi cérébraux).

Chapitre 5

Discussion

L'objectif principal de cette étude était de développer un modèle de rat reproduisant les conditions clés de l'étude clinique LIFE. Plus spécifiquement, une comparaison entre un antagoniste des récepteurs AT1 de l'angiotensine II (losartan) et un β -bloqueur (l'atenolol) a été réalisée dans un modèle de rat souffrant d'accidents vasculaires cérébraux et d'hypertrophie cardiaque. Notre étude a été conçue afin d'étudier les mécanismes cellulaires et pathologiques menant aux bénéfices du losartan, qui sont indépendants de la pression artérielle, tels qu'observés dans l'étude LIFE.

Pour une même diminution de la pression artérielle, nous avons démontré dans l'étude de survie que le losartan offrait une meilleure protection que l'atenolol contre les accidents vasculaires cérébraux et l'hypertrophie cardiaque (prévalence des AVC à cinq semaines : 0% et 50%, respectivement et augmentation de l'HVG de 10% et 39%, respectivement). Ces résultats suggèrent que les conditions clés de l'étude clinique LIFE ont été reproduites pour la première fois dans un modèle de rats SHR recevant du L-NAME. Dans la deuxième phase de cette étude, les SHR ont reçu du L-NAME seulement pour une période de deux semaines. Cette période correspond au temps précédent l'apparition des signes cliniques d'évènements d'accidents vasculaires cérébraux (au jour 15). Cette deuxième phase de l'étude a été produite afin de caractériser les altérations de la fonction cardiovasculaire et les pathologies des tissus menant à l'augmentation du nombre d'évènements d'accidents vasculaires cérébraux. Cette analyse précoce permet de distinguer les changements qui sont à l'origine de ceux qui découlent des AVC. Nous

avons observé que le losartan, mais non l'atenolol, a réduit les infarctus du myocarde et les micro-thrombi cérébraux causés par l'administration de L-NAME, avant même l'apparition des signes cliniques d'AVC. Au meilleur de notre connaissance, cette étude est la première à rapporter que le losartan, mais non l'atenolol, a su prévenir les dommages cérébraux et cardiaques dans un modèle de rat hypertendu, avant même l'apparition d'évènements cliniques d'AVC.

Le modèle de rat SHR recevant du L-NAME semble un modèle approprié pour reproduire l'étude clinique LIFE. Ce modèle démontre une hypertension maligne ainsi qu'une hypertrophie cardiaque, deux caractéristiques bien spécifiques aux patients de l'étude LIFE (Sventek, 1996; Vaskonen, 1997). Il a été démontré que la biodisponibilité du NO était réduite chez les patients hypertendus comparativement aux patients normo-tendus (Klahr, 2001). A cet égard, notre modèle de rat recevant un inhibiteur de la NOS, le L-NAME, se rapproche donc de la situation pathologique de biodisponibilité réduite de NO.

Une différence majeure entre notre étude et l'étude clinique LIFE est l'incidence des infarctus du myocarde. Dans l'étude LIFE, environ 4% des patients ont souffert d'infarctus du myocarde (Dahlof, 2002). Dans notre modèle de rat, tous les SHR ayant reçu du L-NAME et un placebo ont démontré des signes histologiques d'infarctus du myocarde ($0.75 \pm 0.21\%$ et $7.23 \pm 0.82\%$; zone infarctée pour les groupes témoin et L-NAME respectivement). Ces résultats sont en accord avec ceux du groupe de Vaskonen et coll. qui a rapporté que tous les SHR ayant reçu chroniquement du L-NAME avaient plusieurs infarctus du myocarde (Vaskonen, 1997). Dans notre étude, seulement le losartan a su prévenir significativement les infarctus du myocarde, contrairement à l'étude LIFE dans laquelle le losartan et l'atenolol ont démontré la même incidence d'infarctus du myocarde. Ces différences pourraient être reliées au fait qu'environ 40% des infarctus du myocarde chez les patients hypertendus sont silencieux et non diagnostiqués (Kannel, 1995). L'incidence des infarctus du myocarde observée dans l'étude LIFE est basée sur des évidences cliniques. Si un examen d'électrocardiographie de routine avait été fait pour

détecter les infarctus du myocarde silencieux, cette incidence aurait pu être plus élevée et le losartan aurait peut-être pu diminuer l'incidence des infarctus du myocarde silencieux.

