

Université de Montréal

**Mécanismes impliqués dans le développement du remodelage  
eutrophique des artères de résistance et du cœur dans un modèle  
d'hypertension induite par l'inhibition de la synthèse du NO.**

Par

Daphné Girardot

Thèse présentée à la Faculté des études supérieures en vue d'obtention du  
grade de Philosophiae Doctor (Ph.D.) en sciences pharmaceutiques avec  
option en pharmacologie

Novembre 2005



© Daphné Girardot, MMV

Université de Montréal

Faculté des études supérieures

QV  
705  
U58  
2006  
V. 003

**Direction des bibliothèques**

**AVIS**

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

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

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

**NOTICE**

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

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

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

Université de Montréal  
Faculté des études supérieures

Cette thèse intitulée :

**Mécanismes impliqués dans le développement du remodelage  
eutrophique des artères de résistance et du cœur dans un modèle  
d'hypertension induite par l'inhibition de la synthèse du NO**

Présentée par :

Daphné Girardot

A été évaluée par un jury composé des personnes suivantes :

---

Albert Adam, président-rapporteur

---

Pierre Moreau, directeur de recherche

---

Denis deBlois, co-directeur de recherche

---

Gaëtan Thibault, membre du jury

---

Rhian Touyz, examinatrice externe

---

Représentant de la FES

## SOMMAIRE

L'hypertension essentielle mène au changement de structure des artères de résistance (remodelage eutrophique) et de gros calibre (remodelage hypertrophique). Le remodelage eutrophique participe au maintien de l'hypertension et au dommage des organes cible. Les artères de résistance qui ont la capacité de se contracter normalisent ainsi leur tension pariétale, ce qui semble expliquer l'absence d'hypertrophie dans ce type d'artères. Étant donné les connaissances limitées concernant le remodelage eutrophique, l'objectif de mes travaux a porté principalement sur la compréhension des mécanismes impliqués dans le développement du remodelage eutrophique des artères de résistance et aussi brièvement sur la compréhension des mécanismes impliqués dans le remodelage cardiaque, le cœur faisant partie des organes atteints par l'hypertension essentielle. Pour ce faire, nous avons utilisé un modèle d'hypertension induite par l'inhibition de la synthèse du NO (L-NAME), qui mime l'ensemble du remodelage cardiovasculaire observé dans l'hypertension essentielle humaine.

Les résultats de nos travaux ont démontré que la réponse vasoconstrictrice aiguë, observée distinctement dans les artères de résistance, par microscopie intravitale, représentait un processus précoce pouvant initier le développement du remodelage eutrophique. En effet, les artères de plus gros calibre (fémorale) ne se contractent pas et s'hypertrophient. De plus, nous avons démontré une contribution

de ERK 1/2 dans la vasoconstriction mésentérique, laquelle est généralement associée à la prolifération cellulaire.

Des travaux ont démontré que la polymérisation d'actine représentait un mécanisme impliqué tout d'abord dans la contraction soutenue en réponse à l'augmentation de pression (tonus myogénique), qu'elle générait une force de tension contrant la tension pariétale et finalement qu'elle participait à la réorganisation du cytosquelette. Nos travaux ont démontré une expression à la hausse des protéines impliquées dans la polymérisation d'actine, (principalement des effecteurs des voies Rho et Rac, qui participent à la réorganisation du cytosquelette), toutefois, à des temps différents au cours du développement remodelage eutrophique. De plus, nos travaux nous ont permis d'identifier un marqueur spécifique de remodelage eutrophique, PAK1 (un effecteur direct de Rac), son expression étant augmentée durant tout le processus de remodelage dans les artères de résistance; l'expression de PAK1 n'était pas amplifiée dans les artères ayant développé un remodelage hypertrophique.

Une dernière étude cherchait à comprendre l'absence d'hypertrophie cardiaque lors d'une augmentation de la pression artérielle induite par le L-NAME. Or, sachant que la croissance cellulaire est intimement couplée à l'augmentation de la vascularisation afin de permettre l'apport d'oxygène essentiel au fonctionnement cellulaire, la diminution de la disponibilité du NO - qui représente un facteur angiogénique central - pouvait expliquer l'absence d'hypertrophie compensatoire. Nos travaux ont démontré une contribution essentielle du NO endogène dans la

**Mots clés :** hypertension essentielle, artères de résistance, remodelage eutrophique, L-NAME, vasoconstriction, réorganisation du cytosquelette, PAK1, remodelage concentrique cardiaque, artères coronaires, néovascularisation.

## SUMMARY

Essential hypertension leads to an alteration of arterial structure with eutrophic remodeling in small resistance artery and to hypertrophic remodeling in large arteries. Eutrophic remodeling is implicated in the maintenance of hypertension and leads to end organ damage. Having the ability to contract, small arteries normalize their wall stress, explaining possibly the absence of hypertrophy observed in these arteries. Considering the poor information on eutrophic remodeling, my work aimed at improving the understanding of mechanisms implicated in the development of eutrophic remodeling in resistance arteries, and also to clarify the mechanisms involved in cardiac remodeling. Therefore, we have used a L-NAME-induced hypertension model, which is known to mimic cardiovascular remodeling observed in human essential hypertension.

Our results have shown an acute and distinct vasoconstriction observed in mesenteric arteries, using intravital microscopy, which could represent an early event for eutrophic remodeling development. Indeed, hypertrophic remodeling was observed in larger arteries (femoral arteries), which did not contract. In addition, we have demonstrated a contribution of ERK 1/2 in the mesenteric contraction, this MAP kinase being usually associated with cellular proliferation.

In response to elevated pressure, evidence is mounting that actin polymerization represents a process contributing to sustain contraction, which generates a force to oppose wall stress, and to cytoskeleton reorganization. Our results have demonstrated



a modulation of expression of proteins implicated in actin polymerization (mainly Rho and Rac effectors), yet at different times during eutrophic remodeling development. In addition, our study allowed us to identify a marker specific to eutrophic remodeling, PAK1 (a direct effector of Rac), its over expression being observed during the whole development of eutrophic remodeling.

Our last study was based on the understanding of the absence of cardiac hypertrophy observed during L-NAME-induced hypertension, despite the elevated pressure overload. We have proposed that during tissue growth, appropriate vascularization must follow for adequate oxygen supply. Since nitric oxide represents a major angiogenic factor, its reduced bioavailability could have explained the absence of compensatory cardiac hypertrophy. In line with our hypothesis, our results have demonstrated an important involvement of endogenous NO in neovascularization of coronary arteries.

**Key words:** essential hypertension, resistance arteries, eutrophic remodeling, L-NAME-induced hypertension, vasoconstriction, cytoskeleton reorganization, PAK1, cardiac remodeling, coronary arteries, neovascularization.

# TABLE DES MATIÈRES

SOMMAIRE.....	ii
SUMMARY.....	v
TABLE DES MATIÈRES.....	vii
LISTE DES TABLEAUX.....	x
LISTE DES FIGURES.....	xi
LISTE DES ABRÉVIATIONS.....	xiv
Dédicace.....	xvii
Remerciements.....	xviii
Avant-propos.....	xx

## PREMIÈRE PARTIE - INTRODUCTION

CHAPITRE 1. LE SYSTÈME CARDIOVASCUCLAIRE.....	2
1.1 La circulation systémique.....	4
1.1.1 Structure générale des artères de la circulation systémique.....	4
1.1.2 Fonctions des différentes artères composant le système circulatoire systémique .....	6
1.1.2.1 Les artères de gros calibres.....	8
1.1.2.2 Les artères de résistance.....	8
1.1.2.3 Les capillaires.....	9
1.1.3 Pression dans les différents segments vasculaires .....	9
1.1.3.1 Effet tampon.....	10
1.2 La circulation coronarienne.....	12
CHAPITRE 2. PHYSIOLOGIE DU SYSTÈME CARDIOVASCULAIRE.....	14
2.1 Débit sanguin .....	14
2.1.1 Régulation du débit.....	15
2.1.1.1 Régulation du débit à court terme.....	15
2.1.1.2 Régulation du débit à long terme .....	17
2.2 La résistance.....	20
2.2.1 Diminution du diamètre interne des artérioles .....	20
2.2.1.1 Tonus myogénique.....	22
2.2.1.2 Le système nerveux autonome.....	25
2.2.1.3 Fonction endothéliale.....	25
2.2.2 Diminution du nombre des artérioles : raréfaction .....	37
2.3 Pression artérielle.....	37
2.3.1 Régulation à court terme .....	40
2.3.1.1 Rôle du système nerveux autonome sympathique.....	40
2.3.1.2 Rôle des barorécepteurs.....	41
2.3.1.3. Contrôle hormonal.....	42

2.3.2.Régulation à long terme .....	43
2.3.2.1 Diurèse et natriurèse rénales.....	43
2.3.2.2 Contrôle hormonal.....	44
CHAPITRE 3. L'HYPERTENSION ESSENTIELLE.....	45
3.1 Risques cardiovasculaires associés à l'hypertension essentielle.....	47
3.2 Changement de structure des artères de résistance dans l'hypertension essentielle.....	48
3.2.1 Le remodelage vasculaire.....	48
3.2.1.1 Définitions du remodelage vasculaire.....	50
3.2.1.2 Déterminants du remodelage eutrophique des artères de résistance...	53
3.2.2 Raréfaction .....	62
3.3 Modèles expérimentaux d'hypertension essentielle.....	63
3.3.1 Modèles de rats génétiquement modifiés : SHR et Dahl sensibles au sel .	64
3.3.1.1 Rats Dahl sensibles au sel et résistants au sel.....	64
3.3.1.2 Rats SHR.....	65
3.3.1.3 Administration des analogues de la L-arginine.....	67
CHAPITRE 4. MÉCANISMES IMPLIQUÉS DANS LE REMODELAGE VASCULAIRE.....	70
4.1 Éléments vasculaires impliqués dans la mécano-transduction.....	73
4.1.1 La matrice extracellulaire.....	73
4.1.2 Les intégrines .....	73
4.1.3 Le cytosquelette.....	75
4.1.4 Les GTPases de la famille Rho .....	76
4.1.5 Les canaux ioniques.....	76
4.1.6 Les enzymes à activité tyrosine kinase (TK) .....	77
4.1.7 Les enzymes à activité sérine / thréonine kinase.....	78
4.1.7.1 La PKC.....	78
4.1.7.2 Les MAPKs :protéines kinases activées par les mitogènes.....	79
4.2 Voies de signalisation du remodelage hypertrophique.....	79
4.2.1 Augmentation de la tension pariétale .....	83
4.2.2 Hypertrophie stimulée par l'ANG II.....	84
4.3 Voies de signalisation du remodelage eutrophique.....	85
4.3.1 Augmentation de la sensibilité au calcium .....	87
4.3.1.1 Voie de la PKC.....	89
4.3.1.2 Voie Rho-Rho kinase.....	89
4.3.2 Polymérisation d'actine .....	90
4.3.2.1 Régulation de la polymérisation d'actine.....	91
CHAPITRE 5. LE REMODELAGE CARDIAQUE.....	96
OBJECTIFS GÉNÉRAUX.....	98

## DEUXIÈME PARTIE - PRÉSENTATION DES MANUSCRITS

CHAPITRE 6. ERK1/2-mediated vasoconstriction normalizes wall stress in small mesenteric arteries during NOS inhibition <i>in vivo</i> .....	104
6.1 ABSTRACT.....	105
6.2 INTRODUCTION.....	106
6.3 METHODS.....	109
6.4 RESULTS.....	116
6.5 DISCUSSION.....	119
6.6 REFERENCES.....	125
CHAPITRE 7. p21-Activated Protein Kinase 1, an Early and Stable Signaling Marker of Eutrophic Remodeling in Resistance Arteries.....	137
7.1 ABSTRACT.....	138
7.2 INTRODUCTION.....	140
7.3 METHODS.....	141
7.4 RESULTS.....	144
7.5 DISCUSSION.....	146
7.6 REFERENCES.....	152
CHAPITRE 8. CHRONIC NITRIC OXIDE SYNTHASE INHIBITION PREVENTS NEW CORONARY CAPILLARY GENERATION.....	160
8.1 ABSTRACT.....	161
8.2 INTRODUCTION.....	163
8.3 METHODS.....	164
8.4 RESULTS.....	168
8.5 DISCUSSION.....	169
8.6 REFERENCES.....	175
TROISIÈME PARTIE - DISCUSSION, CONCLUSIONS, PERSPECTIVES ET RÉFÉRENCES	
DISCUSSION.....	186
CONCLUSIONS.....	198
PERSPECTIVES.....	199
RÉFÉRENCES.....	202
ANNEXE.....	218

# LISTE DES TABLEAUX

## CHAPITRE 2. Physiologie du système cardiovasculaire

<b>Tableau 2.1</b>	Analogues de la L-arginine.....	32
--------------------	---------------------------------	----

## CHAPITRE 6. ERK1/2-Mediated Vasoconstriction Normalizes Wall Stress in Small Mesenteric Arteries During NOS Inhibition in vivo

<b>Tableau 6.1</b>	Local mean arterial pressure and morphological characteristics of femoral and mesenteric arteries in control and rats chronically treated with L-NAME .....	131
--------------------	---	-----

<b>Tableau 6.2</b>	Morphological characteristics of femoral and mesenteric arteries in control and rats treated acutely with L-NA .....	132
--------------------	--	-----

## CHAPITRE 8. Chronic Nitric Oxide Synthase Inhibition Prevents New Coronary Capillary Generation

<b>Tableau 8.1</b>	Cardiac morphological characteristics and capillary density in control and in vivo L-NAME treated rats.....	180
--------------------	---	-----

# LISTE DES FIGURES

## CHAPITRE 1. Le système cardiovasculaire

- Figure 1.1** Le système circulatoire .....3
- Figure 1.2** Composition des différents segments artériels .....7
- Figure 1.3** Courbe de la pression artérielle dans les différents lits artériels.....11

## CHAPITRE 2. Physiologie du système cardiovasculaire

- Figure 2.1** Mécanismes de la contraction dépendante du calcium .....23
- Figure 2.2** Réaction catalytique de l'enzyme de synthèse du NO .....29
- Figure 2.3** Principaux mécanismes qui régulent la pression artérielle.....39

## CHAPITRE 3. L'hypertension essentielle

- Figure 3.1** Types de remodelage vasculaire .....52
- Figure 3.2** Illustration de la loi de Laplace .....56

## CHAPITRE 4. Voies de signalisation impliquées dans le remodelage vasculaire

- Figure 4.1** Facteurs impliqués dans la mécano-transduction.....72
- Figure 4.2** Mécanismes impliqués dans le remodelage hypertrophique .....82

**Figure 4.3** Mécanismes de la contraction indépendante du calcium .....88

**Figure 4.4** Mécanismes impliqués dans le remodelage eutrophique .....95

**CHAPITRE 6. ERK1/2-Mediated Vasoconstriction Normalizes Wall Stress in Small Mesenteric Arteries During NOS Inhibition in vivo**

**Figure 6.1** Maximal effect of acute NOS inhibition on local mean arterial pressure (MAP), external diameter and wall stress ( $\times 10^3$  dyn/cm<sup>2</sup>) in rat femoral and mesenteric arteries before and after drug Administration .....134

**Figure 6.2** Maximal effect of saline , L-NA and L-NA plus PD 98059 on mean arterial pressure and mesenteric external diameter .....135

**Figure 6.3** Representative western blot using a phosphospecific ERK 1/2 antibody in rats treated with saline (Ctl), L-NA and L-NA plus PD 98059 and mean relative optical density of phosphorylated ERK 1/2 .....136

**CHAPITRE 7. p21-Activated Protein Kinase 1, an Early and Stable Signaling Marker of Eutrophic Remodeling in Resistance Arteries**

**Figure 7.1** Mean blood pressure evolution during L-NAME and angiotensin II administration and M/L ratio and CSA of small mesenteric arteries measured after 14 days of L-NAME and angiotensin II treatments .157

**Figure 7.2** Kinetic of expression of mDia1, p38 MAPK and PAK1 during L-NAME and Angiotensin II treatments in mesenteric arteries .....158

<b>Figure 7.3</b>	Kinetic of PAK1 expression during L-NAME treatment in the aorta and ratio of relative PAK1/mDia1 expression in L-NAME-treated rats .....	159
-------------------	--	-----

## **CHAPITRE 8. Chronic Nitric Oxide Synthase Inhibition Prevents New Coronary Capillary Generation**

<b>Figure 8.1</b>	Relative capillary growth of aortic and coronary artery rings from normotensive rats after L-NAME, SNAP or L-NAME+SNAP addition in culture medium for 12 days .....	182
<b>Figure 8.2</b>	Mean arterial pressure (MAP) and absolute capillary outgrowth of aortic and coronary artery rings from normotensive and L-NAME-treated rats in vivo .....	183
<b>Figure 8.3</b>	Representative pictures of tube outgrowth after 12 days of incubation from aortic rings and coronary rings harvested from control and L-NAME-treated rats in vivo .....	184



## LISTE DES ABRÉVIATIONS

A	adrénaline
AA	acide arachidonique
ACh	acétylcholine
ANG II	angiotensine II
AT <sub>1</sub>	sous-type AT <sub>1</sub> des récepteurs à l'angiotensine II
ATP	adénosine triphosphate
BH <sub>4</sub>	tétrahydrobioptérine
BK	bradykinine
Ca <sup>2+</sup>	calcium
CaM	calmoduline
CaMK	protéine kinase Ca <sup>2+</sup> -calmoduline dépendante
CCVD	canaux calciques voltage-dépendant
CML	cellule musculaire lisse
CMLV	CML vasculaire
CO <sub>2</sub>	dioxyde de carbone
COX	cyclooxygénase
CSA	aire de section
CSK	cytosquelette
DAG	diacylglycérol
DOCA	<i>Deoxycorticosterone Acetate</i>
ECA	enzyme de conversion de l'ANG II
ECE	enzyme de conversion de l'ET-1
EGF	epidermal growth factor
EDHF	facteur hyperpolarisant dérivé de l'endothélium
ERK	extracellular signaled-regulated kinase
ET-1	endothéline
ET <sub>A</sub>	sous-type ET <sub>A</sub> des récepteurs à l'endothéline
ET <sub>B</sub>	sous-type ET <sub>B</sub> des récepteur à l'endothéline
FAD	flavine adénine dinucléotide
FAK	<i>focal adhesion kinase</i>
Fe	fer
FMN	flavine mononucléotide
GC	guanylate cyclase
GDP	guanosine diphosphate
GMPc	guanosine monophosphate cyclique
Grb2	<i>growth-factor-receptor-bound protein 2</i>
GTP	guanosine triphosphate
GTPase	protéine changeant du GDP en GTP
H <sup>+</sup>	hydrogène
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	peroxyde d'hydrogène
HSP	<i>heat shock protein</i>

HT	hypertension
IP <sub>3</sub>	inositol 1,4,5-triphosphate
JNK	<i>c-jun amino-terminal kinase</i>
K <sup>+</sup>	potassium
LIMK	protéine kinase de la famille LIM
L-NA	N <sup>G</sup> -Nitro-L-arginine
L-NAME	N <sup>G</sup> -Nitro-L-arginine methyl ester
LVM	<i>left ventricular mass</i>
MAPK	<i>mitogen-activated protein kinase</i>
mDia1	homologue mammifère de la protéine Diaphanous de la drosophile
MEC	matrice extracellulaire
MEK	MAP/ERK kinase
MEKK	MEK kinase
M/L	rapport entre l'épaisseur de la paroi et la lumière du vaisseau
MLC	<i>myosin light chain</i>
MLCK	<i>myosin light chain kinase</i>
MP	<i>myosin phosphatase</i>
NA	noradrénaline
NaCl	chlorure de sodium (sel)
NADPH	nicotinamide adénine dinucléotide phosphate réduite
NO	<i>nitric oxide</i> (monoxyde d'azote)
NOS	<i>nitric oxide synthase</i>
eNOS	<i>endothelial nitric oxide</i>
iNOS	<i>inducible nitric oxide</i>
nNOS	<i>neuronal nitric oxide</i>
O <sub>2</sub>	oxygène
O <sub>2</sub> <sup>-</sup>	anion superoxide
ONOO <sup>-</sup>	peroxynitrite
PAK1	<i>p21-activated kinase</i>
PDGF	<i>platelet-derived growth factor</i>
PG	prostaglandine
PGH <sub>2</sub>	prostaglandine H <sub>2</sub>
PGI <sub>2</sub>	prostacycline
PIP <sub>2</sub>	phosphatidylinositol 4,5-biphosphate
PKC	protéine kinase C
PKG	protein kinase dépendante du GPMc
PLA <sub>2</sub>	phospholipase A <sub>2</sub>
PLC	phospholipase C
PTK	protéine à activité tyrosine kinase
p38	<i>reactivating kinase</i>
Rac	<i>ras-related C<sub>3</sub>-botulinum toxin substrate</i>
Rho	homologue de ras
ROS	espèces radicalaires oxydatives ( <i>reactive oxygen species</i> )
RE	réticulum endoplasmique
RWT	<i>relative wall thickness</i>

Shc	<i>SH2-domain-containing <math>\alpha</math>2-collagen-related</i>
SHR	<i>spontaneous hypertensive rat</i>
SNS	système nerveux sympathique
SNPS	système nerveux parasympathique
Sos	<i>son of sevenless</i>
SOD	superoxyde dismutase
SP-SHR	<i>stroke-prone SHR</i>
c-Src	<i>pp60<sup>c-src</sup> kinase</i>
TP	tension pariétale
TXA <sub>2</sub>	thromboxane A <sub>2</sub>
UV	ultra violet

## Dédicace

*Je dédie cette thèse à ma famille,  
À mon père qui m'a appris à suivre les chemins les moins fréquentés,  
À ma mère qui m'a toujours encouragé à suivre mes passions,  
À mes sœurs, Elo et Nanou,  
Ô combien je suis reconnaissante de vous avoir dans ma vie.*

## Remerciements

Pour commencer, j'aimerais remercier mon directeur de recherche, Pierre Moreau, pour m'avoir si bien guidé durant toutes ces années de ma formation aux études graduées. Pierre, je te remercie d'avoir partagé avec moi ta passion pour la recherche et aussi de m'avoir transmis l'importance d'être créatif dans tout ce que nous faisons. J'ai grandement apprécié ton talent de pédagogue et tes commentaires constructifs, qui m'ont permis de stimuler continuellement mon intellect. Le fait de m'avoir encouragé à faire un stage de recherche à l'étranger a été une étape saillante dans ma vie et m'a permis de grandir...Encore plus. Je te suis aussi reconnaissante de m'avoir encouragé à poursuivre ma carrière en pédagogie des sciences de la santé, en m'ayant aidé à développer des aptitudes pour ce domaine, et ce, en concomitance avec mes études doctorales. Ainsi, durant toutes ces années, tu as participé activement à mon enrichissement professionnel et aussi à mon développement personnel.

J'aimerais remercier mon co-directeur de recherche, Denis deBlois, pour ses commentaires toujours constructifs, pertinents et créatifs. Je te remercie Denis d'avoir partagé avec moi ta passion pour la vie et ton lourd bagage de connaissances découlant d'une curiosité éminente. J'ai aussi grandement apprécié nos discussions animées.

La fin d'un doctorat est enrichie de nombreuses rencontres de personnes qui sont devenus des être chers ou qui m'ont touché particulièrement à un moment ou à un autre durant ma formation. J'en profite ainsi pour saluer mon premier mentor de stage scientifique, Pierre Farmer, qui a attisé en moi une flamme pour la recherche. Cette période a été une grande révélation dans ma vie. Une autre rencontre marquante au cours de mon stage de recherche à l'étranger, est celle de Daniel Casellas, qui a influencé ma vision sur la recherche. J'aimerais aussi souligner la compagnie fortement appréciée des personnes avec qui j'ai partagé de nombreux beaux moments, des discussions, des voyages. Merci Dung, Bénédicte, Chantal, Rachida pour cette amitié qui a commencé durant mes études graduées et qui se poursuit encore aujourd'hui. J'aimerais aussi remercier Louise Grondin, Céline Bouvet, Liz-Ann Gilbert et Simon Moreau pour leur agréable compagnie, leurs histoires abracadabrantes, leur intégrité et leur humour.

Finalement j'aimerais remercier la Fondation des maladies du cœur, la Société canadienne d'hypertension artérielle, la Société québécoise d'hypertension artérielle, les Instituts de recherche en santé du Canada et Rx&D, la faculté de pharmacie, le GRSNA, la FES et Pierre Moreau, pour leur support financier.

## Avant-propos

Notre passion nous pousse à prendre un chemin plutôt qu'un autre et nous mène à la découverte de nouveaux mondes. Cette découverte mène au développement de passions nouvelles, qui elles nous mène à choisir une autre route. Mon intérêt pour les sciences m'ont conduit à faire un stage de recherche, qui lui, m'a mené à poursuivre des études supérieures dans le laboratoire de Pierre. Durant ces années, j'ai baigné certes dans le monde fascinant des sciences fondamentales, mais j'ai été aussi grandement touchée et interpellée par l'encadrement pédagogique de Pierre. Au milieu de mon doctorat, j'ai fait mes débuts en enseignant devant 200 étudiants de troisième année de pharmacie, mais ce qui m'a le plus motivée pédagogiquement, c'est d'avoir activement participé à créer un outil d'autoévaluation pour les étudiants des cycles supérieurs avec Pierre. Ensuite, j'ai fait la rencontre de Bernard, qui exerce depuis une dizaine d'années de la recherche en pédagogie médicale, m'informant qu'il est possible de combiner les sciences de la santé, la recherche et la pédagogie. Merci Bernard de me montrer qu'il est envisageable de réaliser ma nouvelle passion. Il restera à savoir où cela me conduira dans l'avenir...Sûrement vers de nouveaux mondes à découvrir.

---

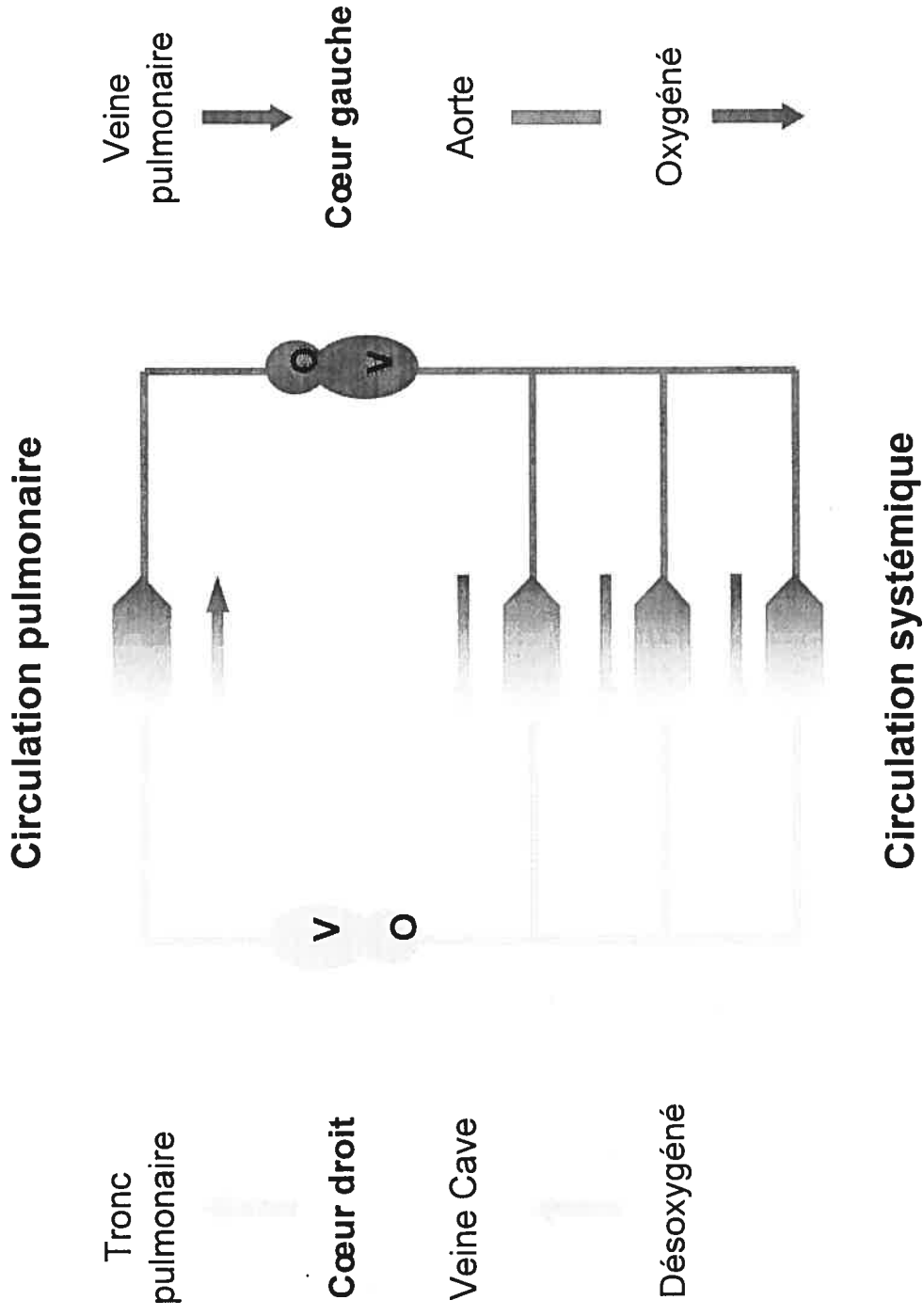
## **PREMIÈRE PARTIE – INTRODUCTION**

---



## CHAPITRE 1. LE SYSTÈME CARDIOVASCUCLAIRE

La principale fonction du système cardiovasculaire est de transporter le sang aux différents tissus et organes vitaux de l'organisme afin d'assurer leur fonctionnement et leur survie. Or, durant un cycle cardiaque, le ventricule gauche pompe le sang hors du cœur dans la crosse aortique, puis le sang est acheminé dans les différents tissus de l'organisme en traversant les différents segments artériels (artères de gros calibre, artères musculaires, artères de résistance et les artérioles). Les besoins métaboliques des organes tels que les reins, le foie, les muscles squelettiques, le cerveau et le cœur, est assuré par l'apport de nutriments et d'oxygène se faisant au niveau des capillaires, lesquels étant situés en aval des artérioles. Les tissus peuvent alors libérer leurs déchets métaboliques dans les veinules, le segment vasculaire suivant les capillaires. L'oreillette droite reçoit le sang veineux par les veines caves inférieures et supérieures, puis remplit le ventricule droit par une contraction auriculaire. Le ventricule droit pompe le sang veineux dans le système pulmonaire pour libérer d'une part, le CO<sub>2</sub> et d'autre part, pour oxygéner le sang à nouveau. Les capillaires alvéolaires permettent ces échanges. Une fois oxygéné, le sang de la veine pulmonaire remplit l'oreillette gauche et, suivant une contraction auriculaire, remplit le ventricule gauche. Un nouveau cycle cardiaque recommence (figure 1.1).



**Figure 1.1** Représentation schématique du système circulatoire. Les régions gris pâle correspondent au sang désoxygéné et les régions gris foncé correspondent au sang oxygéné. O, oreillette; V, ventricule. Adaptée de *McGeown JG. Physiologie/L'essentielle 2003: 75.*

Le système circulatoire comporte différents types de circulation. Or, la circulation favorisant la nutrition tissulaire est la circulation systémique ou générale. Le système circulatoire comporte aussi la circulation pulmonaire (qui ne fera pas l'objet de cet ouvrage) et la circulation coronarienne. Cette dernière a pour fonction de nourrir adéquatement le cœur et sera brièvement décrite.

## **1.1 La circulation systémique**

Le système circulatoire systémique est constitué de différents segments vasculaires ayant une fonction les caractérisant chacun. Or, il comporte des artères de gros calibre, des artères musculaires, des artères de résistance, lesquelles comprennent les petites artères et les artérioles. Finalement, le système circulatoire systémique comporte les capillaires, les veinules et les veines. Dans le cadre de ce travail, une description de la structure et des fonctions des différents segments vasculaires se concentrera majoritairement sur la section artérielle avec une note portant sur les capillaires.

### **1.1.1 Structure générale des artères de la circulation systémique**

Les artères de la circulation systémique partagent une structure similaire d'un segment vasculaire à un autre. Ainsi, leur paroi vasculaire est composée de trois principales couches dont l'intima, la média et l'adventice. Toutefois, les composantes

de la média peuvent varier selon le type d'artères et leurs fonctions au sein du système cardiovasculaire.

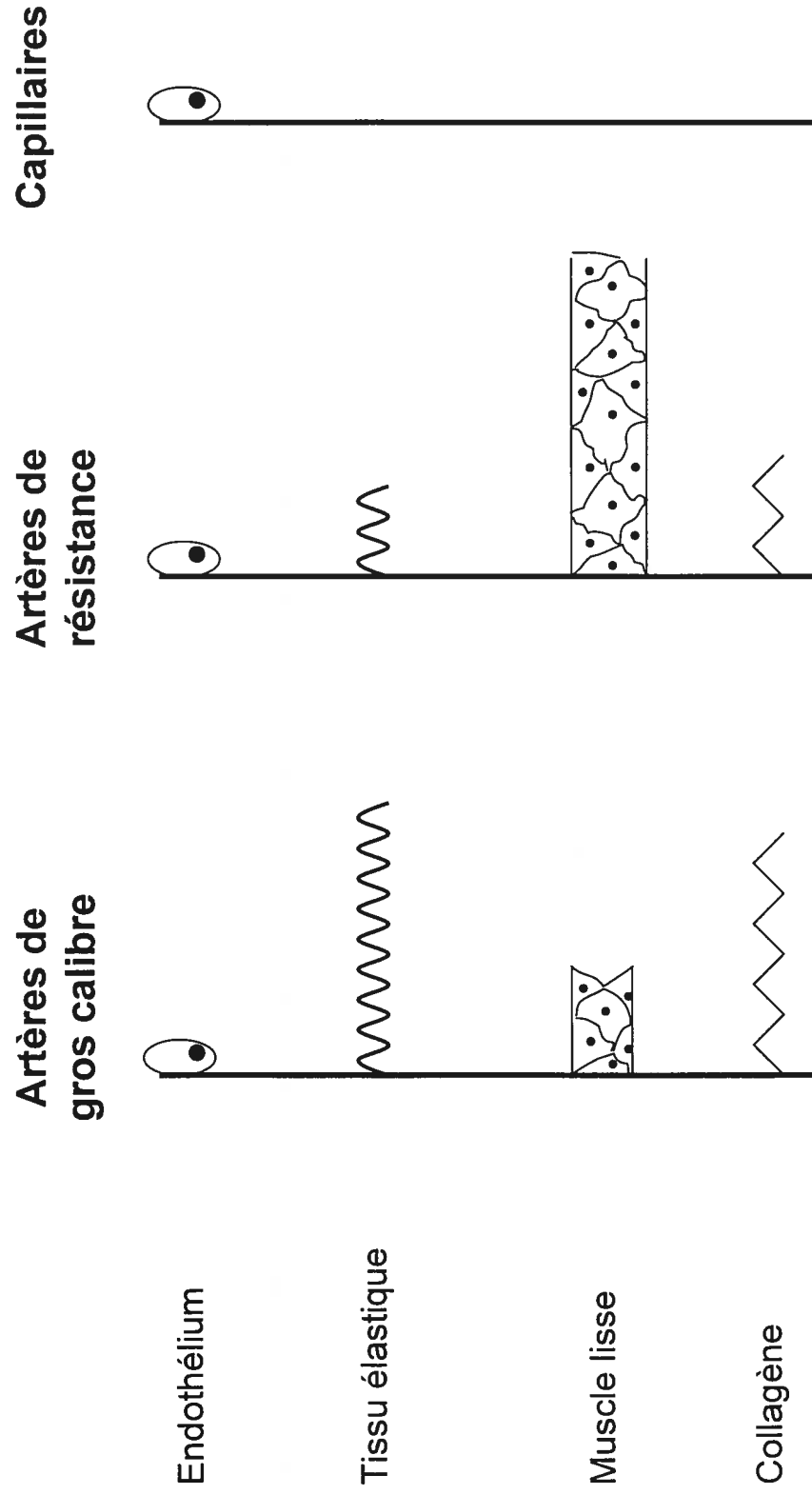
L'intima: l'intima comporte une combinaison d'une monocouche de cellules endothéliales et de tissu conjonctif. Elle est délimitée par la lamelle élastique interne. L'intima est particulièrement importante dans les artères de gros calibre. À mesure que les artères deviennent plus petites, l'intima est surtout composée de l'épithélium endothélial et de la lamelle élastique interne (membrane basale). L'intima des grosses artères contient du tissu conjonctif majoritairement composé de fibres de collagène, de protéoglycanes et un peu de fibres élastiques. Le principal type de cellules présentes dans le tissu conjonctif de l'intima sont des CMLs phénotypiquement modifiées. Parfois, des cellules du système immunitaire (lymphocytes, macrophages) peuvent aussi être présentes<sup>1</sup>.

La média: la média est formée principalement de cellules musculaires lisses, lesquelles sont intercalées de tissus élastiques. Des fibres de collagène et de tissu conjonctif séparent les fibres élastiques des cellules musculaires lisses. La média représente la section de la paroi artérielle la plus épaisse. Toutefois, sa structure varie selon le type d'artères leur confinant ainsi une fonction les caractérisant. Par exemple, la média, composant les artères de gros calibre (comme l'aorte), renferme beaucoup plus de fibres élastiques que les artérioles. Plus les segments artériels s'éloignent du cœur, plus la composante matricielle diminue au profit des cellules musculaires lisses.

L'adventice: entourant la média, l'adventice est composée majoritairement de tissu conjonctif dense (élastine et collagène), puis de tissu conjonctif moins structuré en s'approchant du pourtour de l'adventice. Elle renferme aussi des fibroblastes, des mastocytes et des macrophages et quelques cellules de Schwann<sup>2</sup>. Son épaisseur peut varier d'un segment vasculaire à un autre<sup>3</sup>.

### **1.1.2 Fonctions des différentes artères composant le système circulatoire systémique**

L'architecture des différents segments artériels est organisée de sorte que le sang arrivant au niveau des capillaires, assure les échanges de nutriments et d'oxygène/métabolites et dioxyde de carbone, entre la circulation et les tissus de l'organisme. Or, la composition de la média des différents types d'artères, leur confère une fonction spécifique allant de paire avec le but ultime de la circulation systémique. Ainsi, le flux sanguin pulsatile, sortant du cœur est amorti au niveau de l'aorte grâce à sa composante élastique importante, et devient constant à mesure que le sang s'éloigne du cœur. Les artères de résistances et artérioles assurent un flux constant en causant une augmentation de la résistance au flux sanguin par contraction musculaire basale. La figure 1.2 décrit les composantes des différents segments artériels.



**Figure 1.2** Schéma montrant les constituants des différents segments artériels. Chaque segment est constitué d'un endothélium et d'une lame basale. La composante élastique, musculaire et de collagène diffère entre les artères de gros calibre et les artères de résistance et est absente dans les capillaires. Adaptée de *Berne et al. Cardiovascular Physiology 1997: 2 et de Basar et al. Vasculature and Circulation 1981: 21.*

### **1.1.2.1 Les artères de gros calibres**

Elles comprennent les grosses artères (aorte) et les artères de calibre moyen (carotides et fémorales). Fortement composées de fibres élastiques, elles ont la capacité de transformer le flux pulsatile sortant directement du cœur en flux continu, en emmagasinant l'énergie créée par la pression (effet tampon). Au cours du relâchement cardiaque, la paroi des artères se rétracte, permettant le passage régulier du sang vers les segments vasculaires en aval. La présence importante des fibres de collagène limite un étirement trop important de la paroi artérielle.

### **1.1.2.2 Les artères de résistance**

Elles renferment les petites artères ayant un diamètre compris entre 100 et 300  $\mu\text{m}$  et les artérioles (diamètre entre 10-50  $\mu\text{m}$ ). Leur média est majoritairement composée de cellules musculaires lisses et présente une activité myogénique basale. Leur structure permet de se contracter ou se dilater, contrôlant ainsi le débit sanguin et la résistance périphérique totale. Les artérioles agissent comme valves contrôlant l'entrée de sang dans le lit capillaire en aval. Selon les besoins métaboliques des tissus qu'elles desservent, elles ont la capacité d'obstruer complètement leur ouverture ou de causer une vasodilatation importante.

### **1.1.2.3 Les capillaires**

Les capillaires tissulaires représentent le segment vasculaire ayant la plus grande surface de tout l'organisme (1000 m<sup>2</sup> en comparaison avec les capillaires alvéolaires, lesquels ayant une surface de 90 m<sup>2</sup>), permettant ainsi les échanges nutritionnels tissulaires adéquats. Pour ceci, les capillaires sont formés d'une simple couche de cellules endothéliales, perméables, permettant le passage de petites molécules. Ainsi, l'endothélium permet les échanges par diffusion trans-capillaire et par filtration des fluides, nutriments, électrolytes, hormones et autres substances entre le sang et le fluide interstitiel.

### **1.1.3 Pression dans les différents segments vasculaires**

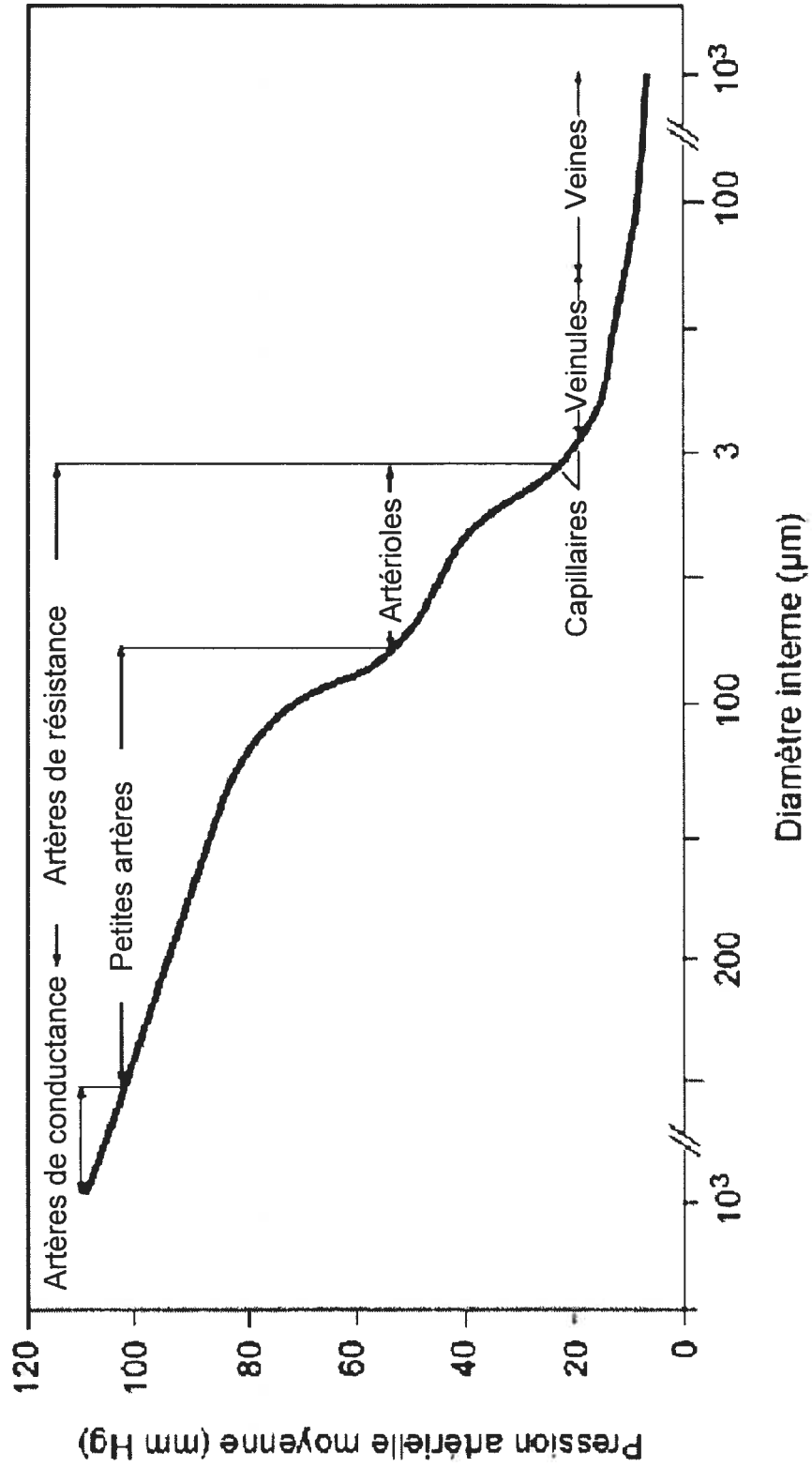
Afin d'approvisionner les tissus en nutriments, le sang doit circuler en partant du cœur jusqu'aux organes cibles avec un gradient de pression. En effet, en sortant du cœur, la pression moyenne est proche des 100 mmHg, et atteint une valeur nulle à l'entrée de l'oreillette droite (collectant le sang veineux arrivant des veines caves inférieure et supérieure). En s'éloignant du cœur, la pression doit considérablement diminuer pour permettre un débit sanguin régulier, prévenant ainsi des lésions au niveau des capillaires. Or, la pression change d'un segment vasculaire à un autre en vue de maintenir un débit constant. La pression dans les capillaires systémiques varie entre 35 mmHg (près de l'artériole) et 10 mmHg (près des veinules) avec une pression fonctionnelle de 17 mmHg, représentant une pression assez haute pour laisser passer les petites molécules nutritives sans laisser passer tout le plasma dans



l'espace interstitiel<sup>4</sup>. La figure 1.3 illustre la chute de pression lors du passage dans les différents segments artériels.

### **1.1.3.1 Effet tampon**

La diminution de la pression d'un segment vasculaire à un autre est assuré par la combinaison de la distension (compliance) de la paroi des artères de gros calibre et de la résistance par friction, laquelle est attribuée au tonus vasoconstricteur des petites artères et artérioles (artères de résistance). La compliance diminue l'effet pulsatile en emmagasinant un volume de sang par élévation de pression. La résistance par vasoconstriction diminue la pulsation pour diminuer la quantité de sang allant vers les segments artériels en aval, permettant ainsi un débit sanguin régulier et une pression sanguine adéquate pour la perfusion des organes.



**Figure 1.3** Courbe de la pression artérielle dans les différents segments artériels. Adaptée de Davis, M.J. et al. *Am J Physiol* 250: H291, 1986

## 1.2 La circulation coronarienne

La circulation coronarienne est responsable d'irriguer le cœur. Deux artères coronaires principales partent de la base de l'aorte (au dessus des valves semi-lunaires). L'artère coronaire gauche irrigue les parties antérieure et latérale du ventricule gauche tandis que l'artère coronaire droite irrigue entièrement le ventricule droit et la partie postérieure du ventricule gauche. L'artère intraventriculaire antérieure suit le sillon interventriculaire antérieur et fournit le sang oxygéné aux parois des deux ventricules. L'architecture générale de la vascularisation cardiaque suit une structure dichotomique en partant de l'épicarde, traversant le myocarde puis l'endocarde, suivant des diamètres d'artères décroissants. Ainsi les artères coronaires de conductance (dont le diamètre varie entre 500-1000  $\mu\text{m}$ ), irriguent l'épicarde, puis se ramifient en artères de résistance (diamètre variant entre 100-300  $\mu\text{m}$ ) et en artérioles (diamètre variant entre 10-100  $\mu\text{m}$ ), ces deux dernières s'immiscant vers les parois internes du cœur<sup>5</sup>. Les artérioles se ramifient ensuite en capillaires, représentant le lieu d'échange en oxygène et nutriments des cardiomyocytes.

Au repos, 70 % de l'oxygène de la circulation coronarienne est consommée par le cœur à mesure qu'il le traverse, laissant peu d'oxygène supplémentaire pour nourrir davantage les cardiomyocytes, sauf si le débit sanguin augmente. Dans la circulation coronarienne, le débit sanguin dépend majoritairement des besoins métaboliques du tissu cardiaque. La libération d'adénosine, qui est un agent

vasodilatateur, est le principal facteur qui permet d'augmenter le débit sanguin coronarien<sup>4</sup>.

## CHAPITRE 2. PHYSIOLOGIE DU SYSTÈME CARDIOVASCULAIRE

### 2.1 Débit sanguin

Le débit sanguin dans le système circulatoire dépend principalement de deux paramètres: la différence de pression entre deux extrémités vasculaires (gradient de pression), générant la force poussant le sang sur la paroi vasculaire, et la résistance au débit sanguin, exercée par la friction du sang le long de la paroi vasculaire. Le débit peut donc être calculé selon la loi d'Ohm:

$$Q = \Delta P/R,$$

où  $Q$  = le débit sanguin,  $\Delta P$  = le gradient de pression et  $R$  = la résistance<sup>4</sup>. Une relation plus complète du débit a ensuite été élaborée par le physicien français, Poiseuille, ayant porté un intérêt sur le débit d'un liquide dans un tube de verre. Son principe a donné lieu à une loi portant son nom, loi de Poiseuille, qui met en relation la différence de pression, le rayon du tube, la longueur du tube, et la viscosité du liquide pour déterminer le débit sanguin<sup>6</sup>. Ses travaux ont été appliqués au système circulatoire. Ainsi, la formule du débit sanguin peut être définie par :

$$Q = \pi(\Delta P) r^4 / 8\eta L$$

où  $\Delta P$  = la différence de pression entre la pression aortique et la pression de la veine cave (à l'entrée de l'oreillette droite),  $r^4$  est le rayon du vaisseau,  $\eta$  = la viscosité du sang et  $L$  = la longueur du vaisseau.  $\pi/8$  étant une constante de proportionnalité<sup>6</sup>. En observant les paramètres de la formule, l'un peut stipuler que le diamètre du vaisseau (qui est le double du rayon) est le principal facteur déterminant le débit sanguin puisqu'il est à la puissance 4.

### **2.1.1 Régulation du débit**

Le débit sanguin peut être régulé de façon aiguë ou chronique. À court terme, la régulation du débit résulte de la contraction des artérioles soit par un besoin métabolique tissulaire ou par processus d'autorégulation myogénique. À long terme, il est plutôt régulé par le changement structurel de la vascularisation des tissus.

#### **2.1.1.1 Régulation du débit à court terme**

##### **A. Besoins métaboliques**

Plus les besoins métaboliques d'un tissu donné sont importants, plus fort sera le débit. L'oxygène représente le nutriment le plus important à la survie des tissus. Un manque d'oxygène tissulaire mène à une dilatation des artérioles et une augmentation du débit. Ce phénomène explique l'augmentation du débit sanguin vers les muscles squelettiques à l'effort (hyperhémie active) ou au repos après une période « d'occlusion » artérielle (hyperhémie réactive). Les métabolites responsables de la

vasodilatation incluent en outre, les ions  $H^+$  et  $K^+$ , le  $CO_2$ , l'acide lactique, les phosphates et l'adénosine<sup>7</sup>.

## **B. Autorégulation**

L'autorégulation est définie comme étant une tendance intrinsèque d'un organe à maintenir un débit sanguin normal en dépit d'un changement de pression artérielle<sup>8</sup>. Cette autorégulation du débit sanguin repose sur des altérations locales de la résistance vasculaire qui compensent les variations importantes de pression. Les cellules musculaires lisses vasculaires sont arrangées en hélice ou suivant une disposition circonférentielle autour de l'axe du vaisseau et lorsqu'elles sont étirées, elles deviennent actives, résultant en une contraction. Ce processus illustre le contrôle local du tonus vasculaire, de sorte que chaque cellule musculaire lisse vasculaire agit comme stimulateur autonome à la réponse myogénique. Les mécanismes contrôlant la réponse myogénique des artères de résistance seront abordés dans la section traitant sur la résistance périphérique.

## **C. Forces de cisaillement**

Les forces de cisaillement causent une augmentation du débit sanguin en libérant du monoxyde d'azote (NO), de la prostacycline et de l'acide époxyeicosatriénique, tous trois favorisant une vasodilatation. En général, les forces de cisaillements stimulent la libération d'agents vasodilatateurs lesquels modulent négativement la réponse d'autorégulation myogénique, permettant ainsi de limiter la réponse vasoconstrictrice. Par exemple, une augmentation subite de la pression mène

à une vasoconstriction aiguë au niveau des artérioles. Par conséquent, le diamètre des artérioles diminue et mène à l'augmentation des forces de cisaillements et permet la libération de facteurs vasodilatateurs, opposant une vasoconstriction trop sévère.

#### **D. Réponse inflammatoire**

Au site d'une lésion ou d'une infection, la libération importante de nombreuses substances vasodilatatrices, notamment la bradykinine et l'histamine, augmente le débit sanguin. La vasodilatation permet ainsi l'arrivée rapide des cellules « réparatrices » et des nutriments au site d'infection, de même que l'élimination des déchets métaboliques.

#### **2.1.1.2 Régulation du débit à long terme**

Le changement du degré de vascularisation tissulaire représente le mécanisme de régulation du débit sanguin à long terme. Une diminution chronique de la pression artérielle mènera à une augmentation physique de la taille du vaisseau et, dans certaines conditions, à une augmentation du nombre des vaisseaux pour un tissu donné. Au contraire, une augmentation chronique de la pression artérielle conduira à une diminution du nombre et de la taille des artères de résistance, artérioles et capillaires. Ce phénomène est appelé la raréfaction des artères et sera détaillé dans la section traitant du remodelage vasculaire. Les besoins métaboliques régulent aussi à long terme le débit sanguin. Par exemple, une augmentation chronique de la demande en oxygène mènera à une augmentation de la vascularisation tissulaire (angiogénèse),



phénomène observé chez les personnes vivant en haute altitude, où l'oxygène est plus rare. Il est aussi présent lors de la croissance d'un tissu (embryogénèse, tumeur) ou lors d'effort musculaire (hypertrophie musculaire).

### **A. Vascularisation**

La vasculogénèse est le développement de novo de vaisseaux sanguins à partir de cellules endothéliales différenciées. Elle représente un processus survenant particulièrement durant l'embryogénèse et transposée dans la formation de nouveaux vaisseaux chez l'homme. De son côté, l'angiogénèse se définit plutôt comme étant la formation de nouveaux capillaires à partir de vaisseaux pré-existants et l'artériogénèse se définit par la formation de nouvelles artérioles ou de collatérales entre deux artérioles existantes<sup>9</sup>. Le recrutement de cellules musculaires lisses et la production des constituants de la matrice extracellulaire permettent ce processus. La formation de nouveaux vaisseaux est stimulée par l'action de facteurs angiogéniques lesquels sont libérés par les tissus environnants au cours des trois conditions suivantes: lors d'ischémie tissulaire, lors de croissance rapide d'un tissu (hypertrophie musculaire) ou lors de besoins métaboliques importants d'un tissu<sup>4</sup>.

La formation de nouveaux vaisseaux implique les étapes suivantes: en réponse à la stimulation provenant d'agents angiogéniques libérés localement, une nouvelle ramification vasculaire apparaît au niveau des veinules post-capillaires où une dissolution de la membrane basale des cellules endothéliales survient. Ensuite, il y a formation de nouvelles cellules endothéliales provenant de la veinule post-capillaire suivi d'une migration de ces cellules le long de la membrane basale de l'endothélium

vers les stimuli angiogéniques. L'hypothèse de cellules endothéliales souches circulantes se différenciant en nouvelles cellules endothéliales a aussi été proposée<sup>10</sup>. En effet, le groupe de Isner<sup>11</sup> a démontré qu'il y a une augmentation du nombre de cellules souches hématopoïétiques circulantes lors d'ischémie tissulaire. Cette augmentation du recrutement de cellules souches pour former de nouveaux vaisseaux peut aussi dépendre du type tissulaire dans lequel l'angiogénèse est stimulée<sup>12</sup>. Concernant la néoformation de collatérales ou d'artérioles, plusieurs hypothèses ont été suggérées pour ce qui est de la provenance des nouvelles cellules musculaires lisses. Il a été rapporté que les fibroblastes interstitiels environnants ou les péricytes nouvellement recrutés se différencient en cellules musculaires lisses. L'autre hypothèse vient de la prolifération, la différenciation et la migration de cellules musculaires lisses provenant de l'artériole-mère<sup>10</sup>. La structure tubulaire vasculaire est favorisée par l'action des péricytes encerclant la nouvelle ramification.

Les facteurs stimulant l'angiogénèse sont nombreux. L'angiogénine, le facteur de croissance fibroblastique (FGF), le facteur de croissance vasculaire endothélial (VEGF) et le NO en sont les principaux. Selon des études *in vivo*<sup>13,14</sup> ou *in vitro*<sup>15</sup>, le NO a été démontré comme étant le modulateur central de l'angiogénèse. Ces études ont démontré entre autre que lorsque la synthèse du NO est bloquée en condition ischémique, la néovascularisation est fortement diminuée.

## 2.2 La résistance

La résistance périphérique est surtout définie par la portion artérielle distale au niveau des artères de résistance (ayant un diamètre plus petit que  $300 \mu\text{m}$ ) et des artérioles (ayant un diamètre plus petit que  $100 \mu\text{m}$ )<sup>2</sup>. Une augmentation de la résistance périphérique est majoritairement due à une diminution du diamètre interne des artères de résistance et des artérioles (processus aigu) et/ou à une diminution du nombre d'artérioles connectées en parallèle (processus chronique), phénomène connu sous le terme de raréfaction<sup>16</sup>.

### 2.2.1 Diminution du diamètre interne des artérioles

Dans le système circulatoire, les 2/3 de la résistance se trouve au niveau des artérioles. Elles ont la fonction de contrôler étroitement la perfusion sanguine des organes qu'elles irriguent afin d'assurer un apport sanguin adéquat pour leur fonction et leur survie. Or, suivant la loi de Poiseuille ( $Q = \pi(\Delta P) r^4 / 8\eta L$ , où  $R = 8\eta L / \pi r^4$ ), pour une pression constante, le diamètre vasculaire fera varier la résistance selon les besoins métaboliques tissulaires, diminuant ou augmentant par le fait même le débit sanguin pour favoriser une perfusion adéquate des organes. En observant la formule, nous pouvons aussi facilement comprendre qu'une faible diminution du diamètre de l'artère augmentera considérablement la résistance périphérique. Ce principe est crucial pour comprendre l'importance du remodelage eutrophique des artères de résistance dans l'hypertension essentielle, qui sera traité plus loin dans le chapitre 3.

Différents facteurs influencent la variation du diamètre interne des artères de résistance, notamment l'augmentation de pression (tonus myogénique), l'innervation des fibres nerveuses sympathiques et l'influence de la libération des facteurs endothéliaux. Étant donné que l'augmentation de la résistance périphérique implique une contraction des cellules musculaires lisses vasculaires, une brève description des mécanismes impliqués dans la réponse contractile classique semble appropriée.

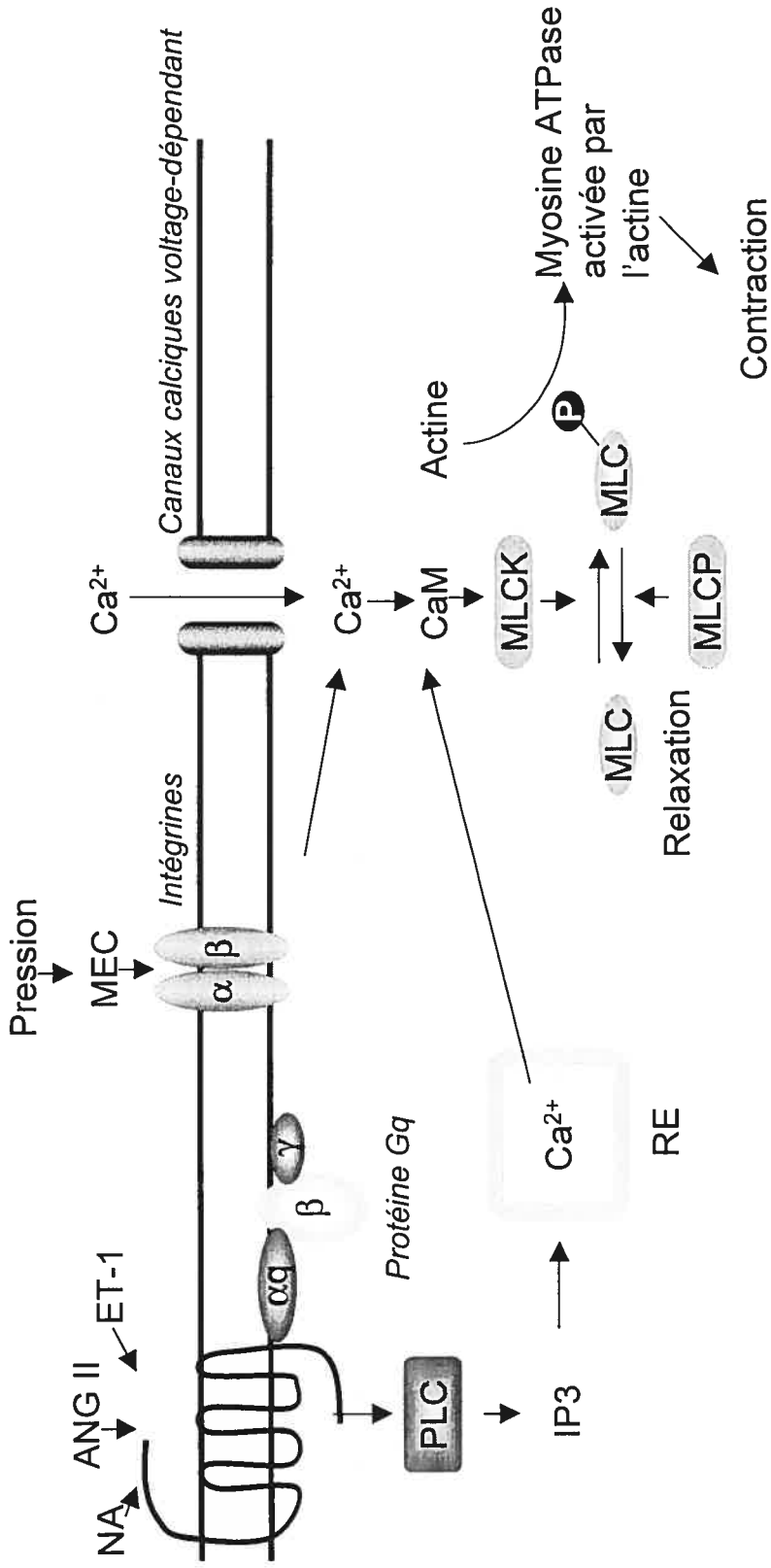
### **A. Mécanismes de la contraction des muscles lisses vasculaires**

La résistance périphérique est contrôlée au niveau des artères de résistance et des artérioles, celles-ci étant majoritairement composées de cellules musculaires lisses. Les mécanismes de la contraction cellulaire des muscles lisses sont dépendants de l'augmentation du calcium intracellulaire. Ainsi, une stimulation sympathique par la libération de noradrénaline (NA), humorale par l'action de l'angiotensine II (ANG II), endothéliale par l'action de l'endothéline (ET-1) ou due à l'augmentation de pression, mène à l'entrée de calcium extracellulaire ou à une libération du calcium intracellulaire emmagasiné préalablement dans le réticulum sarcoplasmique. Le calcium tend alors à se lier une protéine cytoplasmique, la calmoduline. Cette liaison entre le calcium et la calmoduline cause un changement de conformation de la protéine et expose ainsi des sites d'interactions avec d'autres protéines, notamment la kinase de la chaîne légère de la myosine (MLCK). L'interaction du complexe calmoduline/ $\text{Ca}^{2+}$  avec la MLCK active la kinase et mène à la phosphorylation des deux chaînes légères de la myosine au niveau de l'acide aminé sérine à la position 19 (ser-19). Cette phosphorylation active les liaisons entre l'actine et la myosine, initiant

ainsi le cycle de la contraction hydrolysant de l'ATP. (Fig. 2.1). D'autres mécanismes indépendants du calcium intracellulaire activent la contraction en augmentant la sensibilité du calcium. Les mécanismes impliqués dans un tel processus incluent la contribution de la protéine kinase C et celle des petites protéines à activité GTPasique, comme la protéine Rho. Ces mécanismes de contraction seront détaillés plus loin.

### **2.2.1.1 Tonus myogénique**

Tel que mentionné dans la section traitant de l'autorégulation, les artères de résistance possèdent un tonus musculaire basal, qui est pré requis pour la vasodilatation dépendante des besoins métaboliques tissulaires locaux. Le terme tonus représente l'activité contractile moyenne pour une région ou une section de la circulation périphérique<sup>17</sup>. La réponse myogénique est caractérisée par une contraction de l'artère et, par conséquent, à une augmentation de la résistance périphérique, secondaire à l'étirement de la paroi vasculaire en réponse à une augmentation de la pression artérielle. La contraction myogénique implique des mécanismes dépendants de l'entrée de calcium dans la cellule et aussi des mécanismes indépendants de l'entrée calcique, portant majoritairement sur l'augmentation de la sensibilité au calcium<sup>18,19</sup>.



**Figure 2.1.** Illustration des mécanismes impliqués dans la contraction dépendante du calcium. L'entrée de calcium ( $\text{Ca}^{2+}$ ) peut être stimulée par des médiateurs comme la noradrénaline (NA), l'angiotensine II (ANG II) ou l'endothéline (ET-1). Elle peut être aussi stimulée par une augmentation de la pression via les intégrines ou les canaux ioniques. PLC, phospholipase C; IP3, Inositol 1,4,5-triphosphate; RS, réticulum endoplasmique; MEC, matrice extracellulaire; CaM, calmoduline; MLCK, myosin light chain kinase; MLC, myosin light chain; P, phosphorylation; MLCP, myosin light chain phosphatase. Adaptée de Fukata et al. *Trends in Pharm. Sc.* 2001; 22: 33 et Davis et al. *Physiol. Rev.* 1999;79: 404

La réponse myogénique implique une contraction secondaire à une augmentation de la pression. Elle dépend principalement de l'entrée de calcium extracellulaire par l'entremise des canaux calciques voltage-dépendants (CCVD)<sup>18</sup>.

Lorsque la pression augmente, elle étire la paroi qui mène à la stimulation des canaux ioniques non sélectifs, sensibles à l'étirement<sup>20</sup>. Parmi ces derniers, on compte les canaux potassiques, sodiques et calciques qui exhibent une meilleure perméabilité pour les ions  $K^+$ ,  $Na^+$  et  $Ca^{2+}$ , respectivement. Étant donné que la perméabilité du calcium par ces canaux est faible, ils seraient surtout responsables de générer une dépolarisation membranaire, qui conduirait à la stimulation des CCVD<sup>20</sup>. L'entrée de calcium dans la cellule stimule la contraction du muscle lisse.

L'activation des canaux calciques intracellulaires du RS semble aussi impliquée être dans la réponse myogénique<sup>19</sup>. Le calcium qui est entré dans la cellule suivant la dépolarisation peut se lier aux récepteurs transmembranaires à la Ryanodine du RS, qui cause une libération du calcium<sup>21</sup>. L'activation de la PLC membranaire peut aussi conduire à la production d'IP<sub>3</sub>, qui se lie à son récepteur membranaire du RS, causant la libération de calcium. La diffusion de calcium provenant du RS joue aussi un rôle dans l'inhibition de la contraction. En effet, la sortie de calcium intracellulaire active des canaux potassiques dépendants du calcium. Ceci cause l'ouverture des canaux  $K^+$  et, par conséquent, à l'hyperpolarisation de la cellule par la sortie des ions  $K^+$ <sup>21</sup>.

### **2.2.1.2 Le système nerveux autonome**

La contractilité des artères de résistance dépend entre autres des innervations des fibres nerveuses du système nerveux autonome sympathique. L'innervation peut être plus importante au niveau des artères de résistance et artérioles de certains lits vasculaires tels les reins, l'estomac, la rate et la peau et beaucoup moins importante au niveau des muscles squelettiques et du cerveau<sup>4</sup>. Une stimulation du système nerveux sympathique va entraîner une libération de la noradrénaline (neurotransmetteur post-ganglionnaire sympathique), laquelle stimule les récepteurs  $\alpha$ -adrénergiques de la paroi vasculaire. La réponse cellulaire des muscles lisses résulte en une vasoconstriction et par conséquent, à une augmentation de la résistance périphérique, par les mécanismes de la contraction « classique » déjà présentés.

### **2.2.1.3 Fonction endothéliale**

L'endothélium est considéré de plus en plus comme un organe à part entière, jouant un rôle crucial dans l'homéostasie hémodynamique du système artériel. En effet, par sa localisation stratégique faisant le pont entre la circulation et la couche de cellules musculaires lisses, l'endothélium est un organe pouvant réguler le tonus des vaisseaux par la libération de substances causant une dilatation ou une contraction vasculaire. Par conséquent, la libération de facteurs vasodilatateurs mènera à une diminution de la résistance périphérique, et inversement, une libération de facteurs vasoconstricteurs mènera à une augmentation de la résistance périphérique. Parmi les



agents vasodilatateurs endothéliaux, le NO, la prostacycline et le facteur hyperpolarisant dépendant de l'endothélium représentent les principaux. Les agents vasoconstricteurs endothéliaux sont principalement l'endothéline, le thromboxane A2 et les anions superoxydes. Ces facteurs peuvent interagir entre eux et le tonus vasculaire total résulte de la sommation des effets vasodilatateurs et vasoconstricteurs endothéliaux, incluant la constriction basale sympathique.

## **Agents vasodilatateurs**

### **A. Le monoxyde d'azote : NO.**

Le NO est le principal agent vasodilatateur du système vasculaire découvert par Furchgott et Zawadzki vers la fin des années 80. Ces chercheurs ont démontré que la relaxation musculaire des artères de résistance induite par l'acétylcholine était dépendante de la présence d'un endothélium sain<sup>22</sup>. Sa fonction principale est d'opposer l'apport constricteur vasculaire, empêchant ainsi une contraction trop importante des artères de résistance. Le NO est libéré lorsque les besoins métaboliques tissulaires augmentent et lorsque les forces de cisaillement sont élevées (par une diminution du diamètre artérielle lors de la contraction vasculaires)<sup>23</sup>. En plus de ses fonctions vasodilatatrices, le NO joue aussi un rôle dans la réponse inflammatoire, dans l'apoptose des cellules musculaires lisses vasculaires, dans l'angiogénèse (prolifération des cellules endothéliales) et dans l'inhibition de l'agrégation plaquettaire.

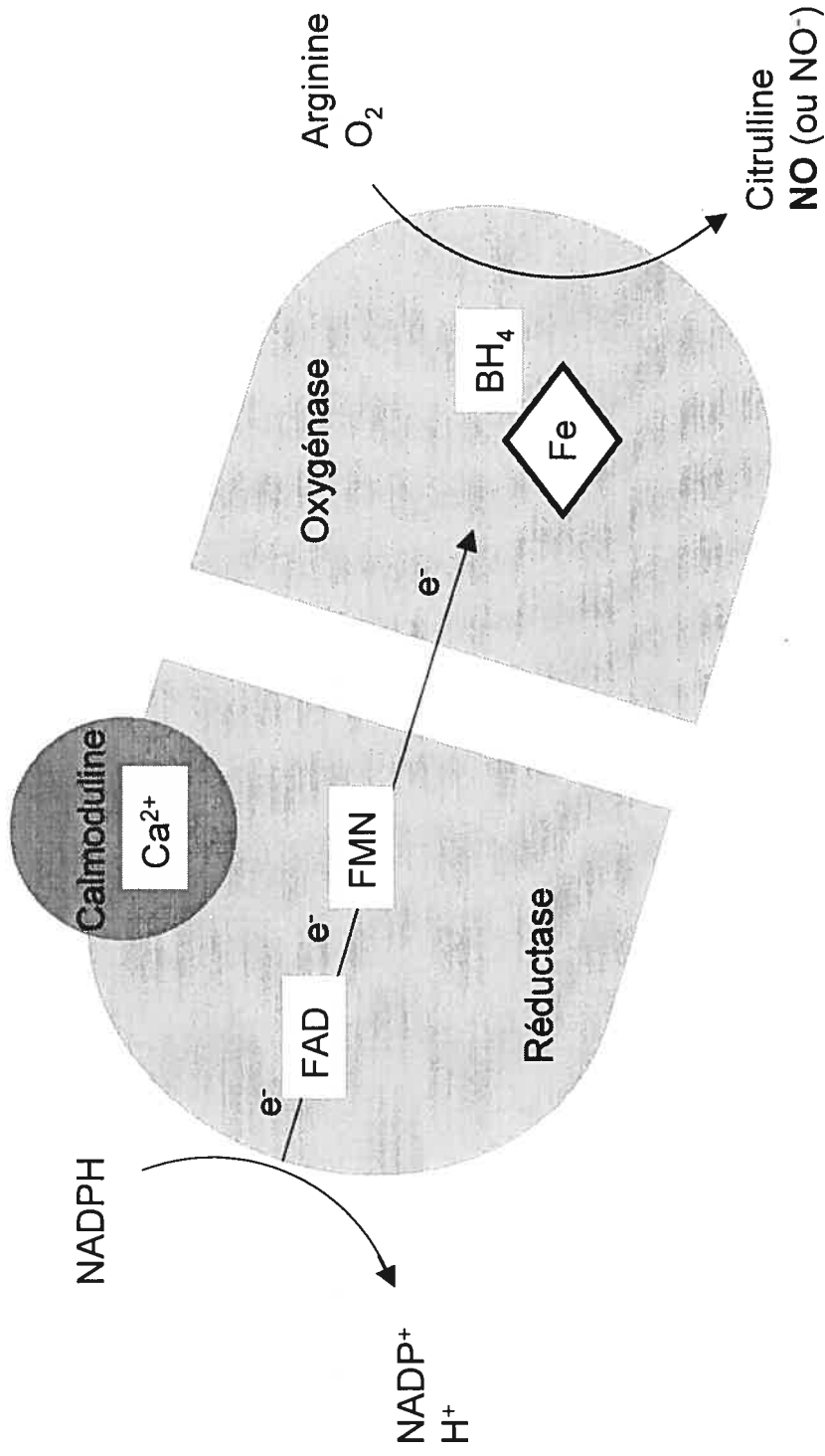
### *A.1 Synthèse du NO*

Le NO est synthétisé par l'enzyme NO synthétase (NOS), à partir de la L-arginine, formant aussi de la L-citrulline. Il existe trois types d'enzymes NOS. La NOS I ou nNOS (neuronal) et la NOS III ou eNOS (endothéliale) sont les enzymes formant le NO de façon constitutive et leur activité est fortement régulée par le complexe intracellulaire  $\text{Ca}^{2+}$ /Calmoduline (CaM). Ces enzymes produisent du NO sur une très courte durée (de secondes à minutes). La NOS II ou iNOS (inductible) génère le NO majoritairement suivant une induction inflammatoire. Cette dernière produit du NO indépendamment du complexe  $\text{Ca}^{2+}$ /CaM sur une période pouvant durer des heures jusqu'à des jours. La NOS inductible peut être présente dans un plus large spectre cellulaire, notamment dans les macrophages, les hépatocytes, les chondrocytes et les cellules musculaires lisses<sup>24</sup>.

### *A.2 Structure de la NOS*

Les différentes NOS présentent une similarité dans leur structure: elles possèdent des sites de liaison pour de nombreux co-facteurs incluant la tétrahydrobioptérine ( $\text{BH}_4$ ), la flavine adénine dinucléotide (FAD), la flavine mononucléotide (FMN) et un groupement hème contenant un ion fer (fer protoporphyrine IX)). Les NOS exhibent deux domaines, l'un ayant une fonction réductase (en C-terminal) et l'autre, oxygénase (en N-terminal). La partie réductase lie le NADPH, la FAD et la FMN et présente aussi un site de liaison pour le complexe  $\text{Ca}^{2+}$ /CaM. La partie oxygénase lie la  $\text{BH}_4$ , la L-arginine, l'ion hème, et

dans le cas de la NOS endothéliale, présente des sites de palmitoylation et de myristoylation permettant l'interaction avec les membranes cellulaires composées d'une bicouche lipidique. Les NOS sont actives lorsqu'elles sont sous forme d'homodimères et catalysent la réaction impliquant la L-arginine, la NADPH et l'oxygène comme substrats pour générer du NO, de la L-citrulline et du NADP. Les co-facteurs FAD et FMN acceptent les électrons du NADPH de la partie réductase de l'enzyme et les transfèrent au groupement hème de la partie oxygénase de l'enzyme. Le principal rôle de ces flavines est de transférer deux électrons provenant du NADPH sur un groupement acceptant seulement un électron en formant des radicaux intermédiaires stables qualifiés de semi-quinones. Quant à lui, le complexe  $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$  accélère le transfert d'électrons de la partie réductase à la partie oxygénase de l'enzyme. Les rôles du  $\text{BH}_4$  se résument dans la dimérisation de l'enzyme, dans le couplage oxydatif du NADPH avec la synthèse du NO, dans l'inhibition de la formation d'anion superoxide et de peroxide d'hydrogène et dans la stabilité de la liaison de la L-arginine, pour en nommer que quelques uns<sup>25</sup>. Une diminution de l'efficacité du co-facteur  $\text{BH}_4$  mène à la production d'anions superoxides<sup>26</sup>. Il s'agit alors d'un découplage fonctionnel de l'enzyme NOS. Une fois formés, les anions superoxides peuvent générer du peroxide d'hydrogène ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) ou des ions peroxynitrites ( $\text{ONOO}^-$ )<sup>26</sup>. La structure de l'enzyme est schématisée à la figure 2.2.



**Figure 2.2** Réaction catalytique de l'enzyme de synthèse du monoxyde d'azote (NO). L'enzyme comporte une région réductase et oxydase. De nombreux cofacteurs assurent la fonction enzymatique. NADPH, nicotinamide adénine dinucléotide phosphate; FAD, flavine adénine dinucléotide; FMN, flavine mononucléotide; Ca<sup>2+</sup>, calcium; e<sup>-</sup>, électron; Fe, fer; BH<sub>4</sub>, tétrahydrobioptérine; O<sub>2</sub>, oxygène.

*Adaptée de Alderton et al. Biochem. J. 2001; 357: p.594.*

### *A.3 Stimulation de la synthèse du NO*

Pour réguler le tonus vasculaire, les cellules endothéliales produisent du NO en réponse à la liaison d'un médiateur chimique à leur récepteur, tels que l'ACh (utilisée pour vérifier la fonction endothéliale en laboratoire), la BK et l'ATP. Aussi, la NOS peut être activée par l'augmentation des forces de cisaillement. La forme neuronale de la NOS pourrait aussi jouer un rôle dans la régulation du tonus vasculaire puisqu'elle est retrouvée au niveau des fibres neuronales entourant l'adventice et dans les CLMs de la média<sup>27</sup>. Toutefois, son rôle de régulateur du tonus vasculaire reste moindre que celui joué par la NOS endothéliale. Une fois synthétisé dans les cellules endothéliales, le NO, qui est une molécule très lipophile, peut traverser la membrane cellulaire des cellules musculaires lisses, où il se lie à la partie hème de la guanylate cyclase soluble (Gcs) cytoplasmique, activant ainsi le site catalytique de l'enzyme. L'activité basale de la GCs étant basse, la liaison du NO à la partie hème de l'enzyme, augmente de 400 fois son activité<sup>28</sup>. Une activation de la guanylate cyclase mène à une augmentation du second messenger GMPc, lequel mène à une diminution de  $Ca^{2+}$  intracellulaire et à une relaxation musculaire. Le principal récepteur protéique du GMPc dans les cellules musculaires lisse est la protéine kinase GMPc-dépendante (PKG). Une activation de la PKG mène à une cascade de phosphorylation/déphosphorylation de protéines cellulaires menant à la déphosphorylation de la chaîne légère de la myosine, résultant ainsi à la relaxation musculaire<sup>29</sup>.

La relaxation des cellules musculaires lisses par le NO peut aussi impliquer un mécanisme jouant sur l'ouverture des canaux potassiques transmembranaires, menant à la libération des ions potassiques à l'extérieur de la cellule et, par conséquent, à l'hyperpolarisation de la membrane cellulaire. Ainsi le NO peut activer indirectement l'ouverture des canaux  $K^+$ /ATP-dépendant via la production cellulaire du GMPc ou le NO peut activer indirectement (via le GMPc) ou directement, l'ouverture des canaux  $K^+$ / $Ca^{2+}$ -dépendant<sup>30</sup>. L'effet vasodilatateur du NO peut être compromis par la formation de  $ONOO^-$  lorsque les anions superoxydes se combinent au NO. Les  $ONOO^-$  sont des ROS très dommageables, ils sont cytotoxiques, oxydent les peroxyosomes qui libèrent leurs enzymes oxydantes et peuvent causer une vasoconstriction en inhibant les canaux potassiques calcium-dépendant des CMLs.

#### *A.4 Les inhibiteurs de la synthèse de la NOS*

La plupart des inhibiteurs de la NOS sont des analogues de la L-arginine, bloquant ainsi son site de liaison à l'enzyme par compétition. Le  $N^G$ -(Mono)méthyl-L-arginine (L-NMMA), étant un des premiers analogues de la L-arg ayant été identifié, il présente peu de sélectivité pour les différentes isoformes de la NOS. Ensuite, d'autres analogues de la L-arginine ont été découverts, le  $N^G$ -Nitro-L-arginine-méthyl ester (L-NAME), et le N-amino-L-arginine (L-NA), lesquels présentent une meilleure sélectivité pour les isoformes enzymatiques constitutives<sup>31</sup> (Tableau 2.1).

Analogues de la L-arginine	Commentaires
N <sup>G</sup> -(Mono)méthyl-L-arginine (L-NMMA, L-NMA)	Inhibiteurs prototypiques de la NOS, peu de sélectivité entre les différentes isoformes de la NOS
N <sup>G</sup> -Nitro-L-arginine (L-NA)	Puissant inhibiteur des NOS constitutives (nNOS et eNOS)
N <sup>G</sup> -Nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME)	Plus faible inhibiteur de la NOS mais bon précurseur du L-NA
N <sup>6</sup> -(1-iminoethyl)-L-lysine (L-NIL)	Inhibiteur très sélectif pour la NOS inducible (iNOS)

**Tableau 2.1** Caractéristiques des principaux analogues de la L-arginine  
Adapté de Southan GJ et al. dans *The Haemodynamic effects of Nitric Oxide 1999; chap. 7: 130*

L'utilisation du L-NAME est fréquente pour induire une augmentation de la pression artérielle chez les rats<sup>32</sup> afin de diminuer la production du NO, augmentant ainsi la résistance périphérique.

## **B. Prostaglandines et métabolites du cytochrome P450**

Les prostaglandines et les métabolites du cytochrome P450 sont des produits enzymatiques provenant de l'acide arachidonique (AA). Sous stimulation hormonale ou par des médiateurs inflammatoires, l'acide arachidonique est libéré des phospholipides tissulaires sous l'action des lipases membranaires. Une fois formé, il est transformé en différents produits sous l'action enzymatique de la cyclooxygénase (COX), des oxygénases du cytochrome P450 (CYP) ou de la lipoxigénase<sup>33</sup>.

### *B.1 Prostacycline (PGI<sub>2</sub>)*

La prostaglandine I<sub>2</sub> (PGI<sub>2</sub>) ou prostacycline, est une des prostaglandines formées par l'activité enzymatique de la cyclooxygénase. Elle résulte de la transformation de l'AA par la cyclooxygénase, donnant en premier lieu la prostaglandine H<sub>2</sub> (PGH<sub>2</sub>). La PGH<sub>2</sub> est soit convertie en thromboxane A<sub>2</sub> via l'enzyme thromboxane synthétase, ou est soit convertie en PGI<sub>2</sub> via la prostacycline synthétase. Une fois formée dans les cellules endothéliales, la PGI<sub>2</sub> diffuse vers les cellules musculaires lisses où elle se lie à son récepteur transmembranaire spécifique couplé à une protéine Gs et active l'effecteur transmembranaire, l'adénylyle cyclase (AC). L'activation de l'AC mène à l'augmentation des taux d'adénosine monophosphate cyclique (AMPC), qui active une kinase A (PKA). Cette kinase



phosphoryle des pompes protéiques qui diminuent la concentration intracellulaire de calcium<sup>34</sup> causant par la suite l'ouverture des canaux potassiques dépendant du calcium et la relaxation musculaire.

### C. EDHF

Mis à part l'action dilatatrice du NO et de la PGI<sub>2</sub>, la dilatation par hyperpolarisation cellulaire a été identifiée lors de l'inhibition de la synthèse du NO et de la cyclooxygénase suivant une stimulation expérimentale à l'ACh. Il s'agit du facteur hyperpolarisant dépendant de l'endothélium. Son identité réelle faisant encore l'objet de nombreux débats, il a été suggéré qu'il pourrait être l'acide 5,6-époxyeicosatriénique (5,6-EET). Ce facteur serait le produit d'oxydation du cytochrome P450 agissant sur l'AA, par un procédé d'époxydation. Ainsi, l'époxydation de l'acide arachidonique produit 4 acides époxyeicosatriéniques (EETs) dont le 5,6-EET, ayant été proposé comme l'agent hyperpolarisant dépendant de l'endothélium<sup>33</sup>.

Le peroxyde d'hydrogène (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) est aussi reconnu comme un EDHF. Il s'agit. La NOS des cellules endothéliales génèrent différentes ROS dont le NO, l'O<sub>2</sub><sup>-</sup>, le ONOO<sup>-</sup>, le H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> et le radical hydroxyle (OH<sup>-</sup>). L'O<sub>2</sub><sup>-</sup> peut former du H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> par l'action catalytique de l'enzyme SOD. Une fois formé, le H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, diffuse vers le muscle lisse et cause l'ouverture des canaux potassiques dépendant du calcium<sup>35</sup>. Ceci cause une libération des ions K<sup>+</sup> et une hyperpolarisation de la cellule (relaxation). Il peut causer directement une activation de la GC soluble et ainsi augmenter les taux de GMPc cellulaire<sup>26</sup>.

## **Agents vasoconstricteurs**

### **A. Le TXA<sub>2</sub>**

Généré dans les cellules endothéliales, le TXA<sub>2</sub> est un produit de l'acide arachidonique par l'action enzymatique et séquentielle de la cyclooxygénase et de la tromboxane synthétase, respectivement. Une fois formé il agit sur son récepteur (?) sur les cellules musculaires lisses qui est couplé à une protéine Gq. Celle-ci active une PLC transmembranaire qui catalyse la formation des messagers secondaires DAG et IP3, à partir des molécules de PIP2 de la membrane plasmique. La production de DAG active la PKC, tandis que l'IP3 stimule la libération intracellulaire du calcium emmagasiné du réticulum endoplasmique. Cette voie d'activation conduit à une vasoconstriction par des mécanismes « classiques ».

### **B. Les anions superoxydes (O<sub>2</sub><sup>-</sup>)**

Les anions superoxydes peuvent être formés à partir des enzymes cyclooxygénases, de la xanthine oxidase, de la NADPH oxidase et de la NOS (par une altération du co-facteur BH<sub>4</sub>). Ils peuvent aussi être générés par une diminution de l'activité enzymatique de la SOD, qui les dégrade. L'ANG II stimule la NADPH oxidase, favorisant ainsi la formation des O<sub>2</sub><sup>-36</sup>. Les anions superoxydes O<sub>2</sub><sup>-</sup> provoquent une vasoconstriction soit directement ou soit indirectement en causant l'inactivation du NO<sup>37</sup> par la production des molécules de peroxynitrite, OONO<sup>-</sup>.

### C. L'endothéline

L'endothéline est un peptide vasoconstricteur de 21-acides aminés découvert d'abord dans les cellules endothéliales. Il existe trois formes d'endothéline (ET-1, ET-2 et ET-3), chacune ayant des fonctions physiologiques différentes. Les cellules endothéliales synthétisent la proendothéline (183 acides aminés) à partir de son précurseur la pré-proendothéline (203 acides aminés). La proendothéline est convertie en big-endothéline (39 acides aminés). En clivant la big endothéline, l'enzyme de conversion à l'endothéline (ECE) forme l'endothéline. La principale isoforme d'endothéline générée est l'endothéline de type 1 (ET-1). Elle est sécrétée en réponse à différents stimuli dont l'augmentation de pression, l'atténuation des forces de cisaillements, l'ANG II, la vasopressine, les catécholamines, et le facteur de croissance transformant- $\beta$ <sup>38</sup>.

Son action vasoconstrictrice se fait par l'interaction avec son récepteur ET<sub>A</sub>, qui est un récepteur à 7 passages transmembranaires couplé à une protéine Gq. Il peut aussi interagir avec son récepteur ET<sub>B</sub> pour engendrer une réponse vasodilatatrice. Les récepteurs ET<sub>B</sub> sont aussi situés au niveau de la membrane des cellules endothéliales pour générer du NO ou de la PGI<sub>2</sub>. Ainsi, l'endothéline peut engendrer une réponse constrictrice ou dilatatrice, la première étant la principale réponse. L'activation du récepteur ET<sub>B</sub> représenterait un mécanisme compensateur pour empêcher une réponse constrictrice trop importante. Tout comme l'activation du récepteur par le TXA<sub>2</sub>, la contraction musculaire induite par l'activation des récepteurs ET<sub>A</sub> passe par la voie de la PLC qui mène à l'activation de la protéine kinase C puis à l'augmentation de la libération de calcium intracellulaire emmagasiné

dans le réticulum endoplasmique. Une augmentation intracellulaire de calcium ou une augmentation de la sensibilité au calcium représentent tous deux des mécanismes menant à la contraction musculaire stimulée par l'endothéline.

### **2.2.2 Diminution du nombre des artéoles : raréfaction**

La résistance périphérique peut aussi être augmentée par la diminution du nombre d'artéoles connectées en parallèle, limitant ainsi le flux sanguin aux tissus. La raréfaction est plutôt une réponse à long terme, et est impliquée surtout dans l'hypertension artérielle chronique. Elle fait partie des changements de structure des artères lorsque la pression artérielle augmente (remodelage vasculaire) et ainsi elle sera traitée plus loin.

## **2.3 Pression artérielle**

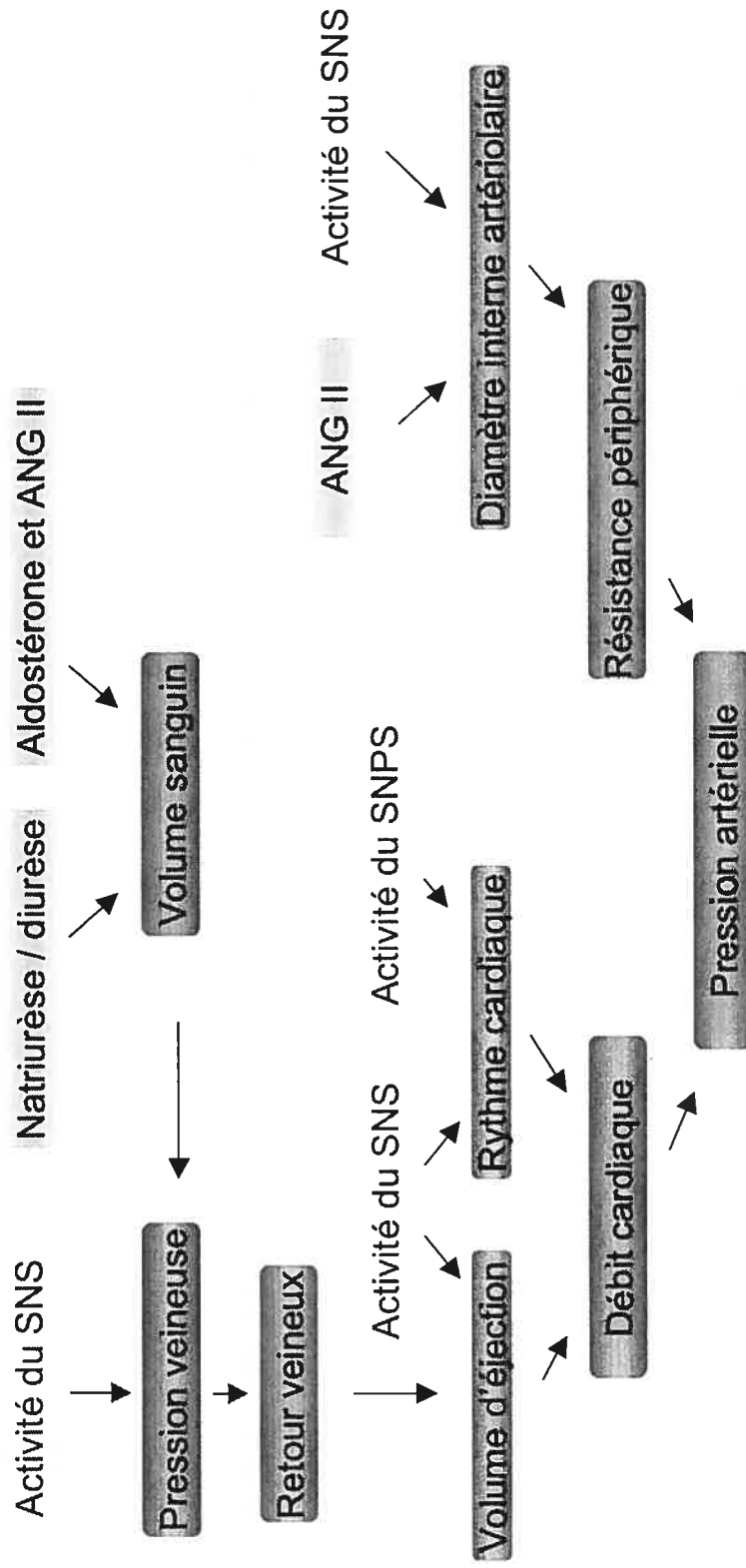
La pression artérielle est définie comme la force exercée par le sang contre chaque unité d'aire de la paroi vasculaire. Elle est mesurée en mm Hg puisque le manomètre de mercure a été utilisé depuis longtemps comme standard de référence pour la mesurer<sup>4</sup>. Les facteurs influençant la pression artérielle sont la résistance totale périphérique et le débit cardiaque. En effet, suivant l'équation

$$\Delta P = RPT \times DC,$$

où RPT=résistance périphérique totale (qui est la somme des résistances de tous les vaisseaux du système vasculaire, notamment au niveau des artères de résistance)

et  $DC = \text{débit cardiaque}$ . Le débit cardiaque est égal au volume d'éjection  $\times$  rythme cardiaque, et le volume d'éjection = volume de remplissage ventriculaire  $\times$  force de contraction ventriculaire. La différence de pression ( $\Delta P$ ) représente la pression aortique moins la pression à l'entrée de l'oreillette droite. Puisque la pression à l'entrée de l'oreillette droite est presque nulle,  $\Delta P =$  la pression aortique moyenne. Par conséquent, un changement au niveau de la résistance et du débit cardiaque aura des conséquences sur la pression artérielle.

L'organisme est pourvu de différents systèmes de contrôle de la pression artérielle qui peuvent réguler les variations de pression sur de très courte ou de très longue période. Les mécanismes de la régulation de la pression à court terme impliquent surtout un changement de la résistance périphérique ou de la fréquence et de la contractilité cardiaque. La contribution du système nerveux sympathique, des barorécepteurs et de certaines hormones jouent un rôle dans la régulation de la pression à court terme. D'autre part, les mécanismes impliqués dans la régulation à long terme de la pression artérielle mènent majoritairement à une altération de la réabsorption / excrétion d'eau et de sel au niveau des reins. Dans ce cas-ci, l'influence hormonale et les reins eux mêmes interviennent dans le contrôle des mécanismes rénaux impliqués dans la régulation chronique de la pression artérielle<sup>4,7</sup>. (Fig.2.3).



**Figure 2.3** Diagramme résumant les facteurs qui régulent la pression à court et à long termes. À court terme, la pression peut être régulée par les systèmes nerveux sympathique (SNS) ou parasymphatique (SNPS) ou par l'hormone angiotensine II (ANG II). À long terme, la pression peut être influencée par la natriurèse / diurèse ou par les hormones aldostérone ou ANG II.

*Adaptée de Vander et al. Human Physiology 1990: 404 et de McGeown. Physiologie / l'essentiel 2003: 93*

## **2.3.1 Régulation à court terme**

### **2.3.1.1 Rôle du système nerveux autonome sympathique.**

La libération de neurotransmetteurs sympathique (majoritairement la noradrénaline) et parasympathique (l'acétylcholine) est contrôlée par le centre vasomoteur du cerveau. Les vaisseaux (artères et veines) et le cœur reçoivent des innervations des fibres nerveuses sympathiques (excitatrices). De son côté, le système nerveux parasympathique (inhibiteur) innerve surtout le cœur par le nerf vague. Au niveau des veines, une stimulation sympathique causant la libération de la noradrénaline mènera à une vasoconstriction augmentant ainsi le retour veineux dans l'oreillette droite, ce qui favorisera le volume de remplissage ventriculaire et, par conséquent, augmentera la contraction cardiaque. Une stimulation sympathique au niveau des artères de résistance mènera à une vasoconstriction, par la liaison de la noradrénaline avec les récepteurs  $\alpha$ -adrénergiques. Ceci contribuera à l'augmentation de la résistance périphérique. Au niveau du cœur, l'augmentation de la libération de la noradrénaline élèvera la fréquence (effet chronotrope positif) et la force de contraction cardiaque (effet inotrope positif) via la liaison aux récepteurs  $\beta$ -adrénergiques, ce qui augmentera le débit cardiaque.

Ainsi, l'activation du système nerveux sympathique augmentera la pression artérielle soit en augmentant la résistance périphérique ou en augmentant le débit cardiaque. Une stimulation du système nerveux parasympathique causera l'effet

inverse, soit une diminution de la pression artérielle principalement en diminuant le débit cardiaque.

### **2.3.1.2 Rôle des barorécepteurs**

Les barorécepteurs sont des récepteurs à l'étirement localisés dans les parois de la crosse aortique et des sinus carotidiens. L'augmentation de la pression artérielle étire la paroi aortique et du sinus carotidien, augmentant la fréquence des décharges nerveuses sensibles des barorécepteurs. Ceci mène à une inhibition de l'activité nerveuse sympathique, diminuant le rythme cardiaque et la résistance périphérique. Simultanément, l'activation du système nerveux parasympathique augmente. Ainsi, la pression artérielle diminue. Inversement, lorsque la pression est trop faible, les barorécepteurs augmentent l'activité du système nerveux sympathique et diminuent celle du système nerveux parasympathique pour élever la pression artérielle. L'intervalle de pression perçue par les deux types de barorécepteurs varie. Par exemple, les barorécepteurs du sinus carotidien sont stimulés dans l'intervalle de pression allant de 60 mmHg à 180 mmHg, comparativement aux barorécepteurs de la crosse aortique, qui ont un intervalle de pression plus important, allant de 90 mmHg à 200 mmHg. Si les changements de pressions persistent sur une longue période, la sensibilité des barorécepteurs s'adapte à ce nouveau niveau de pression, de sorte que les barorécepteurs assurent seulement la régulation des variations aiguës de la pression artérielle.



### **2.3.1.3. Contrôle hormonal**

#### **A. Stimulation de la glande surrénalienne**

L'activation du système nerveux sympathique peut aussi stimuler la glande surrénalienne pour libérer principalement de l'adrénaline et un peu de noradrénaline. L'adrénaline circulante va surtout se lier aux récepteurs  $\beta$ -adrénergiques, puisque l'affinité est plus grande. Ainsi, la stimulation de la glande surrénalienne mènera à une augmentation du débit cardiaque en agissant sur les récepteurs  $\beta$ -adrénergiques cardiaques.

#### **B. Activation du système rénine-angiotensine**

La diminution de la pression artérielle résulte d'une diminution du débit sanguin rénal, qui est détecté par l'appareil juxta-glomérulaire de chaque néphron. Ainsi, les cellules juxta-glomérulaires sécrètent la rénine qui est une protéine maturée provenant de la pro-rénine. Une fois libérée dans la circulation, la rénine convertit le précurseur peptidique inactif, l'angiotensinogène, en angiotensine I. Celle-ci est ensuite convertie au niveau des poumons par l'enzyme de conversion de l'angiotensine (ECA), en angiotensine II. L'ANG II cause une vasoconstriction surtout au niveau des artérioles, en stimulant son récepteurs  $AT_1$  des cellules musculaires lisses. Ainsi, l'ANG II augmente la résistance périphérique. L'ANG II peut aussi contrôler la régulation de la pression de façon chronique en agissant sur le rein. (Voir ci-bas).

## **2.3.2.Régulation à long terme**

### **2.3.2.1 Diurèse et natriurèse rénales**

Un des éléments du contrôle de la pression artérielle est la régulation à long terme du volume sanguin qui contribue au maintien du retour veineux et du débit cardiaque à un niveau constant. Une augmentation de la pression artérielle mènera à une augmentation de l'excrétion d'eau et de sel au niveau des reins, afin de diminuer le volume extracellulaire de l'organisme<sup>4</sup>. L'augmentation de la diurèse et de la natriurèse est un processus se faisant sur de longues périodes (jours) et est efficace pour normaliser la pression artérielle. La prise de sel est un des facteurs influençant la diurèse et la natriurèse. En effet, elle occasionnera une stimulation du centre de la soif cérébrale et déclenchera une augmentation de la réabsorption d'eau au niveau des tubules rénaux en augmentant la libération d'hormones anti-diurétiques. Ainsi, le volume sanguin augmentera. Si le volume extracellulaire de l'organisme devient trop important, le rein augmentera sa diurèse et natriurèse.

### **2.3.2.2 Contrôle hormonal**

#### **L'aldostérone**

L'aldostérone est une hormone sécrétée par la glande cortico-surrénale. Lorsque la pression est basse, elle augmente la réabsorption de sodium et d'eau dans le tubule contourné distal, ce qui induit une augmentation du volume sanguin.

#### **L'angiotensine II**

Le rôle de l'angiotensine II dans la régulation à long terme de la pression artérielle implique son action au niveau du rein. Lorsque la pression est réduite, l'angiotensine II stimule la réabsorption de sel et d'eau rénale et stimule la libération de l'aldostérone. Ces deux mécanismes augmentent le volume sanguin.

#### **Peptide natriurétique auriculaire (ANP)**

Lorsque la pression volumique est trop élevée, elle est perçue au niveau de la paroi de l'oreillette droite qui stimule la libération du peptide natriurétique auriculaire. Celui-ci circule dans le sang et agit au niveau des reins où il diminue la réabsorption de sel et d'eau, surtout au niveau du tubule collecteur. Ceci diminue le volume plasmatique et, par conséquent, la pression artérielle<sup>4</sup>.

## CHAPITRE 3. L'HYPERTENSION ESSENTIELLE

L'hypertension essentielle, idiopathique ou primaire est considérée comme la forme d'hypertension la plus répandue, présente chez 90-95% des patients hypertendus. Elle affecte 20-35% de la population adulte des pays développés et en voie de développement et touche jusqu'à 60-70% des personnes âgées de plus de 70 ans<sup>39</sup>. L'hypertension essentielle est reconnue lorsque l'élévation de pression n'est pas secondaire aux maladies vasculaires rénales, à l'insuffisance rénale, au phéochromocytome, à l'aldostéronisme primaire, aux formes mendéliennes monogéniques d'hypertension, à la thérapie chronique aux stéroïdes ou aux maladies des glandes thyroïde et parathyroïde<sup>40,41</sup>.

L'hypertension essentielle est diagnostiquée lorsque la pression moyenne systolique et/ou la pression moyenne diastolique sont/est supérieure(s) à 140/90 mmHg<sup>40</sup>, une pression artérielle moyenne normale étant de 120/80 mmHg<sup>42</sup>. Les études cliniques classifient la sévérité de la maladie en mesurant la pression diastolique moyenne, qui représente un indice de la résistance périphérique. Cette classification concerne principalement les hypertendus dont l'âge varie entre 18 et 50 ans<sup>41</sup>. Chez les hypertendus plus âgés, la mesure de la pression moyenne systolique est favorisée à la mesure de la pression diastolique moyenne, puisque celle-ci diminue avec l'âge. Ce phénomène est associé à une augmentation de la rigidité aortique et concerne l'hypertension systolique isolée plutôt que l'hypertension

essentielle. L'hypertension systolique isolée touche surtout les hommes âgés de plus de 55 ans et les femmes âgées de plus de 60 ans.

L'origine de l'hypertension essentielle reste mal connue. Toutefois, il a été rapporté qu'une influence génétique pouvait contribuer au développement à l'augmentation de pression puisqu'elle a été observée chez les membres d'une même famille dont un des deux parents était hypertendu. De plus, une meilleure association des valeurs de pression artérielle a été observée chez des jumeaux identiques en comparaison avec des jumeaux non identiques<sup>40</sup>. Des mutations géniques responsables de trois formes rares d'hypertension mendélienne monogénique –aldostérisme glucocorticoïdique rémissible, le syndrome de Liddle et les excès de minéralocorticoïdes apparents- ont été identifiées<sup>40</sup>. Toutefois, les généticiens n'ont pas réussi à identifier des gènes communs qui contribuent de façon importante et fréquemment au développement de l'hypertension essentielle chez l'humain<sup>39</sup>. Cette difficulté semble attribué au fait que de nombreux facteurs autres que génétiques, participent aussi à l'augmentation de la pression artérielle. Parmi ceux-ci, on compte l'obésité, la résistance à l'insuline, l'alcool, la prise de sel (pour les patients sensibles au sel), le vieillissement, le sédentarisme, le stress, une déficience en apport d'ions  $K^+$  ou  $Ca^{2+}$ <sup>40</sup>, en plus du tabagisme et de l'hypercholestérolémie<sup>42</sup>. Ces facteurs ont été caractérisés comme étant hypertensinogènes et lorsqu'ils sont additionnés à la prédisposition génétique de la maladie, ils accentuent la sévérité de l'hypertension.