Nous avons observé que l'administration de L-NAME aux SHR causait une hypertrophie ventriculaire gauche. Cette induction d'HVG dans ce modèle de rat a été observée couramment par plusieurs autres investigateurs (Ono, 1999; de Gasparo, 2002; Olzinski, 2005). Tout comme dans l'étude LIFE, nous avons observé que le losartan, mais non l'atenolol, a prévenu l'augmentation de l'HVG au delà des niveaux déjà présents chez ce modèle d'hypertension génétique. Des données suggèrent que l'hypertrophie cardiaque pourrait être prévenue par l'initiation du remodelage thérapeutique de l'aorte et, par le fait même, de la réduction de la rigidité aortique (Safar, 2000). Le losartan, contrairement à l'atenolol, pourrait probablement déclencher cette réduction d'hypertrophie cardiaque via ce mécanisme. De plus, Sventek et coll. ont démontré que l'administration chronique (16 jours) de L-NAME induit une hypertrophie aortique chez les SHR (Sventek, 1996). Néanmoins, contrairement à ces résultats, nous avons observé une augmentation non-significative de 21% de l'aire de section aortique suite à l'administration de L-NAME pour une période de cinq semaines. Une légère tendance à réduire cette hypertrophie aortique a été constatée suite aux traitements avec le losartan et l'atenolol (augmentation de seulement 13% de l'aire de section, pour chacun des groupes). Après deux semaines d'administration de L-NAME, l'aire de section aortique et le nombre de cellules musculaires lisses de l'aorte étaient augmentés de façon non-significative de 14% et 36% respectivement. En revanche, à cinq semaines, seul le losartan a montré une tendance non-significative à réduire cette hypertrophie aortique (augmentation de seulement 10% de l'aire de section et de 29% du nombre de cellules). Même si ces résultats ne sont pas statistiquement significatifs à ce stade, l'augmentation d'hypertrophie aortique avec le L-NAME pourrait probablement être biologiquement significative à plus long terme. De plus, la tendance à régresser cette hypertrophie avec le losartan, mais non avec l'atenolol, après deux semaines d'administration de L-NAME et une semaine de traitement, est compatible avec des données précédentes de notre groupe selon lesquelles le losartan, mais non l'atenolol,

diminue l'hypertrophie aortique chez les SHR (deBlois, 1997). Dans notre modèle de SHR, l'administration chronique de L-NAME serait possiblement responsable de la perte de cet effet bénéfique. En somme, parce qu'il n'y a pas de différence d'hypertrophie aortique entre les groupes losartan et atenolol après cinq semaines de L-NAME, la réduction de l'HVG observée avec le losartan serait vraisemblablement contrôlée par un autre mécanisme que le remodelage aortique.

Dans notre étude, presque tous les SHR ayant reçu du L-NAME pour une période de cinq semaines ont démontré des évidences cliniques d'AVC à partir du jour 14 de l'étude. Ces résultats sont cohérents avec ceux de l'étude de Vaskonen et coll. qui rapportent qu'approximativement 63% des SHR recevant du L-NAME à 20 mg/kg/jour pour une période de 21 jours ont subi un AVC à partir du jour 13 de l'étude (Vaskonen, 1997). Après analyse histologique, nous pouvons affirmer que les AVC survenus chez les SHR recevant du L-NAME sont de type ischémique et non hémorragique. Ces données sont en accord avec ceux de l'étude LIFE qui stipulent qu'environ 73% des patients ayant souffert d'AVC ont subi un AVC de type ischémique (Kjeldsen, 2005). De plus, le groupe de Blot et coll. a démontré que 79% des rats Wistar recevant du L-NAME à 50 mg/kg/jour pour une période de 11 semaines démontraient des signes de déficit moteur (Blot S, 1994). Étonnamment, ils ont observé que tous les rats hypertendus démontrant des évidences d'AVC avaient des infarctus à la moelle épinière, soit seuls ou combinés à des lésions cérébrales. Nous avons donc constaté dans notre étude que le losartan démontrait une meilleure protection contre les événements d'AVC chez les SHR recevant du L-NAME, comparativement à l'atenolol. Ces résultats concordent avec plusieurs études démontrant que le blocage du récepteur AT1 a démontré des effets protecteurs contre les dommages neuronaux et les AVC de type ischémique chez le rat (Ito, 2002; Forder, 2005). De plus, les données montrant que les dommages cérébraux ont été réduits avant même l'apparition des AVC cliniques seulement par le losartan sont très intéressantes, parce que les données cliniques les plus récentes indiquent que les infarctus cérébraux silencieux et précoces augmentent fortement et indépendamment avec le risque de développer un AVC symptomatique (Bernick, 2001;

Vermeer, 2003). Il est tentant de spéculer que le losartan a un effet protecteur contre les AVC en réduisant les micro-thrombi cérébraux silencieux.