### 3.1 Risques cardiovasculaires associés à l'hypertension essentielle

L'hypertension essentielle est responsable du dommage des organes cibles de l'organisme, notamment le cœur, le cerveau et les reins. En effet, l'augmentation de la pression artérielle pousse le cœur à s'hypertrophier et à diminuer sa réserve coronarienne, tous deux menant à un infarctus du myocarde, une angine instable ou à un arrêt cardiaque. Au niveau du cerveau, l'existence de foyers ischémiques cérébraux a été rapportée en plus des accidents cérébraux vasculaires. Le rein est aussi souvent affecté par l'hypertension essentielle, qui mène à l'insuffisance rénale ou aux maladies vasculaires rénales athérosclérotiques<sup>42</sup>. Il existe une corrélation positive entre la sévérité de l'augmentation de la pression artérielle et les risques d'atteinte de ces organes<sup>41</sup>. L'atteinte des organes cibles est principalement causée par un changement de structure (remodelage) des artères de résistance<sup>43</sup>. Ce changement de structure est caractérisé par une augmentation du rapport média/lumière (M/L) des artères de résistance, qui est défini soit par une réduction de la lumière interne (diamètre) de l'artère, et/ou soit par une augmentation de l'épaisseur de sa paroi<sup>44,45</sup>. Le remodelage des artères de résistance représenterait un processus d'adaptation chronique à l'augmentation de la pression artérielle<sup>46</sup> et, par conséquent, diminuerait la réserve sanguine vasculaire à ce niveau du système artériel<sup>47</sup>. Ainsi, en période d'effort intense ou lorsque les besoins métaboliques tissulaires augmentent, la perfusion des organes, en aval des artères de résistance, serait réduite, contribuant aux dommages des organes cibles. L'amplitude du remodelage des artères de résistance

dépend, entre autres, de la sévérité ou de la vitesse de l'augmentation de la pression artérielle, du type du segment vasculaire remodelé<sup>48</sup> ou de la combinaison d'autres facteurs pathologiques comme le diabète de type 2<sup>49</sup>. Dans ce dernier cas, la structure des artères de résistance est grandement altérée et est associée à une augmentation de la fréquence des événements cardiovasculaires<sup>49</sup>.

## **3.2 Changement de structure des artères de résistance dans l'hypertension essentielle**

### **3.2.1 Le remodelage vasculaire**

L'hypertension essentielle est caractérisée par une élévation de la résistance périphérique, le débit cardiaque restant constant<sup>50</sup>. Des études ont démontré une contribution des artères au niveau pré-capillaire à l'augmentation de la résistance périphérique. Parmi ces travaux, Pickering<sup>51</sup> a observé une augmentation de la résistance vasculaire minimale suivant une dilatation maximale chez des patients hypertendus. Aussi, les travaux de Doyle et Black<sup>52</sup> ont démontré une augmentation de la réactivité des artères de résistance au niveau de l'avant-bras chez des patients hypertendus en réponse à l'infusion d'agonistes vasoconstricteurs. Quelques années plus tard, les études de Folkow<sup>53</sup> ont proposé que pour un même degré de contraction, le changement de la structure des artères de résistance d'individus hypertendus, contribuait à l'augmentation de la résistance périphérique et au maintien de la pression artérielle élevée, sans qu'il n'y ait une altération de l'activité contractile des fibres musculaires lisses. Ainsi, les artères ayant une paroi plus épaisse ou un diamètre interne réduit offrirait une résistance périphérique plus importante, caractérisée par un mécanisme d'amplification dépendant de la structure.

Ces travaux ont marqué le début d'une série d'études portant un intérêt sur le changement de structure des artères de résistance associé à l'hypertension essentielle. La plupart d'entre eux ont démontré une augmentation du rapport M/L dans les artères de résistance, en employant diverses méthodes pour mesurer leur structure. Par exemple, ayant fixé par perfusion le segment vasculaire du lit mésentérique de patients hypertendus et normotendus suivant une autopsie post-mortem, Short<sup>54</sup> a démontré une augmentation du rapport M/L seulement dans les artères mésentériques de patients hypertendus. Ses analyses histologiques ont montré une réduction de la lumière interne des artères, un épaississement de la paroi vasculaire sans augmentation de l'aire de section (CSA) de la média. Or, ces résultats suggéraient que les artères de résistances des patients hypertendus ont changé leur structure sans hypertrophie vasculaire. Ces observations ont aussi été observées dans d'autres études *in vitro*<sup>44,55,56</sup>, employant différentes méthodes de mesure de la structure des artères de résistance de patients hypertendus (soit en condition isométrique<sup>55,56</sup> ou en condition isobarique<sup>44,56</sup>). Or, dépendamment des méthodes de mesure de la structure des artères de résistance chez des patients hypertendus, (histologie<sup>54,57</sup>, myographie<sup>55,56</sup> ou par pressurisation d'artères isolées<sup>44,56</sup>), toutes ont démontré une augmentation du rapport M/L des artères de résistance qui est définie principalement par une réduction de la lumière de l'artère sans augmentation de la CSA.

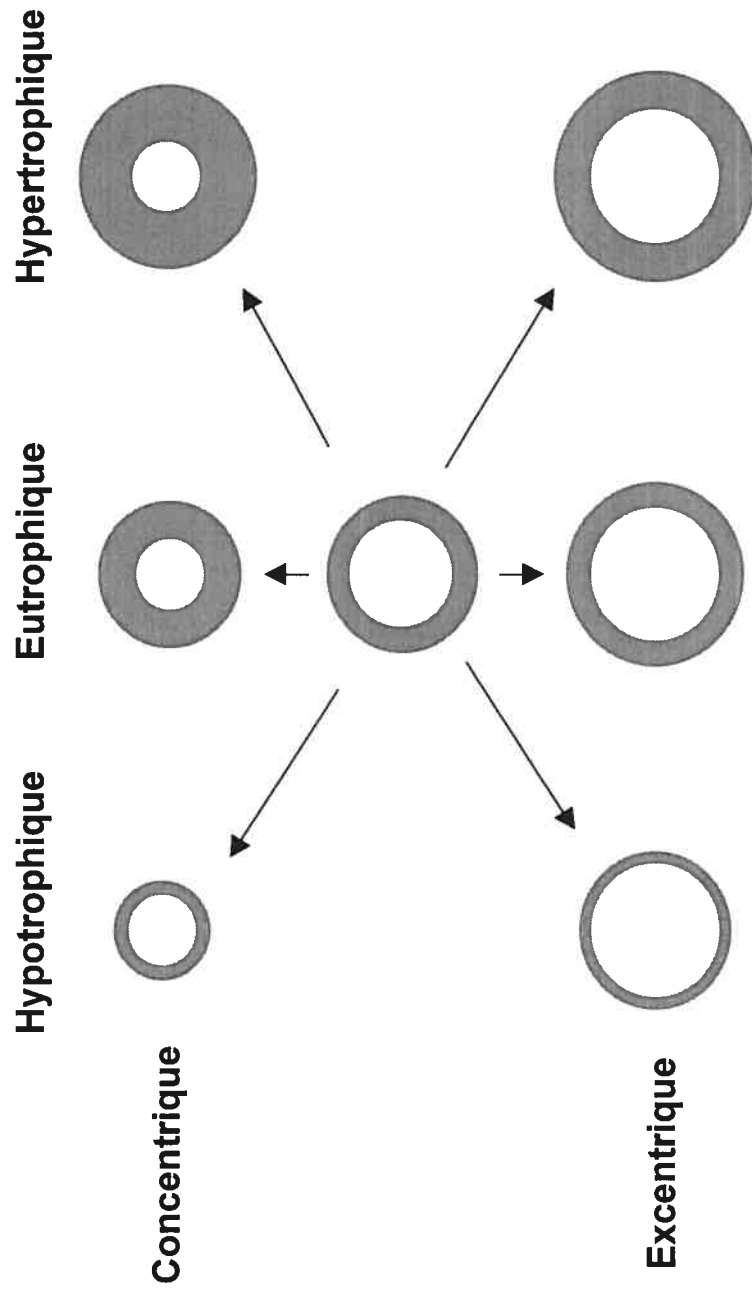
### 3.2.1.1 Définitions du remodelage vasculaire

Au fil des années, il y a eu une évolution dans la terminologie des différents types de remodelage vasculaire associés à l'hypertension. L'augmentation du rapport M/L peut être conséquent d'un épaississement de la paroi par un processus



hypertrophique ou hyperplasique, une réduction de la lumière interne de l'artère ou une combinaison des deux<sup>45</sup>. Vers la fin des années 80, Baumbach et Heistad<sup>58,59</sup> ont caractérisé le changement de structure observé dans des artérioles cérébrales soumises à une augmentation de pression chronique, en utilisant la terminologie de « remodelage vasculaire ». Tout comme les observations établies par Short, les équipes de Baumbach et Heistad ont observé une augmentation du rapport M/L des artères de résistance caractérisé par une diminution de la lumière de l'artère, un épaissement de la paroi vasculaire sans changement de la CSA. Ainsi, ils ont suggéré que les artères de résistance changent leur structure par un réarrangement des éléments tissulaires de la paroi vasculaire préexistants, autour d'une lumière réduite. Suivant ces observations, ils ont été les premiers à introduire le terme « indice de remodelage » qui est défini par le pourcentage de réduction de la lumière interne du vaisseau. Étant donné que les termes hypertrophie et remodelage présentaient certaines limites pour définir correctement le changement de structure vasculaire associé à une élévation du rapport M/L<sup>45,60</sup>, une meilleure terminologie a été proposée par différents chercheurs, dont Mulvany, Baumbach, Aalkjaer et Heagerty<sup>61</sup>. Selon ces derniers, le terme « remodelage » doit être confiné aux situations où il y a une réduction de la lumière interne de l'artère dans des conditions de relaxation complète. Aussi, la structure des artères de résistance doit être mesurée dans des conditions de pression intravasculaire standardisée. De plus, les caractéristiques de l'artère (rigidité de la paroi) ne doivent pas contribuer à la diminution de la lumière<sup>61</sup>. Par conséquent, une distinction entre les différents types de remodelage vasculaire observé dans l'hypertension a été élaborée en donnant une terminologie spécifique pour chacun

d'eux. Par exemple, un changement de structure impliquant une augmentation ou une diminution du matériel tissulaire (volume) de la paroi vasculaire, a été défini par de l'hypertrophie ou de l'hypotrophie vasculaire, respectivement. Si aucun changement de volume tissulaire n'est détecté, il s'agit alors de changement de structure eutrophique. Si le changement de structure résulte d'une diminution de la lumière du vaisseau, on dit que le remodelage est « entrant ou concentrique », par contraste au remodelage « sortant ou excentrique», qui désigne tout surcroît du diamètre de l'artère<sup>61</sup>. (Une schématisation des différents types de remodelage vasculaire est illustrée à la figure 3.1).



**Figure 3.1.** Schématisation des différents types de remodelage vasculaire. Un remodelage associé à une diminution du diamètre interne de l'artériel est dit concentrique. Un remodelage caractérisé par un surcroît du diamètre de l'artère vers l'extérieur est dit excentrique. Une réduction du volume tissulaire de la paroi implique une hypotrophie. Un remodelage sans changement du volume tissulaire de la paroi est dit eutrophique. Une augmentation du volume tissulaire de la paroi implique une hypertrophie. *Adaptée de Mulvany et al., Hypertension 1996; 28:505*

Dans un de ses manuscrits, Folkow<sup>62</sup> a caractérisé le remodelage eutrophique entrant par une augmentation du rapport M/L de 20%, d'une réduction du rayon de la lumière de l'artère de 7-8%, et d'une aire de section inchangée. Dans cette thèse, la terminologie des différents types de remodelage vasculaire émise par Mulvany et al<sup>61</sup>. sera employée.

Dans l'hypertension essentielle le type de remodelage vasculaire observé dans les artères de résistance est principalement un remodelage eutrophique entrant, illustré par la lettre b) de la figure 3.1<sup>45</sup>. Il serait surtout caractérisé par un réarrangement des éléments tissulaires de la paroi autour d'une lumière réduite, sans augmentation de la CSA.

### **3.2.1.2 Déterminants du remodelage eutrophique des artères de résistance**

Les premiers travaux de Folkow<sup>53</sup> ont initialement proposé qu'une faible augmentation de pression artérielle engendrait un changement de structure des artères de résistance. Ce changement de structure élèverait davantage la résistance périphérique et augmenterait, par le fait même, la pression artérielle, la maintenant à la hausse (phénomène d'amplification dépendante de la structure). Ces résultats ont suscité de nombreux débats à savoir s'il y avait une relation de cause à effet entre le changement de la structure des artères de résistance et l'augmentation de la pression artérielle. Certaines études<sup>46,63</sup>, ont démontré que ces deux paramètres pouvaient être dissociés. En effet, ces travaux ont montré qu'un changement de structure des petites artères pouvait être stimulé par des facteurs indépendants de la pression, notamment

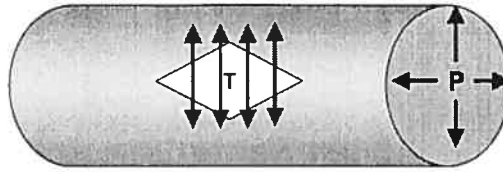
par des facteurs neuro-humoraux<sup>46</sup>, ou génétiques<sup>63</sup>. Certaines études ont montré que le changement de structure des artères de résistance n'influençait pas la pression artérielle après un traitement hypotenseur<sup>2,46</sup>. Il a été suggéré que le remodelage des petites artères seraient plutôt un processus adaptatif à l'augmentation de la pression artérielle. Afin de démontrer ce principe, Bund et al.<sup>64</sup> ont ligaturé unilatéralement l'artère iliaque de rats SHR et normo tendus (WKY) et ont mesuré la structure d'artères fémorales de troisième ordre après 5, 12 et 24 semaines. Leurs résultats ont montré qu'au niveau des artères ligaturées, la pression mesurée chez les SHR était similaire à celle des rats WKY, et que la structure des artères de résistance demeurait inchangée. Du côté de l'artère iliaque non ligaturée, la pression mesurée était à la hausse et la structure des artères de résistance était altérée. Dans une autre étude, Pang et al.<sup>65</sup> ont montré que la transplantation d'artère normo tendue chez des animaux hypertendus, menait à un changement de structure artérielle.

L'ensemble des études mentionnées ci haut, est en accord avec le principe que, bien que le changement de la structure des artères de résistance ne contribue pas précocement à l'augmentation de la pression<sup>53</sup>, il représente toutefois un processus adaptatif qui participe au maintien d'une pression élevée. Cette adaptation diminue la réserve vasculaire, qui est propice aux événements cardiovasculaires<sup>47</sup>. Les traitements antihypertenseurs qui diminuent la pression artérielle sans corriger le changement de structure des artères de résistance, comme avec les  $\beta$ -bloqueurs, n'améliorent pas non plus la réserve vasculaire qui est encore réduite. Pour l'instant, les traitements antihypertenseurs qui améliorent la fonction endothéliale sont les plus efficaces pour corriger le remodelage des artères de résistance. Parmi ces traitements,

les inhibiteurs de l'enzyme de conversion à l'ANG II et les bloqueurs des canaux calciques en sont les principaux<sup>66</sup>. Or, la correction du changement de structure des artères de résistance prend du temps, (elle survient souvent après un an de traitement) tandis que l'effet hypotenseur est observé tôt après le traitement. Nous ignorons l'impact d'une diminution de la pression artérielle précoce sans amélioration immédiate de la réserve vasculaire, sur la fréquence des événements cardiovasculaires.

### **A. Loi de Laplace**

La compréhension des facteurs qui stimulent le développement du remodelage eutrophique des artères de résistance dans l'hypertension essentielle, provient des observations rapportant un lien entre la géométrie vasculaire et la tension pariétale<sup>67</sup>. Tout d'abord, spécifions que la tension pariétale (TP) est la force exercée par unité de longueur tangentielle, par la paroi vasculaire, qui oppose la force de distension (souvent augmentée par une élévation de la pression), qui elle tente d'étirer la paroi vers l'extérieur. Ceci est illustré dans le schéma suivant.



**Figure 3.2.** Illustration du principe de Laplace appliqué à une artère<sup>6</sup>.

Ainsi, lorsque la pression augmente, les artères tentent de normaliser la TP, en répondant au principe de Laplace :

$$T = P \times r$$

où T= la tension pariétale, P= la pression trans-murale r= le rayon du vaisseau.

La pression trans-murale (pression intraluminale - pression extravasculaire) est égale à la pression intraluminale puisque la pression extravasculaire est négligeable. L'équation de la loi de Laplace peut s'appliquer à des vaisseaux de l'ordre des capillaires jusqu'aux vaisseaux de conductance, toutefois, l'équation doit prendre en considération l'épaisseur de la paroi. La formule devient donc  $T = P \times r / \text{l'épaisseur de la paroi}$ . Ainsi, lors d'une augmentation de pression, le vaisseau tentera de normaliser la TP en diminuant le rayon du vaisseau (contraction) et/ou en épaississant sa paroi vasculaire. L'épaississement de la paroi peut être produite par la contraction vasculaire temporaire ou peut résulter d'une prolifération des cellules musculaires lisses vasculaires ou une augmentation de la matrice extracellulaire. La prolifération cellulaire est un processus qui se développe à plus long terme.

Le remodelage vasculaire des grosses artères dans l'hypertension essentielle diffère de celui des artères de résistance, puisqu'elles n'ont pas les atouts fonctionnels

nécessaires pour réduire leur diamètre interne afin de normaliser la TP. En effet, dans l'hypertension essentielle les artères de gros calibres changent de structure en développant un remodelage hypertrophique<sup>68,69</sup>. Leur rôle étant de fournir le sang vers la périphérie et d'amortir le volume d'éjection ventriculaire pour permettre le sang de circuler dans un flux continu, elles « subissent » passivement l'augmentation de la tension pariétale de façon chronique. Ainsi, elles doivent stimuler une hypertrophie cellulaire pour normaliser cette TP. Toutefois, leur changement de structure contribue peu à l'augmentation de la résistance périphérique associée à l'hypertension essentielle. La mesure de leur structure reste tout de même intéressante pour la comparer à celle des artères de résistance.

Cependant, un changement des propriétés élastiques des grosses artères, caractérisées par une augmentation des fibres de collagène par rapport aux fibres élastiques de leur paroi, augmente leur rigidité et contribue de façon importante au développement d'une forme d'hypertension particulière, i.e. l'hypertension systolique isolée et aux risques d'événements cardiaques. Cette forme d'hypertension est surtout associée au vieillissement et est caractérisée par une élévation de la pression pulsée (pression systolique – pression diastolique). L'augmentation de la rigidité aortique mènera à une accélération de l'onde de pouls. L'onde de pouls consiste à l'onde engendrée par le cœur additionnée des réflexions d'ondes provenant de la périphérie. L'accélération de l'onde de pouls est expliquée par un retour de l'onde provenant de la périphérie plus rapidement que la normale, qui arrive au niveau de l'aorte en même temps que le volume d'éjection systolique. Par conséquent, la pression diastolique est plus basse et contribue à une diminution de la perfusion coronarienne. Chez des



individus sains qui ont une aorte aux propriétés élastiques normales, le retour de l'onde de réflexion se fait au même moment du volume d'éjection diastolique. Ceci permet alors de maintenir une pression diastolique suffisamment élevée pour perfuser adéquatement les ventricules.

L'augmentation de la pression systolique et la diminution de la pression diastolique augmentera la pression pulsée. L'augmentation de la pression systolique poussera le cœur à l'hypertrophier, menant ainsi à la dysfonction cardiaque et alors aux événements cardiaques.

Par opposition aux artères de conductance, les artères de résistance ont une plus grande capacité à se contracter, puisqu'elles ont la fonction de réguler l'apport de sang aux organes qu'elles irriguent. Ainsi, selon le principe de Laplace, lors d'une augmentation de pression, elles se contractent, réduisant leur diamètre interne et normalisant du même coup la tension pariétale. L'hypothèse qu'une vasoconstriction chronique stimulerait la réduction structurelle du diamètre des artères de résistance sans augmentation de leur CSA, a émergé de certaines études<sup>70,71</sup>. L'augmentation du tonus myogénique lors d'une élévation de pression a été proposée comme un facteur pouvant d'une part, normaliser la tension pariétale, et d'autre part, stimuler le changement de structure eutrophique des artères de résistance (sans hypertrophie tissulaire). En effet, il a été démontré dans des artères mésentériques isolées pressurisées<sup>72,73</sup>, qu'une augmentation du tonus myogénique engendrant une contraction, normalisait la TP. Ceci inhibait l'expression de gènes impliqués dans la croissance tissulaire, comme le facteur de transcription c-myc<sup>72</sup>. Cette même équipe

de chercheurs ont montré qu'une augmentation de pression sans engendrer de contraction (sans tonus myogénique), induisait une élévation de la TP. Ceci stimulait l'expression des gènes c-fos et c-myc, qui mènent à la croissance tissulaire<sup>73</sup>. De plus, dans les formes d'hypertension secondaires à une dysfonction rénale, les artères de résistance changent de structure en s'hypertrophiant. Dans ces cas, l'hypertrophie résulte surtout d'une stimulation neuro-humorale, par rapport à une stimulation due à la pression. Toutefois, il a été suggéré que dans ces types d'hypertension, l'augmentation de la pression se fait tellement abruptement, qu'elle excède la capacité myogénique des artères de résistance à normaliser la TP, d'où le développement du remodelage hypertrophique dans ces artères. L'augmentation de la réponse myogénique des artères de résistances contribuant au développement d'un remodelage eutrophique (sans hypertrophie), a été vérifiée chez des patients atteints d'hypertension secondaire au diabète de type 2. Dans cette étude<sup>74</sup>, les artères de résistance provenant des patients hypertendus et diabétiques, avaient une dysfonction myogénique et développaient un remodelage hypertrophique. De leur côté, les artères de résistance de patients hypertendus non diabétiques, montraient une capacité myogénique non altérée (elles se contractaient en réponse à une augmentation de pression) et ont développé un remodelage eutrophique. Un des facteurs qui peut accentuer la réponse myogénique dans l'hypertension, est l'altération de la fonction endothéliale des artères de résistance<sup>75</sup>.

## B. Altération de la fonction endothéliale

Une dysfonction endothéliale est observée dans la plupart des études faites chez des patients atteints d'hypertension essentielle<sup>76-79</sup>. Cette dysfonction endothéliale se traduit principalement par une diminution basale de la production de NO et une diminution de sa libération lors d'une stimulation<sup>76,77,80,81</sup>. En effet, l'infusion de L-NMMA (réflétant l'effet basal du NO) diminue le flux sanguin des artères de l'avant-bras chez des patients hypertendus<sup>77</sup>. De plus, le taux de NO plasmatique est réduit chez ces patients<sup>80</sup>. La plupart des études ont démontré une diminution de la vasodilatation des artères de résistance de l'avant-bras de patients hypertendus suivant une stimulation à l'ACh (réflétant la libération du NO par une activation). Seuls les travaux de Crockcroft<sup>82</sup> n'ont pas obtenu les mêmes conclusions. Toutefois, il a été suggéré que cette différence de résultats pouvait être attribuée au faible dosage de l'agent stimulant la libération de NO, i.e. l'ACh<sup>83</sup>.

Ainsi l'atténuation de la vasodilatation stimulée par l'ACh implique une majeure contribution des agents vasoconstricteurs, notamment les facteurs prostanoides (TXA<sub>2</sub> et PGH<sub>2</sub>), les ions superoxydes (O<sub>2</sub><sup>-</sup>) et l'ET-1. Chez des patients hypertendus, Taddei et al.<sup>79</sup> ont démontré une amélioration de la vasodilatation stimulée par l'ACh en présence d'indométhacine, un inhibiteur de la cyclooxygénase. Ainsi, ces résultats suggéraient une contribution des agents vasoconstricteurs prostanoides (TXA<sub>2</sub> et PGH<sub>2</sub>) à la dysfonction endothéliale. Plus tard, cette même équipe de chercheurs ont attribué un rôle prédominant aux anions superoxydes à

l'altération de l'endothélium associée à l'hypertension essentielle<sup>84</sup>. En effet, l'administration de vitamine C, qui est un agent antioxydant, améliore la fonction endothéliale chez les patients hypertendus.

L'ET-1 représente un autre agent participant à l'augmentation du tonus vasculaire lorsque la libération du NO ou son action est déficiente. En effet, en situation normale, le NO inhibe l'effet vasoconstricteur de l'ET-1.<sup>85</sup> De plus, une stimulation du récepteur à l'ET-1 de type B endothélial par l'ET-1 cause une vasodilatation par la libération du NO. Ainsi, lors d'une dysfonction endothéliale, l'effet de l'ET-1 est principalement généré par son récepteur de type A localisé sur les CMLs, qui mène à une vasoconstriction. Ainsi, une altération de la fonction endothéliale au niveau de la microcirculation est associée à une réduction du diamètre interne des artères de résistance et artérioles, contribuant à une augmentation de la résistance périphérique et, par conséquent, à l'augmentation de pression artérielle. Toutefois, mentionnons qu'une dysfonction endothéliale peut être aussi observée dans d'autres situations cliniques pathologiques et physiologiques, comme dans le diabète, l'athérosclérose et le vieillissement<sup>86</sup>.

L'origine de la dysfonction endothéliale dans l'hypertension a soulevé deux hypothèses principales. La première étant que l'augmentation de pression cause une dysfonction endothéliale en exerçant une pression constante sur l'endothélium, celui-ci vieillissant plus rapidement. La deuxième, et la plus controversée des deux, stipule que la dysfonction endothéliale initie l'hypertension. Indépendamment de la cause de l'altération de l'endothélium, elle mène à l'augmentation du tonus vasculaire

périphérique, qui maintient la pression artérielle élevée<sup>87</sup>. Il a été proposé qu'une altération chronique de l'endothélium serait un processus précoce au changement de structure des artères de résistance (remodelage eutrophique). Cette dysfonction endothéliale participerait à l'augmentation du tonus vasculaire myogénique, augmentant la résistance périphérique mais normalisant du même coup la tension pariétale. Les artères de résistance changeraient de structure en s'adaptant à cette vasoconstriction soutenue par un réarrangement dynamique des éléments tissulaires autour d'une lumière réduite.

### 3.2.2 Raréfaction

L'augmentation de la résistance peut être consécutive d'une diminution de la densité des artérioles et des capillaires, processus connu sous le terme de raréfaction. De nombreuses hypothèses ont été proposées pour expliquer la raréfaction de la microcirculation : un trouble dans la programmation génétique, une altération des capacités angiogéniques durant le développement embryonnaire, une activité du système rénine-angiotensine inadéquate ou une altération des mécanismes d'autorégulation de débit sanguin<sup>88</sup>. Dans le développement précoce de l'hypertension essentielle, une raréfaction de la microcirculation est observée. Il a été suggéré que l'hypertension essentielle se caractériserait par une anomalie du développement de la microcirculation, puisqu'une raréfaction des artérioles et des capillaires a été observée chez des rats SHR avant que l'hypertension soit instaurée. De plus, les évidences ont démontré une altération du pouvoir angiogénique chez les SHR<sup>9</sup>. La raréfaction de la microcirculation tend à réduire la surface

d'approvisionnement d'oxygène tissulaire et à augmenter la distance de diffusion entre les capillaires et les tissus qu'ils perfusent. L'ischémie résultante peut être responsable des dommages aux organes cibles associés à l'hypertension artérielle. La raréfaction est un processus se produisant souvent avant la réduction du diamètre des artères de résistance et des artérioles.

Une autre hypothèse a été lancée par le groupe de Prewitt<sup>88</sup> et concerne la raréfaction fonctionnelle précédant la raréfaction anatomique. La raréfaction dite fonctionnelle serait la résultante d'une réduction du diamètre des artérioles, définie par une augmentation de la sensibilité aux agents vasoconstricteurs ou par une diminution de la disponibilité du NO. Ainsi, la dysfonction endothéliale chronique résulterait en une réduction du diamètre de l'artère limitant la perfusion des organes en aval. Étant non fonctionnelles, les artérioles disparaîtraient physiologiquement, diminuant la densité vasculaire (raréfaction anatomique)<sup>88</sup>.

### **3.3 Modèles expérimentaux d'hypertension essentielle**

L'étiologie de l'hypertension essentielle étant hétérogène, différents modèles expérimentaux ont été élaborés pour couvrir les multiples facettes de cette maladie cardiovasculaire. Ainsi, des modèles de rats génétiquement modifiés ont été développés, dont les plus connus sont les rats SHR et les rats Dahl sensibles au sel<sup>89</sup>. Les modèles d'hypertension secondaire à une dysfonction rénale sont les modèles où une sténose de l'artère rénale se fait en présence de deux reins ou d'un seul rein (néphrectomie unilatérale) Ces modèles portent le nom de leur créateur, Goldblatt, les ayant conçus en 1934<sup>90</sup>. D'autres modèles expérimentaux d'hypertension résultent de

l'administration d'hormones (ANG II, minéralocorticoïde (DOCA), aldostérone), en concomitance ou non avec une diète en sel (DOCA-sel)<sup>91</sup>. D'autres modèles causent l'hypertension secondaire à l'administration d'agents vasoconstricteurs, comme c'est le cas avec la NA ou avec les inhibiteurs de la synthèse du NO<sup>91</sup>.

Les modèles expérimentaux qui simulent le plus fidèlement l'hypertension essentielle, sont les modèles de rats génétiquement modifiés Dahl sensibles au sel et les rats SHR ou les rats hypertendus au L-NAME. Les objectifs des travaux de cette thèse reposent sur la compréhension des mécanismes impliqués dans le remodelage eutrophique des artères de résistance et du cœur induit par une augmentation de pression. Par conséquent, parmi les modèles expérimentaux d'hypertension, les rats SHR, les rats 2 reins – 1 pince et les rats hypertendus au L-NAME sont ceux qui développent ce type de remodelage au niveau des artères de résistance. Les rats 2 reins – 1 pince mimant surtout une hypertension rénovasculaire, une description des modèles simulant différents aspects de l'hypertension essentielle est plus appropriée.

### **3.3.1 Modèles de rats génétiquement modifiés : SHR et Dahl sensibles au sel**

#### **3.3.1.1 Rats Dahl sensibles au sel et résistants au sel**

Les rats Dahl sensibles au sel ont été développés en 1961 à partir de rats Sprague-Dawley normotendus<sup>89</sup>. Ce modèle d'hypertension dépend de la diète en sel pour induire l'hypertension artérielle. Par exemple, une diète de NaCl à une concentration de 0.4 % n'induit pas d'hypertension ni chez les rats Dahl sensibles au

sel, ni chez les rats Dahl résistants au sel. Par contre, une diète de NaCl de 8 % augmentera significativement la pression artérielle seulement des rats Dahl sensibles au sel. Ce modèle d'hypertension expérimentale mime une hypertension essentielle sévère<sup>92</sup> et mène au développement du remodelage hypertrophique des artères de résistance<sup>93</sup>. L'ET-1 semble principalement impliquée dans ce processus<sup>94</sup>. De plus, ces rats développent une hypertrophie cardiaque. Le seul aspect pathologique similaire à celui qui est observé dans l'hypertension essentielle, est que ce modèle développe une dysfonction endothéliale. Celle-ci résulte principalement d'une diminution de la production du NO<sup>95</sup>.

### 3.3.1.2 Rats SHR

Ce modèle d'hypertension a été développé en 1959 à l'université de Kyoto par deux chercheurs japonais, Okamoto et Aoki<sup>89</sup>, à partir de la souche de rats Wistar-Kyoto normotendus. En 1970, ils ont conçu les rats SHR-stroke prone (SHR-SP) à partir des SHR. Ces deux modèles ont été utilisés pour observer le dommage des organes cibles, notamment le cerveau (surtout les stroke-prone), les reins et le cœur. Les rats SHR ont un taux de rénine circulante normal et développent une hypertension indépendante de la prise de sel<sup>89</sup>. Une des limitations d'utilisation de ce modèle est liée par le manque d'un groupe témoin adéquat. En effet, les rats Wistar-Kyoto normotendus peuvent varier génétiquement d'une souche à l'autre à travers les colonies et les distributeurs<sup>89</sup>. Ceci peut causer des problèmes d'interprétation des différences hémodynamiques, pharmacologiques ou cellulaires entre les SHR et le



WKY, qui peuvent être indépendantes de l'hypertension<sup>96</sup>. L'utilisation alternative de rats Wistar normotendus a été suggérée comme mesure témoin plus appropriée<sup>96</sup>.

Les études de structure vasculaire de rats SHR ont observé dans certains type d'artères de résistance ou en fonction du temps d'observation, un mélange de remodelages eutrophique et hyperplasique dans les artères mésentériques<sup>45</sup>. Dans ces cas, il a été rapporté que l'hyperplasie est une conséquence génétique indépendante de l'augmentation de la pression artérielle<sup>97,98</sup>.

Dans l'hypertension essentielle humaine, le remodelage des artères de résistance semble être principalement de type eutrophique<sup>99</sup>, i.e. sans hyperplasie. Les rats SHR développent aussi une hypertrophie cardiaque<sup>96,100</sup>, qui ne se déroule pas nécessairement dans l'hypertension essentielle<sup>101</sup>. Toutefois, ces rats présentent une dysfonction endothéliale qui reflète le plus fidèlement celle qui est observée dans l'hypertension humaine<sup>102</sup>, c'est-à-dire où il y a une augmentation du stress oxydatif. Chez les rats SHR, il y a une augmentation de la production des anions superoxydes, entre autres, par une activité accrue de l'enzyme cyclooxygénase<sup>95</sup>. Les radicaux libres ainsi formés, dégradent le NO, diminuant sa disponibilité. La production de NO est augmentée chez les rats SHR et est stimulée en fonction de l'augmentation de la pression artérielle. En effet, l'expression de la NOS endothéliale est plus élevée dans les artères mésentériques de rats SHR<sup>103</sup> et la production des produits de dégradation du NO (nitrates) est accrue, comparativement aux jeunes rats SHR pré-hypertendus, où le taux de nitrates est similaire à celui mesuré chez les rats témoins<sup>103</sup>.

Le modèle SHR est pertinent pour l'étude du dommage des organes cibles ou pour le ciblage d'agents pharmacologiques potentiels pour traiter l'hypertension artérielle.

### 3.3.1.3 Administration des analogues de la L-arginine

Après l'identification du NO comme agent responsable de la vasodilatation dépendante de l'endothélium<sup>22</sup> vers la fin des années 80<sup>104,105</sup>, l'inhibition de sa synthèse est devenue un processus intéressant pour induire une augmentation de la pression artérielle. En effet, l'administration chronique d'analogues de la L-arginine (comme avec le L-NAME) mène à une augmentation de la résistance périphérique<sup>106,107</sup> et, par conséquent, à une augmentation soutenue de la pression artérielle<sup>108,109</sup>. Celle-ci augmente en fonction de la dose et du temps d'administration du L-NAME et est dépendante d'une diminution de l'activité enzymatique de la GC soluble<sup>110</sup>. Tout comme dans l'hypertension essentielle humaine, l'inhibition chronique de la synthèse du NO mène dans la plupart des cas au développement du remodelage eutrophique des artères de résistance<sup>111-115</sup>. Ainsi, dans ce modèle d'hypertension, il y a réarrangement des éléments tissulaires de la paroi autour d'une lumière réduite, sans augmentation de la CSA au niveau des artères de résistance. L'absence d'hypertrophie suivant l'inhibition de la synthèse du NO allait à l'encontre des résultats établis des études *in vitro* précédentes<sup>116,117</sup>, qui attribuaient un rôle anti proliférateur au NO. Dans une étude *in vivo*<sup>118</sup>, l'administration chronique de L-NAME induisant une augmentation de pression et au développement d'un remodelage cardiaque sans hypertrophie, du moins lorsque l'activité du système rénine-angiotensine n'était pas augmentée. D'autres études *in vivo*<sup>119,120</sup> ont même

démontré que le NO semble nécessaire au développement du remodelage hypertrophique dans les artères de résistance. Le remodelage eutrophique développé suivant l'administration chronique au L-NAME semble dépendre de la pression, puisque le traitement avec des agents antihypertenseurs simultanément au L-NAME (inhibiteur de l'ECA et un bloqueur des canaux calciques voltage-dépendant) diminue la pression artérielle et prévient le développement du remodelage eutrophique des artères de résistance<sup>114</sup>.

L'ANG II<sup>121</sup>, le système nerveux sympathique<sup>122</sup> et l'effet vasoconstricteur aigu de l'ET-1<sup>85,123,124</sup> semblent participer à l'augmentation de la pression artérielle dans ce modèle. Le taux de rénine plasmatique varie selon les études<sup>125</sup>, mais il ne semble qu'augmenter lorsque la fonction rénale est atteinte<sup>109</sup>. L'augmentation du tonus vasculaire résulterait de la diminution de l'apport vasodilatateur (diminution de NO) par rapport à l'apport vasoconstricteur (ANG II, NA, ou ET-1). Une diminution de la production du NO mime ainsi une dysfonction endothéliale, qui est aussi observée dans l'hypertension essentielle. Cette dysfonction endothéliale se produit si la dose administrée de L-NAME est suffisamment élevée<sup>126</sup>. Une dose relativement faible de L-NAME induira préférentiellement une augmentation de pression secondaire à une rétention de sel et d'eau plus importantes au niveau des reins<sup>127,128</sup>.

De plus, tout comme dans l'hypertension essentielle, le modèle L-NAME mène au dommage des organes cibles. En effet, une administration de L-NAME durant 8 semaines mène au dommage des reins et augmente le taux de rénine plasmatique<sup>126</sup>. Une administration entre 7 et 11 semaines peut mener à des ischémies cérébrale et de la moëlle épinière<sup>122</sup>. Un traitement de 16 semaines au L-NAME cause 100% de

mortalité chez les rats<sup>32</sup>. Ainsi, le modèle L-NAME n'est pas un modèle qui développe une hypertension chronique progressive, comme celle qui est observée chez les rats SHR (qui peut durer jusqu'à deux ans)<sup>91</sup>.

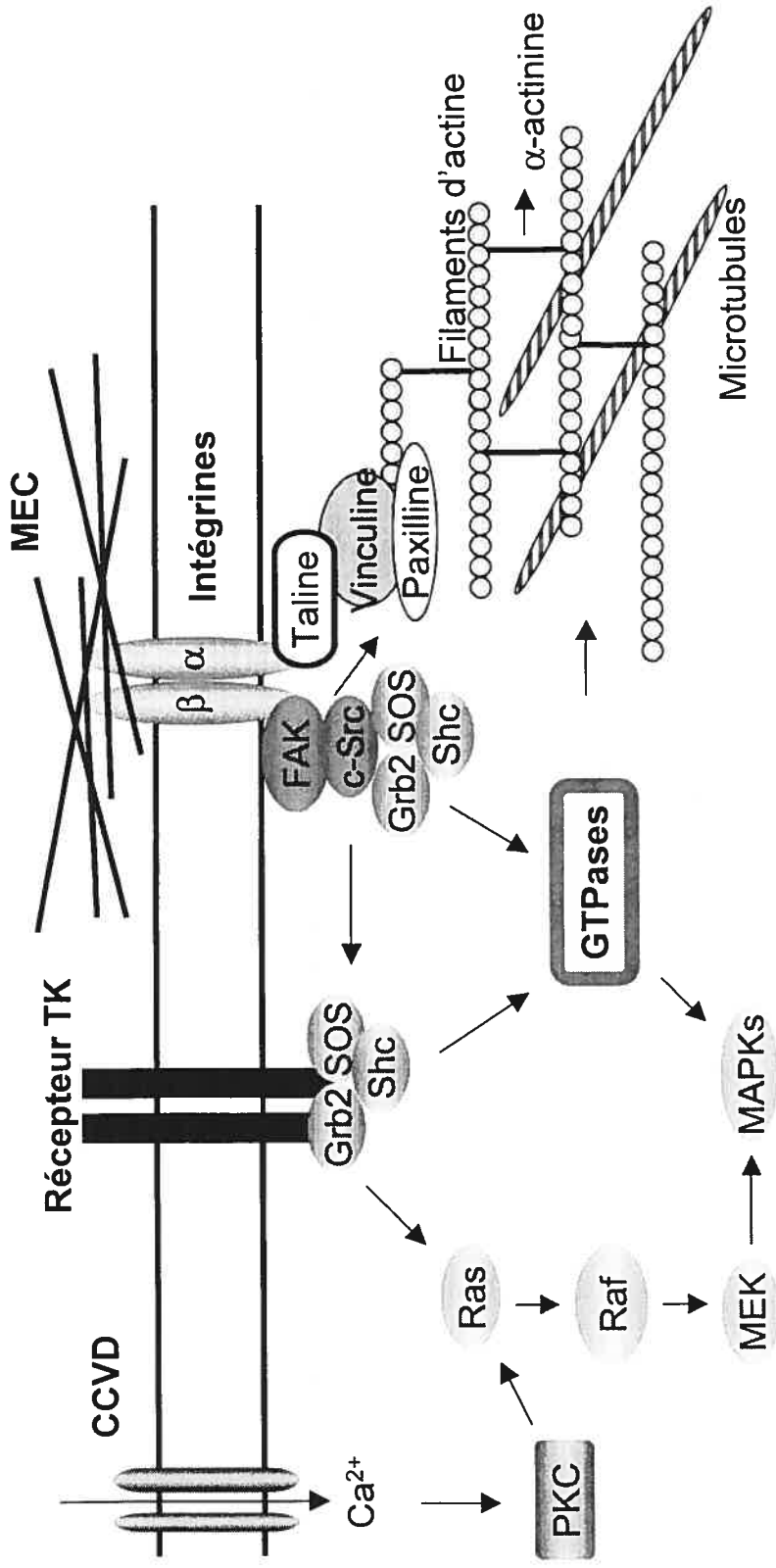
Un autre volet de mes travaux avait pour but d'étudier les mécanismes impliqués dans le remodelage eutrophique cardiaque, i.e. en absence d'hypertrophie ventriculaire. Parmi les modèles expérimentaux d'hypertension décrits ci haut, seul le modèle induit par une inhibition chronique de la synthèse du NO développe ce type de remodelage, du moins, lorsque le système rénine-angiotensine n'est pas activé<sup>118</sup>.

## CHAPITRE 4. MÉCANISMES IMPLIQUÉS DANS LE REMODELAGE VASCULAIRE

L'augmentation de la pression artérielle semble un stimulus important pour générer un changement de structure des artères. En effet, plusieurs études ont démontré que la protection de différents segments vasculaires contre une augmentation de pression, prévenait le changement de structure des artères<sup>64,126,127</sup>. Aussi, dans un modèle d'hypertension induite par une coarctation aortique, l'hypertrophie vasculaire des artères de gros calibre était observée seulement dans la partie hypertendue. De leur côté, les artères de résistance des muscles crémastres n'ont pas développé de remodelage eutrophique dans la section normotendue<sup>128</sup>. Dans l'hypertension essentielle, les artères développent un remodelage vasculaire hétérogène selon le type d'artère : les artères de gros calibre développent un remodelage hypertrophique tandis que les artères de résistance changent de structure par un réarrangement des cellules de leur paroi autour d'un diamètre artériel réduit, sans hypertrophie (remodelage eutrophique). Il a été proposé par Prewitt<sup>129</sup> que l'hypertension artérielle induit un remodelage hypertrophique des grosses artères par un mécanisme qui dépend de l'augmentation de la tension pariétale circonférentielle. Au niveau des artères de résistance, l'hypertension artérielle mènerait au développement d'un remodelage eutrophique par un mécanisme dépendant d'une augmentation du tonus vasculaire. Toutefois, les mécanismes impliqués dans le

développement de ces deux types de remodelages vasculaires, secondaire à une augmentation de pression artérielle, restent encore à définir.

De plus en plus d'études démontrent que, au même titre que les fibroblastes, les cellules musculaires lisses captent les changements hémodynamiques extérieurs et les transmettent à la cellule par une cascade d'activation de facteurs intracellulaires. Ce phénomène réfère au concept de la mécano-transduction cellulaire, terme étant devenu de plus en plus populaire au cours des 10 dernières années. Il a été ainsi proposé que les cellules musculaires lisses soumises à une augmentation de pression génèrent trois réponses cellulaires principales: la première consiste à produire une force résultant d'une contraction soutenue (augmentation du tonus myogénique), la seconde étant la sécrétion de facteurs de croissance ou d'éléments de la matrice extracellulaire (changement du phénotype cellulaire) et la troisième étant la stimulation de l'hypertrophie/hyperplasie cellulaire<sup>19</sup>. Ces différentes réponses impliquent la contribution de nombreux facteurs (éléments de la matrice extracellulaire, intégrines, canaux ioniques, enzymes) qui ont été identifiés dans les voies de signalisation de la mécano-transduction. Ces facteurs sont illustrés sommairement à la figure 4.1. Une brève description de chacun est présentée dans la section suivante et elle ciblera surtout leur implication dans les réponses cellulaires menant à une augmentation du tonus myogénique ou à une stimulation de la prolifération cellulaire.



**Cytosquelette**

**Figure 4.1.** Principaux facteurs impliqués dans la mécano-transduction. Matrice extracellulaire (MEC), intégrines, cytosquelette (filaments d'actine et microtubules), canaux calciques voltage-dépendant (CCVD,) petites protéines G solubles à activité GTPasique (GTPase), protéines à activité tyrosine kinase (TK) (*focal adhesion kinase* (FAK) et la kinase pp60c-src ( c-src)), protéines à activité sérine / thréonine kinase, (protéine kinase C (PKC) et les *mitogen-activated protein kinases* (MAPKs)). Ca<sup>2+</sup>, calcium; La taline, la vinculine et la paxilline sont des protéines adaptatrices. Adaptée de *Intengan et al. Hypertension* 2000; 36: 313

## **4.1 Éléments vasculaires impliqués dans la mécanotransduction**

### **4.1.1 La matrice extracellulaire**

La matrice extracellulaire (MEC) assure l'intégrité du tissu musculaire qu'elle entoure. Elle est formée de la substance fondamentale et de fibres (notamment de fibres de collagène et de fibres élastiques)<sup>130</sup>. La substance fondamentale est constituée de liquide interstitiel, de protéines d'adhérence et de protéoglycanes. Les protéines d'adhérence servent de colle qui permet aux cellules environnantes de se fixer aux éléments de la MEC<sup>130</sup>. Parmi celles-ci, la fibronectine, la laminine et la vitronectine en sont des exemples. Les fibres, elles, servent principalement de soutien. Les artères de conductance ont une MEC riche en fibres élastiques, contrairement aux artères de plus petit calibre, qui est plus riche en fibres de collagène. Lorsque la pression artérielle augmente, les fibres de la MEC résistent à cette force qui est exercée sur elles.

### **4.1.2 Les intégrines**

Elles représentent des glycoprotéines transmembranaires, faisant le pont entre la matrice extracellulaire et le CSK des cellules musculaires lisses ou endothéliales. Elles sont formées d'hétérodimères  $\alpha$  et  $\beta$  dont chacune comprend plusieurs



isoformes. De plus, chacune des isoformes des hétérodimères  $\alpha$  et  $\beta$  peut lier différents constituants de la matrice extracellulaire. La réponse cellulaire dépend de la spécificité de la liaison des intégrines avec les éléments de la matrice extracellulaire. La partie extracellulaire se fixe aux constituants de la matrice extracellulaire incluant la vitronectine (ligand pour l'intégrine  $\alpha v\beta 3$ ), la laminine (ligand pour l'intégrine  $\alpha 6\beta 1$ ), la fibronectine (ligand pour les intégrines  $\alpha 5\beta 1$  et  $\alpha v\beta 3$ ) et les fibres de collène. La partie intracellulaire  $\beta$  de l'intégrine assure la jonction des éléments du cytosquelette comme la taline, la paxilline ou les filaments d'actine, via un site de liaison tri-peptidique renfermant les acides aminés RGD (Arginine-Glycine-Asparagine). Elle lie aussi certaines enzymes à activité TK, tel que la kinase d'adhésion focale (FAK). Cette conformation spatiale permet ainsi aux intégrines de transmettre le message mécanique de façon bidirectionnelle, soit de l'extérieur (MEC) de la cellule vers l'intérieur (CSK) ou soit l'inverse.

Une stimulation mécanique les active et, par conséquent, elles induisent la production de seconds messagers, amplifient la rigidité du CSK et stimulent la phosphorylation des résidus tyrosine des protéines ancrées au CSK<sup>131</sup>. Lorsqu'elles sont activées, les intégrines s'agglomèrent en des endroits particuliers nommés « site d'adhésion focale ». Cette terminologie est surtout attribuée pour des cellules en culture. Les structures analogues aux sites d'adhésion focale dans les CMLs *in situ*, sont les corps denses<sup>131</sup>. Ceux-ci servent de points d'attache pour les protéines contractiles à la membrane plasmique. Les corps denses regroupent de nombreuses protéines impliquées dans la mécano-transduction<sup>131</sup>.

### 4.1.3 Le cytosquelette

Le CSK est formé de microtubules, de microfilaments (filaments d'actine) et de filaments intermédiaires. Les deux premiers éléments sont impliqués principalement dans la structure et la mobilité cellulaires. Leur formation est dynamique puisqu'elle nécessite la polymérisation ou la dépolymérisation de leurs composants unitaires (la tubuline pour les microtubules et l'actine pour les microfilaments), ce qui détermine l'architecture et la forme de la cellule<sup>132</sup>.

Les microtubules servent de charpente cellulaire, déterminent la forme générale de la cellule et l'emplacement des éléments de la cellule. Ils sont les éléments du CSK les plus rigides<sup>130</sup>. Les filaments d'actine assurent la mobilité et la forme de la cellule. Ils forment un réseau dense qui est relié à la face interne de la membrane plasmique (les corps denses) et renforcent ainsi la surface de la cellule. De plus, les filaments d'actine interagissent avec la myosine pour développer une force contractile<sup>130</sup>. Les microfilaments offrent aussi des sites de liaison pour d'autres protéines impliquées dans la réorganisation du cytosquelette.

Les filaments intermédiaires sont des fibres protéiques solides qui résistent aux forces d'étirement de la cellule. Elles sont attachées aux jonctions spécialisées de la cellule, les desmosomes<sup>130</sup>. Leur formation n'implique pas de processus dynamique.

La disposition en réseau des éléments du cytosquelette lui permet de supporter des tensions cellulaires importantes. Le CSK fait le pont entre les intégrines, lesquelles sont connectées à la matrice extracellulaire, et le noyau cellulaire. Il

représente le centre de la machinerie contractile et orchestre les réponses cellulaires en fonctions des stimulations mécaniques extérieures<sup>132</sup>.

#### **4.1.4 Les GTPases de la famille Rho**

Les petites protéines à activité GTPasique de la famille Rho comportent notamment les protéines Rho et Rac. Celles-ci sont impliquées dans de multiples réponses cellulaires dont la prolifération, la contraction et la migration cellulaire ainsi que l'expression génique<sup>133,134</sup>. De la même façon que la sous-unité  $\alpha$  d'une protéine G, les protéines de la famille Rho sont actives par leur liaison au GTP, influençant par la suite l'état d'activation d'effecteurs cellulaires spécifiques<sup>18</sup>. En réponse à de nombreux stimuli mécaniques extérieurs ou suivant la liaison d'un agoniste, leur rôle est de générer une modification dans la structure du cytosquelette d'actine ou de moduler la contraction musculaire en amplifiant la sensibilité au calcium des protéines contractiles. Ainsi, elles représentent le centre de convergence de la transmission de signaux provenant de différentes protéines transmembranaires, notamment les récepteurs couplés aux protéines G (comme les récepteurs AT1 de l'ANG II)<sup>36</sup>, les récepteurs des facteurs de croissance à activité TK ou les intégrines. Celles-ci sont capables de détecter les stimulations mécaniques.

#### **4.1.5 Les canaux ioniques**

De nombreuses études ont démontré une implication des canaux ioniques dans la réponse myogénique. Or, lorsque la membrane des cellules musculaires lisses est soumise à une augmentation de la pression, elle se déforme, ce qui mène à

l'activation de canaux ioniques sensibles à l'étirement. (Voir la section 1.2.2. de l'introduction qui traite de la résistance). L'activation de ces canaux mène à une dépolarisation membranaire et cause l'ouverture des CCVD favorisant l'entrée de calcium, et, par conséquent, la contraction musculaire<sup>19</sup>. L'ouverture des canaux potassiques dépendants du calcium et des canaux K<sup>+</sup> voltage-dépendant cause une hyperpolarisation de la cellule et atténue la réponse myogénique<sup>21</sup>. Leur activation permet de réguler la contraction musculaire comme mécanisme de rétroaction négative.

#### **4.1.6 Les enzymes à activité tyrosine kinase (TK)**

Les enzymes à activité TK sont impliquées dans la réponse au stress mécanique des cellules musculaires lisses. Parmi celles-ci, les enzymes FAK et c-src ont été identifiées. Ce sont des enzymes qui favorisent la phosphorylation des résidus tyrosine d'autres protéines, menant à une cascade de phosphorylations subséquentes et à une réponse cellulaire impliquant la prolifération ou la différenciation cellulaire. Suivant une stimulation mécanique, les intégrines regroupées aux sites d'adhésion focale (ou corps denses) recrutent et activent des enzymes cytoplasmiques à activité TK, comme FAK et c-src. Les récepteurs des facteurs de croissances, ayant eux aussi une activité enzymatique TK, peuvent contribuer à la transmission du signal en servant de cibles aux enzymes TK cytoplasmiques FAK et c-src. Par conséquent, la phosphorylation des récepteurs TK mène au recrutement des complexes SH2/Grb2/Sos, lesquels mènent à l'activation de la voie ras, raf et la phosphorylation

des MAPKs. Ceci conduit notamment à l'activation de la transcription de gènes impliqués dans la prolifération cellulaire.

## **4.1.7 Les enzymes à activité sérine / thréonine kinase**

### **4.1.7.1 La PKC**

La PKC est une protéine à activité sérine / thréonine kinase qui est générée par la liaison de médiateurs, comme l'ANG II, l'ET-1 ou la NE, à leur récepteur transmembranaire couplé à une protéine Gq. Cette liaison mènent à la stimulation de la sous unité  $\alpha$  de la protéine Gq, qui à son tour active l'effecteur transmembranaire, la PLC. L'activation de la PLC mène au clivage enzymatique du  $\text{PIP}_2$  membranaire, pour former deux produits équimolaires : l'inositol-3-phosphate ( $\text{IP}_3$ ) et le diacylglycérol (DAG). L' $\text{IP}_3$  favorise la libération du calcium emmagasiné dans le réticulum endoplasmique (RE) qui augmente ainsi la concentration de calcium intracellulaire. La formation du DAG mène à la stimulation de la PKC. En plus de la liaison des facteurs neuro-humoraux ou endothéliaux aux récepteurs couplés aux protéines Gq, la PKC peut aussi être activée par une augmentation de la pression, lui attribuant un rôle dans la réponse myogénique<sup>18</sup>. Cette kinase est impliquée dans la contraction des muscles lisses par un processus indépendant de l'entrée de calcium (augmentation de la sensibilité au calcium). Les mécanismes qui ont été proposés dans ce processus impliquent l'activation de certaines MAPKs<sup>135</sup> ou la phosphorylation de la phosphatase de la myosine<sup>136</sup>.

#### **4.1.7.2 Les MAPKs :protéines kinases activées par les mitogènes**

Les MAPKs comprennent trois classes de kinases à activité serine /thréonine: ERK 1/2, JNK et p38. Elles sont impliquées dans la prolifération cellulaire et aussi dans la contraction cellulaire. Par exemple, suivant un stimulus mécanique, leur activation résulte d'une cascade de phosphorylations des protéines kinases<sup>137</sup>. ERK 1/2 sont stimulées par l'activation de la voie raf. Cette voie mène à la transcription de gènes impliqués dans la prolifération cellulaire et la synthèse protéique. De plus, ERK 1/2 peuvent être impliquées dans la réponse myogénique (contraction musculaire) indépendante de l'entrée de calcium suivant une stimulation par une PKC<sup>135</sup>.

Les MAPKs JNK et p38 ont été classifiées comme des protéines kinases activées par le stress. Par exemple, p38 peut être stimulée par les rayons UV, le choc thermique, l'hypoxie ou l'hyperosmolarité. Certaines études<sup>138,139</sup> ont démontré une implication de p38 dans la contraction musculaire suivant un stress mécanique. Ceci impliquerait un processus indépendant du calcium<sup>135</sup>. Les MAPKs p38 et JNK semblent impliquées dans la prolifération cellulaire induite par l'ANG II qui stimule la génération de radicaux libres via la NADPHoxidase membranaire<sup>140</sup>.

## **4.2 Voies de signalisation du remodelage hypertrophique**

Le remodelage vasculaire hypertrophique représente le changement de structure artérielle le mieux étudié et le mieux compris. Dans l'hypertension essentielle, il est

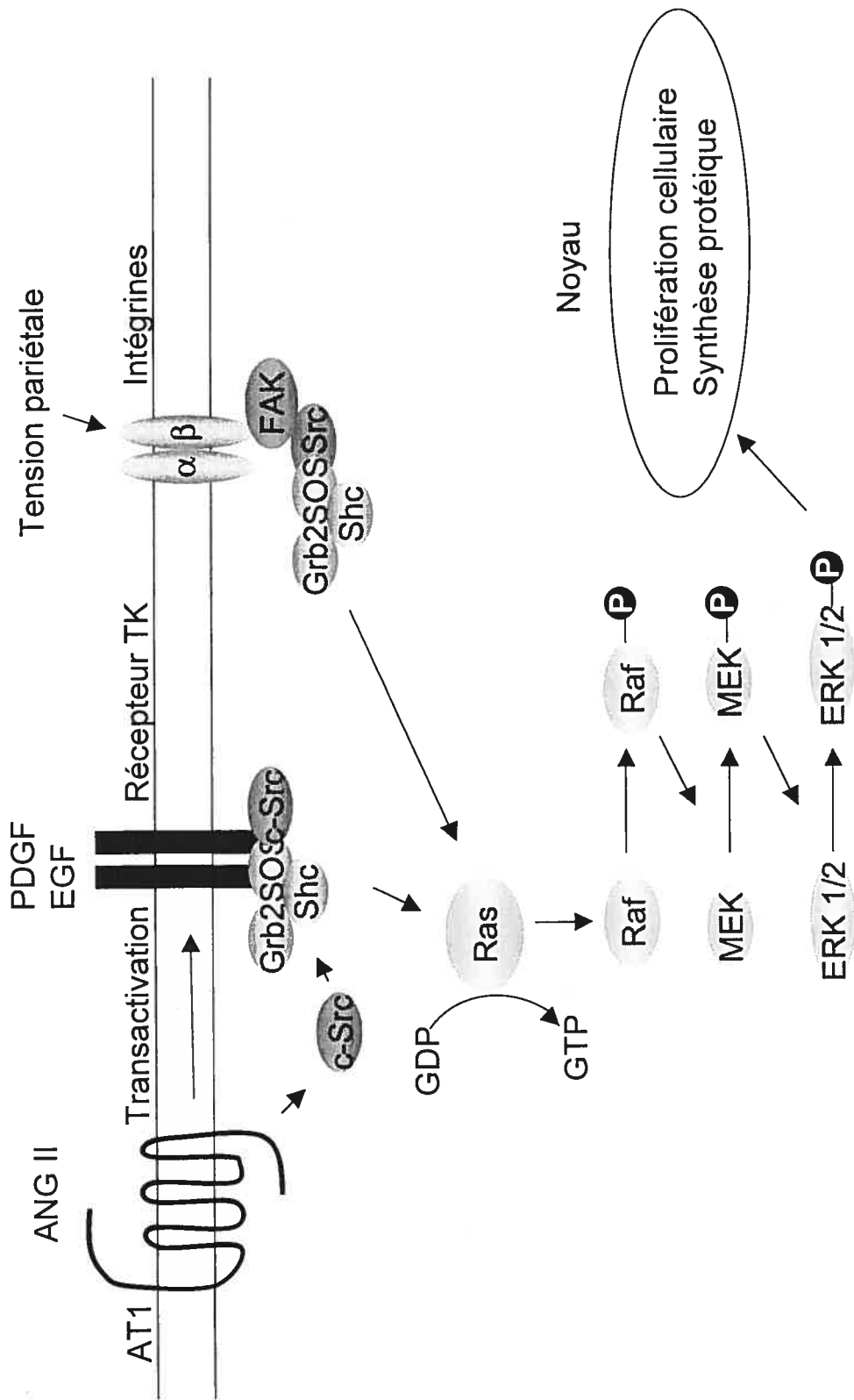
surtout observé dans les artères de conductance. Le remodelage hypertrophique des grosses artères participe faiblement au maintien de la pression artérielle élevée puisqu'il ne contribue pas à l'augmentation de la résistance périphérique. En effet, suivant la loi de Laplace, les artères de gros calibre étant incapable de se contracter de manière à réduire leur diamètre de façon significative, elles doivent augmenter l'épaisseur de leur paroi afin de normaliser la tension pariétale. Pour se faire, elles développent un remodelage hypertrophique, en stimulant la prolifération cellulaire et en augmentant la sécrétion des éléments de la MEC. Au niveau des artères de résistance, le remodelage hypertrophique se développe surtout lors d'hypertension essentielle sévère où l'apport de facteurs neuro-humoraux et endothéliaux intervient dans le processus hypertrophique, indépendamment de la pression. Il a été aussi démontré<sup>43</sup> que l'altération de la capacité myogénique (perte de la capacité à se contracter) des artères de résistance chez des patients diabétiques et hypertendus, a mené au développement d'un remodelage hypertrophique dans ces artères. Ceci suggérait qu'en étant incapable de se contracter, la tension pariétale n'a pu être normalisée qu'en stimulant l'augmentation de la prolifération cellulaire.

Ainsi, la prolifération cellulaire peut être stimulée par l'augmentation de la tension pariétale. Les études du laboratoire de Prewitt<sup>141-143</sup> ont démontré ce concept en utilisant des artères de résistance isolées et soumises à une augmentation de la pression, *ex vivo*. En augmentant la pression trans-murale de façon à ne pas engendrer une réponse myogénique, l'expression des facteurs de transcription impliqués dans la prolifération cellulaire, c-fos et c-myc, était augmentée. Cette amplification d'expression de protéines oncogéniques était aussi associée à une élévation de la

tension pariétale<sup>141</sup>. Les enzymes à activité kinase, c-src et ERK 1/2, interviennent dans la stimulation de la prolifération cellulaire induite par l'augmentation de la TP<sup>143</sup>.

Outre l'augmentation de la tension pariétale, les facteurs neuro-humoraux (NA et ANG II), endothéliaux (ET-1) ou de croissance (PDGF, EGF) peuvent aussi activer la réponse proliférative des artères de conductance et de résistance. Les voies de signalisation impliquées dans ces cas sont similaires à celles induites par une augmentation de la TP, i.e. qu'elles impliquent une augmentation de la phosphorylation des enzymes kinases. La figure 4.2 illustre les voies de signalisation menant à la prolifération cellulaire induite soit par une augmentation de la tension pariétale ou soit par une stimulation à l'ANG II.





**Figure 4.2.** Voies de signalisation impliquées dans le remodelage hypertrophique. La prolifération cellulaire est stimulée par l'angiotensine II (ANG II) via son récepteur de type 1 (AT1). La croissance cellulaire peut être stimulée par une augmentation de la tension pariétale via les intégrines. Les deux stimuli induisent l'activation de la phosphorylation tyrosine kinase (TK) via la kinase pp60c-src(c-src) ou la focal adhesion kinase (FAK). PDGF, *platelet-derived growth factor*, EGF, *epithelial growth factor*, Adaptée de Intengan et al. *Hypertension* 2000; 36: 313

### 4.2.1 Augmentation de la tension pariétale

L'élévation de la pression mène à l'augmentation de la TP lorsque la réponse contractile est absente. Les données de la littérature attribuent une importance aux intégrines pour capter le signal mécanique (augmentation de la TP). L'accroissement de la TP stimule le recrutement des intégrines au site d'adhésion focale où elles activent les enzymes TK, c-src et FAK. Les kinases c-src se lient à la sous unité  $\beta$  des intégrines et permet l'association des complexes de protéines adaptatrices Grb2/Shc/SOS. Ceci mène à la liaison du GTP à la protéine Ras, à la phosphorylation et à l'activation des protéines Raf, MEK et ERK 1/2. Cette dernière étape conduit à l'activation de facteur de transcription nucléaire qui stimule la transcription génique de protéines impliquées dans la prolifération cellulaire telle que c-fos, c-myc et c-jun. Des études faites sur des CMLs en culture ont démontré qu'une stimulation mécanique mène à l'activation des récepteurs TK au PDGF et à l'EGF, indépendamment de la liaison à leur récepteur respectif<sup>144,145</sup>. L'activation des récepteurs TK favorise aussi le recrutement des complexes des protéines adaptatrices Grb2/Shc/SOS, qui stimulent la voie Raf et qui induisent la phosphorylation de ERK 1/2 et à la prolifération cellulaire<sup>137</sup>.

## 4.2.2 Hypertrophie stimulée par l'ANG II

L'ANG II peut stimuler la prolifération cellulaire indépendamment de son effet presseur<sup>111,146,147</sup>. Les voies de signalisation impliquées dans la prolifération cellulaire induite par l'ANG II sont similaires à celles qui sont engendrées par l'augmentation de la TP<sup>148</sup>. Or, en se liant à son récepteur AT1 couplé à une protéine Gq, l'ANG II stimule la croissance cellulaire en augmentant la phosphorylation tyrosine kinase, en activant les MAPKs et en générant des agents oxydants via la NADPH oxydase<sup>149</sup>. Ainsi, l'activation du récepteur AT1 stimule les protéines TK, c-src et FAK. Ceci mène à l'activation de ERK 1/2. Aussi, l'activation du récepteur AT1 peut stimuler les récepteurs à activité TK des facteurs de croissance PDGF ou EGF par un processus impliquant une transactivation<sup>150</sup>. Cette voie de signalisation mène aussi à la phosphorylation de ERK 1/2.

L'ANG II stimule la formation des anions superoxydes par la NADPH oxydase transmembranaire via l'action de c-src, de la PLA<sub>2</sub> et de la PLD en plus d'augmenter la synthèse des sous unités p67phox, p22phox et p47phox constituant la NADPH oxydase. Les anions superoxydes formés et leurs produits dérivés H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> sont des agents mitogènes transmettant le signal en activant les MAPKs p38 et JNK<sup>149</sup>. Cette voie de signalisation qui implique la formation des ROS n'est pas illustrée à la figure 10.

### 4.3 Voies de signalisation du remodelage eutrophique

Le remodelage eutrophique observé dans les artères de résistance chez des patients atteints d'hypertension essentielle est caractérisé par une réduction de la lumière artérielle interne (rappelant une artère en état contracté), un réarrangement des éléments tissulaires de la paroi autour d'un diamètre artériel réduit sans qu'il n'y ait une augmentation de la CSA (absence d'hypertrophie). Suivant la loi de Laplace, les artères de résistance ont la capacité de se contracter de manière significative pour normaliser la tension pariétale lorsque la pression artérielle augmente. Une réduction du diamètre des artères de résistance augmente de façon marquée la résistance périphérique, en considérant la loi de Poiseuille. Or, les artères de résistance changent de structure en gardant leur diamètre interne réduit, participant ainsi au maintien de la pression artérielle élevée. Les mécanismes impliqués dans le développement du remodelage eutrophique restent encore à définir.

Les travaux de Allen et al.<sup>142</sup> ont démontré que la réponse myogénique d'artères mésentériques isolées et soumises à une augmentation de la pression intraluminale, inhibait la transcription de gènes impliqués dans la prolifération cellulaire, comme c-myc et la sous unité 18S de l'ARNr (indice de synthèse protéique). De plus, cette inhibition de l'expression de des protéines était associée à une normalisation de la TP. De plus, les travaux de Bakker et al.<sup>151</sup> ont démontré qu'un stimulus vasoconstricteur (ET-1) en présence d'une élévation de la pression intraluminale, étaient tous deux nécessaires au développement du remodelage

eutrophique d'artère de résistance mise en culture. En effet, une stimulation à l'ET-1 en condition hypotensive menait à une réduction de la lumière de l'artère de résistance sans remodelage eutrophique<sup>70</sup>.

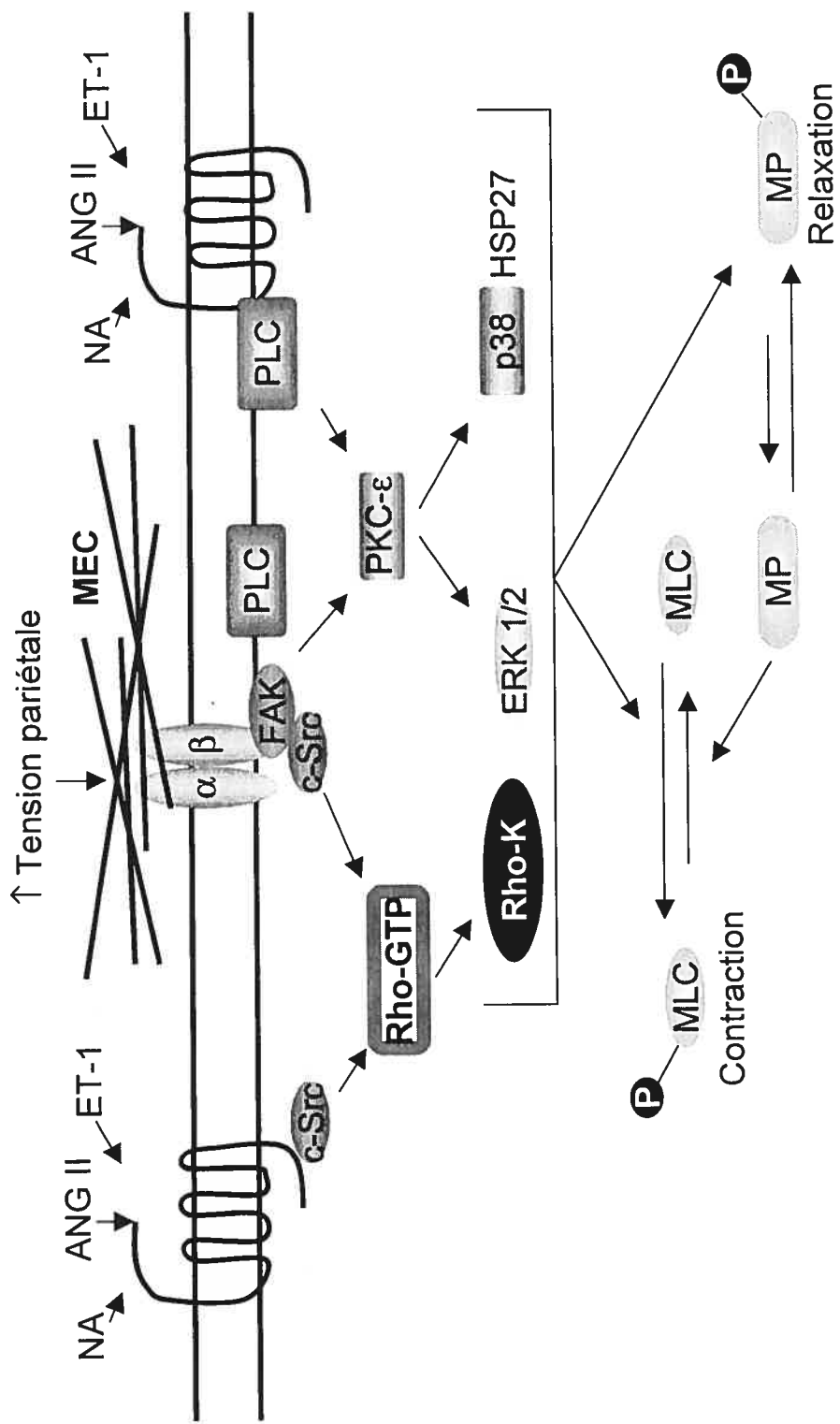
Dans l'hypertension essentielle, une dysfonction endothéliale est souvent observée et la réponse myogénique est amplifiée<sup>72</sup>. Toutefois, après dénudation de l'endothélium, la réponse myogénique est semblable à celle des artères normotendues. Ceci suggère que l'amplification de la réponse myogénique est secondaire à la dysfonction endothéliale et non à une modification intrinsèque du muscle lisse vasculaire des artères de résistance<sup>72</sup>. Il a été rapporté que les inhibiteurs de l'ECA et les bloqueurs des canaux calciques, améliorent la fonction endothéliale en augmentant la libération du NO ou sa biodisponibilité<sup>152</sup>. Ceci expliquerait les bénéfices d'utilisation de ces deux agents anti-hypertenseurs pour renverser le remodelage eutrophique des artères de résistance<sup>66</sup>. Les agents anti-hypertenseurs qui n'ont pas la capacité d'améliorer la fonction endothéliale, tels que les  $\beta$ -bloqueurs, diminuent la pression sans corriger le remodelage eutrophique<sup>16</sup>.

Afin d'expliquer les événements pouvant contribuer au développement du remodelage eutrophique, il a été suggéré<sup>48,153</sup> qu'une vasoconstriction initiale serait l'étape précoce à la stimulation des événements cellulaires conduisant au réarrangement des CMLs normales tout en maintenant un diamètre artériel réduit. En utilisant des artérioles de muscles squelettiques isolées, Martinez-Lemus et al.<sup>71</sup> ont démontré qu'une stimulation vasoconstrictrice aiguë à la NA causait un raccourcissement des fibres musculaires lisses (contraction normale et diminution du diamètre artériel), tandis qu'une stimulation prolongée à la NA menait à un

réarrangement des cellules musculaires lisses par une élongation des fibres, tout en gardant un diamètre artériel réduit. Étant donné qu'une augmentation du tonus myogénique est nécessaire au développement du remodelage eutrophique<sup>48</sup>, les mécanismes impliqués dans la contraction chronique ont été proposés comme processus d'adaptation mécanique des CMLVs. Or, la contraction indépendante du calcium (augmentation de la sensibilité au calcium) et celle qui implique un réarrangement du cytosquelette (polymérisation d'actine), peuvent représenter deux mécanismes de contraction soutenue<sup>153</sup>. De plus, étant des processus de contraction consommant peu d'énergie, ils permettent de maintenir de façon chronique, une force contractile qui garde un diamètre artériel réduit<sup>154</sup>. Ces deux mécanismes semblent favoriser le recrutement des intégrines au site d'adhésion focale ainsi que la phosphorylation TK<sup>18,131,155,156</sup>.

#### **4.3.1 Augmentation de la sensibilité au calcium**

Les travaux de Morgan ont démontré que la génération de la force contractile induite par un agoniste ne corrélait pas nécessairement avec la concentration de calcium intracellulaire<sup>157</sup>. Le concept de la contraction indépendante du calcium a été proposé et celle-ci est caractérisée par une augmentation de la sensibilité au calcium, qui favorise la contraction soutenue. Les deux principaux mécanismes impliqués dans la contraction indépendante du calcium sont l'activation de la voie de la PKC<sup>158-160</sup> et la voie Rho-RhoKinase<sup>161-163</sup>. Ces mécanismes sont schématisés à la figure 4.3.



**Figure 4.3** Mécanismes impliqués dans la contraction indépendante du calcium. Voies de la PKC et de RhoK. NA; noradrénaline; ANG II, angiotensine II; ET-1, endothéline; c-src, pp60c-src kinase; FAK, focal adhesion kinase; PLC, phospholipase C; PKC, protéine kinase C; RhoK, kinase Rho; ERK 1/2, extracellular related kinase 1/2; p38, reactivating kinase; HSP27, heat shock protein; MLC, myosin light chain; MP, myosin phosphatase. Adaptée de Fukata et al. *Trends in Pharm. Sc.* 2001; 22: 33 et de Harnett et al. *Am J Med*; 115: 26S.

#### 4.3.1.1 Voie de la PKC

La voie de la PKC peut être activée par les agents vasoconstricteurs comme l'ET-1<sup>164</sup>, la NA<sup>165,166</sup> ou l'ANG II<sup>36</sup>. Ces agents se lient à leur récepteur à 7 passages transmembranaires couplé à une protéine Gq et active la PLC menant à la stimulation de la PKC. Celle-ci peut aussi être activée par l'augmentation de pression, par des mécanismes de mécanotransduction. En effet, le groupe de Davies<sup>131</sup> a démontré une contribution des intégrines à l'augmentation du tonus myogénique induit par l'augmentation de la pression. Dans ce cas-ci, l'activation de la PKC est le résultat de la cascade d'activation des intégrines via la FAK et c-src, qui stimulent la PLC<sup>131</sup>. Il a été proposé que les MAPKs, ERK 1/2 et p38, sont activées par l'isoforme  $\epsilon$  de la PKC pour induire une vasoconstriction soutenue indépendante du calcium<sup>135</sup>. Or, dans le cas de l'activation de ERK 1/2, la phosphorylation de la MLC se ferait via une kinase liée aux intégrines (ILK). Cette kinase favoriserait aussi la phosphorylation de la myosine phosphatase (MP). De son côté, la p38 activée par la PKC- $\epsilon$  stimulerait une kinase ZIP via une HSP27. L'activation de la kinase ZIP causerait aussi la phosphorylation de la MLC et/ou de la MP. L'activation de ERK 1/2 par la PKC peut résulter d'une stimulation agonistique ou mécanique<sup>72,138</sup>, comparativement à l'activation de p38, qui résulte surtout d'une stimulation mécanique<sup>138</sup>.

#### 4.3.1.2 Voie Rho-Rho kinase

Plus récemment, la protéine monomérique GTPasique Rho a été identifiée pour contribuer à l'augmentation de la sensibilité au calcium<sup>167,168</sup>. Tout comme la voie de



la PKC, la contraction indépendante du calcium induite par Rho peut être activée par des agents vasoconstricteurs<sup>169</sup> et par l'augmentation de la pression, amplifiant le tonus myogénique<sup>161,162</sup>. Les mécanismes de la contraction indépendante du calcium par la voie d'activation de Rho ressemblent à ceux stimulés par la PKC. Ils impliquent une phosphorylation directe de la MLC et/ou une phosphorylation de la myosine phosphatase (MP)<sup>136</sup>.

### 4.3.2 Polymérisation d'actine

L'état de polymérisation / dépolymérisation des filaments d'actine des CMLs est dynamique et participe au cycle de la contraction / relaxation des muscles lisses. Les travaux de Gunst<sup>156</sup> ont démontré que l'augmentation de la polymérisation d'actine contribue au développement de la force de contraction dans les CMLs pulmonaires qui sont soumises au stress mécanique de la respiration. Elle diffère de la contraction induite par la phosphorylation de la MLC, puisque, dans ce cas, celle-ci ne contribue pas à la génération de la force contractile<sup>170</sup>. L'hypothèse est que les mécanismes de contraction stimulés pharmacologiquement ou par une augmentation d'un stress mécanique dépendent de la période de la stimulation<sup>171</sup>. Sur une courte durée, les mécanismes de contraction impliquent ceux qui mènent à la phosphorylation de la MLC, favorisant les interactions actine/myosine. Une stimulation à long terme impliquerait un remodelage dynamique des filaments d'actine à des points membranaires précis permettant à la cellule de s'adapter aux changements mécaniques extérieurs<sup>171</sup>. En utilisant des artères de résistance isolées, Cipolla et al.<sup>154</sup> ont démontré que la polymérisation d'actine participe à

l'augmentation de la production de la force contractile pour contrer la tension pariétale lorsque la pression est élevée. Ce processus permettrait à l'artère de résistance de maintenir son diamètre interne réduit de façon chronique en consommant peu d'énergie<sup>131</sup>. Aussi, l'élongation des filaments d'actine peut favoriser l'ancrage de nouvelles intégrines à la MEC via la liaison d'autres protéines adaptatrices (comme la vinculine ou la paxilline). Ainsi, la polymérisation d'actine assurerait la formation de nouveaux sites d'adhésion focale, ces derniers représentant des endroits de transduction mécanique membranaire<sup>171</sup>.

Pour l'instant, il semble que ce soient les intégrines qui activent le remodelage des filaments d'actine. L'application d'un stimulus mécanique favorise le recrutement des intégrines au site d'adhésion focale, qui mène au regroupement des TK, FAK et c-src, en plus des protéines adaptatrices, taline, vinculine et paxiline. Ces protéines font le pont entre les intégrines et les filaments d'actine. Il a été démontré qu'une activation de la paxiline via la FAK mène à la polymérisation d'actine suivant une stimulation mécanique<sup>156</sup>. D'autres mécanismes régulent la polymérisation d'actine et sont élaborés dans les sections suivantes.

#### **4.3.2.1 Régulation de la polymérisation d'actine**

L'implication des petites protéines à activité GTPasique dans la réorganisation du cytosquelette d'actine a été largement démontrée dans les études ayant été effectuées majoritairement in vitro, dans les fibroblastes mis en culture<sup>133,134</sup>. En effet, en réponse à des stimuli mécaniques, Rho, Rac et cdc42 ont été identifiées comme des agents responsables de la réorganisation du cytosquelette. Ainsi, elles contribuent

à différentes réponses cellulaires incluant la prolifération et la migration cellulaires et la stimulation de l'expression génique.

### **A. Implication de Rho dans la polymérisation d'actine**

En plus d'être impliquée dans la prolifération cellulaire et la contraction soutenue en augmentant la sensibilité au calcium (voir plus haut) l'activation de la voie Rho stimule la polymérisation d'actine. Les principaux effecteurs en aval de Rho, qui permettent son action dans le cytosquelette, sont la p160Rho kinase (ROCK1) et la mDia1. ROCK1 induit la formation des fibres de stress et la formation de sites d'adhésion focale via l'activation des intégrines<sup>172</sup>. De son côté, mDia1 (un homologue mammifère de la protéine diaphanous de la drosophile) induit une augmentation de la polymérisation d'actine en recrutant une protéine liant l'actine, i.e. la profiline<sup>173</sup>. La polymérisation d'actine induite par mDia1 semble être impliquée spécifiquement lors de stimulations mécaniques comparativement à celle induite par ROCK 1<sup>174</sup>.

### **B. Implication de la MAPK P38**

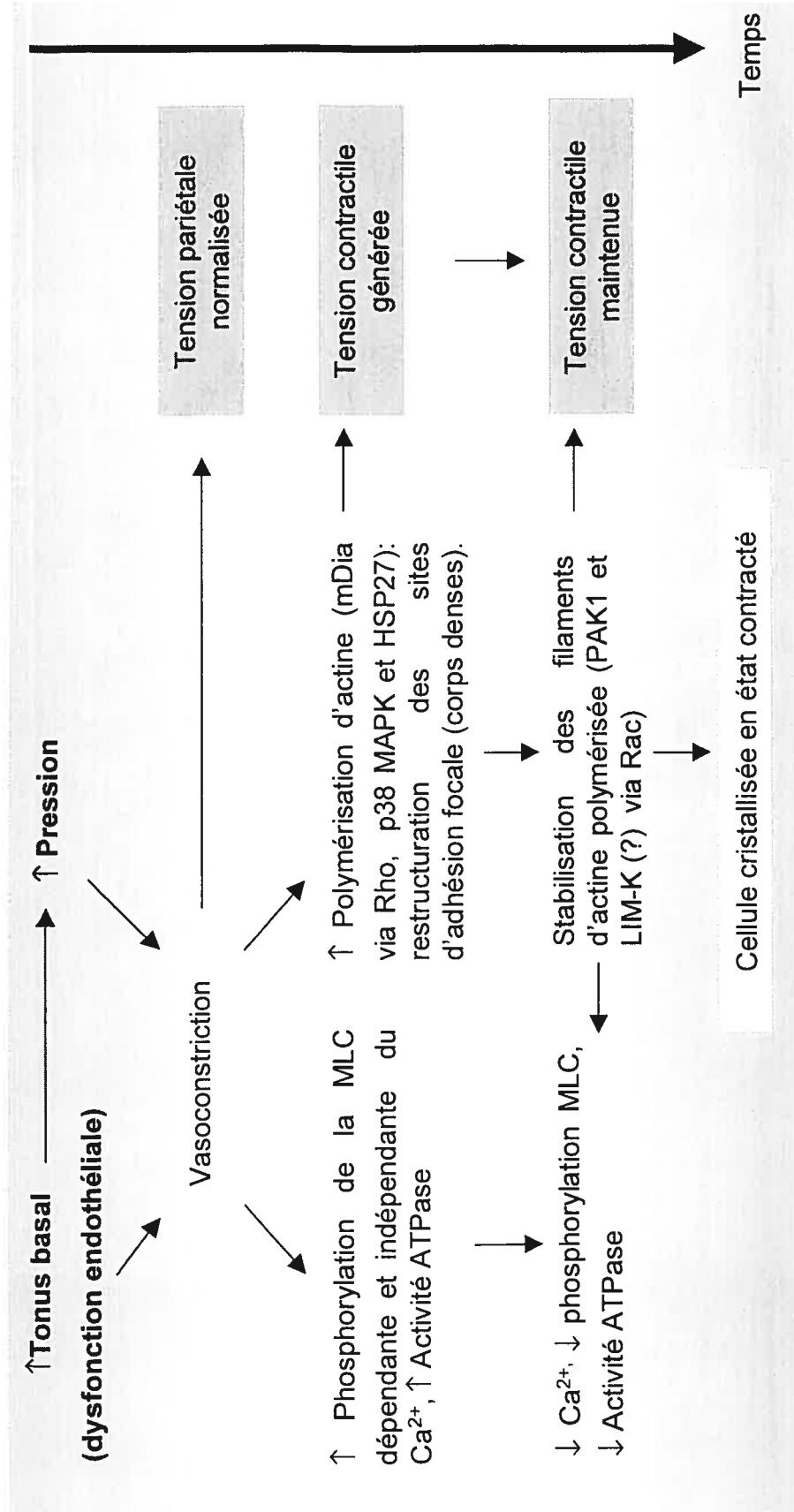
Des études ont démontré une contribution de la MAPK p38 dans la contraction des cellules musculaires lisses en culture<sup>175</sup> et des artérioles isolées<sup>138</sup>. Or, cette contraction semble être impliquée majoritairement en réponse à une stimulation mécanique, et ce, de façon plus importante que ERK 1/2<sup>138</sup>. Des études mécanistiques ont proposé que cette observation pouvait être expliquée par le fait que p38 MAPK stimule la contraction en augmentant la polymérisation d'actine par un processus

impliquant la formation de polymères de la protéine de choc thermique 27 (HSP27)<sup>139</sup>. La voie d'activation en amont de la MAPK p38 reste peu connue dans ce contexte. Toutefois, il a été proposé que Rac et son effecteur PAK peuvent mener à son activation<sup>176,177</sup>.

### C. Implication de Rac dans la stabilisation de la polymérisation d'actine

Au même titre que Rho, la GTPase Rac est aussi une protéine impliquée dans la réorganisation du cytosquelette en réponse à un stimulus mécanique<sup>178</sup>. Toutefois, son rôle a surtout été attribué à la déformation des membranes (« membrane ruffling ») ou à la formation de lamellipodes démontré notamment dans des études *in vitro* vérifiant la migration des fibroblastes en culture. Ces GTPases induisent leur action via l'activation de leurs effecteurs respectifs, PAK étant l'effecteur de Rac le mieux défini jusqu'à présent<sup>177-179</sup>. De plus, il a été proposé que l'activation de la voie Rac antagonise la voie Rho. En effet, l'activation de PAK mène à l'inhibition de la formation des fibres de stress et au renouvellement des sites d'adhésion focale, potentiellement par un mécanisme qui inhibe la MLCK<sup>180</sup>. La phosphorylation de la chaîne lourde de la myosine par PAK peut aussi mener à l'inhibition de la fonction de la myosine, causant la dissociation des structures actine/myosine, un autre effet contraire à celui exercé par la voie Rho<sup>181</sup>. Aussi, PAK influence la réorganisation du cytosquelette en stabilisant les filaments d'actine (actine F) en empêchant l'action de la cofiline, qui est responsable de dépolariser l'actine F en actine globulaire (actine G)<sup>182</sup>. En effet, en stimulant la kinase LIM, PAK phosphoryle et inactive la cofiline<sup>183</sup>. La figure 4.4 résume les mécanismes impliqués dans le remodelage eutrophique dans

le contexte où l'artère réorganise son cytosquelette d'actine en vue d'avoir une apparence en état contracté.



**Figure 4.4** Proposition de mécanismes pouvant contribuer au développement du remodelage eutrophique. Une augmentation du tonus myogénique et une élévation de la pression mènent à une vasoconstriction initiale. Ceci normalise la tension pariétale. À court terme, la contraction via la MLC (*myosin light chain*) et via la polymérisation d'actine augmentent la tension contractile. À long terme, il y a une réduction de la contraction dépendante de la MLC, mais un maintien de la tension contractile via la formation et la stabilisation des filaments d'actine. Ceci représente un mécanisme consommant peu d'énergie et contribue au réarrangement cellulaire en fonction du temps de la stimulation mécanique.  $Ca^{2+}$ , calcium; mDia, homologue mammifère de la protéine Diaphanous de la drosophile; Rho, homologue de ras; p38, *reactivating kinase*; HSP27, *heat shock protein-27*; PAK1, *p21-activated kinase*; LIM-K, protéine kinase de la famille LIM. *Inspirée de Gunst et al. J Appl Physiol. 2003; 95: 420*

## CHAPITRE 5. LE REMODELAGE CARDIAQUE

L'hypertension essentielle mène aussi au changement de structure du cœur, surtout au niveau du ventricule gauche. Tout comme les artères de la circulation systémique, le cœur est soumis à une augmentation de tension pariétale qu'il normalise lorsque la pression artérielle est élevée, suivant la loi de Laplace. Toutefois, les paramètres calculés dans la formule diffèrent quelque peu<sup>184</sup>. Des études cliniques ont mesuré la structure cardiaque de patients atteints d'hypertension essentielle, par la méthode échocardiographique, en considérant la masse ventriculaire gauche (MVG) et l'épaisseur relative de la paroi ventriculaire (ERPV) comme paramètres de mesure géométrique du ventricule gauche<sup>185,186</sup>. Ainsi, ces études ont classifié 4 types de géométrie ventriculaire différents comprenant une géométrie ventriculaire normale avec une MVG et une ERPV normales, un remodelage concentrique avec une MVG normale mais une augmentation de l'ERPV, un remodelage hypertrophique excentrique avec une MVG élevée mais une ERPV normale et finalement un remodelage hypertrophique concentrique, les deux variables étant à la hausse. La majorité des patients présentaient une géométrie ventriculaire normale (entre 41-52%), et très peu de patients développaient un remodelage hypertrophique concentrique (entre 8-10%). Les remodelages concentrique et hypertrophique excentrique montraient des pourcentages de développement variant entre 15 et 32 %<sup>185,187</sup>.

Le remodelage concentrique est caractérisé par une réduction de la cavité du ventricule gauche et est associé à augmentation de la résistance périphérique, l'augmentation du volume de remplissage ventriculaire (pression volumique) étant un facteur moins important dans le développement de ce type de remodelage. Le remodelage hypertrophique excentrique est caractérisé par une augmentation de l'épaisseur ventriculaire sans changement de la cavité du ventricule. Il est associé à une augmentation de la résistance périphérique et à une augmentation de la pression volumique. Le remodelage hypertrophique concentrique montre une cavité ventriculaire réduite et une augmentation de l'épaisseur de la paroi. Il est associé à une augmentation de la résistance périphérique. Des quatre types de remodelage cardiaque observés chez les patients atteints d'hypertension essentielle, le remodelage hypertrophique concentrique est celui qui correspond au plus au taux de mortalité et de morbidité<sup>188,189</sup>. L'hypertrophie cardiaque est fortement associée à la dysfonction cardiaque<sup>190</sup>. Ainsi des études cliniques ont montré une corrélation positive entre la dysfonction cardiaque et le développement du remodelage hypertrophique concentrique<sup>191</sup>. Le développement des remodelages cardiaque eutrophique ou hypertrophique excentrique montrait une meilleure fonction ventriculaire.



## OBJECTIFS GÉNÉRAUX

L'hypertension essentielle est associée à une augmentation de la résistance périphérique et au développement du remodelage eutrophique des artères de résistance. Il a été démontré que le remodelage eutrophique est un processus d'adaptation chronique des artères de résistance contribuant au maintien de l'élévation de la pression artérielle<sup>16</sup>. De plus, il a été observé que le remodelage eutrophique des artères de résistance représente un phénomène précoce contribuant au dommage des organes cibles<sup>43,192</sup>. En effet, ce type de remodelage est caractérisé par une réduction du diamètre interne des artères (lumière) avec un réarrangement des éléments tissulaires de la paroi autour de cette lumière réduite, sans augmentation de la CSA. À long terme, une réduction de la lumière des artères de résistance diminue la réserve vasculaire et peut mener à la diminution de l'apport sanguin des organes qu'elles perfusent, menant ainsi au dommage de ces derniers. Or, peu de connaissances des mécanismes menant au remodelage eutrophique des artères de résistance associée à l'hypertension essentielle, existent à ce jour.

Nous avons utilisé un modèle d'hypertension induite par l'inhibition chronique du monoxyde d'azote (NO) pour étudier les mécanismes impliqués dans le développement du remodelage des artères de résistance et du coeur. L'hypertension induite par le L-NAME est un modèle imitant certaines caractéristiques pathologiques associées à l'hypertension essentielle humaine. Par exemple, tout comme dans l'hypertension essentielle, il induit une dysfonction endothéliale (mais de nature légèrement différente sans production d'O<sub>2</sub><sup>-</sup>), mène au développement du remodelage

eutrophique dans les artères de résistance, produit un remodelage hypertrophique dans les artères de conductance, et, à long terme, cause le dommage des organes cibles. Cette thèse présente l'ensemble des travaux effectués durant ma formation au doctorat, visant à comprendre les mécanismes menant au développement du remodelage eutrophique des artères de résistance et du cœur, dans un modèle d'hypertension induite par l'inhibition de la synthèse du NO.

### **1.Implication de ERK 1/2 dans la vasoconstriction mésentérique menant à la normalisation de la tension pariétale suivant l'inhibition de la NOS.**

Dans l'hypertension essentielle, les artères de gros calibres développent un remodelage hypertrophique et les artères de résistance développent un remodelage eutrophique. L'absence d'hypertrophie des cellules musculaires lisses des artères de résistance serait la conséquence de la normalisation de leur tension pariétale causée par une augmentation du tonus myogénique (vasoconstriction), en réponse à une augmentation de pression. Ainsi en répondant au principe de Laplace, lors d'une augmentation de pression, les artères ayant la capacité de se contracter, normalisent leur tension pariétale, inhibant la prolifération cellulaire. Les artères n'ayant pas la capacité de se contracter (comme les artères de gros calibres ou les artères ayant une fonction myogénique altérée) doivent normaliser la tension pariétale en stimulant la prolifération cellulaire<sup>129</sup>. Au cours d'une étude précédente<sup>193</sup>, nous avons démontré que l'inhibition de la synthèse du NO menait à une augmentation de la synthèse protéique (indice d'hypertrophie) seulement dans l'aorte (en mesurant les taux de

leucine tritiée). Toutefois, l'expression de ERK 1/2 (MAPK impliquée dans la prolifération cellulaire) étant augmentée dans l'aorte et dans les artères mésentériques, ces résultats suggéraient une implication de ERK 1/2 dans une réponse divergeant de la prolifération cellulaire. À la lumière de ces observations, notre premier objectif était de mesurer la réponse vasoconstrictrice, *in vivo* par microscopie intra vitale, dans deux types d'artère (fémorale vs mésentérique) durant l'inhibition de la synthèse de NO. De plus, nous voulions vérifier l'implication de ERK 1/2 dans la réponse contractile.

## **2. Mécanismes impliqués dans le développement du remodelage eutrophique dans les artères de résistance**

Nos travaux précédents<sup>194</sup> ont démontré que les artères mésentériques se contractaient et normalisaient leur tension pariétale en réponse à l'augmentation de pression induite par l'inhibition aiguë de la synthèse du NO. L'inhibition chronique du NO menant au remodelage eutrophique des artères mésentériques, nous avons émis l'hypothèse que la vasoconstriction serait l'étape initiale au développement du remodelage eutrophique des artères de résistance en réponse à l'augmentation de la pression artérielle. Ce concept allait de pair avec celle du groupe de Bakker, dont les études avaient démontré que l'augmentation du tonus myogénique et l'augmentation de la pression des artères de résistance mises en culture étaient nécessaires au développement du remodelage eutrophique. D'autres études ont rapporté que la polymérisation de l'actine (qui est un processus de réorganisation du cytosquelette

cellulaire) représentait le mécanisme de contraction soutenue pour générer une force de tension contrant la tension pariétale, et gardant le diamètre de l'artère réduit<sup>154</sup>. Notre objectif dans cette étude était donc de mesurer l'expression de protéines impliquées dans la polymérisation de l'actine, au cours du développement du remodelage eutrophique d'artère mésentérique suivant l'inhibition de synthèse du NO. Nous visons ainsi à identifier un marqueur spécifique au remodelage eutrophique, au même titre que la synthèse protéique est un marqueur de remodelage hypertrophique.

### **3. Compréhension des mécanismes impliqués dans le remodelage concentrique (eutrophique) dans le cœur suivant l'inhibition de la synthèse du NO.**

Dans l'hypertension essentielle, les remodelages cardiaques les plus observés sont un remodelage concentrique, hypertrophique excentrique et hypertrophique concentrique, le dernier étant grandement associé aux événements cardiovasculaires. Or, dans le modèle d'hypertension induit au L-NAME, le type de remodelage cardiaque observé est un remodelage concentrique, du moins lorsque le système rénine-angiotensine n'est pas activé<sup>115</sup>. Or, il a été rapporté que la croissance cellulaire était couplée dans le temps avec l'augmentation de la vascularisation, afin d'approvisionner adéquatement les cellules en nutriments essentiels à leur fonctionnement et à leur survie. L'implication du NO dans la réponse angiogénique ayant été largement démontrée, notre hypothèse était qu'une diminution de la production du NO, pourrait expliquer l'absence de remodelage hypertrophique, par

l'incapacité des artères coronaires à générer des nouveaux capillaires. Ainsi, les objectifs de travail pour cette étude étaient de vérifier la contribution du NO endogène dans la néovascularisation issue d'artères coronaires suivant l'inhibition chronique du NO. En plus, nous voulions mesurer la structure et la densité des capillaires cardiaques chez des rats hypertendus au L-NAME.

---

## **DEUXIÈME PARTIE – PRÉSENTATION DES MANUSCRITS**

---

**CHAPITRE 6. ERK1/2-mediated vasoconstriction  
normalizes wall stress in small mesenteric arteries  
during NOS inhibition *in vivo***

**Daphné Girardot<sup>1</sup>, Bénédicte Demeilliers<sup>1</sup>, Denis deBlois<sup>2</sup>  
and Pierre Moreau<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>Faculté de pharmacie et <sup>2</sup>Département de pharmacologie, Faculté de médecine,  
Université de Montréal, Montréal, Canada

## 6.1 ABSTRACT

As in essential hypertension, chronic NOS inhibition leads to hypertrophic remodeling in large arteries and inward eutrophic remodeling in small arteries with activation of extracellular signal-regulated kinase (ERK) 1/2 in both vessel types. We tested the hypothesis that this remodeling heterogeneity could be related to distinct vasoreactivity patterns in small and large arteries, with a vessel-specific function of ERK 1/2 signaling. Using intravital microscopy we demonstrate that acute NOS inhibition (L-NA injection, 100 mg/kg) produced vasoconstriction of small mesenteric arteries. Consequently, the calculated in vivo wall stress was not significantly modified, despite the local rise in pressure. This could explain the lack of vascular protein synthesis elevation. Inhibition of ERK 1/2 activation with PD 98059 blunted mesenteric artery contractions. Femoral arteries did not contract and were submitted to an enhanced wall stress and to hypertrophic remodeling in chronic conditions. In conclusion, the heterogeneous vascular remodeling in the L-NAME model appears to be related to a heterogeneous vasoconstriction response to acute NOS inhibition. Indeed, in contrast to large arteries, L-NA-induced vasoconstriction in small arteries normalized wall stress and prevented early signs of hypertrophy. Our results also suggest that ERK 1/2 is a signaling element in NOS inhibition-induced vasoconstriction of small arteries in vivo.

**Key Words :** vascular remodeling, NO, small artery contraction, ERK 1/2, wall stress.



## 6.2 INTRODUCTION

Chronic blockade of nitric oxide synthase (NOS) activity, with L-arginine analogues such as N<sup>G</sup>-nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME), leads to hypertension[1, 2] and mimics a defective endothelium-dependent dilation found in arteries of patients with essential hypertension[3, 4]. As in essential hypertension, L-NAME-induced hypertension is associated with an increase in peripheral resistance[5-7] and leads to a heterogeneous vascular remodeling along the arterial tree. Indeed, large arteries remodel with increases in both media to lumen ratio (M/L) and medial cross sectional area (CSA)[8, 9], while small arteries change their structure (increase M/L) without alteration of media CSA[4, 10, 11]. Thus, small artery remodeling in the L-NAME model and in essential hypertension is generally considered as inward eutrophic remodeling[12, 13]. This type of remodeling is believed to contribute to the increase of peripheral resistance since lumen diameter is reduced. Indeed, according to Poiseuille's Law, resistance varies inversely with the fourth power of the blood vessel radius, so that a small decrease in the lumen diameter markedly increases resistance, potentially leading to decreased organ perfusion and end-organ damage[14-16].

Mechanisms leading to eutrophic remodeling in resistance arteries are still poorly understood. Previous work has demonstrated that an elevation of arterial pressure enhances the expression of genes implicated in cell proliferation in the wall of large[17] and small[18] arteries. Both studies have also observed a contribution of extracellular signal-regulated kinases 1 and 2 (ERK 1/2) in signaling mechanisms

leading to vascular hypertrophy[17, 19]. However, the group of Prewitt has also observed that in response to pressure, contraction of isolated small mesenteric arteries led to wall stress normalization[20]. Interestingly, the vasoconstriction blunted the expression of early response genes involved in growth and proliferation. Thus, early vasoconstriction could lead to eutrophic remodeling by preventing wall stress elevation and the subsequent trophic response [13]. Accordingly, the transition from vasoconstriction to the more stable eutrophic remodeling has been demonstrated in cultured small arteries [21].

Recent work in our laboratory has shown that acute (five hours) endogenous NOS inhibition leads to an augmentation of protein synthesis, an early marker of hypertrophy, in large arteries but not in small arteries *in vivo*[22]. However, ERK 1/2 activity was increased in both types of arteries suggesting that ERK 1/2 could contribute to other functions than proliferation in small arteries. Accordingly, the contribution of ERK 1/2 to vasoconstriction of small arteries has already been confirmed after angiotensin II (Ang II) stimulation in cells [23, 24] and in isolated arteries[25]. However, its role *in vivo* and in NOS inhibition-induced remodeling remains unresolved.

In this study, we aimed at demonstrating, *in vivo*, that early vasoconstriction during NOS inhibition is heterogeneous along the vascular tree and that only small resistance arteries normalize their wall stress by this mechanism. Our observation would then lend support to the hypothesis that vasomotion is a determinant of long-term remodeling. To do so, we documented *in vivo* vasoreactivity in mesenteric and femoral arteries after acute NOS inhibition by intravital microscopy and compared

these acute observations with arterial structural changes induced by chronic treatment with L-NAME. In addition, the contribution of ERK1/2 in mesenteric contraction after acute NOS inhibition was studied by phosphospecific immunoblotting and by inhibition of its activation with PD 98059.

## 6.3 METHODS

Male Wistar rats weighing between 250-275 g were purchased from Charles River (St-Constant, Qc, Canada). All protocols were approved by the Animal Care Committee of Université de Montréal.