Plusieurs paramètres hémodynamiques ont été mesurés chez les SHR après deux semaines d'administration de L-NAME; la pression systolique/diastolique dans l'artère fémorale et carotide, la fréquence cardiaque et la vitesse de l'onde de pouls. Ces résultats préliminaires montrent une tendance non significative vers une augmentation de la pression systolique après deux semaines de L-NAME ($P=0,09$ et $P=0,06$ pour la pression systolique fémorale et carotide respectivement, $n=10$). En revanche, l'étude de survie a montré une augmentation significative de la pression mesurée par plethysmographie par brassard sur la queue ($P=0,00005$; $n=8$). De plus, le losartan et l'atenolol, selon les résultats hémodynamiques préliminaires, n'ont pas su diminuer la pression systolique aux valeurs des rats du groupe témoin, contrairement à l'étude de survie. Il nous est impossible de combiner ces données de pression systolique, puisqu'elles ont été recueillies de façons différentes; par plethysmographie chez des rats conscients et par cathéters chez des rats anesthésiés. L'explication la plus plausible concernant ces différences de niveau de signification de pression systolique est qu'il est possible que cet échec à diminuer la pression artérielle soit dû en partie à la variabilité du temps de l'effet anti-hypertenseur des ces drogues. Il faut prendre en considération que la semaine deux de notre étude correspond à deux semaines d'administration de L-NAME et à une semaine seulement de traitements anti-hypertenseurs. Si la pression artérielle avait été mesurée quelques jours plus tard, il aurait peut-être été possible de constater une diminution significative de la pression artérielle chez ces SHR traités au losartan et à l'atenolol. En plus, cet incapacité du losartan et de l'atenolol à diminuer la pression artérielle pourrait aussi être expliquée par le fait que les doses utilisées (20 mg/kg/jour) dans cette étude soient des doses seuil chez les SHR recevant du L-NAME à 20 mg/kg/jour. Cette affirmation est appuyée par les résultats de l'étude de survie qui ont démontré qu'à la semaine deux de l'étude, le losartan et l'atenolol 10 mg/kg/jour ne provoquaient pas de diminution significative de la pression systolique chez ces rats. Des doses plus élevées auraient possiblement pu être utilisées afin d'éviter

cette confusion, à condition qu'il n'y ait pas de différence entre la pression systolique des SHR traités au losartan et à l'atenolol. Malgré l'impuissance de ces anti-hypertenseurs à diminuer la pression systolique dans cette étude préliminaire, il est déjà possible d'observer une différence assez marquée du nombre de micro-thrombi cérébraux entre les SHR traités au losartan et ceux traités à l'atenolol ($P=0,07$ et $P=0,22$ respectivement, $n=4$). En considérant l'absence de différence entre les pressions systoliques des groupes losartan et atenolol, il nous est possible de confirmer que la protection supérieure du losartan contre les dommages cérébraux est tout à fait indépendante de la régulation de la pression artérielle. Le rythme cardiaque a également été mesuré chez ces rats. L'analyse de ces résultats a montré que les battements cardiaques ont été diminués significativement seulement chez les SHR traités à l'atenolol, comparativement au groupe L-NAME. Ce résultat s'explique par le fait que l'atenolol est un antagoniste β -adrénergique impliqué dans la stimulation du travail cardiaque. Plusieurs études ont démontré que le traitement aux β -bloqueurs provoquait une diminution de la fréquence cardiaque, autant chez l'humain que chez le rat (Pearson, 1989). Par la suite, nous avons constaté que la vitesse de l'onde de pouls était augmentée significativement de 25% par le L-NAME. Cette augmentation n'était prévenue que partiellement par le losartan et par l'atenolol (augmentation de 9% et 16% respectivement; $n=10$). Encore une fois, ces résultats ne sont que préliminaires et l'ajout de rats afin d'augmenter la puissance de cette étude pourrait éventuellement engendrer un changement statistiquement significatif.

Cette étude préliminaire nous a également permis de mesurer les propriétés structurales de l'artère cérébrale moyenne. Schiffrin et coll. ont comparé l'effet du losartan et de l'atenolol sur la structure et la fonction des petites artères de résistance chez des patients hypertendus (Schiffrin, 2000). Cette étude a démontré que seul le losartan avait des effets positifs sur la structure et la fonction endothéliale dans ces petites artères. Le losartan pourrait donc avoir un effet bénéfique sur la structure de l'artère cérébrale moyenne des rats SHR recevant du L-NAME, contrairement à l'atenolol. Malgré qu'aucune mesure recueillie ne soit statistiquement significative, le ratio média sur lumière a diminué sensiblement suite

à l'administration de L-NAME (diminution de 17%; n=10). Les traitements au losartan et à l'atenolol ont également provoqué une diminution non-significative du ratio média sur lumière (diminution de 20% chacun; n=10). Pourtant, plusieurs études ont démontré que l'administration de L-NAME chez les rats Wistar Kyoto provoquait une augmentation significative du ratio média sur lumière dans l'artère cérébrale basilaire (Moreau, 1995; Katoh, 2001). Il est donc très surprenant de constater une tendance à la diminution de ce ratio dans notre modèle de rats SHR recevant du L-NAME, toutefois des études supplémentaires sont nécessaires afin de confirmer ces résultats. Néanmoins, ces diminutions statistiquement non-significatives pourraient hypothétiquement être biologiquement significatives, car une diminution de l'ordre d'environ 20% de l'épaisseur de la média est susceptible d'avoir des effets importants sur la résistance au flot sanguin.