### Chronic study

Male Wistar rats (n=8) were treated with L-NAME (N<sup>G</sup>-nitro-L-arginine methyl ester, Sigma Chemical CO) at a dose of 50 mg/kg/day during 4 weeks, dissolved in their drinking water. Eight untreated rats served as control. After treatment and under anesthesia, (sodium pentobarbital (50 mg/kg, i.p.)), a polyethylene catheter (PE10 tubing welded with a PE 50 tubing) was inserted in left femoral artery followed by a tracheotomy. After a laparotomy, a second polyethylene catheter was inserted in a first order mesenteric artery located more distal than another first order artery feeding the small artery selected for analysis. Mesenteric and femoral mean arterial pressure were recorded through a pressure transducer. The right femoral artery and the selected third order mesenteric artery were collected and prepared under a dissection microscope in a cold Krebs' solution of the following composition (in mmol/L; control solution): NaCl 118.6, KCl 4.7, CaCl<sub>2</sub> 2.5, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.2, MgSO<sub>4</sub> 1.2, NaHCO<sub>3</sub> 25.1, edetate calcium disodium 0.026, glucose 10.1. Arteries were pulled and sutured on two glass cannulae positioned in a vessel chamber (Living System Instrumentation) and superfused with calcium free control solution maintained at 37°C and oxygenated (95% O<sub>2</sub> / 5% CO<sub>2</sub>). The vessel chamber was positioned on a stage of an inverted microscope (Zeiss) and the amplified image was

transmitted to a monitor and a video dimension analyzer (Living System Instrumentation) as previously described [26]. Both arteries were equilibrated for 30 minutes in a calcium control solution with a constant perfusion pressure allowing for the measurements of lumen diameter, external diameter and media thickness of the small mesenteric artery. Mesenteric dimensions allowed the calculation of M/L ratio and CSA. Due to the thickness of the femoral artery, its structure could not be reliably measured in the system. Therefore, they were fixed with 4 % paraformaldehyde PBS solution for 15 minutes in perfused and pressurized conditions. Femoral structure parameters were obtained by digital morphometry on 5  $\mu\text{m}$  paraffin-embedded histological slices.

Thus, mesenteric CSA =  $(\pi/4) \cdot [(ED)^2 - (ID)^2]$  while femoral CSA = External Area – Internal Area

### **Acute study**

In the first acute intravital study, one group of 8 rats served for intravital femoral reactivity measurement and another group of 8 rats served for mesenteric reactivity, each rat serving as its own control. For the femoral measurement, a polyethylene catheter (PE10 tubing welded with a PE 50 tubing) was inserted in the left femoral vein under anesthesia (sodium pentobarbital (50 mg/kg, IP)). This procedure was followed by a tracheotomy and rats were laid on a temperature controlled (37°C) surgery board. After careful isolation of the artery from the vein, the external diameter of the right femoral artery was measured by video microscopy, using a trinocular dissection microscope (Zeiss, Stemi2000) at a final magnification of 50x. The quantification was done using a video dimension analyzer (Living

systems instrumentation). Local femoral mean arterial pressure and external diameter were recorded before and after an acute intravenous injection of L-nitro arginine (L-NA, 100 mg/kg in 0.25 mL). The maximal response for both parameters is presented. Preliminary experiments showed that a similar volume of physiological saline did not increase arterial pressure.

Mesenteric reactivity was measured after laparotomy and exteriorization of the mesenterium, which was superfused with a control Krebs solution oxygenated (95 % O<sub>2</sub> / 5 % CO<sub>2</sub>) and maintained at 37°C. The external diameter of a selected third order artery was obtained by video microscopy (see above) and local mesenteric mean arterial pressure was recorded as described in the chronic study section.

Since CSA does not change after acute treatments, arterial lumen diameters were obtained by measuring the CSA for each artery as described in the chronic study section. Femoral and mesenteric internal diameter, media thickness and wall stress were obtained by using the following formulas:

Lumen area =  $(\text{External diameter}/2)^2 \cdot \pi - \text{wall CSA}$

Lumen diameter =  $2 \cdot (\text{lumen area}/\pi)^{1/2}$

Media thickness =  $(\text{external diameter} - \text{lumen diameter})/2$ .

Wall stress (LaPlace Law) =  $\text{pressure} \cdot 1334 \text{ dyn/cm}^2/\text{mmHg} \cdot \text{lumen diameter} /$   
media thickness.

In the second acute study, three additional groups of rats served to determine the in vivo contribution of ERK 1/2 in mesenteric reactivity and to measure its phosphorylation state. A group of rats (n=4) was used as controls and received an injection of physiological saline solution (NaCl 0.9%). A second group received an intravenous injection of L-NA (100 mg/kg in 0.25 mL) and a last group received an i.p. administration of PD 98059 (3 mg/kg), a selective inhibitor of ERK 1/2 activation, one hour before the L-NA injection. Local mean arterial pressure and the external diameter were measured before and after the i.v. injection of L-NA, as described above.

### **Western blotting of ERKs**

ERK 1/2 phosphorylation was estimated by western blot, using a phosphospecific antibody, as previously described [22, 23]. In the second acute study described above, all arterial branches of the mesenterium, excluding the superior mesenteric artery, were harvested and frozen at  $-80^\circ\text{C}$ . Samples were pulverized in dry ice and liquid nitrogen and homogenized using a polytron in ice cold lysis buffer (PBS 20 %, Igepal CA-630 1%, Na-deoxycholate 0,5 %, SDS 0.1 %, PMSF 0.25 %,

aprotinine 0.1 %). After 30 minutes of incubation at 4 °C, the protein supernatant was separated by centrifugation (4°C, 30 min, 14 000 g) and protein concentration determined with a Micro BCA Protein Reagent Kit (Pierce).

Equal amounts of protein (20 µg) were loaded on a 10 % SDS polyacrylamide gel (SDS-PAGE). Proteins were then transferred to a polyvinylidene difluoride membrane (Fisher Scientific) and incubated overnight at 4°C with a phosphospecific ERK 1/2 antibody (p44/p42 MAPK thr 202/tyr 204 E10 monoclonal antibody New England Biolabs, final dilution 1:2000). The membrane was then washed and incubated for 2 hours at room temperature with a second antibody (anti-rabbit IgG (H&L) HRP-linked, Cell Signalling Technology). After the final wash, the membrane was incubated 1 minute with ECL western blotting reagents (Amersham Pharmacia Biotech), exposed on Hyperfilm ECL (Amersham) which was subsequently developed. The film was scanned and optical density quantified using NIH Image. The optical density of ERK 1 and 2 were generally closely related and the values were added to provide a single value. Results were normalized to control values on each gel to account for methodological variation.

### **Plasma renin activity measurements**

Blood was obtained from control and L-NA-treated rats used in the second acute study, 15 minutes after the injection of L-NA. Samples were collected in eppendorffs containing EDTA (1 mg/mL), centrifuged during 15 min at 12000 g and stored at -20°C. Plasma renin activity was measured by determining the generation of



angiotensin I by a radioimmunoassay using  $^{125}\text{I}$ -labeled angiotensin I as a tracer (angiotensin I [ $^{125}\text{I}$ ] radioimmunoassay kit, NEN Life Science Products, NEA104).

### **Protein synthesis measurements**

Vascular protein synthesis during NOS inhibition was measured in a previous study[22]. However, the dose of L-arginine analogs was smaller and there was no significant elevation of arterial pressure. Additional control and L-NA treated rats (n=4 per group) were used to confirm our previous findings, but with pressor doses of L-NA. Rats received a first i.v. bolus of L-NA (50 mg/kg), one hour before the start of a four-hour [ $^3\text{H}$ ] L-leucine infusion (12  $\mu\text{Ci/hr}$ ). The injection of L-NA was repeated 2.5 hours after the first injection. Rats were then rapidly sacrificed, mesenteric arteries collected and processed to determine the incorporation of radiolabeled leucine, as previously described[22]. The final results are expressed as cpm/mg protein. Pressure was measured throughout the experiment and the average of the five-hour recording is reported.

### **Drugs and statistical analysis**

All drugs were obtained from Sigma, except PD98059, which was purchased at Calbiochem. A suspension of PD98059 was prepared using a 1% polymeric solution (pluronic F68) and sonication, before the i.p. administration. Data are presented as mean  $\pm$ SEM except for ERK 1/2 activity where data were expressed as mean percent changes from control values  $\pm$ SEM. Statistical analysis was performed by unpaired t-test (chronic study and protein synthesis), paired t-test (acute study), ANOVA

followed by Bonferroni's correction for multiple comparisons (study with PD98059) and one sample analysis (western blots).  $P < 0.05$  was considered significant.

## 6.4 RESULTS

### **Vascular structure after chronic NOS inhibition**

In the first series of experiments (**Table 1**), chronic L-NAME significantly increased local femoral mean arterial pressure, as expected. Femoral medial thickness increased significantly, and since the internal diameter did not change significantly, both M/L and CSA were significantly elevated in the L-NAME-treated group. The local pressure in the mesenteric artery was also elevated by L-NAME. In contrast to the femoral artery, however, the elevation of M/L was not associated with changes in CSA under L-NAME treatment, confirming a eutrophic type of inward remodeling (**Table 1**).

### **In vivo reactivity of the femoral and the mesenteric arteries after acute NOS inhibition**

Acute administration of L-NA significantly increased local mean arterial pressure in the femoral and mesenteric arteries, as compared to control values (**Fig. 1A and 1D**). The absence of femoral contraction after L-NA injection (**Fig. 1B**) led to a local increase of wall stress, as compared to control values (**Fig. 1C**). In contrast, the significant reduction in external and, more importantly, in lumen diameter of mesenteric arteries confirmed that L-NA induced local vasoconstriction in these arteries (**Fig. 1E and table 2**). This acute change of morphology prevented any significant elevation of wall stress. In fact, wall stress tended to decrease under L-NA administration (**Fig. 1F**), as compared to control values. As presented in the methods, femoral and mesenteric wall stresses were calculated from structural parameters shown in **table 2**.

Since there was no femoral reactivity after acute NOS inhibition, the contribution of ERK 1/2 to vascular contraction was only studied in mesenteric arteries (**Fig. 2**). As previously observed, the acute administration of L-NA increased systemic mean arterial pressure when compared to control values (**Fig. 2A**). Pre-treatment of animals with an IP injection of PD 98059 one hour before L-NA injection, did not modify baseline blood pressure, nor the pressor response to L-NA. However, the L-NA-induced mesenteric constriction was totally prevented by PD 98059, as shown by the changes in the external diameter (**Fig. 2B**).

### **ERK 1/2 phosphorylation**

Western blot analysis with a phosphospecific antibody showed a significant increase of ERK 1/2 phosphorylation in mesenteric arteries harvested from rats treated acutely with L-NA (**Fig. 3**). Pretreatment with PD 98059, in addition to prevent contraction, abrogated the ERK 1/2 phosphorylation induced by L-NA. In fact, the level of ERK 1/2 phosphorylation even decreased below control levels (**Fig. 3**).

### **Plasma renin activity measurements**

To rule out any global effect of the circulating renin-angiotensin system on mesenteric contraction during acute NOS inhibition, we measured plasma renin activity in control and L-NA treated rats. Acute injection of L-NA (100 mg/kg) had no significant effect on the plasma renin activity ( $9.3 \pm 1.0$  ng/ml/hr as compared to  $7.8 \pm 0.9$  ng/ml/hr in the control group).

**Protein synthesis**

Basal protein synthesis was  $217.7 \pm 42.9$  cpm/mg protein in mesenteric arteries. Injection of a pressor dose of L-NA (2x 50 mg/kg administered at 2.5 hour interval), did not enhance mesenteric protein synthesis ( $234.8 \pm 62.0$  cpm/mg protein vs control). On average over the five hours of recording, the pressure increased from  $104 \pm 3.9$  to  $134 \pm 6.6$  mmHg with L-NA.

## 6.5 DISCUSSION

The use of intravital microscopy enabled us to measure in vivo reactivity of femoral and mesenteric arteries during acute NOS inhibition, and the simultaneous local pressure recording allowed us to directly evaluate local wall stress. We observed that mesenteric contraction in response to acute NOS blockade normalized wall stress, while no contraction was observed in femoral arteries, leading to a rise of wall stress. These acute differences were translated into distinct remodeling patterns in chronic conditions. In addition, we report that ERK 1/2 activation contributes to mesenteric contraction, but not proliferation in vivo during acute NOS inhibition.

Chronic administration of L-NAME increased local femoral and mesenteric mean arterial pressure, as expected from numerous studies using this drug to induce hypertension. We have previously reported that the dose used inhibits approximately 50% of tissue NOS activity [27]. The M/L ratio of large and small arteries increased, suggesting that chronic NOS inhibition caused remodeling. However, the type of remodeling was heterogeneous along the vascular tree. Indeed, in femoral arteries the increase of media thickness was mainly responsible for the elevation of M/L ratio, while a reduction of lumen diameter contributed to the remodeling of mesenteric arteries. Thus, large arteries adapted to the pressure elevation by an hypertrophic process, while mesenteric arteries underwent inward eutrophic remodeling. These results are in line with previous work from our group, showing that acute NOS inhibition leads to an elevation of protein synthesis in large, but not in small arteries[22]. Moreover, previous work showed eutrophic remodeling in resistance

arteries after chronic NOS inhibition [10, 11] and hypertrophic remodeling in large arteries [8], but never in the same animals. The distinction is important, considering the discrepancy in the literature regarding cardiovascular hypertrophy in the L-NAME model (see discussion in [26]). Interestingly, this heterogeneous remodeling also seems to occur in essential hypertension [9, 13, 28], suggesting that the L-NAME model and essential hypertension could share similar characteristics that are relevant to the heterogeneous remodeling process.

The hallmark of essential hypertension is an enhanced peripheral vascular resistance and L-NAME administration also elevates arterial pressure by favoring vasoconstriction [7]. Thus, resistance artery vasoconstriction could represent a common characteristic determining the remodeling process. Accordingly, the major aim of this study was to characterize the early vasoreactivity changes in small and large arteries during NOS inhibition, in an attempt to test the hypothesis that vasoconstriction (and normalization of wall stress) prevents vascular growth *in vivo*. This concept was elegantly studied *in vitro* by the group of Prewitt. They showed that vasoconstriction prevents the expression of early genes involved in the trophic process, by normalizing wall stress, while arteries not contracting show signs of hypertrophy [20]. Our data lend support to the hypothesis. Indeed, vasoconstriction was observed only in small resistance arteries *in vivo* after acute NOS inhibition, and this effect normalized (or even reduced) wall stress. In contrast to what was observed in large arteries [22], there was no elevation of protein synthesis in small arteries. Furthermore, in chronic conditions, small mesenteric arteries did not develop hypertrophy but eutrophic remodeling. In contrast, wall stress was acutely elevated in

the femoral artery, as no vasomotion was observed, and a significant increase in CSA, an index of hypertrophy/hyperplasia, was observed in chronic conditions. Thus, although the direct relationship between acute wall stress and chronic hypertrophy remains speculative, our observations suggest such a relationship in vivo. Further studies are needed to better identify the mechanism linking early vasoconstriction to inward eutrophic remodeling during endothelial dysfunction. The contribution of extracellular matrix components and integrins [29, 30] are likely and currently under investigation in our laboratory.

The MAP kinase ERK 1/2 is known to be part of an important cellular signaling pathway leading to hypertrophy in VSMC and other cell types [31]. It was thus of interest that ERK 1/2 phosphorylation was enhanced acutely by L-NA in small arteries, but that these arteries do not develop hypertrophy. In agreement, we have previously reported that five hours of NOS inhibition leads to ERK 1/2 phosphorylation both in large and small arteries, but protein synthesis was enhanced only in the former in basal and Ang II-stimulated conditions[22]. However, this previous study was done with non-pressor doses of L-arginine analogs and since elevated pressure was found to stimulate early index of hypertrophy in isolated mesenteric arteries[18, 19], we have measured in vivo protein synthesis after acute administration of pressor dose of L-NA. Our results confirm that protein synthesis is not enhanced in small mesenteric arteries in this context of increased pressure. These results have two implications: 1) the measurement of protein synthesis is a good early index of the type of remodeling that will ensue (enhanced in hypertrophic remodeling, but normal in eutrophic remodeling), and 2) the function of ERK 1/2 in



small arteries may not be related to growth. Accordingly, other studies performed in cultured cells from SHR[23] or human resistance arteries[24], or by using intact pressurized rat mesenteric arteries[25], have reported a contribution of ERK 1/2 to contraction after ANG II stimulation. In the present study, by using intravital microscopy, we have demonstrated, for the first time *in vivo*, that ERK 1/2 contributes to small mesenteric contraction induced by NOS inhibition. Indeed, L-NA-induced vasoconstriction was completely prevented by PD98059, at a dose that we confirmed to inhibit local ERK 1/2 phosphorylation *in vivo*. The involvement of ERK 1/2 in the vasoconstriction of arteries that will eventually undergo eutrophic remodeling is of great interest, considering the growing body of evidence indicating that specific members of MAPKs, including ERKs, mediate ECM and integrin-derived signaling events in vascular responses[32-34]. Indeed, the contribution of factors involved in the interaction of VSMC with extracellular matrix components represent an avenue to determine the transition of vasoconstriction to eutrophic remodeling.

Although, PD 98059 abrogated ERK 1/2 phosphorylation and L-NA-induced contraction in mesenteric arteries, as mentioned above, it did not affect arterial pressure. We believe that these results could be related to the site of injection of PD98059. Indeed, is it possible that because of its chemical properties[35], with limited tissue diffusion, the action of PD 98059 could have been most prominent in the mesenteric bed. Moreover, a study has demonstrated that the mesenteric bed contributes only partially to total peripheral vascular resistance, and hence pressure elevation, under NOS inhibition[36].

The increased CSA observed after chronic NOS in the present study, suggests that NO modulates vascular growth. Alternatively, the pressure increase produced by small artery vasoconstriction could also influence growth of large arteries, as an elevation of transmural pressure has been shown to induce growth of VSMCs in large arteries through ERK 1/2 phosphorylation[17]. However, we have previously reported that acute treatment with a non pressor dose of three different L-arginine analogs increased protein synthesis in large arteries[22], suggesting that NO has a pressure-independent growth inhibitory effect. In the present study, the pressure-dependence of the responses cannot be accounted for and it is likely that both factors, pressure and NOS inhibition, contribute to the trophic response. One further limitation of working in vivo is the presence of several modulatory mechanisms. Thus, it is not possible to rule out the involvement of neurohumoral influences on large arteries SMCs growth or proliferation during chronic NOS inhibition. Indeed, NO has been shown to interact with several systems such as sympathetic nerve fibers, the renin angiotensin system and endothelin-1[37-39], that could all contribute to the trophic process. Furthermore, all these systems also stimulate the ERK 1/2 signaling pathway[40-42]. However, considering that these trophic factors also cause hypertrophy of small arteries[22, 26, 43], their activation would have to be localized only to large arteries in the L-NAME model, since small arteries did not hypertrophy. Alternatively, their activation in small arteries could contribute only to the initial vasoconstriction, as it was previously suggested that the elevation of arterial pressure after acute NOS inhibition depends mainly on endothelin [44, 45]. It was not the aim of the present study to examine the intermediate effectors between NOS inhibition

and the parameters studied, but to document the final effects in vivo. Nonetheless, measurement of plasma renin activity confirms that the circulating renin-angiotensin system is not implicated in NOS-induced vasoconstriction.

In conclusion, our results lend further support to the concept that wall stress is a determinant of vascular hypertrophy. Indeed, normalization of this parameter in small resistance arteries through vasoconstriction blunts protein synthesis and appears to lead to eutrophic remodeling. In contrast, large arteries tend to normalize the elevated wall stress by thickening their wall, since they are not acutely compensating by a reduction of lumen diameter. Furthermore, while our previous report suggested that ERK 1/2 contributed to large artery hypertrophy under NOS inhibition [22], our new findings suggest that ERK 1/2 contributes to small artery vasoconstriction in vivo and may represent an initial signaling event in the evolution of vasoconstriction to inward eutrophic remodeling. These observations obtained from intravital microscopy could explain, at least in part, the heterogeneous vascular remodeling observed during NOS inhibition and, eventually, in essential hypertension.

## 6.6 REFERENCES

1. Rees D, Palmer R, Moncada S: Role of endothelium-derived nitric oxide relaxing factor in the regulation of blood pressure. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989;86:3375-3378.
2. Riberio M, Antunes E, De Nucci G, Lovisollo S, Zatz R: Chronic inhibition of nitric oxide synthase: A new model of arterial hypertension. *Hypertension* 1992;20:298-303.
3. Taddei S, Virdis A, Mattei P, Salvetti A: Vasodilation to acetylcholine in primary and secondary forms of human hypertension. *Hypertension* 1993;21:929-933.
4. Falloon B, Heagerty A: In vitro perfusion studies of human resistance artery function in essential hypertension. *Hypertension* 1994;24:16-23.
5. Dominiczak A, Bohr D: Nitric oxide and its putative role in hypertension. *Hypertension* 1995;25:1202-1211.
6. Vallance P, Collier J, Moncada S: Effects of endothelium-derived nitric oxide on peripheral tone in man. *Lancet* 1989;2:997-1000.
7. Sakai H, Hara H, Tsai A, Tsuchida E: Constriction of resistance arteries determines l-name-induced hypertension in a conscious hamster model. *Microvascular Research* 1999;60:21-27.
8. Kato H, Hou J, Chobanian AV, Brecher P: Effects of angiotensin ii infusion and inhibition of nitric oxide synthase on the rat aorta. *Hypertension* 1996;28:153-8.

9. Laurent S: Arterial wall hypertrophy and stiffness in essential hypertension patients. *Hypertension* 1995;26:355-362.
10. Deng L, Thibault G, Schiffrin E: Effect of hypertension induced by nitric oxide synthase inhibition on structure and function of resistance arteries in the rat. *Clin Exp Hypertens* 1993;15:527-537.
11. Moreau P, Takase H, Kung C, Rooijen Mv, Schaffner T, Lusher T: Structure and function of the rat basilar artery during chronic nitric oxide synthase inhibition. *Stroke* 1995;26:1922-1929.
12. Mulvany MJ, Baumbach GL, Aalkjaer C, Heagerty AM, Korsgaard N, Schiffrin EL, Heistad DD: Vascular remodeling (letter). *Hypertension* 1996;28:505-506.
13. Mulvany M: Small artery remodeling in hypertension. *Curr Hypertens Reports* 2002;4:49-55.
14. Boudier H: Arteriolar and capillary remodeling in hypertension. *Drugs* 1999;58:43-47.
15. le Noble F, Stassen F, Hacking W, Boudier H: Angiogenesis and hypertension. *Journal of Hypertension* 1998;16:1563-1572.
16. Vicaut E: Microcirculation and arterial hypertension. *Drugs* 1999;58:1-11.
17. Xu Q, Liu Y, Goroscope M, Udelsman R, Holbrook N: Acute hypertension activates mitogen-activated protein kinases in arterial wall. *J Clin Invest* 1996;97:508-514.

18. Allen S, Liang H, Hill M, Prewitt R: Elevated pressure stimulates protooncogene expression in isolated mesenteric arteries. *Am J Physiol (Heart Circ Physiol)* 1996;271:H1517-H1523.
19. Wesselman J, Dobrian A, Schriver S, Prewitt R: Src tyrosine kinases and extracellular signal-regulated kinase 1/2 mitogen-activated protein kinases mediate pressure-induced c-fos expression in cannulated rat mesenteric small arteries. *Hypertension* 2001;37:955-960.
20. Allen S, Wade S, Prewitt R: Myogenic tone attenuates pressure-induced gene expression in isolated small arteries. *Hypertension* 1997;30:203-208.
21. Bakker EN, van Der Meulen ET, Spaan JA, VanBavel E: Organoid culture of cannulated rat resistance arteries: Effect of serum factors on vasoactivity and remodeling. *Am J Physiol (Heart Circ Physiol)* 2000;278:H1233-40.
22. Martens FM, Demeilliers B, Girardot D, Daigle C, Dao HH, deBlois D, Moreau P: Vessel-specific stimulation of protein synthesis by nitric oxide synthase inhibition: Role of extracellular signal-regulated kinases 1/2. *Hypertension* 2002;39:16-21.
23. Thouyz R, Mabrouk E, He G, Wu X-H, Schiffrin E: Mitogen-activated protein/extracellular signal-regulated kinase inhibition attenuates angiotensin ii-mediated signaling and contraction in shr vascular smooth muscle cells. *Circulation Research* 1999;84:505-515.
24. Thouyz R, He G, Deng L, Schiffrin E: Role of extracellular signal-regulated kinases in angiotensin ii-stimulated contraction of smooth muscles cells from human resistance arteries. *Circulation* 1999;99:392-399.

25. Matrougui K, Eskildsen-Helmond Y, Fiebeler A, Henrion D, Levy B, Tedgui A, Mulvany M: Angiotensin ii stimulates extracellular signal-regulated kinase activity in intact pressurized rat mesenteric resistance arteries. *Hypertension* 2000;36:617-621.
26. Moreau P: Effect of chronic nitric oxide deficiency on angiotensin ii-induced hypertrophy of rat basilar artery. *Stroke* 1998;29:1031-1036.
27. Takase H, Moreau P, Kung C, Nava E, Lusher T: Antihypertensive therapy prevents endothelial dysfunction in chronic nitric oxide deficiency. *Hypertension* 1996;27:25-31.
28. Heagerty A, Izzard A: Small-artery changes in hypertension. *Journal of Hypertension* 1995;13:1560-1565.
29. Intengan H, Schiffrin E: Structure and mechanical properties of resistance arteries in hypertension: Role of adhesion molecules and extracellular matrix determinants. *Hypertension* 2000;36:312-318.
30. Osol G: Mechanotransduction by vascular smooth muscle. *Journal of Vascular Research* 1995;32:275-292.
31. Servant MJ, Giasson E, Meloche S: Inhibition of growth factor-induced protein synthesis by a selective mek inhibitor in aortic smooth muscle cells. *Journal of Biological Chemistry* 1996;271:16047-16052.
32. Boudreau N, Jones P: Extracellular matrix and integrin signalling: The shape of things to come. *Biochemical Society* 1999;339:481-488.
33. Giancotti F, Ruoslahti E: Integrin signaling. *Science* 1999;285:1028-1032.

34. Goldschmidt M, McLeod K, Taylor W: Integrin-mediated mechanotransduction in vascular smooth muscle cells: Frequency and force response characteristics. *Circulation Research* 2001;88:674-680.
35. Alessi D, Cuanda A, Cohen P, Dudley D, Saltiel A: Pd 098059 is a specific inhibitor of the activation of mapk in vitro and in vivo. *Journal of Biological Chemistry* 1995;270:27489-27494.
36. Greenblatt E, Loeb A, Longnecher D: Marked regional heterogeneity in the magnitude of edrf/no-mediated vascular tone in awake rats. *Journal of Cardiovascular Pharmacology* 1992;21:235-240.
37. Moreau P, Takase H, Kung C, Shaw S, Lusher T: Blood pressure and vascular effects of endothelin blockade in chronic nitric oxide-deficient hypertension. *Hypertension* 1997;29:763-769.
38. Takemoto M, Egashira K, Tomita H, Usui M, Okamoto H, Kitabatake A, Shimokawa H, Sueishi K, Takeshita A: Chronic angiotensin-converting enzyme inhibition and angiotensin ii type 1 receptor blockade: Effects on cardiovascular remodeling in rats induced by long-term blockade of nitric oxide synthesis. *Hypertension* 1997;30:1621-1627.
39. Zanchi A, Schaad N, Osterheld M-C, Grouzmann E, Nussberger J, Brunner H, Waeber B: Effects of chronic no synthase inhibition in rats on renin-angiotensin system and sympathetic nervous system. *Am J Physiol* 1995:H2267-H2273.
40. Suzuki E, Nagata D, Kakoki M, Hayakawa H, Goto A, Omata M, Hirata Y: Molecular mechanisms of endothelin-1-induced cell-cycle progression: Involvement of extracellular signal-regulated kinase, protein kinase c, and phosphatidylinositol 3-kinase at distinct points. *Circulation Research* 1999;84:611-619.



41. Thouyz R, Deng L, He G, Wu H, Schiffrin E: Angiotensin ii stimulates DNA and protein synthesis in vascular smooth muscle cells from human arteries: Role of extracellular signal-regulated kinases. *Journal of Hypertension* 1999;17:907-916.
42. Yu S, Tsai S, Guh J, Ko F, Teng C, Ou J: Mechanisms of catecholamine-induced proliferation of vascular smooth muscle cells. *Circulation* 1996;94:547-554.
43. Dao HH, Martens FM, Lariviere R, Yamaguchi N, Cernacek P, de Champlain J, Moreau P: Transient involvement of endothelin in hypertrophic remodeling of small arteries. *J Hypertens* 2001;19:1801-12.
44. Banting J, Friberg P, Adams M: Acute hypertension after nitric oxide synthase inhibition is mediated primarily by increased endothelin vasoconstriction. *Journal of Hypertension* 1996;14:975-961.
45. Richard V, Hogie M, Clozel M, Löffler B-M, Thuillez C: In vivo evidence of an endothelin-induced vasopressor tone after inhibition of nitric oxide synthesis in rats. *Circulation* 1995;91:771-775.

## TABLES

**TABLE 1** - Local mean arterial pressure (MAP) and morphological characteristics of femoral and mesenteric arteries in control and rats chronically treated with L-NAME.

Parameters	Femoral Artery		Mesenteric Artery	
	Control	L-NAME	Control	L-NAME
Local MAP, mmHg	103 ± 3	153* ± 11	97 ± 4	150* ± 16
Lumen diameter, μm	336 ± 15	303 ± 34	260 ± 8	237 ± 7
External diameter, μm	440 ± 14	448 ± 25	310 ± 11	291 ± 8
Media thickness, μm	52 ± 3	72* ± 6	25 ± 1	27 ± 1
M/L (%)	15.6 ± 1.2	26.6* ± 4.9	9.7 ± 0.4	11.5* ± 0.2
Media CSA, μm <sup>2</sup> × 10 <sup>3</sup>	63 ± 4	83* ± 5	23 ± 1.8	23 ± 1.2

M/L: media thickness / lumen diameter ratio; CSA: cross-sectional area  
 \*P<0.05 vs respective control values.

**TABLE 2** - Morphological characteristics of femoral and mesenteric arteries in control and rats treated acutely with L-NA.

Parameters	Femoral Artery		Mesenteric Artery	
	Control	L-NA	Control	L-NA
External CSA ( $\mu\text{m}^2 \times 10^3$ )	116 $\pm$ 8	123 $\pm$ 5	27 $\pm$ 3	18* $\pm$ 2
Medial CSA ( $\mu\text{m}^2 \times 10^3$ )	103 $\pm$ 13	103 $\pm$ 8	12 $\pm$ 1	12 $\pm$ 1
Lumen Area ( $\mu\text{m}^2 \times 10^3$ )	28.8 $\pm$ 7.5	31.7 $\pm$ 8.2	15.3 $\pm$ 2.6	5.3* $\pm$ 2.0
Lumen diameter ( $\mu\text{m}$ )	189 $\pm$ 24	197 $\pm$ 28	137 $\pm$ 13	94* $\pm$ 12
Media thickness ( $\mu\text{m}$ )	106 $\pm$ 9	104 $\pm$ 9	24 $\pm$ 2	31 $\pm$ 5

The external cross-sectional area (CSA) was calculated from in vivo external diameter (Figures 1B and 1E), while the other morphological parameters were deduced from in vitro measurements on the same arteries. These values were used to calculate wall stress (Figures 1C and F). See "Materials and Methods" for calculations.

P\* < 0.05 vs respective control values.

## FIGURE LEGENDS

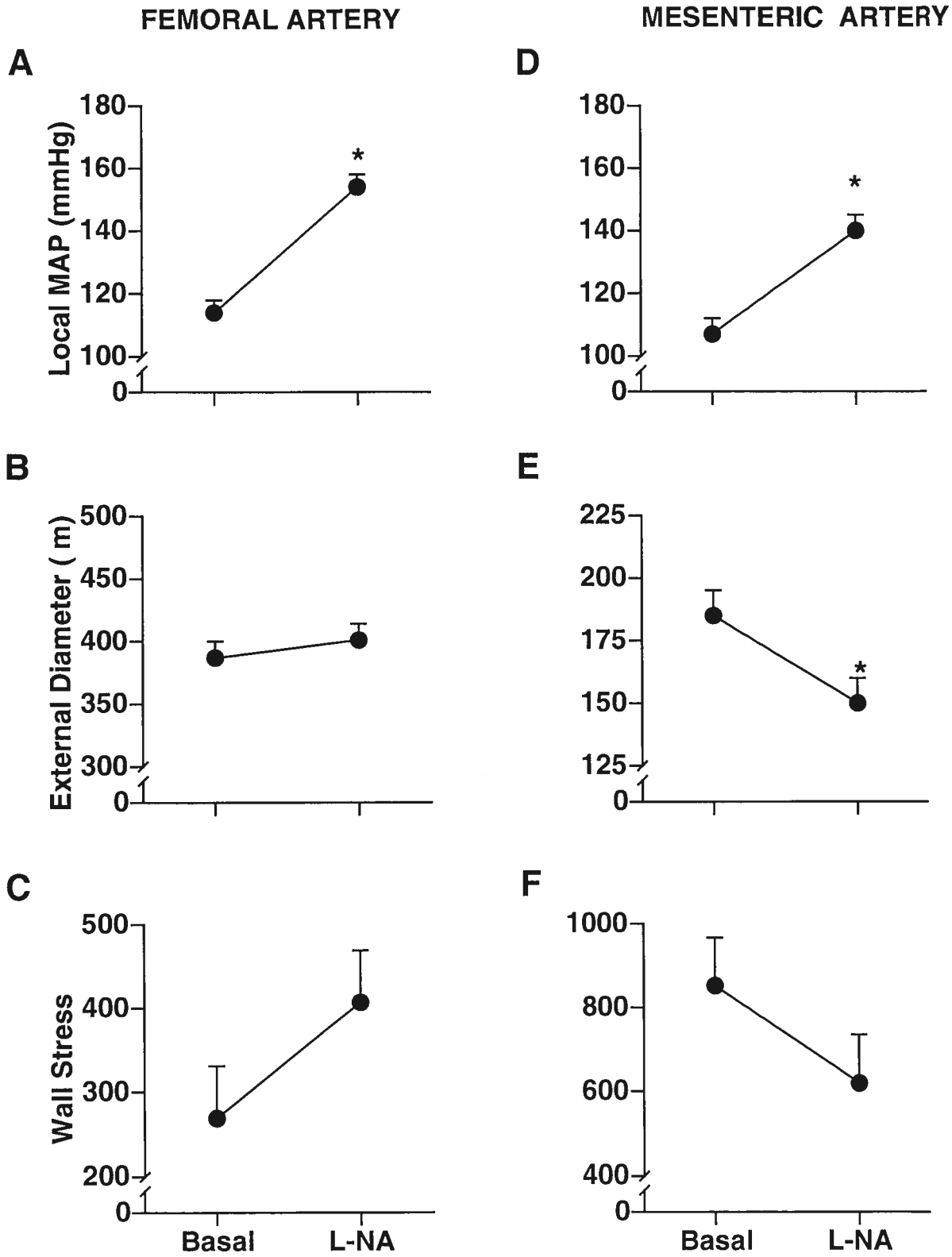
**Fig. 1** Maximal effect of acute NOS inhibition on local mean arterial pressure (MAP), external diameter and wall stress ( $\times 10^3$  dyn/cm<sup>2</sup>) in rat femoral (A,B,C) and mesenteric (D, E, F) arteries before and after drug administration (L-NA, 100 mg/kg). \*P<0.05 vs basal, paired t-test.

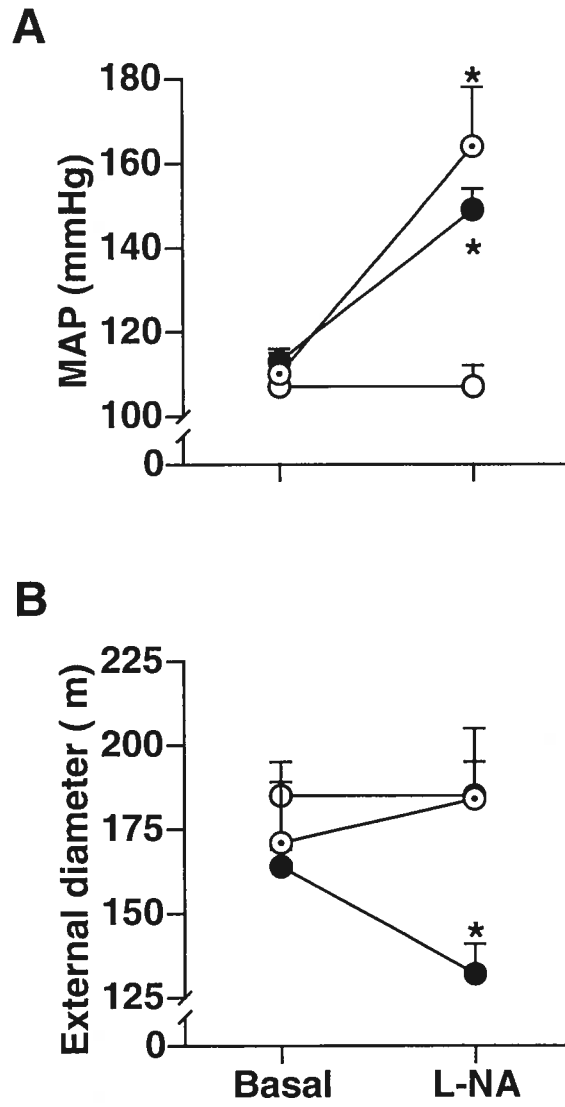
**Fig. 2** Maximal effect of saline (hollow symbols), L-NA (100 mg/kg, filled symbols) and L-NA plus PD 98059 (3 mg/kg, given one hour before, dotted circles ⊙) on (A) mean arterial pressure and (B) mesenteric external diameter.

\*P<0.05 vs basal, ANOVA plus Bonferroni's correction for multiple comparisons.

**Fig. 3 (A)** Representative western blot using a phosphospecific ERK 1/2 (p44-p42 MAP Kinase) antibody in rats treated with saline (Ctl), L-NA and L-NA plus PD 98059 (3 mg/kg, given one hour before). **(B)** Mean relative optical density of phosphorylated ERK 1/2. Each bar represents the mean of 4 animals, performed on 3 separated experiments. Values were corrected by the control value (fixed at 100) on each gel.

\*P<0.05 vs 100, one sample analysis.

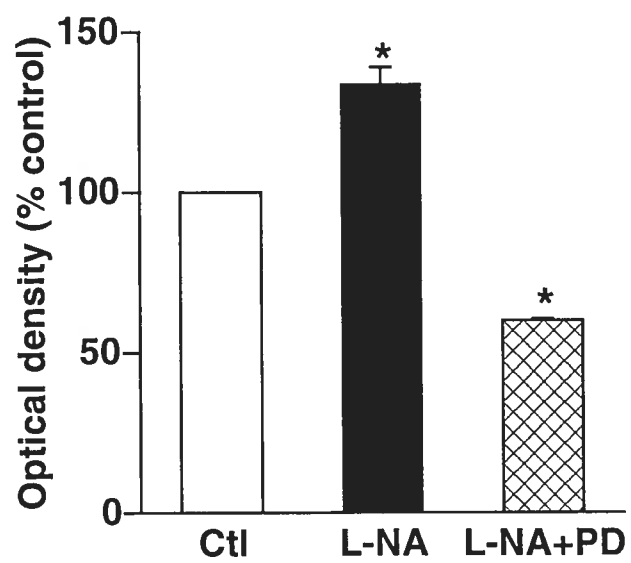




**A**



**B**



Re-soumis au journal Hypertension  
29 septembre 2005

**CHAPITRE 7. P21-ACTIVATED PROTEIN KINASE 1,  
AN EARLY AND STABLE SIGNALING MARKER OF  
EUTROPHIC REMODELING IN RESISTANCE  
ARTERIES**

Daphné Girardot, M.Sc. <sup>1</sup>, Denis deBlois, Ph.D. <sup>2</sup>, and Pierre Moreau, Ph.D. <sup>1</sup>

<sup>1</sup>Faculty of Pharmacy and <sup>2</sup>Department of Pharmacology, Faculty of Medicine,  
Université de Montréal, Québec, Canada



## 7.1 ABSTRACT

As in essential hypertension, L-NAME-induced hypertension leads to eutrophic remodeling (reduced lumen diameter without change in cross-sectional area) in small resistance arteries. During this process, small resistance arteries could reorganize their actin-based cytoskeleton by altering signaling involved in this cellular process. Our objective was to identify a specific marker for eutrophic remodeling by measuring the kinetic of expression of proteins implicated in actin polymerization, such as Dia1, p38 MAPK and p21-activated protein kinase (PAK1), during NOS inhibition. Wistar rats were treated with L-NAME (50 mg/kg/day) during 1, 3, 6 and 24 hours, and 3, 7 and 14 days. Another group of rats received angiotensin II (as a comparative model of hypertrophic remodeling) at a dose of 200 ng/kg/min for similar durations. A third group of rats served as controls. Mesenteric arteries were harvested and used for the measurement of their structure and of protein expression by western immunoblotting. In the L-NAME group, Dia1 increased transiently to become reduced after 3 days. The expression of p38 MAPK increased after 3 and 7 days of treatment, while that of PAK1 increased up to four folds throughout the treatment interval. In the ANG II-treated rats, p38 MAPK increased after 1 hour to return to baseline values. Ang II did not modify Dia1 and PAK1 protein expression. In conclusion, we observed a marked and sustained over expression of PAK1 in mesenteric arteries during chronic L-NAME-induced hypertension. Considering that PAK1 is known to stabilize polymerized actin filaments, this process appears significant during the development hypertension-induced eutrophic remodeling.

**Keywords :** vascular remodeling, L-NAME-induced hypertension, resistance arteries, actin polymerization, PAK1

## 7.2 INTRODUCTION

Small resistance arteries adapt to chronic elevation of arterial pressure by increasing their media to lumen ratio (M/L), in order to normalize their wall stress<sup>1</sup>. In essential hypertension, these arteries undergo a reduction of their lumen diameter without alteration of cross-sectional area (CSA), a process known as inward eutrophic remodeling<sup>2, 3</sup>. This remodeling is probably not without consequences. Indeed, considering Poiseuille's relation which dictates that the resistance varies inversely with the fourth power of the blood vessel radius, eutrophic remodeling is likely to contribute to the total peripheral resistance elevation seen in hypertension<sup>1</sup>. Moreover, there is mounting evidence that eutrophic remodeling contributes to decrease organ perfusion, thus contributing to hypertension-induced target organ damage<sup>4, 5</sup>. Endothelial dysfunction is another key vascular alteration of essential hypertension, resulting mainly from an impairment of nitric oxide (NO) availability<sup>6, 7</sup>. Interestingly, chronic nitric-oxide synthase (NOS) inhibition with N $\gamma$ -nitro-arginine-methyl ester (L-NAME), leads to hypertension in rats<sup>8</sup>, characterized by increased peripheral resistance<sup>9</sup> and inward eutrophic remodeling of resistance arteries<sup>10,11</sup>.

Since small arteries contribute to the elevation of arterial pressure by reducing their lumen (contraction leading to peripheral resistance), they simultaneously normalize their wall stress, which is believed to eliminate the need for a hypertrophic response to the pressure load<sup>12, 13</sup>. Additional studies, including ours, have proposed that sustained small artery vasoconstriction precedes inward eutrophic remodeling<sup>14, 15</sup>. However, there is a lack of understanding of how active vasoconstriction evolves

into structural remodeling. Recent studies have demonstrated that smooth muscle cells adapt to changes in their external environment by reorganizing their actin-based cytoskeleton and by altering signaling pathways that regulate contractile protein activation and function<sup>16,17</sup>. Small GTPases, such as Rho and Rac have been reported as molecular switches for actin cytoskeletal reorganization<sup>18,19</sup>.

The hypothesis tested is that during eutrophic remodeling, vascular smooth muscle cells reorganize their actin-based cytoskeleton by altering signaling dynamically involved in actin remodeling. Since Rho and Rac also contribute to a wide range of cellular responses (growth, migration), measuring the expression of their downstream effectors known to be directly involved in actin polymerization appeared more appropriate. Our objective was thus to determine the kinetic of mDia1 (Rho pathway), p38 MAPK and p21-activated protein kinase (PAK1, Rac pathway) expression, in an *in vivo* model of eutrophic remodeling (L-NAME rat model). A comparative *in vivo* model known to induce hypertrophic remodeling in small resistance arteries (ANG II administration<sup>20,21</sup>) was used in an effort to find signaling events specific for eutrophic remodeling.

## 7.3 METHODS

### Treatments

Male Wistar rats weighing between 250 and 275 g were purchased from Charles River (St-Constant, Canada). All protocols were approved by the Animal Care Committee of Université de Montréal. A group of rats were treated with L-

NAME at a dose of 50 mg/kg/day and were sacrificed after 1, 3, 6 and 24 hours, and 3, 7 and 14 days. Drug treatments less than 24 h were made by intravenous infusion and for longer times of treatment, L-NAME was added to the drinking water. A second group of rats received ANG II at a dose of 200 ng/kg/minutes following the same time course as L-NAME treated rats. ANG II was administered intravenously for 1, 3 and 6 hour subgroups, and through osmotic pumps (Alzet, models 1002 and 1003D, Cupertino) for other time points. Finally, a third group of rats served as controls. Twenty four hours before sacrifice, a polyethylene catheter (PE10 tubing welded into a PE50 tubing) was inserted in the femoral artery under anesthesia with sodium pentobarbital (50 mg/kg, i.p.). This allowed for measurements of arterial pressure through a pressure transducer in awake and freely moving condition. Rats were sacrificed by pentobarbital overdose (150 mg/kg) and a third order artery from the mesenteric tree was used for measurement of arterial structure in rats treated for 14 days with L-NAME or Ang II and in age-matched control rats (n=8/group). In our experience, 14 days represent the minimal period to observe significant remodeling<sup>22</sup>. Mesenteric artery structure was determined in a perfused vessel chamber (Living System Instrumentation, Burlington, USA) at a constant perfusion pressure of 40 mmHg in fully relaxed conditions, as previously described<sup>23</sup>. This allowed for the measurements of lumen diameter, external diameter and media thickness of small mesenteric arteries, from which media to lumen ratio (M/L) and cross-sectional area (CSA) were calculated. Mesenteric CSA was calculated as  $(\pi/4) \times [(\text{External diameter})^2 - (\text{internal diameter})^2]$ .

### **Western immunoblotting**

All the arterial mesenterium, excluding the superior mesenteric artery, were harvested and frozen at  $-80^{\circ}\text{C}$ . Samples were pulverized in dry ice and liquid nitrogen and homogenized using polytron in ice-cold lysis buffer (PBS 20%, Igepal CA-630 1%, Na-deoxycholate 0.5%, SDS 0.1%, PMSF 0.25% and aprotinine 0.1%). After 30 minutes of incubation at  $4^{\circ}\text{C}$ , the protein supernatant was separated by centrifugation ( $4^{\circ}\text{C}$ , 30 minutes, 14,000g) and protein concentration obtained with a Micro BCA Protein Reagent Kit (Pierce). The kinetic expression of proteins implicated in remodeling the actin-based cytoskeleton, such as mDia1, p38 and PAK1 was determined by western immunoblotting, using equal amount of protein ( $20\ \mu\text{g}$ ) loaded on a 6 % SDS polyacrilamide gel for p140mDia and PAK1 and on a 10 % SDS polyacrilamide gel for p38. Proteins were transferred to a nitrocellulose membrane overnight at  $4^{\circ}\text{C}$ . Membranes were then incubated with specific mDia1 (final dilution 1 :500, BD Transduction Laboratories, Mississauga, Ontario, Canada) p38 and PAK1 (both from at a final dilution of 1 :100 and from Cell Signaling Technology, Pickering, Ontario, Canada) antibodies overnight at  $4^{\circ}\text{C}$ . Membranes were washed and incubated for 90 minutes at room temperature with a secondary antibody (p38 and PAK1 : anti-rabbit IgG, H&L, HRP-linked; mDia1 : anti-mouse IgG, H&L, HRP-linked, Cell Signaling Technology). After the final wash, membranes were incubated 5 minutes with a chemiluminescent substrate (ChemiGlow, Alpha Innotech, San Leandro, CA, USA). Results were normalized to control values on each gel to account for methodological variation.

## Drugs and Statistical analysis

L-NAME and Ang II were obtained from Sigma (Oakville, Ontario, Canada). Data are presented as mean  $\pm$  SEM. Protein expression from western immunoblotting was expressed as the percent change from control values obtained on the same gel. Statistical analysis was performed by ANOVA followed by Bonferroni's correction for multiple comparisons (hemodynamic and mesenteric artery structure) and by One-sample analysis for Western blots (comparing to the reference value of 100%). A *P* value less than 0.05 was considered significant.

## 7.4 RESULTS

### Haemodynamic and resistance arteries structure

Inhibition of eNOS with L-NAME increased significantly the mean arterial pressure already from 1 hr until 14 days of treatment (**Fig. 1A**). In contrast, mean arterial pressure remained similar to control values in ANG II-treated rats.

After 14 days of L-NAME and ANG II treatment, internal and external diameters were modified. In the L-NAME group, internal diameter was reduced (from  $244.4 \pm 8.1 \mu\text{m}$  in controls to  $236.9 \pm 5.5 \mu\text{m}$ ,  $p < 0.05$ ), while the external diameter was unaltered ( $284.3 \pm 8.3$  and  $283.2 \pm 6.6 \mu\text{m}$ , respectively). In Ang II-treated rats, both internal ( $299.3 \pm 19.2 \mu\text{m}$ ) and external ( $361.3 \pm 16.9 \mu\text{m}$ ) diameters increased ( $p > 0.05$ ). Thus, M/L ratio was increased in both groups (**Fig. 1B**), but CSA was only enhanced in the ANG II group (**Fig. 1C**).

### **Kinetic of protein expression**

The expression of mDial increased rapidly after 1 hour of L-NAME administration but decreased significantly at 3 days and remained below control values thereafter (n.s.) (**Fig. 2A**). In contrast, ANG II had no significant effect on mDial expression in mesenteric arteries (**Fig. 2A**). The mesenteric artery expression of p38 MAPK increased slowly at 3 and 7 days to return to baseline levels at 14 days of L-NAME treatment (**Fig. 2B**). In contrast, Ang II induced only a transient elevation of p38 MAPK at 1 hr (**Fig. 2B**). In L-NAME treated rats, PAK1 expression was increased significantly throughout the time course, except for the 6 hr and 14 days time points where the elevation did not reach statistical significance (**Fig. 2C**). Mesenteric artery PAK1 expression in the ANG II group was not different from controls (**Fig. 2C**). To further confirm that PAK1 was limited to eutrophic remodeling, its kinetic of expression was measured in the aorta of the same L-NAME treated rats. As shown in **figure 3A**, PAK1 expression in the aorta did not differ from control values.

Since mDial and PAK1 are effectors of the Rho and the Rac pathways, respectively, and that these pathways appear to have antagonistic effects (see discussion), we are proposing that the PAK1/mDial ratio could represent an index of the dominant pathway in terms of actin polymerization. **Figure 3B** illustrates that in small mesenteric arteries undergoing eutrophic remodeling, the Rac pathway predominates, reaching significance after the first day of the remodeling process.



## 7.5 DISCUSSION

Nitric oxide synthase inhibition led to a predictable elevation of mean arterial pressure from 1 hour to 14 days of treatment. Moreover, the structural measurement of mesenteric arteries after 14 days of L-NAME treatment, showing an increase of the M/L ratio without elevation of the CSA, confirmed the type of remodeling expected in this model<sup>10, 11</sup>, which is comparable to small artery remodeling found in patients with essential hypertension<sup>2</sup>. Previous studies have shown that Ang II induces hypertrophy of small arteries partially by a pressure-independent mechanism<sup>21, 24</sup>. For that reason, the Ang II model was selected to compare the kinetic of expression of candidate proteins with that of the L-NAME model. The dose of Ang II selected was previously reported to produce an elevation of arterial pressure of approximately 30 mmHg<sup>20, 24</sup>. However, our results did not show any significant elevation of blood pressure for reasons that we are unable to explain. Nonetheless, the expected increase in small artery M/L ratio and CSA characterizing hypertrophic remodeling was observed, lending strong support to the proposed pressure-independent trophic effect of Ang II.

Our general hypothesis is that an initial vasoconstriction of small arteries, which contributes to the elevation of arterial pressure, evolves into eutrophic remodeling. We explored the involvement of VSMC actin-based cytoskeleton reorganization as a link between vasoconstriction and remodeling. Current evidence suggests that dynamic remodeling of the actin cytoskeleton may provide an important mechanism for mechanical adaptation in smooth muscle cells<sup>17</sup>. It has been well documented that the Rho pathway is implicated in sustained smooth muscle cell

contraction by a mechanism underlying  $\text{Ca}^{2+}$ -sensitization through the inhibition of myosin phosphatase activity, in addition of its action on myosin light chain phosphorylation<sup>25</sup>. More recently, it has been reported that Rho leads to contraction by a mechanism implicating actin polymerization through its downstream effector mDia1 (mammalian homolog of *Drosophila diaphanous*)<sup>26</sup>. Indeed, Watanabe et al. have reported that mDia1 could provide a direct molecular link between Rho and profilin, which have been characterized separately as regulators of the actin cytoskeleton<sup>27</sup>. Actin polymerization by mDia1 seems an important contraction mechanism when external stimuli or contraction-generated force is applied on cells<sup>28</sup>. In the present study, we have shown a marked over expression of mDia1 after 1 hour of L-NAME in mesenteric arteries, while in ANG II treated rats, mDia1 expression was unchanged at all times. These findings are in agreement with our hypothesis suggesting that an initial vasoconstriction evolves into eutrophic remodeling. Indeed, the early overexpression of mDia1 in L-NAME treated rats suggests a contribution of the Rho pathway in the very early phase by fostering acute actin polymerization. Since a significant reduction of mDia1 was observed after 3 days of treatment with L-NAME, we can speculate that other mechanisms are responsible for the consolidation of the remodeling process.

It has been suggested that the downstream effectors of Rac, such as p38 MAPK, are activated in response to mechanical stress *in vitro*, leading to sustained contraction of VSMC<sup>29</sup>. Indeed, it has been previously reported that p38 MAPK, together with heat shock protein 27 (HSP 27), was implicated in the maintenance of the contractile response and actin polymerization<sup>30,31</sup>. Moreover, another recent study

has demonstrated a specific involvement of the p38 MAPK pathway in the mechanotransduction of wall tension in pressurized skeletal arterioles<sup>32</sup>. Taking these considerations into account, the late overexpression of p38 MAPK observed in our study (days 3 and 7) suggests that it could be implicated in the transition from vasoconstriction to eutrophic remodeling.

Evidence is mounting that PAK1 has an important role in the regulation of the actin cytoskeleton dynamics<sup>33,34</sup>. It has been identified as a direct effector of Rac and a potential upstream activator of p38 MAPK. The contribution of PAK1 on actin-based cytoskeleton remodeling seems to be antagonistic to Rho-dependant MLC phosphorylation via inhibition of the MLCK or by direct phosphorylation of myosin II heavy chain<sup>33-36</sup>. Another target of PAK for its regulation of actin dynamics is LIM Kinase (LIMK). When activated by PAK, LIMK inactivates cofilin and thus promotes stabilization of actin filaments<sup>33,34</sup>. Our experiments have revealed, for the first time, a marked and sustained over expression of PAK1 in mesenteric arteries during L-NAME treatment. Considering the *in vivo* nature of our experiments, where modulations are often subtle, the magnitude of the increase suggest a prominent role of PAK1 in the remodeling process. Interestingly, PAK1 expression was not elevated by Ang II, which produced hypertrophic remodeling of resistance arteries. Moreover, we have measured the kinetic of PAK1 expression in the aorta of L-NAME treated rats to confirm that its over expression in mesenteric arteries was not explained by NOS blockade or pressure elevation. We have previously reported that there is heterogeneous vascular remodeling in L-NAME-induced hypertension according to the artery type, as in essential hypertension<sup>15, 22, 37</sup>. Indeed there is hypertrophic

remodeling of large arteries, but eutrophic remodeling of small arteries following L-NAME treatment. Thus, PAK1 appears to be specifically up regulated in small mesenteric arteries undergoing eutrophic remodeling, where it could promote actin filament stabilization.

As mentioned above, Rho and Rac pathways are increasingly suggested to be antagonistic. Looking at some of their downstream effectors, our results support that such a functional interaction occurs in vivo. The early overexpression of mDia1 is probably implicated in the actin polymerization process to ensure the translation of the global vasoconstriction force to the cell, so that wall tension is normalized. PAK 1 could then be over expressed to stabilize the polymerized actin, preventing it from depolymerization. Simultaneously, p38 MAPK could take over the actin polymerization process, maybe through PAK1 signaling. If we accept that mDia1 is a direct effector of Rho involved in actin polymerization and that PAK1 is a direct effector of Rac involved in stabilization of polymerization, the ratio between PAK1 and mDia1 expression could provide a visual representation of the dynamics of actin polymerization. A ratio below one would suggest active actin polymerization, while a ratio over one represents stabilization. From figure 3B, one can clearly see that during the remodeling process, actin stabilization seems to predominate. In addition, this process appears to be engaged early on, although it became significant at day 3.

In the ANG II-induced hypertrophic remodeling model, few of the signaling elements that were measured in this study were modified. In the past, we have demonstrated early ERK 1/2 activation and the involvement of a rapamycin-sensitive pathway in the trophic response<sup>38</sup>. The early activation of the p38 MAPK pathway by

Ang II has been previously reported and related to the generation of local reactive oxygen species<sup>39</sup>.

### **Perspectives**

The difficulty to dissociate the local vascular effects from the hemodynamic conditions represents a limitation of *in vivo* studies. However, in the present study both cannot and should not be dissociated, and working *in vivo* becomes a distinct advantage. Indeed, according to our hypothesis, eutrophic remodeling will only occur if the arteries first constrict, which will inevitably elevate pressure. Accordingly, in a previous study using the same L-NAME model, we have shown that if arterial pressure is prevented from increasing by vasodilators, the remodeling process is completely blunted<sup>11</sup>. Since the majority of studies measuring cell signaling of actin-based cytoskeleton reorganization have been made *in vitro*, our study offers the advantage of studying the expression of target proteins with time during the whole remodeling process. Thus, the kinetic of protein expression presented here, together with a previous paper reporting the time-course of remodeling development<sup>22</sup>, could be valuable to others wishing to study the transition from vasoconstriction to overt remodeling. Indeed, studies of eutrophic remodeling *in vivo* have traditionally been limited to long-term studies, since there were no surrogate markers of the process. Although our finding of PAK1 overexpression needs to be substantiated in other models, and its involvement confirmed by some kind of pharmacological intervention, we believe that it could serve as an early marker, thus allowing shorter studies to be performed with pharmacological agents difficult to administer *in vivo* for prolonged periods due to toxicity or cost.

## **Conclusion**

By comparing a model of small artery eutrophic remodeling to conditions of small and large artery hypertrophic remodeling in vivo, our study allowed the identification of a signaling element, PAK1, that is specific for eutrophic remodeling. Indeed, this downstream effector of the small GTPase Rac involved in the stabilization of polymerized actin filaments was markedly up regulated during the remodeling process, along with p38 MAPK also stimulated by the Rac pathway. Thus, according to the known effects of PAK1, actin filament stabilization appears to be an intermediate step between acute vasoconstriction and chronic remodeling.

## **Acknowledgements**

This work has been supported by an operating grant from the Heart and Stroke Foundation of Canada. PM is a Junior 2 scholar from the “Fonds de la recherche en santé du Québec (FRSQ). DG was financially supported by a research and development (Rx&D) / Canadian Institutes for Health Research (CIHR) studentship. The authors acknowledge the skillful technical assistance of Louise Ida Grondin.

## 7.6 REFERENCES

- 1 Heagerty AM, Aalkjaer C, Bund SJ, Korsgaard N, Mulvany MJ: Small artery structure in hypertension. Dual processes of remodeling and growth. *Hypertension* 1993;21:391-7.
- 2 Mulvany MJ: Small artery remodeling in hypertension. *Curr Hypertens Rep* 2002;4:49-55.
- 3 Mulvany MJ, Baumbach GL, Aalkjaer C, Heagerty AM, Korsgaard N, Schiffrin EL, Heistad DD: Vascular remodeling. *Hypertension* 1996;28:505-6.
- 4 Park JB, Schiffrin EL: Small artery remodeling is the most prevalent (earliest?) form of target organ damage in mild essential hypertension. *J Hypertens* 2001;19:921-30.
- 5 Rizzoni D, Porteri E, Boari GE, De Ciuceis C, Sleiman I, Muiesan ML, Castellano M, Miclini M, Agabiti-Rosei E: Prognostic significance of small-artery structure in hypertension. *Circulation* 2003;108:2230-5.
- 6 Falloon BJ, Heagerty AM: In vitro perfusion studies of human resistance artery function in essential hypertension. *Hypertension* 1994;24:16-23.
- 7 Taddei S, Virdis A, Mattei P, Salvetti A: Vasodilation to acetylcholine in primary and secondary forms of human hypertension. *Hypertension* 1993;21:929-33.
- 8 Ribeiro MO, Antunes E, de Nucci G, Lovisollo SM, Zatz R: Chronic inhibition of nitric oxide synthesis. A new model of arterial hypertension. *Hypertension* 1992;20:298-303.
- 9 Sakai H, Hara H, Tsai AG, Tsuchida E, Intaglietta M: Constriction of resistance arteries determines I-NAME-induced hypertension in a conscious hamster model. *Microvasc Res* 2000;60:21-7.
- 10 Deng LY, Thibault G, Schiffrin EL: Effect of hypertension induced by nitric oxide synthase inhibition on structure and function of resistance arteries in the rat. *Clin Exp Hypertens* 1993;15:527-37.
- 11 Moreau P, Takase H, Kung CF, van Rooijen MM, Schaffner T, Luscher TF: Structure and function of the rat basilar artery during chronic nitric oxide synthase inhibition. *Stroke* 1995;26:1922-8; discussion 1928-9.

- 12 Osol G: Mechanotransduction by vascular smooth muscle. *J Vasc Res* 1995;32:275-92.
- 13 Allen SP, Wade SS, Prewitt RL: Myogenic tone attenuates pressure-induced gene expression in isolated small arteries. *Hypertension* 1997;30:203-8.
- 14 Bakker EN, van der Meulen ET, van den Berg BM, Everts V, Spaan JA, VanBavel E: Inward remodeling follows chronic vasoconstriction in isolated resistance arteries. *J Vasc Res* 2002;39:12-20.
- 15 Girardot D, Demeilliers B, deBlois D, Moreau P: ERK1/2-mediated vasoconstriction normalizes wall stress in small mesenteric arteries during NOS inhibition in vivo. *J Cardiovasc Pharmacol* 2003;42:339-47.
- 16 Gunst SJ, Tang DD, Opazo Saez A: Cytoskeletal remodeling of the airway smooth muscle cell: a mechanism for adaptation to mechanical forces in the lung. *Respir Physiol Neurobiol* 2003;137:151-68.
- 17 Cipolla MJ, Gokina NI, Osol G: Pressure-induced actin polymerization in vascular smooth muscle as a mechanism underlying myogenic behavior. *Faseb J* 2002;16:72-6.
- 18 Ridley AJ, Hall A: The small GTP-binding protein rho regulates the assembly of focal adhesions and actin stress fibers in response to growth factors. *Cell* 1992;70:389-99.
- 19 Ridley AJ, Paterson HF, Johnston CL, Diekmann D, Hall A: The small GTP-binding protein rac regulates growth factor-induced membrane ruffling. *Cell* 1992;70:401-10.
- 20 Moreau P, d'Uscio LV, Shaw S, Takase H, Barton M, Luscher TF: Angiotensin II increases tissue endothelin and induces vascular hypertrophy: reversal by ET(A)-receptor antagonist. *Circulation* 1997;96:1593-7.
- 21 Griffin SA, Brown WC, MacPherson F, McGrath JC, Wilson VG, Korsgaard N, Mulvany MJ, Lever AF: Angiotensin II causes vascular hypertrophy in part by a non-pressor mechanism. *Hypertension* 1991;17:626-35.
- 22 Bouvet C, Gilbert LA, Girardot D, deBlois D, Moreau P: Different involvement of extracellular matrix components in small and large arteries during chronic NO synthase inhibition. *Hypertension* 2005;45:432-7.
- 23 Dao HH, Martens FMAC, Larivière R, Yamaguchi N, Cernacek P, de Champlain J, Moreau P: Transient involvement of endothelin in hypertrophic remodeling of small arteries. *Journal of Hypertension* 2001;19:1801-1812.



- 24 Moreau P, Takase H, d'Uscio LV, Luscher TF: Effect of chronic nitric oxide deficiency on angiotensin II-induced hypertrophy of rat basilar artery. *Stroke* 1998;29:1031-5; discussion 1035-6.
- 25 Fukata Y, Amano M, Kaibuchi K: Rho-Rho-kinase pathway in smooth muscle contraction and cytoskeletal reorganization of non-muscle cells. *Trends Pharmacol Sci* 2001;22:32-9.
- 26 Narumiya S, Ishizaki T, Watanabe N: Rho effectors and reorganization of actin cytoskeleton. *FEBS Lett* 1997;410:68-72.
- 27 Watanabe N, Madaule P, Reid T, Ishizaki T, Watanabe G, Kakizuka A, Saito Y, Nakao K, Jockusch BM, Narumiya S: p140mDia, a mammalian homolog of *Drosophila* diaphanous, is a target protein for Rho small GTPase and is a ligand for rofiling. *Embo J* 1997;16:3044-56.
- 28 Riveline D, Zamir E, Balaban NQ, Schwarz US, Ishizaki T, Narumiya S, Kam Z, Geiger B, Bershadsky AD: Focal contacts as mechanosensors: externally applied local mechanical force induces growth of focal contacts by an mDia1-dependent and ROCK-independent mechanism. *J Cell Biol* 2001;153:1175-86.
- 29 Meloche S, Landry J, Huot J, Houle F, Marceau F, Giasson E: p38 MAP kinase pathway regulates angiotensin II-induced contraction of rat vascular smooth muscle. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2000;279:H741-51.
- 30 Yamboliev IA, Hedges JC, Mutnick JL, Adam LP, Gerthoffer WT: Evidence for modulation of smooth muscle force by the p38 MAP kinase/HSP27 pathway. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2000;278:H1899-907.
- 31 Gerthoffer WT, Gunst SJ: Invited review: focal adhesion and small heat shock proteins in the regulation of actin remodeling and contractility in smooth muscle. *J Appl Physiol* 2001;91:963-72.
- 32 Massett MP, Ungvari Z, Csiszar A, Kaley G, Koller A: Different roles of PKC and MAP kinases in arteriolar constrictions to pressure and agonists. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2002;283:H2282-7.
- 33 Daniels RH, Bokoch GM: p21-activated protein kinase: a crucial component of morphological signaling? *Trends Biochem Sci* 1999;24:350-5.
- 34 Cotteret S, Chernoff J: The evolutionary history of effectors downstream of Cdc42 and Rac. *Genome Biol* 2002;3:REVIEWS0002.
- 35 Sanders LC, Matsumura F, Bokoch GM, de Lanerolle P: Inhibition of myosin light chain kinase by p21-activated kinase. *Science* 1999;283:2083-5.

- 36 van Leeuwen FN, van Delft S, Kain HE, van der Kammen RA, Collard JG: Rac regulates phosphorylation of the myosin-II heavy chain, actinomyosin disassembly and cell spreading. *Nat Cell Biol* 1999;1:242-8.
- 37 Martens FM, Demeilliers B, Girardot D, Daigle C, Dao HH, deBlois D, Moreau P: Vessel-specific stimulation of protein synthesis by nitric oxide synthase inhibition: role of extracellular signal-regulated kinases 1/2. *Hypertension* 2002;39:16-21.
- 38 Daigle C, Martens FM, Girardot D, Dao HH, Touyz RM, Moreau P: Signaling of angiotensin II-induced vascular protein synthesis in conduit and resistance arteries in vivo. *BMC Cardiovasc Disord* 2004;4:6.
- 39 Touyz RM: The role of angiotensin II in regulating vascular structural and functional changes in hypertension. *Curr Hypertens Rep* 2003;5:155-64.

## Figure legends

**Figure 1.** **A)** Mean blood pressure (MBP, mmHg) evolution during L-NAME (50 mg/kg/day, closed circles) and angiotensin II (200  $\mu$ g/kg/minute, closed triangles) administration. Open circles represent control rats. **B)** Media to lumen ratio (M/L) and **C)** Cross-sectional area (CSA,  $\times 10^3 \mu\text{m}^2$ ) of small mesenteric arteries measured after 14 days of L-NAME and angiotensin II treatments. \* $P < 0.05$  versus control, ANOVA with Bonferroni's correction for multiple comparisons.

**Figure 2.** Kinetic of expression of **A)** mDia1, **B)** p38 MAPK and **C)** PAK1 during L-NAME (closed circles) and Angiotensin II treatments (closed triangles) in mesenteric arteries. Results are expressed as the relative optical density compared to the control value, which was normalized at 100% (line). Each time point represents the mean of 4 animals. \* $P < 0.05$  versus 100, One-sample analysis.

**Figure 3.** **A)** Kinetic of PAK1 expression during L-NAME treatment in the aorta. Each point represents the mean of 4 animals. \* $P < 0.05$  versus 100, One-sample analysis. **B)** Ratio of relative PAK1/mDia1 expression in L-NAME-treated rats. \* $P < 0.05$  versus 1, One-sample analysis.

Figure 7.1

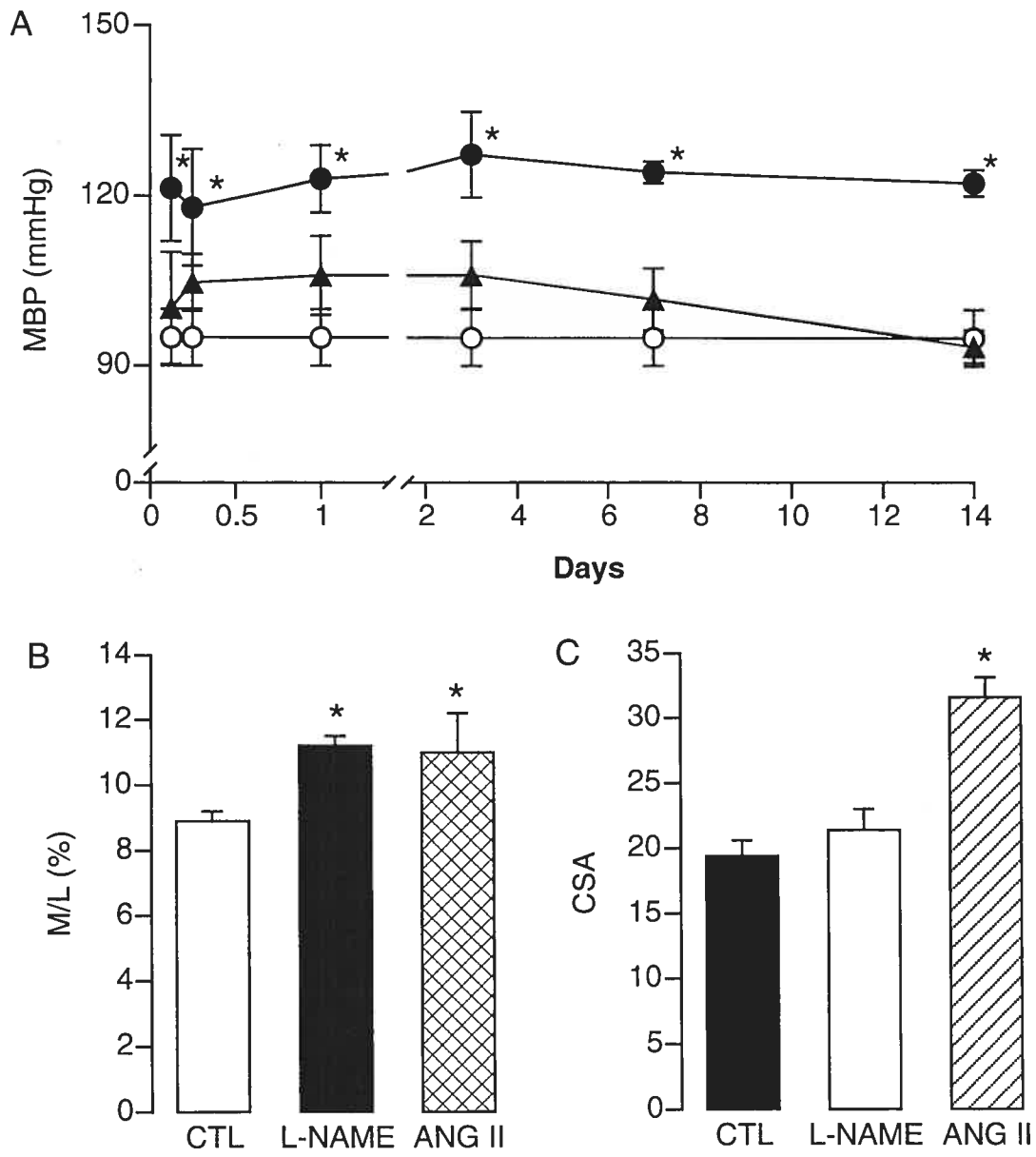


Figure 7.2

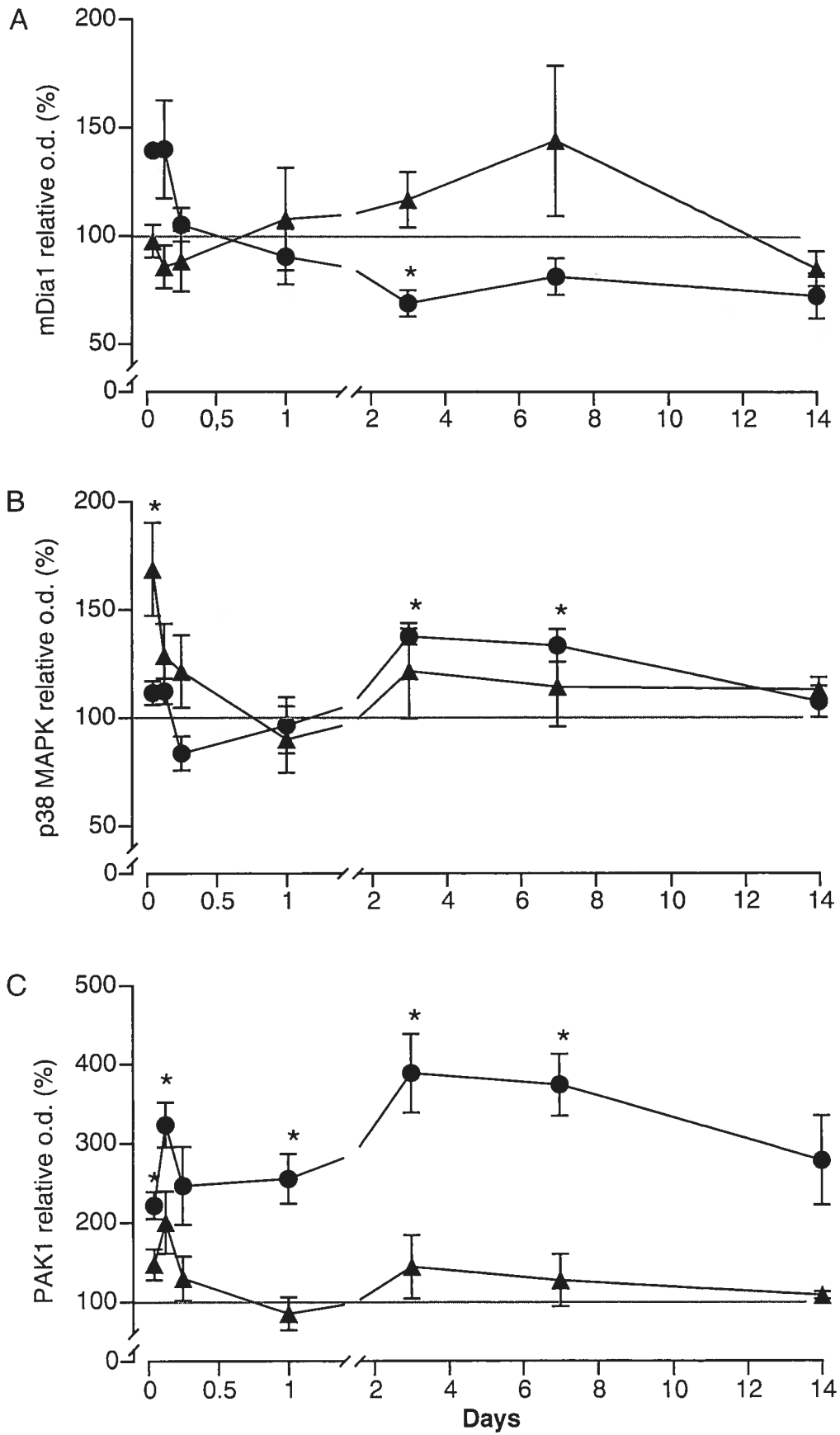
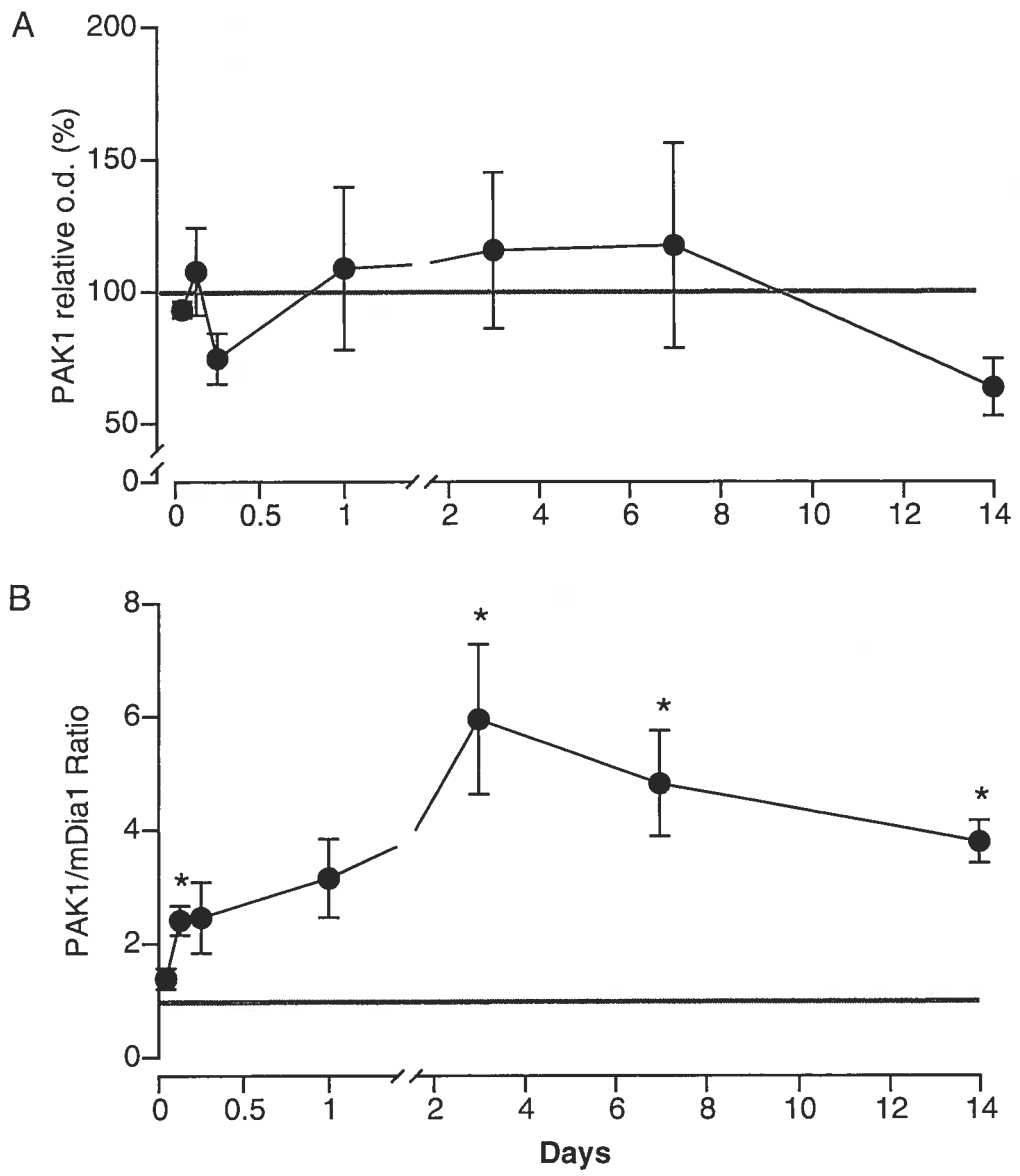


Figure 7.3



## **CHAPITRE 8. CHRONIC NITRIC OXIDE SYNTHASE INHIBITION PREVENTS NEW CORONARY CAPILLARY GENERATION**

**Daphné Girardot<sup>1</sup>, M.Sc., Bernard Jover<sup>2</sup>, Ph.D, Jean-Pierre Moles<sup>2</sup>, Ph.D.,  
Denis deBlois<sup>3</sup>, Ph.D. and Pierre Moreau<sup>1</sup>, Ph.D.**

<sup>1</sup> Faculty of Pharmacy and <sup>3</sup>Department of Pharmacology, Faculty of Medicine,  
Université de Montréal, Montréal, Canada

<sup>2</sup> Institut Universitaire de Recherche Clinique, Université Montpellier I, Montpellier,  
France

<sup>3</sup> Centre de recherche du CHUM, Pavillon Hôtel-Dieu, Montréal, Canada

## 8.1 ABSTRACT

L-NAME-induced hypertension has been shown to produce concentric (eutrophic) remodeling of the heart despite an enhanced afterload. We postulated that nitric oxide synthase inhibition could limit coronary capillary growth to explain the nature of remodeling. To test our hypothesis, we aimed at determining the effect of endogenous and exogenous nitric oxide on coronary neovascularization. Aortic and coronary rings from normotensive animals were incubated in a three-dimensional type I collagen matrix in the presence of L-NAME or the nitric oxide donor SNAP. L-NAME inhibited, while SNAP stimulated neovascularization from aortic and coronary rings after 12 days of *in vitro* incubation. In arterial rings harvested from rats treated with L-NAME for 14 days and in which no further *in vitro* treatment was added, only coronary rings showed a reduction in new capillary generation. While confirming that chronic L-NAME treated rats develop concentric remodeling, the evaluation of capillary density did not reveal any difference as compared to the controls in 3 areas of the myocardium. In conclusion, chronic inhibition of nitric oxide synthesis *in vivo* produces a long lasting reduction in the capacity of coronary arteries to generate new capillaries *in vitro*. Thus, our results lend support to the hypothesis that an inhibition of new capillary formation could prevent the development of compensatory ventricular hypertrophy, in favor of concentric remodeling.



**Keywords:** cardiac remodeling, angiogenesis, nitric oxide, capillary density, hypertension

## 8.2 INTRODUCTION

In patients with essential hypertension, concentric remodeling is the most common change of cardiac morphology. It is characterized by a normal left ventricular mass, but an increased thickness of the ventricular wall[1]. Concentric remodeling decreases the risk of mortality, as compared to eccentric or concentric hypertrophic remodeling[2]. Mechanisms determining the type of remodeling that patients with essential hypertension will develop are still poorly understood. Chronic inhibition of nitric oxide synthase (NOS) activity with N<sup>ω</sup>-nitro-L-arginine-methyl ester (L-NAME), leads to hypertension[3, 4]. Recent studies have shown that such a treatment, similarly to essential hypertension, induces concentric eutrophic remodeling of the heart[5, 6]. Moreover, these studies have reported that this adaptation of the left ventricle to the chronic pressure overload normalizes cardiac systolic stress. Furthermore, concentric remodeling decreases passive myocardial stiffness, allowing greater muscle strain for a given diastolic stress of preload[5] and an enhanced left ventricular (LV) contractile reserve in response to calcium[6].

Angiogenesis, defined as new blood vessel growth from existing vessels, has been observed in chronic pathological ischemia, wound healing, tumor growth and metastases[7]. Furthermore, it has been observed that angiogenesis and compensatory muscle hypertrophy are temporally coupled, suggesting that muscular hypertrophy requires angiogenesis[8]. Several in vitro and in vivo studies have demonstrated a direct involvement of NO in angiogenesis[9-12]. We hypothesized that endothelial dysfunction (reduction in NO release / availability) in hypertension could affect the

compensatory ventricular hypertrophy expected with an enhanced afterload, by limiting coronary capillary growth. To lend support to this hypothesis, we aimed at determining the effect of NO on coronary neovascularization measured in three-dimensional type I collagen cultures following *in vitro* and *in vivo* L-NAME treatments, using the aorta as a comparative artery. The effect of chronic L-NAME on myocardial structure and capillary density was also assessed to support the hypothesis.

### **8.3 METHODS**

#### **Treatments**

Male Wistar rats weighing between 250-275g were purchased from Iffa-Credo (L'Arbresle, France) for the *in vitro* neovascularization experiments, which were divided in *in vitro* and *in vivo* experiments. In the former, culture medium (see below) was either used alone (control group, n=9) or supplemented with L-NAME (1 mmol/L, n=8), the NO donor S-nitroso-N-acetylpenicillamine (SNAP, 0.1 mmol/L, n=7), or both (n=6). In the *in vivo* study of neovascularization, rats were treated with L-NAME at a dose of 50 mg/kg/day (dissolved in drinking water) during 14 days (n=4 rats, two rings from each rat were averaged and a n of 4 was used in statistical analysis). Untreated rats served as controls (n=4 in replicate). Additional control and *in vivo* L-NAME-treated rats from Charles River (St-Constant, Qc, Canada) were used for the cardiac structure and capillary density evaluation (n=7/group). The local animal care committees approved all protocols.

## Neovascularization

Neovascularization was measured as described previously[13]. Briefly, the abdominal aorta and the heart were removed from untreated (in vitro and control animals for in vivo experiments) or L-NAME treated (in vivo experiments) rats under a binocular dissection microscope. One millimeter thick aortic and coronary rings from the septum were prepared in a sterile Hank's balance salt solution (HBSS) and embedded in a three-dimensional gel of type I collagen on a 24-well plate at 37°C. Type I collagen was obtained from rat-tail tendon as described by Elsdale and Bard[14]. Gels of collagen were prepared according to Montesano et al.[15] by quickly mixing at 4°C, 1:2 rat-tail collagen solution (3 mg/ml) 1:2.5 DMEM, 1:17 sodium bicarbonate (0.1 N). Gelation was allowed to take place at 37°C for 30 minutes by coating each well with 0.5 ml of the collagen solution. After gelation, Dolbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) solution supplemented with l-glutamine, endothelial cell growth supplement (ECGS, 15 mg/mL), 10 % fetal calf serum, epidermal growth factor (EGF, 10 ng/mL) and insulin (5 µg/mL), was added to the wells. Embedded artery rings were then incubated for 12 days at 37°C. All cultures were observed every second day with an inverted microscope equipped with a 35 mm camera. Final quantification of new tube growth and ramification was performed on images captured after twelve days of culture. The number of tubes emerging from the artery and the number of ramifications from each of these new capillaries were added to obtain a final score. The data are expressed as a percentage of growth relative to the control wells on each plate, to reduce the influence of plate

to plate variability. In the in vivo study, however, absolute values are given since fewer plates were required.

### **Cardiac morphometry and capillary density measurement**

After treatment, rats were anesthetized with sodium pentobarbital (50 mg/kg, i.p.) and instrumented using a polyethylene catheter (P10 tubing welded with a PE 50 tubing) in the right femoral artery. Mean arterial pressure was recorded 24 hours later in the awake and freely moving rats through a pressure transducer. Rats were sacrificed and hearts were removed, transferred in cold Krebs solution and weighed. Slices from the base of the heart were fixed with 4% paraformaldehyde PBS solution for 24 hours. This method yields similar structural observations as using KCl to stop the heart in diastole [16]. Structural parameters of the left ventricle (cavity diameter, external diameter, wall thickness, and CSA) were obtained by digital morphometry on 4  $\mu\text{m}$  paraffin-embedded histological slices. Wall/lumen ratio and wall stress (in  $\text{dynes/cm}^2 = \text{pressure} \cdot \text{lumen diameter} \cdot 1334/\text{wall thickness}$ ) were calculated from the morphometric values.

Capillary density was obtained from serial sections of the basal part of the left ventricle. The tissue sections were first heated and dewaxed with ethanol and then blocked with saponine-EGTA solution for 15 minutes at room temperature. Tissue sections were rinsed with PBS and incubated with lectin TRITC labeled from *Bandeiraria simplicifolia* (5  $\mu\text{g/ml}$ ) for 1 hour at 37°C. After 4 washes with PBS, sections were mounted with Vectashield. Slides were kept in the dark at 4°C until microscopic analysis. Capillary density was determined in sections labeled with lectin

and was based on quantification of positively labeled structure with  $<8 \mu\text{m}$  lumen size and with 1 nucleus (endothelial cell) per  $\text{mm}^2$ . Only sections oriented perpendicular to the capillaries were counted. Vessel density was evaluated by a blinded investigator throughout the subendocardium, midmyocardium and subepicardium of the circumference of the left ventricle, in two different areas for each ventricular layer (the duplicates were averaged). Capillaries were counted (400X) by use of fluorescent microscopy.

### **Drugs and statistics**

L-NAME, SNAP, ECGs, EGF, IGF were obtained from Sigma. HBSS, DMEM, HAM F12, FVS, penicillin, fungizone were obtained from GibcoBRL-Life Technologies. Data are presented as mean  $\pm$  SEM. Statistical analysis was performed by one sample analysis when controls were normalized to 100 (Fig. 1), or by unpaired t-test,.  $P<0.05$  was considered significant.

## 8.4 RESULTS

### Neovascularization

In the *in vitro* study of neovascularization, the presence of L-NAME (1mM) in the culture medium significantly decreased the relative (control = 100%) neovascularization from normotensive aortic and coronary rings by  $35.5 \pm 9.9\%$ , and  $57.9 \pm 6.7\%$ , respectively ( $p < 0.05$ ) (**Fig. 1**). When compared between arteries, the effect had a tendency to be of greater magnitude in coronary arteries ( $p = 0.08$ ). The addition of SNAP (0.1 mM) in the culture medium significantly increased growth of new vessels from both artery rings ( $27.3 \pm 9.2\%$  in aortic rings;  $85.6 \pm 28.1\%$  in coronary rings,  $p < 0.05$ ). Again, coronary arteries had a tendency to be more sensitive ( $p = 0.07$ ). Simultaneous incubation with L-NAME and SNAP abrogated the effect of either drug used alone.

In the *in vivo* study, treatment with L-NAME (50 mg/kg/day during 14 days) significantly increased mean arterial pressure, as expected (**Fig. 2**). Angiogenesis from aortic rings was not altered in chronic L-NAME treated rats as compared to controls (**Fig. 2 and 3**). In contrast, however, chronic NOS inhibition led to an impaired neovascularization from coronary rings as compared to control values (**Fig. 2 and 3**). It must be reemphasized that modulators of NO were not added acutely in the culture medium in these experiments.

### **Ventricular structure and capillary density**

In this study, chronic *in vivo* administration of L-NAME also significantly increased mean arterial pressure (Table 1). Body weight, heart weight and heart weight/body weight ratio (HW/BW) of L-NAME hypertensive rats was similar to that of untreated rats (Table 1). Detailed morphological analysis demonstrated that chronic NOS inhibition induced a change in left ventricular (LV) geometry, as compared to control animals. Specifically, a decreased LV cavity chamber size and an increased relative wall thickness were observed, leading to an increased wall to lumen ratio (W/L, Table 1). Furthermore, LV cross-sectional area (CSA) was similar in L-NAME treated and in control rats, confirming the lack of hypertrophy suggested by the normal HW/BW. Altogether, these data suggest that chronic NOS inhibition led to concentric cardiac remodeling. Calculation of ventricular wall stress revealed that the increase in pressure was overcompensated by cardiac remodeling in L-NAME-treated rats (Table 1).

Capillary density analysis showed no significant differences between L-NAME treated and untreated rats in all three myocardial areas, although there was a tendency for lower capillary density in the subendomyocardium L-NAME treated rats. Estimated total capillaries in a cross-section did not differ between the groups.

## **8.5 DISCUSSION**

According to several *in vitro* and *in vivo* studies, NO is directly involved in angiogenesis[9-12]. Compounds of different chemical nature which mimic the effect of NO, like NO donors such as SNP, promote endothelial cell proliferation and migration *in vivo* and *in vitro*, while inhibitors of NOS suppress these responses[17].



Our results of acute neovascularization are consistent with the concept that endogenous NO is involved in the process. Indeed, aortic and coronary angiogenesis was decreased with the addition of L-NAME in the culture medium. Furthermore, supplementation of the culture medium with a NO donor, SNAP, increased neovascularization. When both drugs were used in combination, a net effect could not be observed, suggesting that endogenous NO (inhibited by L-NAME) and exogenous NO have additive effects. In other words, endogenous NO continues to influence neovascularization even in the presence of an NO donor. Interestingly, the magnitude of the response in coronary arteries (to NOS inhibition or exogenous NO), tended to be superior to that of the aorta, suggesting that coronary arteries could be more sensitive or responsive to angiogenesis modulation by NO. In that respect, the dose of L-NAME used in this study (1 mM) was similar[18, 19] or even less[20] as compare to other in vitro studies measuring the contribution of NO in the angiogenesis process.

The major new finding of this study was that chronic in vivo NOS inhibition led to a persistent reduction of the coronary angiogenic capacity. In contrast, the ability of aortic rings to generate new tubes was not modified by treating rats chronically with L-NAME. This difference could be explained by the lower sensitivity or responsiveness of the aorta to NO, as suggested by our in vitro experiments. We have also observed that coronary arteries precontracted with phenylephrine also relax significantly more than aortic rings to sodium nitroprusside (79.4 vs 37.8%), suggesting that their general responsiveness to NO is enhanced (data not shown). Our results would therefore implicate that different types of arteries

(conductance vs. more muscular) could respond differently to angiogenic stimuli or inhibitors, including endothelial dysfunction.

The evaluation of cardiac morphology revealed that the LV underwent concentric remodeling. Indeed, chronic treatment with L-NAME led to a decreased LV chamber size, and to increases in wall thickness and in wall to lumen cavity ratio. Both HW/BW and CSA of the LV supported an absence of cardiac hypertrophy after chronic NOS inhibition. Our results are in line with previous work reporting that L-NAME-induced hypertension was associated with a distinct pattern of LV remodeling, characterized by a decrease in LV chamber size relative to wall thickness in the absence of an increase in LV mass[5, 6]. We found wall stress on the left ventricle to be reduced in L-NAME-treated rats as compared to controls, suggesting that the change in geometry overcompensated the blood pressure increase. Accordingly, functional evaluation of the heart did not reveal any differences between control and L-NAME-treated rats[5, 6]. In contrast to the concentric remodeling observed in this and other studies, other groups have reported cardiac hypertrophy in hypertensive rats subjected to chronic NOS inhibition[21-23]. In that respect, Arnal et al. found significant myocardial hypertrophy only in six out of twenty five rats with L-NAME-induced hypertension[24]. Interestingly, only these six rats showed elevated plasma renin activity (PRA). Thus, as previously discussed elsewhere[25], the renin angiotensin system appears important to mediate cardiovascular hypertrophy in this experimental model. We found no increased PRA after 14 days of treatment with L-NAME at a dose of 50 mg/kg/day (data not shown). Alternatively, it has been postulated that the development of cardiac hypertrophy

could depend on the dosage of L-NAME and the duration of treatment[21]. However, our results are similar to those obtained in rats treated with 50 mg/kg/day for 6 weeks[6] and 100 mg/kg/day for 8 weeks[5]. It is still unclear as to what triggers the activation of the RAS in the L-NAME model, but renal injury appears to be a likely candidate. Nonetheless, our results suggest that the L-NAME model can reproduce the concentric cardiac remodeling observed in essential hypertension when the RAS is not activated.

Blood vessel recruitment is an important feature of normal tissue growth. It has been observed that compensatory muscle hypertrophy and angiogenesis are temporally coupled[8]. Numerous evidences have also showed a positive correlation between coronary vascular growth (and/or capillary growth) and cardiac hypertrophy, depending upon specific factors associated with either species or models of cardiac hypertrophy[26]. During development of pressure overload hypertrophy, structural remodeling and angiogenesis occur. Studies manipulating coronary microvascular growth during the development of LVH suggest that angiogenesis is an important factor in maintaining coronary capillary density[26-29]. Indeed, as cardiac hypertrophy develops, the flow through any given capillary needs to increase in proportion to the magnitude of the enhanced metabolic demand[26]. It is thus interesting that Kubis et al. observed left ventricular hypertrophy and normal capillary density (suggesting proportional capillary growth), in hypertensive mice lacking the eNOS gene[30]. Although these results suggest that NO does not modulate capillary growth and associated hypertrophy, they have not determined the possible contribution of compensatory mechanisms in the angiogenic process, nor the

possible contribution of the RAS system in their model. In contrast to the results obtained in eNOS knockout mice, there was no increase in ventricular mass in L-NAME-treated rats (see above). Since capillary density was similar to controls, this suggests that the net amount of capillaries was not modified. Considering that chronic NOS inhibition reduced the capacity of coronary arteries to generate new vessels *in vitro*, it is tempting to speculate that reduced capacity to stimulate proportional capillary angiogenesis *in vivo* could impede on the development of compensatory ventricular hypertrophy. To support our hypothesis, a study specifically designed to address the capillary / tissue growth relationship, reported that mice in which NOS was pharmacologically inhibited or mice lacking eNOS had a marked reduction in compensatory lung growth[31]. Furthermore, two studies have reported that chronic NOS inhibition prevents the development of ventricular hypertrophy induced by DOCA-salt treatment [32] or by a carotid arterio-venous shunt [33].

Our study has limitations, including a very superficial evaluation of the mechanisms explaining the difference in responsiveness to NO between the aorta and coronary arteries. The amount of coronary arteries collectable to measure biochemical parameters, such as cGMP, guanylate cyclase or even NOS, is insufficient. In addition, it is difficult to extrapolate results obtained *in vitro* to the *in vivo* situation. Thus, our study lends support, but does not prove that lack of ventricular hypertrophy is directly linked to inhibition of neovascularization. The method used to harvest and fix the heart did not use KCl to clearly stop the heart in diastole. Nonetheless, we have evidence that the dimensions obtained are in accordance with this technique. Finally, some rats were treated in France, while others came from Canada. The

arterial pressure is different between the two sets of experiments and we cannot exclude that other parameters may vary as well.

### **Conclusion**

Chronic inhibition of NO synthesis *in vivo* produces concentric remodeling of the heart and a long lasting reduction in the capacity of coronary arteries to generate new tubes *in vitro*. Although present experiments do not allow to causally relate the inhibition of capillary growth to concentric (eutrophic) ventricular remodeling, our results nonetheless lend support to the hypothesis that an inhibition of new capillary formation could prevent the development of compensatory ventricular hypertrophy, at least when the RAS is not activated.

### **Acknowledgements**

The authors acknowledge the contribution of Shant der Sarkassian and David Duguay, both from Dr deBlois' Laboratory.

## 8.6 REFERENCES

1. Bugra Z, Koylan N, Vural A, et al. Left ventricular geometric patterns and QT dispersion in untreated essential hypertension. *Am J Hypertens* 1998;11:1164-70.
2. Koren MJ, Devereux RB, Casale PN, et al. Relation of left ventricular mass and geometry to morbidity and mortality in uncomplicated essential hypertension. *Ann Intern Med* 1991;114:345-52.
3. Rees DD, Palmer RM, Moncada S. Role of endothelium-derived nitric oxide in the regulation of blood pressure. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1989;86:3375-8.
4. Ribeiro MO, Antunes E, de Nucci G, et al. Chronic inhibition of nitric oxide synthesis. A new model of arterial hypertension. *Hypertension* 1992;20:298-303.
5. Matsubara BB, Matsubara LS, Zornoff LA, et al. Left ventricular adaptation to chronic pressure overload induced by inhibition of nitric oxide synthase in rats. *Basic Res Cardiol* 1998;93:173-81.
6. Bartunek J, Weinberg EO, Tajima M, et al. Chronic N(G)-nitro-L-arginine methyl ester-induced hypertension : novel molecular adaptation to systolic load in absence of hypertrophy. *Circulation* 2000;101:423-9.
7. Folkman J. Angiogenesis: initiation and control. *Ann N Y Acad Sci* 1982;401:212-27.

8. Plyley MJ, Olmstead BJ, Noble EG. Time course of changes in capillarization in hypertrophied rat plantaris muscle. *J Appl Physiol* 1998;84:902-7.
9. Granger HJ, Ziche M, Hawker JR, Jr., et al. Molecular and cellular basis of myocardial angiogenesis. *Cell Mol Biol Res* 1994;40:81-5.
10. Conway EM, Collen D, Carmeliet P. Molecular mechanisms of blood vessel growth. *Cardiovasc Res* 2001;49:507-21.
11. Murohara T, Asahara T, Silver M, et al. Nitric oxide synthase modulates angiogenesis in response to tissue ischemia. *J Clin Invest* 1998;101:2567-78.
12. Noiri E, Lee E, Testa J, et al. Podokinesis in endothelial cell migration: role of nitric oxide. *Am J Physiol* 1998;274:C236-44.
13. Nicosia RF, Ottinetti A. Modulation of microvascular growth and morphogenesis by reconstituted basement membrane gel in three-dimensional cultures of rat aorta: a comparative study of angiogenesis in matrigel, collagen, fibrin, and plasma clot. *In Vitro Cell Dev Biol* 1990;26:119-28.
14. Elsdale T, Bard J. Collagen substrata for studies on cell behavior. *J Cell Biol* 1972;54:626-37.
15. Montesano R, Orci L, Vassalli P. In vitro rapid organization of endothelial cells into capillary-like networks is promoted by collagen matrices. *J Cell Biol* 1983;97:1648-52.
16. Der Sarkissian S, Marchand EL, Duguay D, et al. Reversal of interstitial fibroblast hyperplasia via apoptosis in hypertensive rat heart with valsartan or enalapril. *Cardiovasc Res* 2003;57:775-83.

17. Ziche M, Morbidelli L. Nitric oxide and angiogenesis. *J Neurooncol* 2000;50:139-48.
18. Papapetropoulos A, Desai KM, Rudic RD, et al. Nitric oxide synthase inhibitors attenuate transforming-growth-factor-beta 1-stimulated capillary organization in vitro. *Am J Pathol* 1997;150:1835-44.
19. Babaei S, Teichert-Kuliszewska K, Monge JC, et al. Role of nitric oxide in the angiogenic response in vitro to basic fibroblast growth factor. *Circ Res* 1998;82:1007-15.
20. Babaei S, Stewart DJ. Overexpression of endothelial NO synthase induces angiogenesis in a co-culture model. *Cardiovasc Res* 2002;55:190-200.
21. Pereira LM, Mandarim-De-Lacerda CA. Quantitative study of myocardial microcirculation in arterial hypertension due to progressive inhibition of NO synthesis. *Arq Bras Cardiol* 1999;73:407-18.
22. Sladek T, Gerova M, Znojil V, et al. Morphometric characteristics of cardiac hypertrophy induced by long-term inhibition of NO synthase. *Physiol Res* 1996;45:335-8.
23. Takemoto M, Egashira K, Usui M, et al. Important role of tissue angiotensin-converting enzyme activity in the pathogenesis of coronary vascular and myocardial structural changes induced by long-term blockade of nitric oxide synthesis in rats. *J Clin Invest* 1997;99:278-87.
24. Arnal JF, el Amrani AI, Chatellier G, et al. Cardiac weight in hypertension induced by nitric oxide synthase blockade. *Hypertension* 1993;22:380-7.



25. Moreau P, Takase H, d'Uscio LV, et al. Effect of chronic nitric oxide deficiency on angiotensin II-induced hypertrophy of rat basilar artery. *Stroke* 1998;29:1031-5; discussion 1035-6.
26. Tomanek RJ, Torry RJ. Growth of the coronary vasculature in hypertrophy: mechanisms and model dependence. *Cell Mol Biol Res* 1994;40:129-36.
27. Bishop SP, Powell PC, Hasebe N, et al. Coronary vascular morphology in pressure-overload left ventricular hypertrophy. *J Mol Cell Cardiol* 1996;28:141-54.
28. Anversa P, Capasso JM. Loss of intermediate-sized coronary arteries and capillary proliferation after left ventricular failure in rats. *Am J Physiol* 1991;260:H1552-60.
29. Rakusan K, Flanagan MF, Geva T, et al. Morphometry of human coronary capillaries during normal growth and the effect of age in left ventricular pressure-overload hypertrophy. *Circulation* 1992;86:38-46.
30. Kubis N, Besnard S, Silvestre JS, et al. Decreased arteriolar density in endothelial nitric oxide synthase knockout mice is due to hypertension, not to the constitutive defect in endothelial nitric oxide synthase enzyme. *J Hypertens* 2002;20:273-80.
31. Leuwerke SM, Kaza AK, Tribble CG, et al. Inhibition of compensatory lung growth in endothelial nitric oxide synthase-deficient mice. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2002;282:L1272-8.
32. Li JS, Sventek P, Schiffrin EL. Effect of antihypertensive treatment and N omega-nitro-L-arginine methyl ester on cardiovascular structure in

deoxycorticosterone acetate-salt hypertensive rats. *J Hypertens* 1996;14:1331-9.

33. Miyamoto T, Takeishi Y, Shishido T, et al. Role of nitric oxide in the progression of cardiovascular remodeling induced by carotid arterio-venous shunt in rabbits. *Jpn Heart J* 2003;44:127-37.

**TABLES****Table 1** – Cardiac morphological characteristics and capillary density in control and in vivo L-NAME treated rats, n= 7/ group.