Les mécanismes sous-jacents aux effets protecteurs du losartan sont actuellement indéterminés. Toutefois, ces changements pourraient être dus à des effets anti-thrombotiques, à une interaction entre le cœur et le cerveau ou à des propriétés anti-inflammatoires et angiogéniques. Le losartan est reconnu pour ses propriétés anti-thrombotiques via le blocage de l'agrégation plaquettaire induite par l'analogue de la thromboxane A₂ (TXA₂), le U46619, en déplaçant la liaison du ligand au récepteur TXA₂ aussi appelé le récepteur TP (Lopez-Farre, 2001; Sadoshima, 2002, Narumiya, 1999 #229). Cet effet anti-thrombotique pourrait peut-être réduire la formation de thrombose dans le cerveau. Cependant, Chabielska et coll. ont démontré que l'activité anti-thrombotique du losartan chez les SHR était abolie par l'administration de L-NAME; notre modèle de rat semble représenter un autre exemple de cette inhibition (Chabielska, 1998). Une interaction entre le cœur et le cerveau pourrait représenter un autre mécanisme expliquant les effets protecteurs du losartan. Certaines études ont démontré une association entre l'HVG et les AVC (Bikkina, 1994; Verdecchia, 2001). Récemment, l'HVG a été associée aux dommages cérébraux asymptomatiques chez les patients hypertendus Selvetella, 2003 #158}. Dans notre modèle de rat, seulement le losartan réduit l'HVG. Donc, il pourrait possiblement avoir un lien entre la prévention de cette hypertrophie cardiaque et la

réduction des micro-thrombi cérébraux. De plus, une corrélation entre les infarctus du myocarde et les dommages cérébraux pourrait probablement être faite, parce que nous avons observé le même profil de protection avec le losartan et l'atenolol pour ces deux types de dommages. Une autre hypothèse justifiant l'effet supérieur du losartan, comparativement à l'atenolol, a trait aux propriétés angiogéniques du losartan. Une étude récente de Forder et coll. a démontré que le traitement au losartan chez des rats Sprague-Dawley induisait une réponse angiogénique au cerveau (Forder, 2005). Dans cette étude, le traitement au losartan, pendant une période de deux semaines avant l'occlusion d'une artère cérébrale, a permis l'activation de l'angiogénèse cérébrale et la diminution de la taille de l'infarctus, comparativement aux rats témoins. Le traitement au losartan chez les SHR recevant du L-NAME pourrait éventuellement activer l'angiogénèse cérébrale et ainsi permettre la diminution des dommages cérébraux, contrairement à l'atenolol. Paradoxalement, l'inhibition chronique de la NO synthase entraînerait une réduction de la génération de nouveaux vaisseaux (Girardot, 2004). Afin d'éclaircir cette hypothèse, d'autres travaux sont nécessaires. Il faut toutefois mentionner que l'occlusion de l'artère cérébrale est un modèle plus violent et résulte en une zone cérébrale infarctée beaucoup plus importante que chez les rats recevant du L-NAME. La dernière hypothèse concerne les propriétés anti-inflammatoires du losartan. Le losartan a démontré une diminution des marqueurs inflammatoires vasculaires chez des patients (Graninger, 2004). Cette propriété anti-inflammatoire peut impliquer le métabolite EXP3179 du losartan, qui s'apparente à un inhibiteur de la cyclooxygénase (COX) (Sadoshima, 2002). Un autre mécanisme est la réduction des effets inflammatoires de l'angiotensine II dépendants du récepteur AT1. L'angiotensine II est reconnue pour être un agent pro-inflammatoire impliqué dans la dysfonction endothéliale de l'hypertension via l'activation de médiateurs inflammatoires tels des facteurs nucléaires, des cytokines et des molécules d'adhésion. Récemment, une étude a démontré l'effet anti-inflammatoire très puissant des antagonistes du récepteur AT1 dans les micro-vaisseaux cérébraux des SHR. Les ARA y provoquent une diminution de l'expression des marqueurs inflammatoires NF- κ B, TNF- α et IL-1 β (Zhou, 2005). Il est

bien connu que l'angiotensine II produit des effets pro-inflammatoires en activant la nicotinamide adénine dinucléotide phosphate (NADPH) oxydase qui produit des radicaux libres dans les cellules vasculaires. Cette inflammation s'effectue via le récepteur AT1, tout comme les autres effets pathologiques de l'angiotensine II. Des études cliniques ont démontré que les antagonistes des récepteurs AT1 réduisent l'expression des médiateurs inflammatoires, tandis que les β -bloqueurs n'ont pas d'effet sur l'inflammation (Schiffrin, 2002). De plus, une étude récente a observé que l'effets anti-inflammatoire des antagonistes des récepteurs AT1 serait un mécanisme important dans la protection contre les ischémies cérébrales survenant dans les micro-vaisseaux des SHR (Ando, 2004). Donc, dans notre modèle le losartan, contrairement à l'atenolol, pourrait possiblement réduire l'inflammation de l'endothélium cérébral, ce qui contribuerait à diminuer les micro-thrombi cérébraux, mais davantage de travaux sont nécessaires afin de valider cette hypothèse.

Chapitre 6

Conclusion

Ces travaux nous ont permis de reproduire pour la première fois certaines des conditions essentielles de l'étude clinique LIFE dans un modèle de rat, soit des SHR recevant du L-NAME. Nous y avons donc observé une protection supérieure du losartan, comparativement à l'atenolol, contre les événements d'AVC et contre l'hypertrophie cardiaque. Cette protection supérieure du losartan s'est avérée dissociable de la régulation de la pression artérielle.

Par la suite, nos études nous ont permis de constater que le losartan, mais non l'atenolol, a réduit significativement les dommages cérébraux et les infarctus du myocarde causés par l'administration de L-NAME, et ce avant même l'apparition des signes cliniques d'AVC.