Parameters	Control	L-NAME
Body weight (g)	339 ± 19	362± 8
Heart weight (mg)	901 ± 23	995 ± 33
HW/BW ratio (mg/g)	2.66 ± 0.13	2.75 ± 0.69
MAP (mmHg)	96 ± 5	118± 5*
Heart rate (bpm)	385 ± 8	371± 19
LV cavity diameter (mm)	3.52± 0.05	3.01 ± 0.09*
LV external diameter (mm)	7.79 ± 0.25	8.16 ± 0.23
LV wall thickness (mm)	2.14 ± 0.12	2.58 ± 0.08*
Wall / Lumen ratio	0.607 ± 0.035	0.858 ± 0.024*
LV CSA (mm <sup>2</sup> )	38.1 ± 2.9	45.5 ± 2.5
Wall stress (dyn/cm <sup>2</sup> )	274X10 <sup>3</sup> ± 14X10 <sup>3</sup>	226X10 <sup>3</sup> ± 10X10 <sup>3</sup>
Mean capillary density in LV (capillaries/ mm <sup>2</sup> )	1747 ± 113	1621± 93
- subendomyocardium	1928 ± 154	1606 ± 157
- midmyocardium	1936 ± 171	1895 ± 107
- subepimyocardium	1201 ± 109	1361 ± 111
<u>Total capillaries in a cross section</u>	<u>78832 ± 2927</u>	<u>78870 ± 3121</u>

HW/BW: heart weigh/ body weigh ratio; MAP: mean arterial pressure; LV: left ventricle;

CSA: cross-sectional area.

\*P<0.05 vs control values (unpaired t-test)

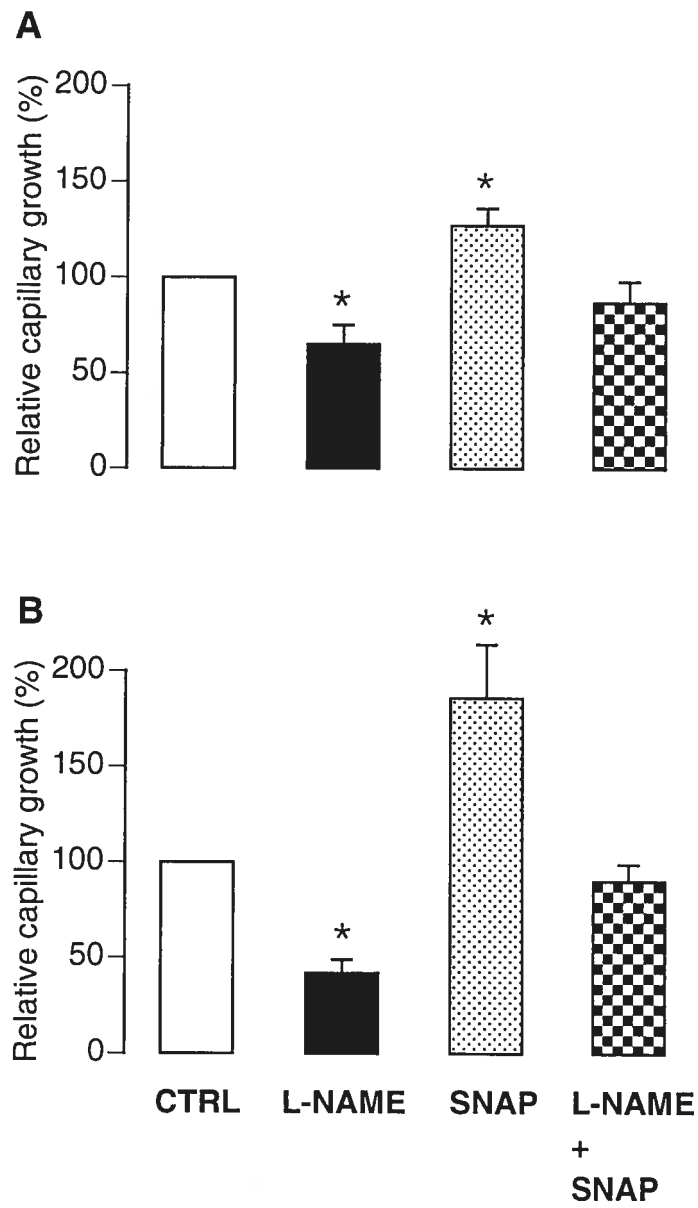
## FIGURE LEGENDS

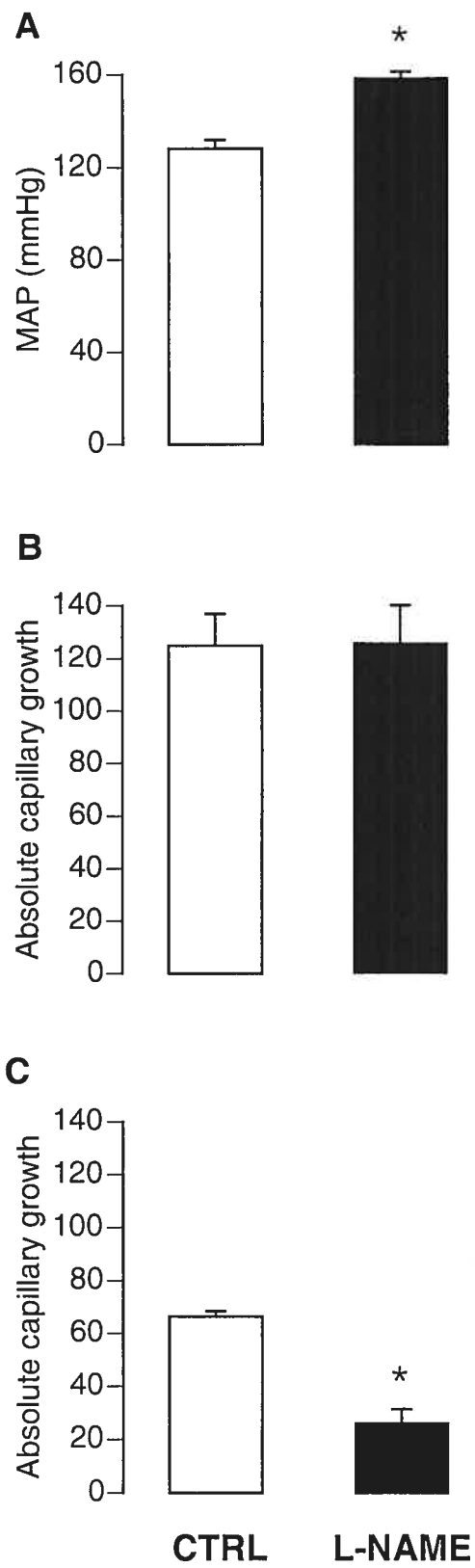
**Figure 1.** Relative capillary growth of **A)** aortic and **B)** coronary artery rings from normotensive rats (normal culture condition (CTRL) was normalized to 100%).

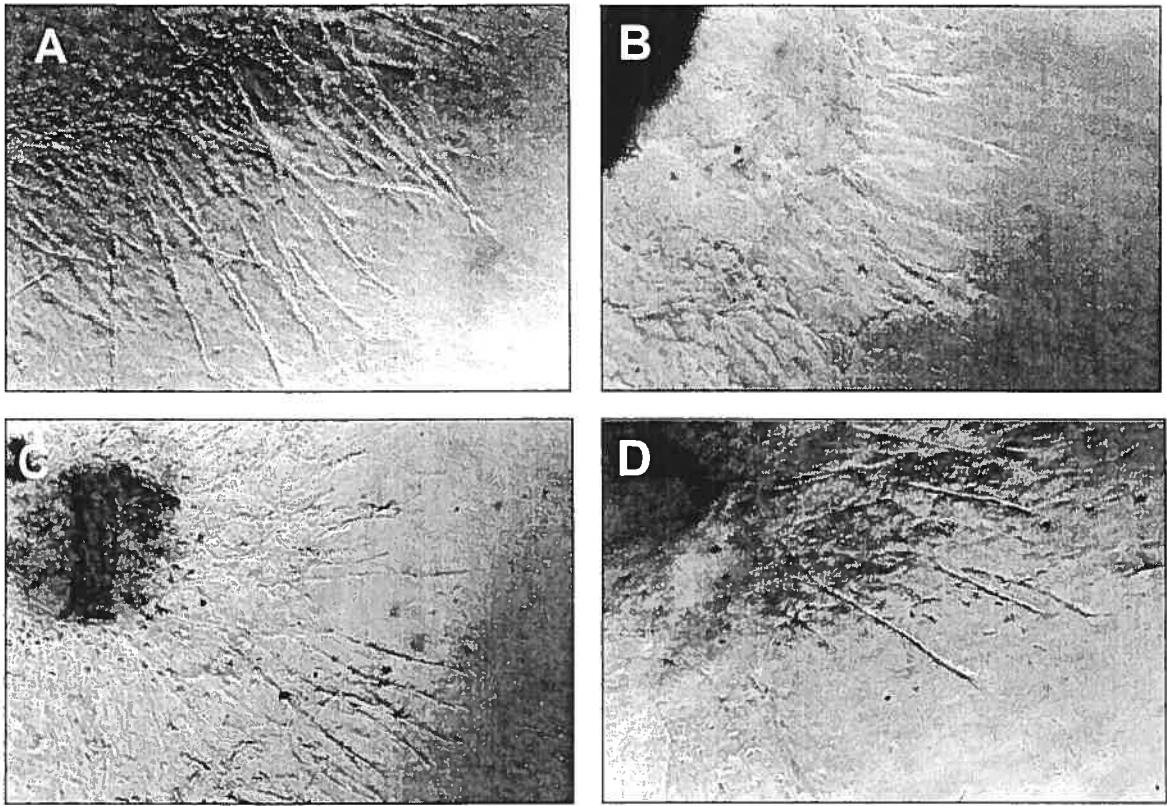
Drugs were added only to the culture medium: L-NAME (1 mmol/L), S-nitroso-N-acetylpenicillamine (SNAP, 0.1 mmol/L), or both for 12 days, at which time the capillary growth was quantified (see methods),  $n = 6-9$ . Data are presented as mean  $\pm$  SEM, \*  $P < 0.05$  vs. 100, one sample analysis.

**Figure 2.** **A)** Mean arterial pressure (MAP) and absolute capillary outgrowth of **B)** aortic and **C)** coronary artery rings from normotensive (CTRL) and L-NAME-treated rats in vivo. ( $n=4$  rats, two rings from each rat were averaged). No drugs were added to the culture medium. Data are presented as mean  $\pm$  SEM, \*  $P < 0.05$  vs. Control rats, unpaired t-test.

**Figure 3.** Representative pictures of tube outgrowth after 12 days of incubation from aortic rings harvested from **A)** control and **B)** L-NAME-treated rats in vivo. **C)** Coronary artery tube formation from control and **D)** L-NAME-treated rats. The reduction of coronary neovascularization with L-NAME (D vs. C) is evident.







---

**TROISIÈME PARTIE – DISCUSSION,  
PERSPECTIVES, CONCLUSIONS ET  
RÉFÉRENCES**

---



## DISCUSSION

### Remodelage eutrophique des artères de résistance

Tout comme dans l'hypertension essentielle, l'hypertension induite par une inhibition chronique de la synthèse du NO, laquelle mime une dysfonction endothéliale, mène à une hétérogénéité dans le changement de structure artérielle selon le type d'artère. En effet, en réponse à une augmentation de pression, les artères de conductance de gros et de moyen calibre, ayant une composante matricielle importante, semble générer un remodelage hypertrophique. Ce dernier est défini par un diamètre interne peu ou inchangé et un épaissement de la paroi vasculaire montrant une augmentation de l'aire de section de la média. De leur côté, les artères de résistance, ayant une composante musculaire importante et donc ayant la capacité de se contracter, génèrent à long terme un remodelage eutrophique. Celui-ci est défini par un réarrangement des cellules de la paroi vasculaire autour d'un diamètre interne réduit, sans augmentation de l'aire de section de la média. Ainsi, les artères composant le système artériel périphérique répondent à la loi de Laplace lorsque la pression augmente afin de normaliser la tension pariétale. Les artères de conductance n'ayant pas la capacité de se contracter de façon significative, doivent épaissir leur paroi en favorisant l'hypertrophie ou l'hyperplasie des cellules musculaires lisses. Les artères de résistance, ayant la capacité de se contracter, normalisent ainsi la tension pariétale sans avoir à augmenter le volume cellulaire constituant la média. Par conséquent, nous pouvons avancer que les artères qui subissent une augmentation de pression génèrent un remodelage hypertrophique. Par opposition aux artères de

résistance, qui développent un remodelage eutrophique, maintenant la pression artérielle élevée. Le remodelage eutrophique est souvent associé à l'atteinte des organes cibles puisqu'il diminue la réserve vasculaire au repos<sup>47</sup>. Dans un modèle d'hypertension secondaire à une dysfonction rénale, les artères de résistance développent un remodelage hypertrophique. Une étude a démontré que dans ce modèle d'hypertension, les artères de résistance avaient une fonction myogénique altérée, ce qui pouvait expliquer l'augmentation de la tension pariétale et le développement du remodelage hypertrophique dans ces artères<sup>195</sup>. Aussi dans un modèle administrant des faibles doses d'ANG II, il a été rapporté que l'augmentation graduelle et modeste de la pression artérielle était secondaire à la stimulation trophique par l'ANG II qui cause une hypertrophie des artères de résistance, caractérisée surtout par une accumulation des éléments de la matrice extracellulaire<sup>147</sup>.

Nous avons ainsi cherché à vérifier la loi de Laplace dans notre modèle d'hypertension induite par le L-NAME, en mesurant la vasoconstriction d'artères de types différents, par microscopie intravitale. Ainsi, après l'inhibition aiguë de la synthèse du NO, nous avons observé une réponse vasoconstrictrice dans les artères mésentériques, laquelle menait à une normalisation de la tension pariétale. La mesure de la vasoréactivité dans les artères fémorales s'est avérée nulle, et donc associée à une augmentation de la tension pariétale. Une inhibition chronique de la synthèse du NO et la mesure du changement de structure vasculaire dans ces deux types d'artères a montré un remodelage hypertrophique au niveau fémoral et un remodelage eutrophique au niveau mésentérique. Nous avons ainsi stipulé d'après nos

observations que la contraction mésentérique précoce, laquelle a mené à une normalisation de la tension pariétale, représenterait le processus initial dans le développement du remodelage eutrophique, lors d'une hypertension induite par une diminution de la production du NO (dysfonction endothéliale). Nos résultats sont en accord avec les travaux du laboratoire de Russel L Prewitt<sup>141-143</sup>, qui ont démontré dans des artères mésentériques isolées, qu'une augmentation de la tension pariétale en réponse à l'augmentation de pression menait à l'activation du facteurs oncogènes, c-myc et c-fos, et ainsi à la prolifération cellulaire<sup>143</sup>. De plus, cette même équipe de recherche a démontré dans une même série d'expériences, qu'une augmentation du tonus myogénique mésentérique, en réponse à une augmentation de pression, inhibait la stimulation du facteur oncogénique c-myc ou de l'expression de l'ARNr de la sous unité 18S (indice de synthèse protéique)<sup>142</sup>. Ainsi, une réponse vasoconstrictrice menant à une normalisation de la tension pariétale expliquerait l'absence de remodelage hypertrophique dans les artères de résistance. De plus, les travaux de Bakker<sup>70,151</sup> ont aussi démontré ce concept dans un autre montage expérimental, ce dernier mesurant le remodelage vasculaire à partir d'artères mésentériques mises en culture et soumises à une augmentation de pression constante. Ces résultats ont démontré l'importance d'une stimulation vasoconstrictrice à l'ET-1, en plus de l'augmentation de pression, pour induire un remodelage eutrophique, suggérant que la réponse contractile des artères de résistance, lors d'une élévation de pression, représenterait la réponse initiant le remodelage eutrophique. Allant dans le même ordre d'idées, une étude a démontré<sup>117</sup> que l'administration de L-NAME chez des rats induisant une augmentation de la pression, menait au remodelage eutrophique des

artères de résistance cérébrales et qu'en présence d'un agent hypertrophique (ANG II à une dose non pressive), ces artères ont développé tout de même un remodelage eutrophique. Ainsi, l'augmentation du tonus myogénique est cruciale pour initier le développement du remodelage eutrophique des artères de résistance<sup>48</sup>.

Lors d'une étude précédente<sup>193</sup>, nous avons tenté de vérifier l'implication du NO dans la réponse proliférative de différents segments vasculaires afin d'expliquer l'hétérogénéité du changement de la structure vasculaire rencontré dans les grosses artères par rapport aux artères de résistance lors d'hypertension induite par l'inhibition de la synthèse du NO. Dans cette étude, nous avons mesuré la synthèse protéique (index d'hypertrophie) dans l'aorte (artère de gros calibre) et dans les artères mésentériques (artères de résistance) en plus de mesurer l'expression de ERK 1/2, qui représente une protéine kinase largement connue pour induire la prolifération cellulaire. Or, les résultats de cette étude ont démontré un rôle anti-prolifératif du NO uniquement dans les grosse artères étant donné qu'une inhibition de la génération du NO a mené à une augmentation de la synthèse protéique seulement dans l'aorte. De plus, l'expression de ERK 1/2 étant élevée dans les deux types d'artères, nous avons suggéré une implication autre que la synthèse protéique dans les artères mésentériques, à savoir une contribution dans la réponse vasoconstrictrice. Voulant vérifier cette hypothèse, nous avons mesuré l'expression de ERK 1/2 dans les artères mésentériques en mesurant la vasoréactivité par microscopie intravitale, lors de l'inhibition aiguë de la synthèse de NO. Nos résultats ont confirmé que ERK 1/2 sont impliquées dans la vasoconstriction mésentérique puisque l'administration de

l'inhibiteur de son précurseur (MEK) a inhibé la vasoconstriction normalement induite par l'administration du bloqueur de la NOS.

L'implication de ERK 1/2 dans la vasoconstriction a été rapportée dans de nombreuses études. Par exemple, il a été démontré que ERK 1/2 sont impliquées dans le développement du tonus myogénique d'artères de résistance soumises à une élévation de la pression via l'activation de la PKC<sup>163</sup>. D'autres études ont mesuré une augmentation de la phosphorylation de ERK 1/2 dans des cellules musculaires lisses de rats SHR et d'humains hypertendus, mises en culture, lors d'une réponse vasoconstrictrice stimulée par l'ANG II<sup>196</sup>. Aussi, Mulvany et al. ont démontré un effet synergique de l'ANG II avec l'augmentation de la pression sur la réponse vasoconstrictrice d'artères mésentériques isolées<sup>197</sup>. L'implication de ERK 1/2 dans la vasoconstriction peut être induite soit par l'ANG II ou par l'augmentation de pression<sup>138</sup>. Toutefois, l'augmentation de pression nécessite une contribution moindre de ERK 1/2 dans la réponse myogénique comparativement à une autre MAPK kinase, la MAPK p38<sup>138</sup>. L'utilisation d'un modèle *in vivo* chez le rat permet de conserver toute la complexité des influences locales et hémodynamiques. Or, dans un modèle d'hypertension induite par l'inhibition de la synthèse du NO, il a été rapporté que des agents vasoconstricteurs tels que l'ET-1 et l'ANG II tissulaire sont présents et contribuent à la vasoconstriction résultant de la diminution de l'apport vasodilatateur du NO. Il est donc difficile de trancher de façon irrévocable si la contribution de ERK 1/2 dans la vasoconstriction suivant l'inhibition de la NOS est due à l'augmentation de pression ou à l'influence de l'ET-1 ou de l'angiotensine II tissulaire. Toutefois, mentionnons des observations rapportant que ERK 1/2 ne sont pas impliquées dans la

vasoconstriction stimulée par l'ET-1<sup>139,151</sup>. Ceci expliquerait en partie pourquoi les inhibiteurs des récepteurs à l'ET-1 n'ont pas d'influence pour diminuer la pression ou pour prévenir le remodelage eutrophique dans un modèle d'hypertension essentielle<sup>112,198</sup> contrairement aux inhibiteurs de l'enzyme de conversion à l'ANG II et aux bloqueurs des canaux calciques<sup>16,199</sup>.

Nos travaux ont donc confirmé que dans le modèle d'hypertension induite par l'inhibition de la synthèse du NO, les artères ayant la capacité de se contracter, normalisent la tension pariétale et développent un remodelage eutrophique, contrairement aux types d'artères n'ayant pas la capacité à se contracter significativement. Ces observations nous ont ensuite poussé à vouloir comprendre davantage les mécanismes impliqués dans le processus adaptatif menant au remodelage eutrophique des artères de résistance, en considérant la vasoconstriction comme événement initial au changement de structure. Notre hypothèse de recherche s'est alors focalisée sur les concepts de transduction mécanique des cellules musculaires lisses qui se définissent par une adaptation de structure en réponse à une stimulation mécanique (augmentation de pression). La mécanotransduction est caractérisée par la transmission d'un signal mécanique capté par la membrane cellulaire et qui est ensuite transformé en signal biochimique dans la cellule. Une des principales réponses cellulaires générées par les cellules musculaires lisses lors d'une stimulation mécanique est la vasoconstriction soutenue<sup>19</sup>. Compte tenu du contexte du remodelage eutrophique, nous nous sommes davantage intéressés à étudier les mécanismes impliqués dans la transduction mécanique résultant de la vasoconstriction soutenue.

Le cytosquelette représente la principale structure cellulaire pouvant générer une force ou supporter un stress mécanique, d'une part, par sa localisation faisant le pont entre les intégrines et les éléments contractiles cellulaires, et d'autre part, par sa capacité à réorganiser sa structure. Les travaux de Cipolla et al.<sup>154</sup> ont démontré qu'en réponse à l'augmentation de pression, la polymérisation d'actine représentait un processus pour générer une force contractile et maintenir le diamètre de l'artère de résistance réduit, opposant ainsi l'augmentation de la tension pariétale. D'autres études ont démontré l'importance de la génération d'une force contractile dans la réponse myogénique, laquelle peut mener au remodelage eutrophique<sup>70</sup>. Ainsi pour qu'une force contractile soit générée, la polymérisation d'actine doit être augmentée ou les filaments d'actines nouvellement formés doivent être stabilisés<sup>200</sup>. D'autres études ont démontré que des cellules musculaires lisses pulmonaires soumises au stress mécanique se contractent en augmentant la polymérisation de l'actine<sup>170</sup>. Ce processus contractile consomme peu d'énergie et représente un mécanisme intéressant pour garder les artères dans une conformation en état de contraction chronique en réponse à un stimulus mécanique. Suivant ces observations, nous nous sommes alors concentrés à vérifier l'implication de molécules impliquées dans la réorganisation du cytosquelette d'actine (polymérisation d'actine) durant le développement du remodelage eutrophique des artères de résistance dépendant d'une augmentation de pression.

Dans notre étude, nous avons cherché à mesurer la cinétique d'expression de protéines pouvant être impliquées dans la polymérisation d'actine, durant l'hypertension induite par l'inhibition de la synthèse du NO, afin de déterminer leur

contribution potentielle dans le processus de remodelage eutrophique des artères de résistance (mésentériques). De plus, en mesurant dans le temps l'expression protéique de telles molécules, nous pouvions identifier un marqueur spécifique de remodelage eutrophique, au même titre que la synthèse protéique est un marqueur pour la prolifération cellulaire. Sachant que les petites protéines à activité GTPasique, telles que Rho et Rac, représentent des cibles intéressantes pour stimuler la réorganisation du cytosquelette<sup>133,134,201</sup>, nous avons décidé de mesurer l'expression de leurs effecteurs directement impliqués dans la polymérisation d'actine. Ainsi, mDia1 est un effecteur direct de la voie Rho pour stimuler la polymérisation d'actine<sup>173</sup> et PAK1 est un effecteur direct de la voie Rac impliqué dans la réorganisation du cytosquelette d'actine<sup>202-204</sup>. De plus, la MAP kinase p38 semble un effecteur de Rac<sup>176,205</sup> mais d'autres études doivent confirmer cette observation. D'autre part, plusieurs études ont démontré un rôle de p38 dans la contraction soutenue en réponse à un stress mécanique<sup>138,175</sup> impliquant l'augmentation de la polymérisation d'actine via la phosphorylation d'une protéine de choc thermique 27<sup>139</sup>.

Nos résultats ont montré une augmentation marquée de mDia1 dans la phase précoce du développement du remodelage eutrophique, une augmentation soutenue de l'expression de la MAPK p38 entre les jours 3 et 7 d'hypertension induite par l'inhibition de la synthèse du NO, et une augmentation marquée et stable de PAK1 tout au long du développement du remodelage eutrophique dans les artères mésentériques soumises à une augmentation de pression. Or, PAK1 semble un marqueur spécifique de remodelage eutrophique, puisque son expression est restée inchangée dans les artères ayant développé un remodelage hypertrophique induit soit



par l'administration d'ANG II (artères mésentériques) ou par le traitement au L-NAME (aorte). À la lumière de ces observations, nous pensons que la voie Rho est impliquée dans la phase précoce du développement du remodelage eutrophique, probablement associée à la vasoconstriction soutenue initiale. En effet, au cours d'études précédentes, il a été clairement démontré que Rho est impliquée dans l'augmentation de la sensibilité au calcium dans le processus contractile<sup>136</sup>. De plus, puisque les voies Rho et Rac semblent être des voies de signalisations antagonistes<sup>180,181,206</sup>, le rapport entre leur effecteur respectif, mDia1 et PAK1, nous a permis de mesurer leur implication relative dans le développement du remodelage eutrophique. Or, cette mesure nous a suggéré que la voie Rho semble importante dans la phase précoce du remodelage eutrophique et la voie Rac semble importante tout au long du processus adaptatif de la structure des artères mésentériques. Bien que cette étude nous ait apporté une information convaincante sur l'identification d'un marqueur spécifique de remodelage eutrophique, ces résultats ouvrent la porte à de nombreuses études futures, visant à améliorer la compréhension des voies de signalisation pouvant être impliquées dans le remodelage eutrophique et basée sur la réorganisation du cytosquelette cellulaire.

### **Remodelage eutrophique cardiaque**

Tout comme les artères, le cœur change sa structure en réponse à une augmentation de pression. Or, subissant une post-charge élevée expliquée par une augmentation de la résistance périphérique, il serait concevable de penser que le cœur développerait une hypertrophie cardiaque, selon les principes de Laplace mentionnés plus haut. Or, dans l'hypertension essentielle, différents types de remodelage

cardiaque sont observés comme le remodelage concentrique (ou eutrophique par comparaison au remodelage vasculaire), le remodelage hypertrophique excentrique (surtout observé dans un modèle d'hypertension volumique) et le remodelage hypertrophique concentrique. Ce dernier est souvent observé dans l'hypertension essentielle sévère et est associé aux événements cardiaques mortels. L'hypertension induite par l'inhibition de la synthèse du NO, est associée à une augmentation de la résistance périphérique, le débit cardiaque restant inchangé. Des études utilisant le L-NAME comme agent induisant l'hypertension ont démontré un remodelage cardiaque concentrique<sup>207,208</sup>, tel que nous l'avons observé dans notre étude. Or, ces résultats semblent contradictoires avec d'autres laboratoires administrant du L-NAME, qui ont rapporté un remodelage hypertrophique cardiaque. Toutefois l'influence de l'ANG II dans le processus hypertrophique cardiaque représente la meilleure explication pour interpréter cette divergence et les résultats de Arnal et al. ont su répondre adéquatement au débat. En effet, ce groupe a rapporté que sur 25 rats traités au L-NAME, 6 d'entre eux, dont le système rénine-angiotensine était activé, ont développé un remodelage hypertrophique concentrique<sup>115</sup>. De plus, selon différentes études, il a été rapporté que le remodelage concentrique, sans hypertrophie, se définit comme un réarrangement des cellules cardiaques autour d'une cavité ventriculaire réduite, sans qu'il n'y ait des altérations dans les fonctions cardiaques<sup>207,208</sup>. Afin d'expliquer la présence de remodelage concentrique dans le modèle L-NAME, nous nous sommes inspirés des concepts démontrant que l'hypertrophie doit être couplée à la formation de nouveaux vaisseaux, permettant ainsi l'apport d'oxygène nécessaire à la survie cellulaire. Nous avons émis l'hypothèse qu'une diminution de la production du NO

qui induit une augmentation de pression, peut aussi réduire la capacité des artères coronaires à générer des nouveaux capillaires puisque le NO est aussi un facteur angiogénique. Or, ne pouvant s'hypertrophier, le cœur développerait un remodelage eutrophique (du moins lorsque le système rénine-angiotensine n'est pas activé). Nos résultats ont démontré une plus grande sensibilité des artères coronaires au NO endogène par rapport aux anneaux aortiques pour générer des nouveaux capillaires. En effet, en inhibant chroniquement la production de NO chez des rats traités au L-NAME, la capacité à générer des nouveaux vaisseaux en culture semblait fortement atténuée dans les anneaux issues d'artères coronaires en comparaison avec les anneaux issus d'aortes. Or, ces observations suggéraient que la capacité angiogénique vasculaire change d'un type artériel à un autre, les artères coronaires étant plus sensibles au NO endogène pour générer des nouveaux capillaires. Pour confirmer cette observation nous avons aussi mesuré la sensibilité au NO dans ces deux types d'artères dans la réponse dilatatrice. Nos résultats ont démontré que les artères coronaires avaient une meilleure réponse vasodilatatrice au NO que les anneaux aortiques. Cette sensibilité accrue des artères coronaires au NO pourrait être expliquée par leur composition; ces artères sont constituées principalement de fibres musculaires en comparaison avec une importante composition en fibres élastiques dans les anneaux aortiques. De plus, contribuant majoritairement à l'apport nutritionnel du cœur, les artères coronaires ont une fonction d'autorégulation importante, ce qui pourrait expliquer leur plus grande sensibilité au NO endothélial vasodilatateur et angiogénique par rapport à l'aorte. La seconde partie de visait à mesurer la densité des capillaires de cœurs traités au L-NAME et de cœurs témoins.

Nous avons observé une densité des capillaires similaires dans les deux groupes de rats. Or, le cœur de rats traités au L-NAME ayant démontré un remodelage concentrique (eutrophique), l'absence d'hypertrophie pourrait s'expliquer par la perte de la capacité des artères coronaires à générer des nouveaux capillaires. Nous ne pouvons qu'extrapoler nos observations faites sur des anneaux coronaires et aortiques en culture avec celles observées in vivo. Encore une fois, de plus amples expériences sont nécessaires pour clarifier les mécanismes responsables de l'absence de remodelage hypertrophique cardiaque lorsque l'hypertension est induite par une diminution de la synthèse du NO. Ceci est d'autant plus pertinent que le remodelage concentrique (eutrophique) est associé à une meilleure performance cardiaque et à un risque réduit de complications cardiaques comparativement au remodelage hypertrophique concentrique.

## CONCLUSIONS

Une réduction sélective de la production du NO mimant une dysfonction endothéliale, conduit à une élévation de la pression artérielle associée à un remodelage eutrophique des artères de résistance et du cœur.

Le remodelage artériel eutrophique semble être tributaire de la vasoconstriction initiale, ERK 1/2-dépendante, qui normalise la tension pariétale. Cette vasoconstriction initiale se transforme en changement de structure par l'intervention de modifications du cytosquelette, via, principalement, une polymérisation et une stabilisation des filaments d'actine sous l'effet de PAK1, un effecteur de la voie Rac.

Au niveau du cœur, le remodelage eutrophique concentrique serait tributaire de l'inhibition de l'angiogénèse coronarienne par le L-NAME. Ainsi, l'adaptation cardiaque à la dysfonction endothéliale semble être relativement bénéfique. Par contre, le remodelage des artères de résistance semble contribuer au dommage des organes vitaux en diminuant la réserve vasculaire au repos, ce qui limite la perfusion sanguine, principalement en période de demande accrue.

Dans l'ensemble, nos travaux ont permis de préciser l'impact d'une réduction de la production du NO, une composante importante de la dysfonction endothéliale, sur la structure du système cardiovasculaire. Nos études sur la signalisation, en particulier, ouvrent la porte à d'autres études futures visant à mieux comprendre cette adaptation chronique qui est un déterminant majeur de l'impact de l'hypertension sur la morbidité et la mortalité cardiovasculaires.

## PERSPECTIVES

Nos travaux sur la signalisation cellulaire au cours du développement du remodelage eutrophique ouvrent la porte sur de nombreuses possibilités d'études futures. En effet, en ayant démontré une importance de PAK1 dans le remodelage eutrophique, nous avons impliqué la voie Rac dans le processus d'adaptation chronique des artères lors d'hypertension artérielle. Selon des études *in vitro* précédentes, la voie Rac semblait surtout impliquée dans la migration cellulaire<sup>134,209,210</sup>.

Suivant nos résultats, nous pourrions mesurer la cinétique d'expression de PAK1 dans d'autres modèles d'hypertension induisant un remodelage eutrophique dans les artères de résistance. Par exemple, chez les rats SHR ou chez les rats Goldblatt 2 reins/ 1 pince<sup>211</sup>. Aussi, étant donné que PAK1 est connu pour activer la LIM-kinase afin de favoriser la stabilisation des filaments d'actine en forme polymérisée<sup>203,204</sup>, la mesure de l'expression de la LIM-kinase ajouterait un complément mécanistique important.

À la lumière de nos découvertes, nous pourrions pousser davantage nos recherches en favorisant l'importance des interactions entre les éléments de la MEC, des intégrines et des éléments du cytosquelette au développement du remodelage eutrophique. Ces interactions reflètent en partie la théorie tensorielle élaborée précédemment par l'architecte Fuller<sup>212</sup>. Ce dernier définissait les systèmes tensoriels comme des structures étant capables de stabiliser leur forme en générant

continuellement une tension. Dans son modèle, Ingber<sup>213</sup> décrit qu'en réponse à un stress mécanique, le cytosquelette d'actine et les filaments intermédiaires de la cellule génèrent une tension contractile produite par la polymérisation de l'actine. Cette tension est par la suite équilibrée par la force de résistance provenant des microtubules et des éléments de la matrice extracellulaire (MEC). L'atteinte de ce nouvel équilibre est tributaire au changement adaptatif de la structure cellulaire<sup>214</sup>. Ce concept va de pair avec les travaux de Gunst<sup>171</sup>, qui impliquent une restructuration des filaments d'actine en fonction du temps d'application du stress mécanique. Par un processus favorisant la polymérisation d'actine, la cellule génère une force de contraction chronique par un mécanisme qui consomme peu d'énergie. À long terme, la cellule solidifie sa nouvelle conformation, et ce, aussi longtemps que le stimulus mécanique est présent.

Dans un premier temps, nous pourrions vérifier l'implication des éléments de la MEC dans le développement du remodelage eutrophique. Par exemple, il a été proposé que les éléments de la MEC influencent la contractilité cellulaire par un processus favorisant l'adhésion des cellules musculaires lisses aux éléments de la MEC via les intégrines<sup>131,155,215</sup>. De plus, une étude de Bakker<sup>216</sup> a démontré l'implication de la trans-glutaminase, une enzyme ayant comme substrat les éléments de la MEC, dans le développement du remodelage eutrophique. Ces travaux ont suggéré que la trans-glutaminase est nécessaire pour fixer les CMLs à la MEC pour maintenir l'artère en état contracté<sup>216</sup>. Aussi, une étude publiée dans notre laboratoire<sup>217</sup> a montré que les MMPs (« matrix metalloproteases ») ne sont pas nécessaires au développement du remodelage eutrophique des artères mésentériques,

suggérant que la MEC n'est pas dégradée dans le processus du remodelage eutrophique.

Les mécanismes impliqués dans les interactions entre les éléments de la MEC, les intégrines et les éléments du cytosquelette menant à la stabilisation de la structure des CMLs soumises à une stimulation mécanique chronique, représente une avenue de recherche intéressante et prometteuse pour prévenir les complications cardiovasculaires secondaires au changement de la structure des artères de résistance.



## RÉFÉRENCES

1. Schwartz SM, Majesky MW, Murry CE. The intima: development and monoclonal responses to injury. *Atherosclerosis*. 1995;118 Suppl:S125-40.
2. Mulvany MJ, Aalkjaer C. Structure and function of small arteries. *Physiol Rev*. 1990;70:921-61.
3. Basar E WC. *Vasculature and Circulation: The Role of Myogenic Reactivity in the Regulation of Blood Flow*. Amsterdam: Elsevier/North-Holland Biomedical Press; 1981.
4. Guyton AC HJ. *Textbook of Medical Physiology*. ninth edition ed. Philadelphia: W.B. Saunders Company; 1996.
5. Strauer BE, Schwartzkopff B, Kelm M. Assessing the coronary circulation in hypertension. *J Hypertens*. 1998;16:1221-33.
6. Berne R, Levy, MN. *Cardiovascular Physiology*. seventh ed: Mosby; 1997.
7. McGeown J. *Physiologie-L'essentielle*. Paris: Maloine; 2003.
8. Hoffman JI. Maximal coronary flow and the concept of coronary vascular reserve. *Circulation*. 1984;70:153-9.
9. le Noble FA, Stassen FR, Hacking WJ, Struijker Boudier HA. Angiogenesis and hypertension. *J Hypertens*. 1998;16:1563-72.
10. Peirce SM, Skalak TC. Microvascular remodeling: a complex continuum spanning angiogenesis to arteriogenesis. *Microcirculation*. 2003;10:99-111.
11. Takahashi T, Kalka C, Masuda H, Chen D, Silver M, Kearney M, Magner M, Isner JM, Asahara T. Ischemia- and cytokine-induced mobilization of bone marrow-derived endothelial progenitor cells for neovascularization. *Nat Med*. 1999;5:434-8.
12. Crosby JR, Kaminski WE, Schatteman G, Martin PJ, Raines EW, Seifert RA, Bowen-Pope DF. Endothelial cells of hematopoietic origin make a significant contribution to adult blood vessel formation. *Circ Res*. 2000;87:728-30.
13. Kon K, Fujii S, Kosaka H, Fujiwara T. Nitric oxide synthase inhibition by N(G)-nitro-L-arginine methyl ester retards vascular sprouting in angiogenesis. *Microvasc Res*. 2003;65:2-8.
14. Murohara T, Asahara T, Silver M, Bauters C, Masuda H, Kalka C, Kearney M, Chen D, Symes JF, Fishman MC, Huang PL, Isner JM. Nitric oxide synthase modulates angiogenesis in response to tissue ischemia. *J Clin Invest*. 1998;101:2567-78.

15. Dulak J, Jozkowicz A, Dembinska-Kiec A, Guevara I, Zdzienicka A, Zmudzinska-Grochot D, Florek I, Wojtowicz A, Szuba A, Cooke JP. Nitric oxide induces the synthesis of vascular endothelial growth factor by rat vascular smooth muscle cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2000;20:659-66.
16. Mulvany MJ. Small artery remodeling and significance in the development of hypertension. *News Physiol Sci.* 2002;17:105-9.
17. Mellander S. Contribution of small vessel tone to the regulation of blood volume and formation of oedema. *Proc R Soc Med.* 1968;61:55-61.
18. Davis MJ, Hill MA. Signaling mechanisms underlying the vascular myogenic response. *Physiol Rev.* 1999;79:387-423.
19. Osol G. Mechanotransduction by vascular smooth muscle. *J Vasc Res.* 1995;32:275-92.
20. Hill MA, Zou H, Potocnik SJ, Meininger GA, Davis MJ. Invited review: arteriolar smooth muscle mechanotransduction: Ca(2+) signaling pathways underlying myogenic reactivity. *J Appl Physiol.* 2001;91:973-83.
21. Thorneloe KS, Nelson MT. Ion channels in smooth muscle: regulators of intracellular calcium and contractility. *Can J Physiol Pharmacol.* 2005;83:215-42.
22. Furchgott RF, Zawadzki JV. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature.* 1980;288:373-6.
23. Kelm M. The L-arginine-nitric oxide pathway in hypertension. *Curr Hypertens Rep.* 2003;5:80-6.
24. Boucher JL, Moali C, Tenu JP. Nitric oxide biosynthesis, nitric oxide synthase inhibitors and arginase competition for L-arginine utilization. *Cell Mol Life Sci.* 1999;55:1015-28.
25. Alderton WK, Cooper CE, Knowles RG. Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition. *Biochem J.* 2001;357:593-615.
26. Cosentino F, Patton S, d'Uscio LV, Werner ER, Werner-Felmayer G, Moreau P, Malinski T, Luscher TF. Tetrahydrobiopterin alters superoxide and nitric oxide release in prehypertensive rats. *J Clin Invest.* 1998;101:1530-7.
27. Boulanger CM, Heymes C, Benessiano J, Geske RS, Levy BI, Vanhoutte PM. Neuronal nitric oxide synthase is expressed in rat vascular smooth muscle cells: activation by angiotensin II in hypertension. *Circ Res.* 1998;83:1271-8.
28. Stone JR, Sands RH, Dunham WR, Marletta MA. Spectral and ligand-binding properties of an unusual hemoprotein, the ferric form of soluble guanylate cyclase. *Biochemistry.* 1996;35:3258-62.

29. Lang D, Lewis, MJ. Biochemical Effects of Nitric Oxide on Vascular Smooth Muscle. In: Robert T Mathie TMG, ed. *The Haemodynamic Effects of Nitric Oxide*: Imerial College Press; 1999:4-21.
30. Félétou M, Vanhoutte, PM. Endothelium-Derived Hyperpolarizing Factor. In: Vallance P, Webb, DJ, ed. *Vascular Endothelium in Human Physiology and Pathology*: Hardwood Academic Publishers; 2000:75-92.
31. Southan GJ, Szabo C. Selective pharmacological inhibition of distinct nitric oxide synthase isoforms. *Biochem Pharmacol*. 1996;51:383-94.
32. Arnal JF, Dinh-Xuan AT, Pueyo M, Darblade B, Rami J. Endothelium-derived nitric oxide and vascular physiology and pathology. *Cell Mol Life Sci*. 1999;55:1078-87.
33. John C. McGiff AN. Prostaglandines and P450 Metabolites. In: Joseph L. Izzo HRB, ed. *Hypertension Primer: The Essentials of High Blood Pressure*: American Heart Association; 1999:30-32.
34. Foegh M, Ramwell, PW. The Eicosanoids: Prostaglandins, Thromboxanes, Leukotrienes, & Related Compounds. In: Lange, ed. *Basic and Clinical Pharmacology*. ninth ed: Katzung, BG; 2001:298-312.
35. Shimokawa H, Morikawa K. Hydrogen peroxide is an endothelium-derived hyperpolarizing factor in animals and humans. *J Mol Cell Cardiol*. 2005;39:725-732.
36. Touyz RM, Schiffrin EL. Signal transduction mechanisms mediating the physiological and pathophysiological actions of angiotensin II in vascular smooth muscle cells. *Pharmacol Rev*. 2000;52:639-72.
37. Taddei S. Cyclooxygenase-Dependant Endothelium-Derived Contracting Factors. In: Vallance P, Webb, DJ, ed. *Vascular Endothelium in Human Physiology and Pathophysiology*: Hardwood Academic Publishers; 2000:63-72.
38. Schiffrin EL. Endothelin. In: Joseph L. Izzo HRB, ed. *Hypertension Primer: the Essentials of High Blood Pressure*: American Heart Association; 1999:36-37.
39. Staessen JA, Wang J, Bianchi G, Birkenhager WH. Essential hypertension. *Lancet*. 2003;361:1629-41.
40. Carretero OA, Oparil S. Essential hypertension. Part I: definition and etiology. *Circulation*. 2000;101:329-35.
41. Chobanian AV, Bakris GL, Black HR, Cushman WC, Green LA, Izzo JL, Jr., Jones DW, Materson BJ, Oparil S, Wright JT, Jr., Roccella EJ. The Seventh Report of the Joint National Committee on Prevention, Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Pressure: the JNC 7 report. *Jama*. 2003;289:2560-72.

42. Goodman Gilman A. *The Pharmacologic Basis of Therapeutics*. Tenth ed: McGraw Hill; 2001.
43. Rizzoni D, Porteri E, Boari GE, De Ciuceis C, Sleiman I, Muiesan ML, Castellano M, Miclini M, Agabiti-Rosei E. Prognostic significance of small-artery structure in hypertension. *Circulation*. 2003;108:2230-5.
44. Falloon BJ, Heagerty AM. In vitro perfusion studies of human resistance artery function in essential hypertension. *Hypertension*. 1994;24:16-23.
45. Heagerty AM, Aalkjaer C, Bund SJ, Korsgaard N, Mulvany MJ. Small artery structure in hypertension. Dual processes of remodeling and growth. *Hypertension*. 1993;21:391-7.
46. Mulvany MJ. Resistance vessel growth and remodelling: cause or consequence in cardiovascular disease. *J Hum Hypertens*. 1995;9:479-85.
47. Heagerty A. Structural changes in resistance arteries in hypertension. In: Zanchetti A, Mancia, G, ed. *Handbook of Hypertension*: Elsevier Science B.V.; 1997:426-437.
48. Izzard AS, Rizzoni D, Agabiti-Rosei E, Heagerty AM. Small artery structure and hypertension: adaptive changes and target organ damage. *J Hypertens*. 2005;23:247-50.
49. Rizzoni D, Porteri E, Guelfi D, Muiesan ML, Valentini U, Cimino A, Girelli A, Rodella L, Bianchi R, Sleiman I, Rosei EA. Structural alterations in subcutaneous small arteries of normotensive and hypertensive patients with non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Circulation*. 2001;103:1238-44.
50. Lund-Johansen P. Haemodynamics in essential hypertension. *Clin Sci (Lond)*. 1980;59 Suppl 6:343s-354s.
51. Pickering G. The peripheral resistance in persistent arterial hypertension. *Clinical Science*. 1936;2:209-235.
52. Doyle AE, Black H. Reactivity to pressor agents in hypertension. *Circulation*. 1955;12:974-80.
53. Folkow B, Grimby G, Thulesius O. Adaptive structural changes of the vascular walls in hypertension and their relation to the control of the peripheral resistance. *Acta Physiol Scand*. 1958;44:255-72.
54. Short D. Morphology of the intestinal arterioles in chronic human hypertension. *Br Heart J*. 1966;28:184-92.
55. Aalkjaer C, Heagerty AM, Petersen KK, Swales JD, Mulvany MJ. Evidence for increased media thickness, increased neuronal amine uptake, and depressed excitation--contraction coupling in isolated resistance vessels from essential hypertensives. *Circ Res*. 1987;61:181-6.

56. Falloon BJ, Stephens N, Tulip JR, Heagerty AM. Comparison of small artery sensitivity and morphology in pressurized and wire-mounted preparations. *Am J Physiol*. 1995;268:H670-8.
57. Furuyama M. Histometrical investigations of arteries in reference to arterial hypertension. *Tohoku J Exp Med*. 1962;76:388-414.
58. Baumbach GL, Heistad DD. Remodeling of cerebral arterioles in chronic hypertension. *Hypertension*. 1989;13:968-72.
59. Baumbach GL, Heistad DD. Adaptive changes in cerebral blood vessels during chronic hypertension. *J Hypertens*. 1991;9:987-91.
60. Bund SJ, Lee RM. Arterial structural changes in hypertension: a consideration of methodology, terminology and functional consequence. *J Vasc Res*. 2003;40:547-57.
61. Mulvany MJ, Baumbach GL, Aalkjaer C, Heagerty AM, Korsgaard N, Schiffrin EL, Heistad DD. Vascular remodeling. *Hypertension*. 1996;28:505-6.
62. Folkow B. Physiological aspects of primary hypertension. *Physiol Rev*. 1982;62:347-504.
63. Lee RM. Structural alterations of blood vessels in hypertensive rats. *Can J Physiol Pharmacol*. 1987;65:1528-35.
64. Bund SJ, West KP, Heagerty AM. Effects of protection from pressure on resistance artery morphology and reactivity in spontaneously hypertensive and Wistar-Kyoto rats. *Circ Res*. 1991;68:1230-40.
65. Pang SC, Scott TM. An examination of the arterial media in transplanted arteries of spontaneously hypertensive (SHR) and normotensive Wistar Kyoto rats (WKY). *Artery*. 1985;12:382-7.
66. Christensen KL, Mulvany MJ. Vasodilatation, not hypotension, improves resistance vessel design during treatment of essential hypertension: a literature survey. *J Hypertens*. 2001;19:1001-6.
67. Wolinsky H. Long-term effects of hypertension on the rat aortic wall and their relation to concurrent aging changes. Morphological and chemical studies. *Circ Res*. 1972;30:301-9.
68. Laurent S. Arterial wall hypertrophy and stiffness in essential hypertensive patients. *Hypertension*. 1995;26:355-62.
69. London GM, Guerin AP, Pannier B, Marchais SJ, Safar ME. Large artery structure and function in hypertension and end-stage renal disease. *J Hypertens*. 1998;16:1931-8.
70. Bakker EN, van der Meulen ET, van den Berg BM, Everts V, Spaan JA, VanBavel E. Inward remodeling follows chronic vasoconstriction in isolated resistance arteries. *J Vasc Res*. 2002;39:12-20.

71. Martinez-Lemus LA, Hill MA, Bolz SS, Pohl U, Meininger GA. Acute mechanoadaptation of vascular smooth muscle cells in response to continuous arteriolar vasoconstriction: implications for functional remodeling. *Faseb J*. 2004;18:708-10.
72. Koller A. Signaling pathways of mechanotransduction in arteriolar endothelium and smooth muscle cells in hypertension. *Microcirculation*. 2002;9:277-94.
73. Panza JA, Quyyumi AA, Brush JE, Jr., Epstein SE. Abnormal endothelium-dependent vascular relaxation in patients with essential hypertension. *N Engl J Med*. 1990;323:22-7.
74. Calver A, Collier J, Moncada S, Vallance P. Effect of local intra-arterial NG-monomethyl-L-arginine in patients with hypertension: the nitric oxide dilator mechanism appears abnormal. *J Hypertens*. 1992;10:1025-31.
75. Kiowski W, Luscher TF, Linder L, Buhler FR. Endothelin-1-induced vasoconstriction in humans. Reversal by calcium channel blockade but not by nitrovasodilators or endothelium-derived relaxing factor. *Circulation*. 1991;83:469-75.
76. Taddei S, Viridis A, Mattei P, Salvetti A. Vasodilation to acetylcholine in primary and secondary forms of human hypertension. *Hypertension*. 1993;21:929-33.
77. Forte P, Copland M, Smith LM, Milne E, Sutherland J, Benjamin N. Basal nitric oxide synthesis in essential hypertension. *Lancet*. 1997;349:837-42.
78. Panza JA, Quyyumi AA, Callahan TS, Epstein SE. Effect of antihypertensive treatment on endothelium-dependent vascular relaxation in patients with essential hypertension. *J Am Coll Cardiol*. 1993;21:1145-51.
79. Cockcroft JR, Chowienczyk PJ, Benjamin N, Ritter JM. Preserved endothelium-dependent vasodilatation in patients with essential hypertension. *N Engl J Med*. 1994;330:1036-40.
80. Corti R. Endothelial Dysfunction and Hypertension. In: Patrick J.T. Vallance DJW, ed. *Vascular Endothelium in Human Physiology and Pathophysiology*. Hardwood Academic Publishers; 2000:109-127.
81. Taddei S, Viridis A, Ghiadoni L, Magagna A, Salvetti A. Vitamin C improves endothelium-dependent vasodilation by restoring nitric oxide activity in essential hypertension. *Circulation*. 1998;97:2222-9.
82. Richard V, Hogie M, Clozel M, Loffler BM, Thuillez C. In vivo evidence of an endothelin-induced vasopressor tone after inhibition of nitric oxide synthesis in rats. *Circulation*. 1995;91:771-5.
83. Taddei S, Salvetti A. Endothelial dysfunction in essential hypertension: clinical implications. *J Hypertens*. 2002;20:1671-4.