En résumé, les SHR recevant du L-NAME représentent un modèle adéquat pour l'étude des mécanismes protecteurs des antagonistes du récepteur AT1 contre les atteintes aux organes cibles dans l'hypertension. Plus spécifiquement, ces travaux pourraient mener à de nouvelles stratégies thérapeutiques contre les AVC.

Chapitre 7

Bibliographie

- Ahmad S** (1997). Angiotensin receptor antagonists delay nitric oxide-deficient stroke in stroke-prone rats. *Eur J Pharmacol* 333: 39-45.
- Ando H, Zhou J, Macova M, Imboden H, Saavedra JM** (2004). Angiotensin II AT1 receptor blockade reverses pathological hypertrophy and inflammation in brain microvessels of spontaneously hypertensive rats. *Stroke* 35: 1726-31.
- Appel GB, Appel AS** (2004). Angiotensin II receptor antagonists: Role in hypertension, cardiovascular disease, and renoprotection. *Progress in Cardiovascular Diseases* 47: 105-115.
- Awazu M, Ichikawa I** (1993). Biological significance of atrial natriuretic peptide in the kidney. *Nephron* 63: 1-14.
- Beilin LJ** (2004). Hypertension research in the 21st century: where is the gold? *Journal of Hypertension* 22: 2243-2251.
- Bernatova I, Pechanova O, Pelouch V, Simko F** (2000). Regression of chronic L - NAME-treatment-induced left ventricular hypertrophy: effect of captopril. *J Mol Cell Cardiol* 32: 177-85.
- Bernick CM, Kuller LMDD, Dulberg CPMPH, Jr WTLMDMPH, Manolio TMM, Beauchamp NM, Price TM, for the Cardiovascular Health Study Collaborative Research Group** (2001). Silent MRI infarcts and the risk of future stroke: The cardiovascular health study. *Neurology* 57: 1222-1229.
- Bikkina M, Levy D, Evans JC, Larson MG, Benjamin EJ, Wolf PA, Castelli WP** (1994). Left ventricular mass and risk of stroke in an elderly cohort. The Framingham Heart Study. *Jama* 272: 33-6.

- Blot S AJ, Xu Y, Gray F, Michel JB** (1994). Spinal cord infarcts during long-term inhibition of nitric oxide synthase in rats. *Stroke* 25: 1666-1673.
- Boulanger CM, Heymes C, Benessiano J, Geske RS, Levy BI, Vanhoutte PM** (1998). Neuronal nitric oxide synthase is expressed in rat vascular smooth muscle cells: activation by angiotensin II in hypertension. *Circ Res* 83: 1271-8.
- Brenner BM, Ballermann BJ, Gunning ME, Zeidel ML** (1990). Diverse biological actions of atrial natriuretic peptide. *Physiol Rev* 70: 665-99.
- Bristow MR** (1993). Pathophysiologic and pharmacologic rationales for clinical management of chronic heart failure with beta-blocking agents. *Am J Cardiol* 71: 12C-22C.
- Bugra Z, Koylan N, Vural A, Erzenigin F, Umman B, Yilmaz E, Meric M, Buyukozturk K** (1998). Left ventricular geometric patterns and QT dispersion in untreated essential hypertension. *Am J Hypertens* 11: 1164-70.
- Cabrera CL, Bealer SL, Bohr DF** (1996). Central depressor action of nitric oxide is deficient in genetic hypertension. *Am J Hypertens* 9: 237-41.
- Chabielska E, Pawlak R, Golatowski J, Rolkowski R, Pawlak D, Buczko W** (1998). Losartan Inhibits Experimental Venous Thrombosis in Spontaneously Hypertensive Rats. *Thrombosis Research* 90: 271-278.
- Chowdhary S** (2001). Nitric oxide and hypertension: not just an endothelium derived relaxing factor! *Journal of Human Hypertension* 15: 219-227.
- Contreras F, de la Parte MA, Cabrera J, Ospino N, Israili ZH, Velasco M** (2003). Role of angiotensin II AT1 receptor blockers in the treatment of arterial hypertension. *Am J Ther* 10: 401-8.

- Dahlof B** (2002). Cardiovascular morbidity and mortality in the Losartan Intervention For Endpoint reduction in hypertension study (LIFE): a randomised trial against atenolol. *The Lancet* 359: 995-1003.
- de Gasparo M, Hess P, Clozel M, Persohn E, Roman D, Germann PG, Clozel JP, Webb RL** (2002). Combination of low-dose valsartan and enalapril improves endothelial dysfunction and coronary reserve in Nomega-nitro-L-arginine methyl ester-treated spontaneously hypertensive rats. *J Cardiovasc Pharmacol* 40: 789-800.
- de Simone G, Palmieri V** (2002). Left ventricular hypertrophy in hypertension as a predictor of coronary events: relation to geometry. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 11: 215-220.
- deBlois D, Tea BS, Than VD, Tremblay J, Hamet P** (1997). Smooth muscle apoptosis during vascular regression in spontaneously hypertensive rats. *Hypertension* 29: 340-9.
- deBold AJ** (1985). Atrial natriuretic factor: a hormone produced by the heart. *Science* 230: 767-770.
- Dominiczak AF, McBride MW** (2003). Genetics of common polygenic stroke. *Nat Genet* 35: 116-7.
- Ezekowitz JA** (2003). Stroke: Strategies for Primary Prevention. *American Family Physician* 68: 2279-2386.
- Forder JP, Munzenmaier DH, Greene AS** (2005). Angiogenic protection from focal ischemia with angiotensin II type 1 receptor blockade in the rat. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 288: H1989-96.

- Fumiko Sekiguchi YM, Atsuko Hirakawa, Tomohiro Nakahira, Miku Yamaoka, Keiichi Shimamura, Kazuo Yamamoto and Satoru Sunano (2001).** Hypertension and Impairment of Endothelium-Dependent Relaxation of Arteries from Spontaneously Hypertensive and L-NAME-Treated Wistar Rats. *Journal of Smooth Muscle Research* 37: 67-79.
- Gavras HP, Salerno CM (1996).** The angiotensin II Type 1 receptor blocker losartan in clinical practice: a review. *Clinical Therapeutics* 18: 1058-1067.
- Girardot DM, Jover BP, Moles J-PP, deBlois DP, Moreau PP (2004).** Chronic Nitric Oxide Synthase Inhibition Prevents New Coronary Capillary Generation. *J Cardiovasc Pharmacol* 44: 322-328.
- Graninger M, Reiter R, Drucker C, Minar E, Jilma B (2004).** Angiotensin receptor blockade decreases markers of vascular inflammation. *J Cardiovasc Pharmacol* 44: 335-9.
- Heel RC, Brogden RN, Speight TM, Avery GS (1979).** Atenolol: a review of its pharmacological properties and therapeutic efficacy in angina pectoris and hypertension. *Drugs* 17: 425-60.
- Ito T, Yamakawa H, Bregonzio C, Terron JA, Falcon-Neri A, Saavedra JM (2002).** Protection against ischemia and improvement of cerebral blood flow in genetically hypertensive rats by chronic pretreatment with an angiotensin II AT1 antagonist. *Stroke* 33: 2297-303.
- Jennings GL, Dilley RJ (2002).** Left ventricular remodelling impacts on coronary flow reserve in hypertensive patients: is there a vascular mechanism? *Journal of Hypertension* 20: 1291-1293.
- Kahan T, Bergfeldt L (2005).** Left ventricular hypertrophy in hypertension: its arrhythmogenic potential. *Heart* 91: 250-256.

- Kannel WB** (1995). Framingham study insights into hypertensive risk of cardiovascular disease. *Hypertens Res* 18: 181-96.
- Katoh M, Egashira K, Kataoka C, Usui M, Koyanagi M, Kitamoto S, Ohmachi Y, Takeshita A, Narita H** (2001). Regression by ACE inhibition of arteriosclerotic changes induced by chronic blockade of NO synthesis in rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 280: H2306-12.
- Katzung B** (2001). *Basic and Clinical Pharmacology*. New York, McGraw-Hill.
- Kelly RA, Balligand JL, Smith TW** (1996). Nitric oxide and cardiac function. *Circ Res* 79: 363-80.
- Kirch W, Gorg KG** (1982). Clinical pharmacokinetics of atenolol--a review. *Eur J Drug Metab Pharmacokinet* 7: 81-91.
- Kjeldsen SE, Dahlof B, Devereux RB, Julius S, Aurup P, Edelman J, Beevers G, de Faire U, Fyhrquist F, Ibsen H, Kristianson K, Lederballe-Pedersen O, Lindholm LH, Nieminen MS, Omvik P, Oparil S, Snapinn S, Wedel H, for the LIFE Study Group** (2002). Effects of Losartan on Cardiovascular Morbidity and Mortality in Patients With Isolated Systolic Hypertension and Left Ventricular Hypertrophy: A Losartan Intervention For Endpoint Reduction (LIFE) Substudy. *JAMA* 288: 1491-1498.
- Kjeldsen SE, Lyle PA, Kizer JR, Dahlof B, Devereux RB, Julius S, Beevers G, de Faire U, Fyhrquist F, Ibsen H, Kristianson K, Lederballe-Pedersen O, Lindholm LH, Nieminen MS, Omvik P, Oparil S, Snapinn SM, Harris KE, Wedel H** (2005). The effects of losartan compared to atenolol on stroke in patients with isolated systolic hypertension and left ventricular hypertrophy. The LIFE study. *J Clin Hypertens (Greenwich)* 7: 152-8.

- Klahr S** (2001). The role of nitric oxide in hypertension and renal disease progression. *Nephrol. Dial. Transplant.* 16: 60-62.
- Koren MJ, Devereux RB, Casale PN, Savage DD, Laragh JH** (1991). Relation of left ventricular mass and geometry to morbidity and mortality in uncomplicated essential hypertension. *Ann Intern Med* 114: 345-52.
- Lammie GA** (2000). Pathology of small vessel stroke. *British Medical Bulletin* 56: 296-306.
- Leclercq B, Jaimes EA, Raj L** (2002). Nitric oxide synthase and hypertension. *Current Opinion in Nephrology & Hypertension* 11: 185-189.
- London GM** (2003). Left ventricular hypertrophy: why does it happen? *Nephrol. Dial. Transplant.* 18: 2viii-6.
- Lopez-Farre A, Sanchez de Miguel L, Monton M, Jimenez A, Lopez-Bloya A, Gomez J, Nunez A, Rico L, Casado S** (2001). Angiotensin II AT1 receptor antagonists and platelet activation. *Nephrol. Dial. Transplant.* 16: 45-49.
- Luchner A, Stevens TL, Borgeson DD, Redfield M, Wei CM, Porter JG, Burnett JCJ** (1998). Differential atrial and ventricular expression of myocardial BNP during evolution of heart failure. *American Journal of Physiology* 274: H1684-H1689.
- Mancia G** (2004). Prevention and treatment of stroke in patients with hypertension. *Clinical Therapeutics* 26: 631-648.
- Massion PB, Feron O, Dessy C, Balligand J-L** (2003). Nitric Oxide and Cardiac Function: Ten Years After, and Continuing. *Circ Res* 93: 388-398.
- Matsubara BB, Matsubara LS, Zornoff LA, Franco M, Janicki JS** (1998). Left ventricular adaptation to chronic pressure overload induced by inhibition of nitric oxide synthase in rats. *Basic Res Cardiol* 93: 173-81.

- McInnes GT** (2005). Lowering blood pressure for cardiovascular risk reduction. *J Hypertens Suppl* 23: S3-8.
- McIntyre M, Caffè SE, Michalak RA, Reid JL** (1997). Losartan, an orally active angiotensin (AT1) receptor antagonist: a review of its efficacy and safety in essential hypertension. *Pharmacology & Therapeutics* 74: 181-194.
- Mehvar R** (2001). Stereospecific Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of Beta-Adrenergic Blockers in Humans. *J Pharm Pharmaceut Sci* 4: 185-200.
- Meneses A, Hong E** (1998). Spontaneously Hypertensive Rats : A Potential Model to Identify Drugs for Treatment of Learning Disorders. *Hypertension* 31: 968-972.
- Moreau P, Takase H, Kung CF, van Rooijen M-M, Schaffner T, Luscher TF** (1995). Structure and Function of the Rat Basilar Artery During Chronic Nitric Oxide Synthase Inhibition. *Stroke* 26: 1922-1929.
- Mukoyama M, Nakao K, Hosada K, Suga S, Saito Y, Ogawa Y, Shirakami G, Jougasaki M, Obata K, Yasue H, Kambayashi Y, Inouye K, Imura H** (1991). Brain natriuretic peptide as a novel cardiac hormone in humans. *Journal of Clinical Investigation* 87: 1402-1412.
- Nishimura Y, Ito T, Saavedra JM, Sandberg K** (2000). Angiotensin II AT1 Blockade Normalizes Cerebrovascular Autoregulation and Reduces Cerebral Ischemia in Spontaneously Hypertensive Rats Editorial Comment. *Stroke* 31: 2478-2486.
- Okamoto K** (1969). Spontaneous hypertension in rats. *Int Rev Exp Pathol* 7: 227-70.
- Olzinski AR, McCafferty TA, Zhao SQ, Behm DJ, Eybye ME, Maniscalco K, Bentley R, Frazier KS, Milliner CM, Mirabile RC, Coatney RW, Willette RN** (2005). Hypertensive target organ damage is attenuated by a p38 MAPK inhibitor: role of systemic blood pressure and endothelial protection. *Cardiovasc Res* 66: 170-8.

- Ono Y, Ono H, Matsuoka H, Fujimori T, Frohlich ED** (1999). Apoptosis, coronary arterial remodeling, and myocardial infarction after nitric oxide inhibition in SHR. *Hypertension* 34: 609-16.
- Packer M, Bristow MR, Cohn JN, Colucci WS, Fowler MB, Gilbert EM, Shusterman NH** (1996). The effect of carvedilol on morbidity and mortality in patients with chronic heart failure. U.S. Carvedilol Heart Failure Study Group. *N Engl J Med* 334: 1349-55.
- Pearson AA, Gaffney TE, Walle T, Privitera PJ** (1989). A stereoselective central hypotensive action of atenolol. *J Pharmacol Exp Ther* 250: 759-63.
- Pitt B** (1998). Regression of Left Ventricular Hypertrophy in Patients With Hypertension : Blockade of the Renin-Angiotensin-Aldosterone System. *Circulation* 98: 1987-1989.
- Pokharel S, Sharma UC, Pinto YM** (2003). Left ventricular hypertrophy: virtuous intentions, malign consequences. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 35: 802-806.
- Pontieri V, Venezuela MK, Scavone C, Michelini LC** (1998). Role of endogenous nitric oxide in the nucleus tractus solitarius on baroreflex control of heart rate in spontaneously hypertensive rats. *J Hypertens* 16: 1993-9.
- Reaves PY, Beck CR, Wang HW, Raizada MK, Katovich MJ** (2003). Endothelial-independent prevention of high blood pressure in L-NAME-treated rats by angiotensin II type I receptor antisense gene therapy. *Exp Physiol* 88: 467-73.
- Sadoshima J** (2002). Novel AT1 Receptor-Independent Functions of Losartan. *Circ Res* 90: 754-756.

- Safar ME** (2000). Pulse pressure, arterial stiffness, and cardiovascular risk. *Curr Opin Cardiol* 15: 258-63.
- Salter M, Duffy C, Garthwaite J, Strijbos PJ** (1995). Substantial regional and hemispheric differences in brain nitric oxide synthase (NOS) inhibition following intracerebroventricular administration of N omega-nitro-L-arginine (L-NA) and its methyl ester (L-NAME). *Neuropharmacology* 34: 639-49.
- Savitz SI, Erhardt JA, Anthony JV, Gupta G, Li X, Barone FC, Rosenbaum DM** (2000). The novel beta-blocker, carvedilol, provides neuroprotection in transient focal stroke. *J Cereb Blood Flow Metab* 20: 1197-204.
- Schiffrin EL** (2002). Beyond blood pressure: the endothelium and atherosclerosis progression. *Am J Hypertens* 15: 115S-122S.
- Schiffrin EL, Park JB, Intengan HD, Touyz RM** (2000). Correction of arterial structure and endothelial dysfunction in human essential hypertension by the angiotensin receptor antagonist losartan. *Circulation* 101: 1653-9.
- Selvetella G, Notte A, Maffei A, Calistri V, Scamardella V, Frati G, Trimarco B, Colonnese C, Lembo G** (2003). Left Ventricular Hypertrophy Is Associated With Asymptomatic Cerebral Damage in Hypertensive Patients. *Stroke* 34: 1766-1770.
- Smallegange C, Kline RL, Adams MA** (2003). Transplantation of enalapril-treated kidneys confers persistent lowering of arterial pressure in SHR. *Hypertension* 42: 932-6.
- Staessen JA, Wang J, Bianchi G, Birkenhager WH** (2003). Essential hypertension. *The Lancet* 361: 1629-1641.

- Sventek P, Li J-S, Grove K, Deschepper CF, Schiffrin EL** (1996). Vascular Structure and Expression of Endothelin-1 Gene in L-NAME-Treated Spontaneously Hypertensive Rats. *Hypertension* 27: 49-55.
- Tambascia RC, Fonseca PM, Corat PD, Moreno H, Jr., Saad MJ, Franchini KG** (2001). Expression and distribution of NOS1 and NOS3 in the myocardium of angiotensin II-infused rats. *Hypertension* 37: 1423-8.
- van Zwieten PA** (2001). Drug treatment of isolated systolic hypertension. *Nephrol. Dial. Transplant.* 16: 1095-1097.
- Vanhoutte PM** (2003). Endothelial Control of Vasomotor Function. *Circ Journal* 67: 572-575.
- Vapaatalo H** (2000). Role of Endothelium and Nitric Oxide in Experimental Hypertension. *Physiol. Res.* 49: 1-10.
- Varagic J, Jerkic M, Jovovic D, Nastic-Miric D, Adanja-Grujic G, Markovic-Lipkovski J, Lackovic V, Radujkovic-Kuburovic G, Kentera D** (2000). Regional hemodynamics after chronic nitric oxide inhibition in spontaneously hypertensive rats. *Am J Med Sci* 320: 171-6.
- Vaskonen T, Mervaala E, Krogerus L, Teravainen TL, Laakso J, Karppanen H, Vapaatalo H** (1997). Cardiovascular effects of chronic inhibition of nitric oxide synthesis and dietary salt in spontaneously hypertensive rats. *Hypertens Res* 20: 183-92.
- Verdecchia P, Porcellati C, Reboldi G, Gattobigio R, Borgioni C, Pearson TA, Ambrosio G** (2001). Left ventricular hypertrophy as an independent predictor of acute cerebrovascular events in essential hypertension. *Circulation* 104: 2039-44.

- Vermeer SE, Hollander M, van Dijk EJ, Hofman A, Koudstaal PJ, Breteler MMB** (2003). Silent Brain Infarcts and White Matter Lesions Increase Stroke Risk in the General Population: The Rotterdam Scan Study. *Stroke* 34: 1126-1129.
- Vikrant S** (2001). Essential Hypertension - Pathogenesis and Pathophysiology. *Journal, Indian Academy of Clinical Medicine* 2: 140-161.
- Wardlaw JM** (2005). What causes lacunar stroke? *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 76: 617-619.
- Warlow C, Sudlow C, Dennis M, Wardlaw J, Sandercock P** (2003). Stroke. *The Lancet* 362: 1211-1224.
- Yamori Y, Horie R, Handa H, Sato M, Okamoto K** (1975). Proceedings: Studies on stroke in stroke-prone spontaneously hypertensive rats (SHRSP). (I). Local factor analysis on stroke. *Jpn Heart J* 16: 329-31.
- Zhou J, Ando H, Macova M, Dou J, Saavedra JM** (2005). Angiotensin II AT1 receptor blockade abolishes brain microvascular inflammation and heat shock protein responses in hypertensive rats. *J Cereb Blood Flow Metab* 25: 878-86.