84. De Artinano AA, Gonzalez VL. Endothelial dysfunction and hypertensive vasoconstriction. *Pharmacol Res.* 1999;40:113-24.
85. Prewitt RL. Autoregulation of blood flow, endothelial nitric oxide synthase and microvascular rarefaction. *J Hypertens.* 2002;20:177-8.
86. Dipette D. Experimental Models of Hypertension. In: Izzo JL, Jr., ed. *Hypertension Primer: the Essentials of High Blood Pressure*: American Heart Association; 1999:128-130.
87. Goldblatt H LJ, Hanzal RF, Summerville WW. Studies of experimental hypertension: I. Production of persistent elevation of systolic blood pressure by means of renal ischemia. *J Exp Med.* 1934;59:347-79.
88. Lerman LO, Chade AR, Sica V, Napoli C. Animal models of hypertension: an overview. *J Lab Clin Med.* 2005;146:160-73.
89. Intengan HD, Schiffrin EL. Vascular remodeling in hypertension: roles of apoptosis, inflammation, and fibrosis. *Hypertension.* 2001;38:581-7.
90. Lee RM, Triggle CR. Morphometric study of mesenteric arteries from genetically hypertensive Dahl strain rats. *Blood Vessels.* 1986;23:199-224.
91. D'Uscio LV, Barton M, Shaw S, Moreau P, Luscher TF. Structure and function of small arteries in salt-induced hypertension: effects of chronic endothelin-subtype-A-receptor blockade. *Hypertension.* 1997;30:905-11.
92. Moreau P. Hypertension. In: Rubanyi G, ed. *The Endothelium in Clinical Practice*: Marcel Dekker; 1997:331-354.
93. Doggrell SA, Brown L. Rat models of hypertension, cardiac hypertrophy and failure. *Cardiovasc Res.* 1998;39:89-105.
94. Hu WY, Fukuda N, Kanmatsuse K. Growth characteristics, angiotensin II generation, and microarray-determined gene expression in vascular smooth muscle cells from young spontaneously hypertensive rats. *J Hypertens.* 2002;20:1323-33.
95. Korsgaard N, Christensen KL, Mulvany MJ. Cellular morphology in mesenteric resistance vessels from antihypertensive treated spontaneously hypertensive rats. *Basic Res Cardiol.* 1991;86 Suppl 1:33-41.
96. Korsgaard N, Aalkjaer C, Heagerty AM, Izzard AS, Mulvany MJ. Histology of subcutaneous small arteries from patients with essential hypertension. *Hypertension.* 1993;22:523-6.
97. Bing OH, Conrad CH, Boluyt MO, Robinson KG, Brooks WW. Studies of prevention, treatment and mechanisms of heart failure in the aging spontaneously hypertensive rat. *Heart Fail Rev.* 2002;7:71-88.
98. Devereux RB. Left ventricular geometry, pathophysiology and prognosis. *J Am Coll Cardiol.* 1995;25:885-7.

99. Taddei S, Virdis A, Ghiadoni L, Salvetti G, Salvetti A. Endothelial dysfunction in hypertension. *J Nephrol.* 2000;13:205-10.
100. Noll G, Tschudi M, Nava E, Luscher TF. Endothelium and high blood pressure. *Int J Microcirc Clin Exp.* 1997;17:273-9.
101. Moncada S, Higgs A. The L-arginine-nitric oxide pathway. *N Engl J Med.* 1993;329:2002-12.
102. Ignarro LJ. Endothelium-derived nitric oxide: actions and properties. *Faseb J.* 1989;3:31-6.
103. Vallance P, Collier J, Moncada S. Effects of endothelium-derived nitric oxide on peripheral arteriolar tone in man. *Lancet.* 1989;2:997-1000.
104. Joannides R, Richard V, Haefeli WE, Linder L, Luscher TF, Thuillez C. Role of basal and stimulated release of nitric oxide in the regulation of radial artery caliber in humans. *Hypertension.* 1995;26:327-31.
105. Rees DD, Palmer RM, Moncada S. Role of endothelium-derived nitric oxide in the regulation of blood pressure. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1989;86:3375-8.
106. Ribeiro MO, Antunes E, de Nucci G, Lovisollo SM, Zatz R. Chronic inhibition of nitric oxide synthesis. A new model of arterial hypertension. *Hypertension.* 1992;20:298-303.
107. Arnal JF, Warin L, Michel JB. Determinants of aortic cyclic guanosine monophosphate in hypertension induced by chronic inhibition of nitric oxide synthase. *J Clin Invest.* 1992;90:647-52.
108. Li JS, Schiffrin EL. Resistance artery structure and neuroeffector mechanisms in hypertension induced by inhibition of nitric oxide synthase. *Am J Hypertens.* 1994;7:996-1004.
109. Chillon JM, Ghoneim S, Baumbach GL. Effects of chronic nitric oxide synthase inhibition on cerebral arterioles in rats. *Hypertension.* 1997;30:1097-104.
110. Deng LY, Thibault G, Schiffrin EL. Effect of hypertension induced by nitric oxide synthase inhibition on structure and function of resistance arteries in the rat. *Clin Exp Hypertens.* 1993;15:527-37.
111. Moreau P, Takase H, Kung CF, van Rooijen MM, Schaffner T, Luscher TF. Structure and function of the rat basilar artery during chronic nitric oxide synthase inhibition. *Stroke.* 1995;26:1922-8; discussion 1928-9.
112. Moreau P, Takase H, Kung CF, Shaw S, Luscher TF. Blood pressure and vascular effects of endothelin blockade in chronic nitric oxide-deficient hypertension. *Hypertension.* 1997;29:763-9.



113. Garg UC, Hassid A. Nitric oxide-generating vasodilators and 8-bromo-cyclic guanosine monophosphate inhibit mitogenesis and proliferation of cultured rat vascular smooth muscle cells. *J Clin Invest.* 1989;83:1774-7.
114. Kariya K, Kawahara Y, Araki S, Fukuzaki H, Takai Y. Antiproliferative action of cyclic GMP-elevating vasodilators in cultured rabbit aortic smooth muscle cells. *Atherosclerosis.* 1989;80:143-7.
115. Arnal JF, el Amrani AI, Chatellier G, Menard J, Michel JB. Cardiac weight in hypertension induced by nitric oxide synthase blockade. *Hypertension.* 1993;22:380-7.
116. Li JS, Sventek P, Schiffrin EL. Effect of antihypertensive treatment and N omega-nitro-L-arginine methyl ester on cardiovascular structure in deoxycorticosterone acetate-salt hypertensive rats. *J Hypertens.* 1996;14:1331-9.
117. Moreau P, Takase H, d'Uscio LV, Luscher TF. Effect of chronic nitric oxide deficiency on angiotensin II-induced hypertrophy of rat basilar artery. *Stroke.* 1998;29:1031-5; discussion 1035-6.
118. Pollock DM, Polakowski JS, Divish BJ, Opgenorth TJ. Angiotensin blockade reverses hypertension during long-term nitric oxide synthase inhibition. *Hypertension.* 1993;21:660-6.
119. Cunha RS, Cabral AM, Vasquez EC. Evidence that the autonomic nervous system plays a major role in the L-NAME-induced hypertension in conscious rats. *Am J Hypertens.* 1993;6:806-9.
120. Qiu C, Engels K, Baylis C. Endothelin modulates the pressor actions of acute systemic nitric oxide blockade. *J Am Soc Nephrol.* 1995;6:1476-81.
121. Thompson A, Valeri CR, Lieberthal W. Endothelin receptor A blockade alters hemodynamic response to nitric oxide inhibition in rats. *Am J Physiol.* 1995;269:H743-8.
122. Zatz R, Baylis C. Chronic nitric oxide inhibition model six years on. *Hypertension.* 1998;32:958-64.
123. Baylis C, Mitruka B, Deng A. Chronic blockade of nitric oxide synthesis in the rat produces systemic hypertension and glomerular damage. *J Clin Invest.* 1992;90:278-81.
124. Lahera V, Salom MG, Miranda-Guardiola F, Moncada S, Romero JC. Effects of NG-nitro-L-arginine methyl ester on renal function and blood pressure. *Am J Physiol.* 1991;261:F1033-7.
125. Salazar FJ, Pinilla JM, Lopez F, Romero JC, Quesada T. Renal effects of prolonged synthesis inhibition of endothelium-derived nitric oxide. *Hypertension.* 1992;20:113-7.

126. Folkow B, Gurevich M, Hallback M, Lundgren Y, Weiss L. The hemodynamic consequences of regional hypotension in spontaneously hypertensive and normotensive rats. *Acta Physiol Scand.* 1971;83:532-41.
127. Hansen TR, Bohr DF. Hypertension, transmural pressure, and vascular smooth muscle response in rats. *Circ Res.* 1975;36:590-8.
128. Stacy DL, Prewitt RL. Attenuated microvascular alterations in coarctation hypertension. *Am J Physiol.* 1989;256:H213-21.
129. Prewitt RL, Rice DC, Dobrian AD. Adaptation of resistance arteries to increases in pressure. *Microcirculation.* 2002;9:295-304.
130. Marieb E. *Anatomie et physiologie humaine.* 3ème ed: ERPI; 2005.
131. Davis MJ, Wu X, Nurkiewicz TR, Kawasaki J, Davis GE, Hill MA, Meininger GA. Integrins and mechanotransduction of the vascular myogenic response. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2001;280:H1427-33.
132. Lehoux S, Tedgui A. Cellular mechanics and gene expression in blood vessels. *J Biomech.* 2003;36:631-43.
133. Ridley AJ, Hall A. The small GTP-binding protein rho regulates the assembly of focal adhesions and actin stress fibers in response to growth factors. *Cell.* 1992;70:389-99.
134. Ridley AJ, Paterson HF, Johnston CL, Diekmann D, Hall A. The small GTP-binding protein rac regulates growth factor-induced membrane ruffling. *Cell.* 1992;70:401-10.
135. Harnett KM, Biancani P. Calcium-dependent and calcium-independent contractions in smooth muscles. *Am J Med.* 2003;115 Suppl 3A:24S-30S.
136. Fukata Y, Amano M, Kaibuchi K. Rho-Rho-kinase pathway in smooth muscle contraction and cytoskeletal reorganization of non-muscle cells. *Trends Pharmacol Sci.* 2001;22:32-9.
137. Lehoux S, Tedgui A. Signal transduction of mechanical stresses in the vascular wall. *Hypertension.* 1998;32:338-45.
138. Massett MP, Ungvari Z, Csiszar A, Kaley G, Koller A. Different roles of PKC and MAP kinases in arteriolar constrictions to pressure and agonists. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2002;283:H2282-7.
139. Yamboliev IA, Hedges JC, Mutnick JL, Adam LP, Gerthoffer WT. Evidence for modulation of smooth muscle force by the p38 MAP kinase/HSP27 pathway. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2000;278:H1899-907.
140. Touyz RM, Cruzado M, Tabet F, Yao G, Salomon S, Schiffrin EL. Redox-dependent MAP kinase signaling by Ang II in vascular smooth muscle cells: role of receptor tyrosine kinase transactivation. *Can J Physiol Pharmacol.* 2003;81:159-67.

141. Allen SP, Liang HM, Hill MA, Prewitt RL. Elevated pressure stimulates protooncogene expression in isolated mesenteric arteries. *Am J Physiol.* 1996;271:H1517-23.
142. Allen SP, Wade SS, Prewitt RL. Myogenic tone attenuates pressure-induced gene expression in isolated small arteries. *Hypertension.* 1997;30:203-8.
143. Wesselman JP, Dobrian AD, Schriver SD, Prewitt RL. Src tyrosine kinases and extracellular signal-regulated kinase 1/2 mitogen-activated protein kinases mediate pressure-induced c-fos expression in cannulated rat mesenteric small arteries. *Hypertension.* 2001;37:955-60.
144. Hu Y, Bock G, Wick G, Xu Q. Activation of PDGF receptor alpha in vascular smooth muscle cells by mechanical stress. *Faseb J.* 1998;12:1135-42.
145. Iwasaki H, Eguchi S, Ueno H, Marumo F, Hirata Y. Mechanical stretch stimulates growth of vascular smooth muscle cells via epidermal growth factor receptor. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2000;278:H521-9.
146. Griffin SA, Brown WC, MacPherson F, McGrath JC, Wilson VG, Korsgaard N, Mulvany MJ, Lever AF. Angiotensin II causes vascular hypertrophy in part by a non-pressor mechanism. *Hypertension.* 1991;17:626-35.
147. Simon G, Abraham G, Cserep G. Pressor and subpressor angiotensin II administration. Two experimental models of hypertension. *Am J Hypertens.* 1995;8:645-50.
148. Touyz RM. Intracellular mechanisms involved in vascular remodelling of resistance arteries in hypertension: role of angiotensin II. *Exp Physiol.* 2005;90:449-55.
149. Touyz RM. The role of angiotensin II in regulating vascular structural and functional changes in hypertension. *Curr Hypertens Rep.* 2003;5:155-64.
150. Saito Y, Berk BC. Transactivation: a novel signaling pathway from angiotensin II to tyrosine kinase receptors. *J Mol Cell Cardiol.* 2001;33:3-7.
151. Bakker EN, Buus CL, VanBavel E, Mulvany MJ. Activation of resistance arteries with endothelin-1: from vasoconstriction to functional adaptation and remodeling. *J Vasc Res.* 2004;41:174-82.
152. Ignarro LJ, Napoli C, Loscalzo J. Nitric oxide donors and cardiovascular agents modulating the bioactivity of nitric oxide: an overview. *Circ Res.* 2002;90:21-8.
153. Hill MA, Potocnik SJ, Martinez-Lemus LA, Meininger GA. Delayed arteriolar relaxation after prolonged agonist exposure: functional remodeling involving tyrosine phosphorylation. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2003;285:H849-56.

154. Cipolla MJ, Gokina NI, Osol G. Pressure-induced actin polymerization in vascular smooth muscle as a mechanism underlying myogenic behavior. *Faseb J.* 2002;16:72-6.
155. Martinez-Lemus LA, Sun Z, Trache A, Trzciakowski JP, Meininger GA. Integrins and regulation of the microcirculation: from arterioles to molecular studies using atomic force microscopy. *Microcirculation.* 2005;12:99-112.
156. Gunst SJ, Tang DD, Opazo Saez A. Cytoskeletal remodeling of the airway smooth muscle cell: a mechanism for adaptation to mechanical forces in the lung. *Respir Physiol Neurobiol.* 2003;137:151-68.
157. Morgan KG. The role of calcium in the control of vascular tone as assessed by the Ca<sup>2+</sup> indicator aequorin. *Cardiovasc Drugs Ther.* 1990;4:1355-62.
158. Rasmussen H, Takuwa Y, Park S. Protein kinase C in the regulation of smooth muscle contraction. *Faseb J.* 1987;1:177-85.
159. Osol G, Laher I, Cipolla M. Protein kinase C modulates basal myogenic tone in resistance arteries from the cerebral circulation. *Circ Res.* 1991;68:359-67.
160. Gokina NI, Knot HJ, Nelson MT, Osol G. Increased Ca<sup>2+</sup> sensitivity as a key mechanism of PKC-induced constriction in pressurized cerebral arteries. *Am J Physiol.* 1999;277:H1178-88.
161. VanBavel E, van der Meulen ET, Spaan JA. Role of Rho-associated protein kinase in tone and calcium sensitivity of cannulated rat mesenteric small arteries. *Exp Physiol.* 2001;86:585-92.
162. Schubert R, Kalentchuk VU, Krien U. Rho kinase inhibition partly weakens myogenic reactivity in rat small arteries by changing calcium sensitivity. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2002;283:H2288-95.
163. Lagaud G, Gaudreault N, Moore ED, Van Breemen C, Laher I. Pressure-dependent myogenic constriction of cerebral arteries occurs independently of voltage-dependent activation. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2002;283:H2187-95.
164. Gorlach C, Benyo Z, Wahl M. Endothelin-1-induced contraction in cerebral vessels mediated by phospholipase C/protein kinase C cascade. *Kidney Int Suppl.* 1998;67:S224-5.
165. Meininger GA, Faber JE. Adrenergic facilitation of myogenic response in skeletal muscle arterioles. *Am J Physiol.* 1991;260:H1424-32.
166. Faber JE, Meininger GA. Selective interaction of alpha-adrenoceptors with myogenic regulation of microvascular smooth muscle. *Am J Physiol.* 1990;259:H1126-33.
167. Pfitzer G. Invited review: regulation of myosin phosphorylation in smooth muscle. *J Appl Physiol.* 2001;91:497-503.

168. Somlyo AP, Somlyo AV. Ca<sup>2+</sup> sensitivity of smooth muscle and nonmuscle myosin II: modulated by G proteins, kinases, and myosin phosphatase. *Physiol Rev.* 2003;83:1325-58.
169. Seasholtz TM, Majumdar M, Brown JH. Rho as a mediator of G protein-coupled receptor signaling. *Mol Pharmacol.* 1999;55:949-56.
170. Mehta D, Gunst SJ. Actin polymerization stimulated by contractile activation regulates force development in canine tracheal smooth muscle. *J Physiol.* 1999;519 Pt 3:829-40.
171. Gunst SJ, Fredberg JJ. The first three minutes: smooth muscle contraction, cytoskeletal events, and soft glasses. *J Appl Physiol.* 2003;95:413-25.
172. Narumiya S, Ishizaki T, Watanabe N. Rho effectors and reorganization of actin cytoskeleton. *FEBS Lett.* 1997;410:68-72.
173. Watanabe N, Madaule P, Reid T, Ishizaki T, Watanabe G, Kakizuka A, Saito Y, Nakao K, Jockusch BM, Narumiya S. p140mDia, a mammalian homolog of *Drosophila* diaphanous, is a target protein for Rho small GTPase and is a ligand for profilin. *Embo J.* 1997;16:3044-56.
174. Riveline D, Zamir E, Balaban NQ, Schwarz US, Ishizaki T, Narumiya S, Kam Z, Geiger B, Bershadsky AD. Focal contacts as mechanosensors: externally applied local mechanical force induces growth of focal contacts by an mDia1-dependent and ROCK-independent mechanism. *J Cell Biol.* 2001;153:1175-86.
175. Meloche S, Landry J, Huot J, Houle F, Marceau F, Giasson E. p38 MAP kinase pathway regulates angiotensin II-induced contraction of rat vascular smooth muscle. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2000;279:H741-51.
176. Li S, Moon JJ, Miao H, Jin G, Chen BP, Yuan S, Hu Y, Usami S, Chien S. Signal transduction in matrix contraction and the migration of vascular smooth muscle cells in three-dimensional matrix. *J Vasc Res.* 2003;40:378-88.
177. Bagrodia S, Cerione RA. Pak to the future. *Trends Cell Biol.* 1999;9:350-5.
178. Burridge K, Wennerberg K. Rho and Rac take center stage. *Cell.* 2004;116:167-79.
179. Bokoch GM. Biology of the p21-activated kinases. *Annu Rev Biochem.* 2003;72:743-81.
180. Sanders LC, Matsumura F, Bokoch GM, de Lanerolle P. Inhibition of myosin light chain kinase by p21-activated kinase. *Science.* 1999;283:2083-5.
181. van Leeuwen FN, van Delft S, Kain HE, van der Kammen RA, Collard JG. Rac regulates phosphorylation of the myosin-II heavy chain, actinomyosin disassembly and cell spreading. *Nat Cell Biol.* 1999;1:242-8.

182. Stanyon CA, Bernard O. LIM-kinase1. *Int J Biochem Cell Biol.* 1999;31:389-94.
183. Edwards DC, Sanders LC, Bokoch GM, Gill GN. Activation of LIM-kinase by Pak1 couples Rac/Cdc42 GTPase signalling to actin cytoskeletal dynamics. *Nat Cell Biol.* 1999;1:253-9.
184. Lips DJ, deWindt LJ, van Kraaij DJ, Doevendans PA. Molecular determinants of myocardial hypertrophy and failure: alternative pathways for beneficial and maladaptive hypertrophy. *Eur Heart J.* 2003;24:883-96.
185. Ganau A, Devereux RB, Roman MJ, de Simone G, Pickering TG, Saba PS, Vargiu P, Simongini I, Laragh JH. Patterns of left ventricular hypertrophy and geometric remodeling in essential hypertension. *J Am Coll Cardiol.* 1992;19:1550-8.
186. Reichek N. Patterns of left ventricular response in essential hypertension. *J Am Coll Cardiol.* 1992;19:1559-60.
187. Bugra Z, Koylan N, Vural A, Erzenin F, Umman B, Yilmaz E, Meric M, Buyukozturk K. Left ventricular geometric patterns and QT dispersion in untreated essential hypertension. *Am J Hypertens.* 1998;11:1164-70.
188. Thurmann PA. Left ventricular and microvascular hypertrophy in essential hypertension: clinical relevance and prognostic implications. *Int J Clin Pharmacol Ther.* 1997;35:181-7.
189. Koren MJ, Devereux RB, Casale PN, Savage DD, Laragh JH. Relation of left ventricular mass and geometry to morbidity and mortality in uncomplicated essential hypertension. *Ann Intern Med.* 1991;114:345-52.
190. Izzo JL. Pathogenesis of Left Ventricular Hypertrophy and Diastolic Dysfunction. In: Joseph L. Izzo HRB, ed. *Hypertension Primer.* second ed: American Heart Association; 1999:471.
191. Qu P, Ding Y, Xia D, Wang H, Tian X. Variations in cardiac diastolic function in hypertensive patients with different left ventricular geometric patterns. *Hypertens Res.* 2001;24:601-4.
192. Park JB, Schiffrin EL. Small artery remodeling is the most prevalent (earliest?) form of target organ damage in mild essential hypertension. *J Hypertens.* 2001;19:921-30.
193. Martens FM, Demeilliers B, Girardot D, Daigle C, Dao HH, deBlois D, Moreau P. Vessel-specific stimulation of protein synthesis by nitric oxide synthase inhibition: role of extracellular signal-regulated kinases 1/2. *Hypertension.* 2002;39:16-21.
194. Girardot D, Demeilliers B, deBlois D, Moreau P. ERK1/2-mediated vasoconstriction normalizes wall stress in small mesenteric arteries during NOS inhibition in vivo. *J Cardiovasc Pharmacol.* 2003;42:339-47.

195. Schofield I, Malik R, Izzard A, Austin C, Heagerty A. Vascular structural and functional changes in type 2 diabetes mellitus: evidence for the roles of abnormal myogenic responsiveness and dyslipidemia. *Circulation*. 2002;106:3037-43.
196. Touyz RM, He G, Deng LY, Schiffrin EL. Role of extracellular signal-regulated kinases in angiotensin II-stimulated contraction of smooth muscle cells from human resistance arteries. *Circulation*. 1999;99:392-9.
197. Matrougui K, Eskildsen-Helmond YE, Fiebeler A, Henrion D, Levy BI, Tedgui A, Mulvany MJ. Angiotensin II stimulates extracellular signal-regulated kinase activity in intact pressurized rat mesenteric resistance arteries. *Hypertension*. 2000;36:617-21.
198. Sventek P, Turgeon A, Schiffrin EL. Vascular endothelin-1 gene expression and effect on blood pressure of chronic ETA endothelin receptor antagonism after nitric oxide synthase inhibition with L-NAME in normal rats. *Circulation*. 1997;95:240-4.
199. Takase H, Moreau P, Kung CF, Nava E, Luscher TF. Antihypertensive therapy prevents endothelial dysfunction in chronic nitric oxide deficiency. Effect of verapamil and trandolapril. *Hypertension*. 1996;27:25-31.
200. Zigmond SH. Signal transduction and actin filament organization. *Curr Opin Cell Biol*. 1996;8:66-73.
201. Tapon N, Hall A. Rho, Rac and Cdc42 GTPases regulate the organization of the actin cytoskeleton. *Curr Opin Cell Biol*. 1997;9:86-92.
202. Symons M. Adhesion signaling: PAK meets Rac on solid ground. *Curr Biol*. 2000;10:R535-7.
203. Daniels RH, Bokoch GM. p21-activated protein kinase: a crucial component of morphological signaling? *Trends Biochem Sci*. 1999;24:350-5.
204. Cotteret S, Chernoff J. The evolutionary history of effectors downstream of Cdc42 and Rac. *Genome Biol*. 2002;3:REVIEWS0002.
205. Li C, Hu Y, Sturm G, Wick G, Xu Q. Ras/Rac-Dependent activation of p38 mitogen-activated protein kinases in smooth muscle cells stimulated by cyclic strain stress. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2000;20:E1-9.
206. Nimnual AS, Taylor LJ, Bar-Sagi D. Redox-dependent downregulation of Rho by Rac. *Nat Cell Biol*. 2003;5:236-41.
207. Bartunek J, Weinberg EO, Tajima M, Rohrbach S, Katz SE, Douglas PS, Lorell BH. Chronic N(G)-nitro-L-arginine methyl ester-induced hypertension : novel molecular adaptation to systolic load in absence of hypertrophy. *Circulation*. 2000;101:423-9.

208. Matsubara BB, Matsubara LS, Zornoff LA, Franco M, Janicki JS. Left ventricular adaptation to chronic pressure overload induced by inhibition of nitric oxide synthase in rats. *Basic Res Cardiol*. 1998;93:173-81.
209. Nobes CD, Hall A. Rho, rac and cdc42 GTPases: regulators of actin structures, cell adhesion and motility. *Biochem Soc Trans*. 1995;23:456-9.
210. Wittmann T, Waterman-Storer CM. Cell motility: can Rho GTPases and microtubules point the way? *J Cell Sci*. 2001;114:3795-803.
211. Mulvany MJ. Small artery remodeling in hypertension. *Curr Hypertens Rep*. 2002;4:49-55.
212. Fuller RB. Tensegrity. In: *Portfolio Artnews Annual*; 1961:112-127.
213. Ingber DE. Tensegrity I. Cell structure and hierarchical systems biology. *J Cell Sci*. 2003;116:1157-73.
214. Chicurel ME, Chen CS, Ingber DE. Cellular control lies in the balance of forces. *Curr Opin Cell Biol*. 1998;10:232-9.
215. Martinez-Lemus LA, Wu X, Wilson E, Hill MA, Davis GE, Davis MJ, Meininger GA. Integrins as unique receptors for vascular control. *J Vasc Res*. 2003;40:211-33.
216. Bakker EN, Buus CL, Spaan JA, Perree J, Ganga A, Rolf TM, Sorop O, Bramsen LH, Mulvany MJ, Vanbavel E. Small artery remodeling depends on tissue-type transglutaminase. *Circ Res*. 2005;96:119-26.
217. Bouvet C, Gilbert LA, Girardot D, deBlois D, Moreau P. Different involvement of extracellular matrix components in small and large arteries during chronic NO synthase inhibition. *Hypertension*. 2005;45:432-7.



**ANNEXE**

## ERK1/2-Mediated Vasoconstriction Normalizes Wall Stress in Small Mesenteric Arteries During NOS Inhibition In Vivo

Daphné Girardot, Bénédicte Demeilliers, \*Denis deBlois, and Pierre Moreau

**Abstract:** As in essential hypertension, chronic nitric-oxide synthase (NOS) inhibition leads to hypertrophic remodeling in conduit and muscular arteries and inward eutrophic remodeling in small resistance arteries with activation of extracellular signal-regulated kinases 1 and 2 (ERK1/2) in both vessel types. The authors tested the hypothesis that this remodeling heterogeneity could be related to distinct vasoreactivity patterns in small and larger arteries, with a vessel-specific function of ERK1/2 signaling. Using intravital microscopy in rats we have demonstrated that acute NOS inhibition (L-NA injection, 100 mg/kg) produced vasoconstriction of small mesenteric arteries. Consequently, the calculated in vivo wall stress was not significantly modified, despite the local rise in pressure. This could explain the lack of vascular protein synthesis elevation in vivo, an early index of hypertrophy. Inhibition of ERK1/2 activation with PD98059 blunted mesenteric artery contractions. Femoral arteries did not contract and were thus submitted to an enhanced wall stress and underwent hypertrophic remodeling in chronic conditions. In conclusion, the heterogeneous vascular remodeling in the L-NAME model is associated with a heterogeneous vasoconstriction response to acute NOS inhibition. Indeed, in contrast to larger arteries, L-NA-induced vasoconstriction in small arteries normalized wall stress and prevented early signs of hypertrophy. The results also suggest that ERK1/2 is a signaling element in NOS inhibition-induced vasoconstriction of small arteries in vivo.

**Key Words:** vascular remodeling, NO, small artery contraction, ERK1/2, wall stress

(*J Cardiovasc Pharmacol*<sup>TM</sup> 2003;42: 339–347)

Chronic blockade of nitric-oxide synthase (NOS) activity, with L-arginine analogues such as N<sup>G</sup>-nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME), leads to hypertension<sup>1,2</sup> and mimics a

defective endothelium-dependent dilation found in arteries of patients with essential hypertension.<sup>3,4</sup> As in essential hypertension, L-NAME-induced hypertension is associated with an increase in peripheral resistance<sup>5–7</sup> and leads to a heterogeneous vascular remodeling along the arterial tree. Indeed, conduit arteries remodel with increases in both media to lumen ratio (M/L) and medial cross-sectional area (mCSA),<sup>8,9</sup> while small arteries change their structure (increase M/L) without alteration of mCSA.<sup>4,10,11</sup> Thus, small artery remodeling in the L-NAME model and in essential hypertension is generally considered as inward eutrophic remodeling.<sup>12,13</sup> This type of remodeling is believed to contribute to the increase of peripheral resistance, since lumen diameter is reduced. Indeed, according to Poiseuille's law, resistance varies inversely with the fourth power of the blood vessel radius, so that a small decrease in the lumen diameter markedly increases resistance, potentially leading to decreased organ perfusion and end-organ damage.<sup>14–16</sup>

Mechanisms leading to eutrophic remodeling in resistance arteries are still poorly understood. Two studies have demonstrated that an elevation of arterial pressure enhances the expression of genes implicated in cell proliferation in the wall of large<sup>17</sup> and small<sup>18</sup> arteries. Both studies also observed a contribution of extracellular signal-regulated kinases 1 and 2 (ERK1/2) in signaling mechanisms leading to vascular hypertrophy.<sup>17,19</sup> However, Prewitt et al<sup>20</sup> observed in vitro that in response to pressure, contraction of isolated small mesenteric arteries led to wall stress normalization and blunted the expression of early response genes involved in growth and proliferation. Thus, early vasoconstriction could lead to eutrophic remodeling by preventing wall stress elevation and the subsequent trophic response.<sup>13</sup> Accordingly, the transition from vasoconstriction to the more stable eutrophic remodeling has been demonstrated in cultured small arteries.<sup>21,22</sup> However, this concept has not been tested in vivo.

Recent work in our laboratory has shown that acute (5-hour) endogenous NOS inhibition leads to an augmentation of protein synthesis, an early marker of hypertrophy, in the aorta but not in small arteries in vivo.<sup>23</sup> However, ERK1/2 activity was increased in both types of arteries, suggesting that ERK1/2 could contribute to functions other than proliferation in small arteries. Accordingly, the contribution of ERK1/2 to vasocon-

Received September 12, 2002; accepted January 27, 2003.

Faculty of Pharmacy and \*Department of Pharmacology, Faculty of Medicine, Université de Montréal, Montréal, Canada

Supported by the Heart and Stroke Foundation of Canada. Drs. Girardot and Demeilliers received a stipend from the Canadian Hypertension Society. Dr. Moreau is a Canadian Institutes for Health Research Scholar. Dr deBlois was supported by the Fonds de la recherche en santé du Québec.

Address correspondence and reprint requests to Pierre Moreau, PhD, Faculty of Pharmacy H3C 3J7, Édouard-Montpetit, Room R-313, P.O. Box 6128, Stn Centre-Ville, Université de Montréal, Montréal, Canada. E-mail: [REDACTED]

striction of small arteries has already been confirmed after angiotensin II stimulation in cells<sup>24,25</sup> and in isolated mesenteric arteries.<sup>26</sup> However, its role in vivo and in NOS inhibition-induced remodeling remains unresolved.

In this study, we aimed to demonstrate, in vivo, that early vasoconstriction during NOS inhibition is heterogeneous along the vascular tree and that only small resistance arteries normalize their wall stress by this mechanism. This would lend support to the hypothesis that vasomotion is a determinant of long-term remodeling. The originality of our work lies in the in vivo approach of evaluating vasoreactivity in mesenteric and femoral arteries during acute NOS inhibition by intravital microscopy, and we compared these acute observations with arterial structural changes induced by long-term treatment with L-NAME. In addition, the contribution of ERK1/2 in mesenteric contraction during acute NOS inhibition was studied by phosphospecific immunoblotting and by inhibition of its activation with PD98059, which has also not been tested in vivo.

## METHODS

Male Wistar rats weighing between 250 and 275 g were purchased from Charles River (St-Constant, Canada). All protocols were approved by the Animal Care Committee of Université de Montréal.

### Long-term study

Male Wistar rats ( $n = 8$ ) were treated during a 4-week period with a daily dose of 50-mg/kg L-NAME ( $N^G$ -nitro-L-arginine methyl ester, Sigma Chemical Company) dissolved in their drinking water. Eight untreated rats served as controls. After treatment and under anesthesia with sodium pentobarbital (50 mg/kg, i.p.), a polyethylene catheter (PE10 tubing welded with a PE 50 tubing) was inserted in the left femoral artery followed by a tracheotomy. After a laparotomy, a second polyethylene catheter was inserted in a first-order mesenteric artery distal to the vessel under study (see below). Mesenteric and femoral mean arterial pressure were recorded through a pressure transducer. The right femoral artery and the selected third-order mesenteric artery were collected and prepared under a dissection microscope in a cold Krebs solution of the following composition (in mmol/L, control solution): NaCl 118.6, KCl 4.7,  $CaCl_2$  2.5,  $KH_2PO_4$  1.2,  $MgSO_4$  1.2,  $NaHCO_3$  25.1, edetate calcium disodium 0.026, glucose 10.1. Arteries were pulled and sutured on 2 glass cannulae positioned in a vessel chamber (Living System Instrumentation) and superfused with calcium-free control solution maintained at 37°C and oxygenated (95%  $O_2$  and 5%  $CO_2$ ). The vessel chamber was positioned on a stage of an inverted microscope (Zeiss) and the amplified image was transmitted to a monitor and a video dimension analyzer (Living System Instrumentation) as previously described.<sup>27</sup> Both arteries were equilibrated for 30 minutes in a calcium-free control solution with a constant perfusion pressure in fully relaxed conditions. This allowed for

the measurements of lumen diameter, external diameter and media thickness of small mesenteric arteries, from which M/L ratio and mCSA were calculated. Due to the thickness of the femoral artery, its structure could not be reliably measured in the system. Therefore, they were fixed with 4% paraformaldehyde PBS solution for 15 minutes in the organ bath in perfused, pressurized, and fully relaxed conditions. Femoral structure parameters were obtained by digital morphometry on 5- $\mu$ m paraffin-embedded histologic slices.

Thus, mesenteric mCSA was calculated as:  $(\Pi/4) \times [(ED)^2 - (ID)^2]$ , while femoral mCSA was calculated as: external elastic laminae area – internal elastic lamellae area.

### Acute Studies

In the first acute intravital study, 1 group of 8 rats served for intravital femoral reactivity measurement and another group of 8 rats served for mesenteric reactivity, each rat serving as its own control. For the femoral measurement, a polyethylene catheter (PE10 tubing welded with a PE 50 tubing) was inserted in the left femoral vein under anesthesia with sodium pentobarbital (50 mg/kg, IP). This procedure was followed by a tracheotomy and rats were laid on a temperature-controlled (37°C) surgery board. After careful isolation of the artery from the vein, the external diameter of the right femoral artery was measured by video microscopy, using a trinocular dissection microscope (Zeiss, Stemi2000) at a final magnification of 50X. The quantification was done using a video dimension analyzer (Living systems instrumentation). Local femoral mean arterial pressure and external diameter were recorded before and after an acute intravenous injection of L-nitro arginine (100 mg/kg in 0.25 mL). The maximal response for both parameters is presented. Preliminary experiments showed that a similar volume of physiological saline did not increase arterial pressure. L-NA was chosen because it provided more reproducible acute pressor responses than L-NAME.

Mesenteric reactivity was measured after laparotomy and exteriorization of the mesentery, which was superfused with a control Krebs solution that was oxygenated (95%  $O_2$  and 5%  $CO_2$ ) and maintained at 37°C. The external diameter of a selected third-order artery was obtained by video microscopy (see above) and local mesenteric mean arterial pressure was recorded as described in the long-term study section.

Since the external diameter was measured in vivo and mCSA does not change after acute treatments, other parameters were obtained by measuring the mCSA in vitro for each artery in relaxed conditions as described in the long-term study section. Femoral and mesenteric internal diameter, media thickness, and wall stress were then obtained by using the following formulas:

$$\begin{aligned} \text{Lumen area} &= (\text{external diameter}/2)^2 \times \pi - \text{wall CSA} \\ \text{Lumen diameter} &= 2 \times (\text{lumen area}/\pi)^{1/2} \end{aligned}$$

Media thickness = (external diameter – lumen diameter)/2

Wall stress (LaPlace law) = pressure × 1334 dyn/cm<sup>2</sup>/mm Hg × lumen diameter/media thickness

Due to the different methodology used for structure measurements in the acute and long-term studies, it must be noted that similar anatomic segments gave different external and lumen diameters (Tables 1 and 2). The expansion of arteries in vitro (acute study, Table 2) could be related to direct manipulation, removal of supporting tissues, change of longitudinal tension, or other factors.

In the second acute study, 3 additional groups of rats served to determine the in vivo contribution of ERK1/2 in mesenteric reactivity and to measure its phosphorylation state. A group of rats (n = 4) was used as controls and received an injection of physiological saline solution (NaCl 0.9%). A second group received an intravenous injection of L-NA (100 mg/kg in 0.25 mL), and the third group received an i.p. administration of PD98059 (3 mg/kg), a selective inhibitor of ERK1/2 activation, 1 hour before the L-NA injection. Local mean arterial pressure and the external diameter were measured before and after the i.v. injection of L-NA or physiological saline solution, as described previously.

### Western Blotting of ERKs

ERK1/2 phosphorylation was estimated by Western blotting using a phosphospecific antibody, as previously described.<sup>23,24</sup> In the second acute study, all arterial branches of the mesenterium, excluding the superior mesenteric artery, were harvested and frozen at -80°C. Samples were pulverized in dry ice and liquid nitrogen and homogenized using a polytron in ice-cold lysis buffer (PBS 20%, Igepal CA-630 1%, Na-deoxycholate 0.5%, SDS 0.1%, PMSF 0.25%, and aprotinin 0.1%). After 30 minutes of incubation at 4°C, the protein supernatant was separated by centrifugation (4°C, 30 minutes,

14,000g) and protein concentration determined with a Micro BCA Protein Reagent Kit (Pierce).

Equal amounts of protein (20 µg) were loaded on a 10% SDS polyacrylamide gel. Proteins were then transferred to a polyvinylidene difluoride membrane (Fisher Scientific) and incubated overnight at 4°C with a phosphospecific ERK1/2 antibody (p44/p42 MAPK thr 202/tyr 204 E10 monoclonal antibody New England Biolabs, final dilution 1:2000). The membrane was then washed and incubated for 2 hours at room temperature with a second antibody (anti-rabbit IgG, H&L, HRP-linked, Cell Signaling Technology). After the final wash, the membrane was incubated 1 minute with ECL Western blotting reagents (Amersham Pharmacia Biotech) and exposed on Hyperfilm ECL (Amersham), which was subsequently developed. The film was scanned and optical density quantified using NIH Image. The optical density of ERKs 1 and 2 were generally closely related and the values were added to provide a single value. Results were normalized to control values on each gel to account for methodological variation.

### Plasma Renin Activity Measurements

Blood was obtained from control and L-NA-treated rats used in the second acute study, 15 minutes after the injection of L-NA. Samples were collected in Eppendorfs containing EDTA (1 mg/mL), centrifuged during 15 minutes at 12,000g, and stored at -20°C. Plasma renin activity was measured by determining the generation of angiotensin I by a radioimmunoassay using <sup>125</sup>I-labeled angiotensin I as a tracer (angiotensin I [<sup>125</sup>I] radioimmunoassay kit, NEN Life Science Products, NEA104).

### Protein Synthesis Measurements

Vascular protein synthesis during NOS inhibition was measured in a previous study.<sup>23</sup> However, the dose of L-arginine analogs was smaller and there was no significant el-

**TABLE 1.** Local mean arterial pressure (MAP) and morphological characteristics of femoral and mesenteric arteries in control rats and rats receiving long-term L-NAME treatment

Parameters	Femoral Artery		Mesenteric Artery	
	Control	L-NAME	Control	L-NAME
Local MAP (mm Hg)	103 ± 3	153 ± 11*	97 ± 4	150 ± 16*
Lumen diameter (µm)	336 ± 15	303 ± 34	260 ± 8	233 ± 7*
External diameter (µm)	440 ± 14	448 ± 25	310 ± 11	291 ± 8
Media thickness (µm)	52 ± 3	72 ± 6*	25 ± 1	27 ± 1
M/L (%)	15.6 ± 1.2	26.6 ± 4.9*	9.7 ± 0.4	11.5 ± 0.2*
mCSA (µm <sup>2</sup> × 10 <sup>3</sup> )	63 ± 4	83 ± 5*	23 ± 1.8	23 ± 1.2

M/L, media thickness/lumen diameter ratio; mCSA, cross-sectional area of the media  
\*P < 0.05 versus respective control values.

**TABLE 2.** Characteristics of femoral and mesenteric arteries in control and rats treated acutely with L-NA

Parameters	Femoral Artery		Mesenteric Artery	
	Control	L-NA	Control	L-NA
External CSA ( $\mu\text{m}^2 \times 10^3$ )	116 $\pm$ 8	123 $\pm$ 5	27 $\pm$ 3	18* $\pm$ 2
Medial CSA ( $\mu\text{m}^2 \times 10^3$ )	103 $\pm$ 13	103 $\pm$ 8	12 $\pm$ 1	12 $\pm$ 1
Lumen Area ( $\mu\text{m}^2 \times 10^3$ )	28.8 $\pm$ 7.5	31.7 $\pm$ 8.2	15.3 $\pm$ 2.6	5.3* $\pm$ 2.0
Lumen diameter ( $\mu\text{m}$ )	189 $\pm$ 24	197 $\pm$ 28	137 $\pm$ 13	94* $\pm$ 12
Media thickness ( $\mu\text{m}$ )	106 $\pm$ 9	104 $\pm$ 9	24 $\pm$ 2	31 $\pm$ 5

The external cross-sectional area (CSA) was calculated from in vivo external diameter (Figs. 1B and 1E), while the other morphological parameters were deduced from in vitro measurements of the same arteries. These values were used to calculate wall stress (Figs. 1C and 1F). See Methods for calculations.

\* $P < 0.05$  versus respective control values.

evation of arterial pressure. Thus, in a third acute study, L-NA-treated rats ( $n = 4$ ) received a first i.v. bolus of L-NA (50 mg/kg) 1 hour before the start of a 4-hour [ $^3\text{H}$ ] L-leucine infusion (12  $\mu\text{Ci/h}$ ). The injection of L-NA was repeated 2.5 hours after the first injection. Control rats ( $n = 4$ ) received a similar volume of saline at the same time points. Rats were then rapidly killed, and mesenteric arteries were collected and processed to determine the incorporation of radiolabeled leucine, as previously described.<sup>23</sup> The final results are expressed as cpm/mg protein. Pressure was measured throughout the experiment and the average of the 5-hour recording is reported.

### Drugs and Statistical Analysis

All drugs were obtained from Sigma, except PD98059, which was purchased from Calbiochem. A suspension of PD98059 was prepared using a 1% polymeric solution (pluronic F68) and sonication, before the i.p. administration. Data are presented as mean  $\pm$  SEM except for ERK1/2 activity, which is expressed as mean percent change from control value  $\pm$  SEM. Statistical analysis was performed by unpaired  $t$  test (long-term study and protein synthesis), paired  $t$  test (acute study), ANOVA followed by Bonferroni correction for multiple comparisons (study with PD98059), and 1-sample analysis (Western blots). A  $P$  value less than 0.05 was considered significant.

## RESULTS

### Vascular Structure after Chronic NOS Inhibition

In the long-term experiments (Table 1), L-NAME significantly increased femoral mean arterial pressure, as expected. Femoral medial thickness was increased, and since the internal diameter did not change significantly, both M/L and mCSA were elevated in the L-NAME-treated group. The local pressure in the mesenteric artery was also elevated by L-

NAME. However, in contrast to the femoral artery, the elevation of M/L was not associated with changes in mCSA under L-NAME treatment, confirming a eutrophic type of inward remodeling (Table 1).

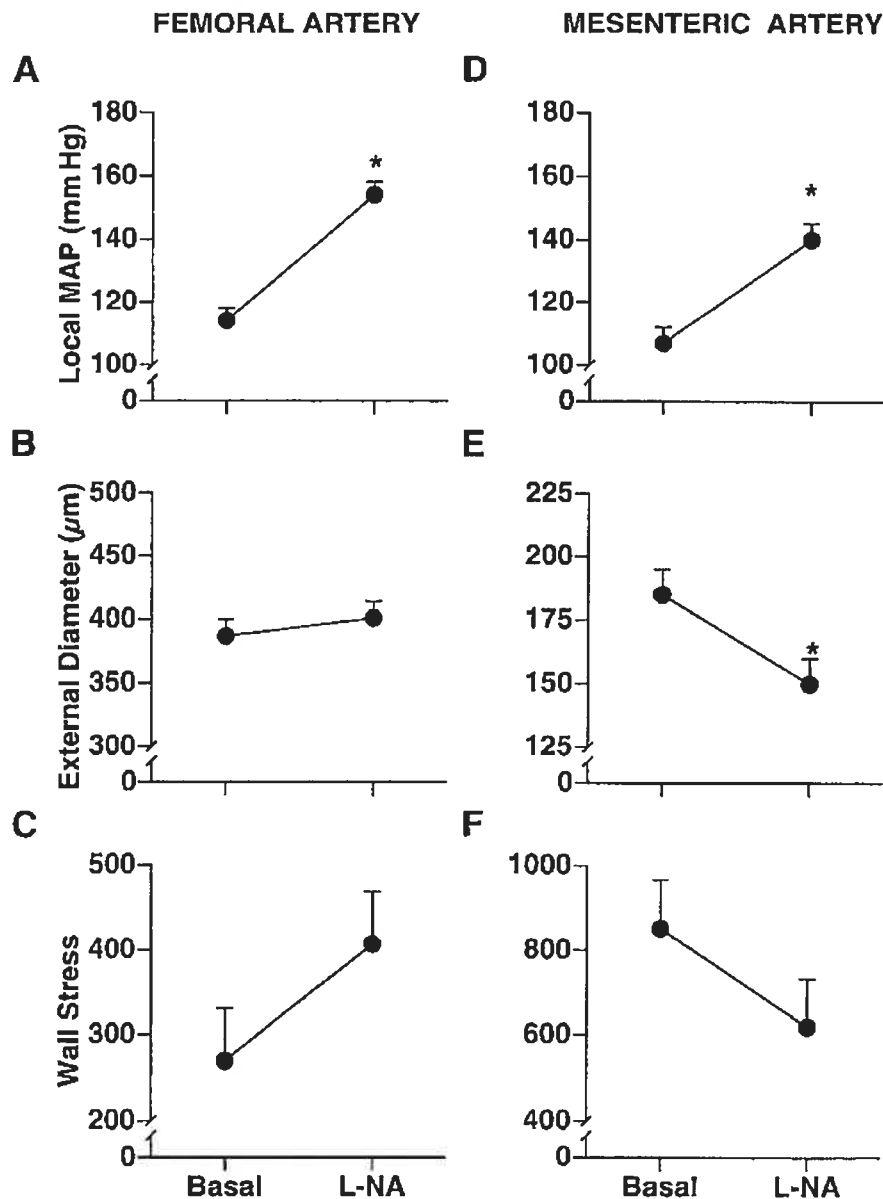
### In Vivo Reactivity of the Femoral and the Mesenteric Arteries During Acute NOS Inhibition

Acute administration of L-NA significantly increased local mean arterial pressure in the femoral and mesenteric arteries, as compared with control values (Figs. 1A and 1D). The absence of femoral contraction during L-NA injection (Fig. 1B) led to a local increase of wall stress, as compared with control values (Fig. 1C). In contrast, the significant reduction in external and, more importantly, in lumen diameter of mesenteric arteries confirmed that L-NA induced local vasoconstriction in these arteries (Fig. 1E and Table 2). This acute change of morphology prevented any significant elevation of wall stress. In fact, wall stress tended to decrease under L-NA administration, as compared with control values (Fig. 1F). As described in Methods, femoral and mesenteric wall stresses were calculated from structural parameters presented in Table 2.

Since there was no femoral reactivity during acute NOS inhibition, the contribution of ERK1/2 to vascular contraction was only studied in mesenteric arteries (Fig. 2). As previously observed, the acute administration of L-NA increased systemic mean arterial pressure when compared with control values (Fig. 2A). Pretreatment with an IP injection of PD98059 1 hour before L-NA injection did not modify baseline blood pressure or pressor response to L-NA. However, the L-NA-induced mesenteric constriction was totally prevented by PD98059, as shown by the changes in the external diameter (Fig. 2B).

### ERK1/2 Phosphorylation

Western blot analysis with a phosphospecific antibody showed a significant increase of ERK1/2 phosphorylation in



**FIGURE 1.** Maximal effect of acute NOS inhibition on local mean arterial pressure (MAP, mm Hg), external diameter (μm), and wall stress ( $\times 10^3$  dyn/cm<sup>2</sup>) in rat femoral (A–C) and mesenteric (D–F) arteries before and after drug administration (L-NA, 100 mg/kg). \* $P < 0.05$  versus basal level, paired  $t$  test.

mesenteric arteries harvested from rats treated acutely with L-NA (Fig. 3). Pretreatment with PD98059, in addition to prevent contraction, abrogated the ERK1/2 phosphorylation induced by L-NA. In fact, the level of ERK1/2 phosphorylation even decreased below control levels (Fig. 3).

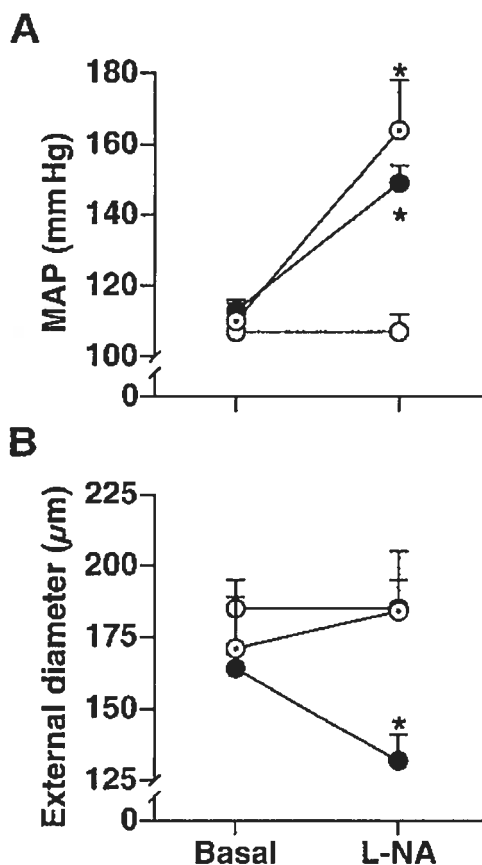
**Plasma Renin Activity Measurements**

To rule out any global effect of the circulating renin-angiotensin system on mesenteric contraction during acute

NOS inhibition, we measured plasma renin activity in control and L-NA-treated rats. Acute injection of L-NA (100 mg/kg) had no significant effect on the plasma renin activity ( $9.3 \pm 1.0$  ng/mL per hour as compared with  $7.8 \pm 0.9$  ng/mL per hour in the control group).

**Protein Synthesis**

Basal protein synthesis was  $217.7 \pm 42.9$  cpm/mg protein in mesenteric arteries of control animals. Injection of a



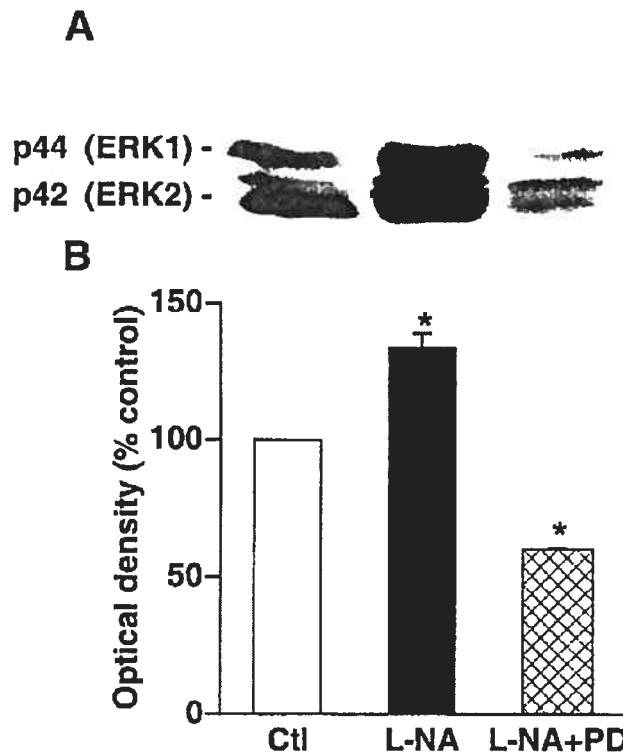
**FIGURE 2.** Maximal effect of saline (○), 100-mg/kg L-NA (●), and L-NA plus 3-mg/kg PD98059 given 1 hour before (○) on (A) mean arterial pressure and (B) mesenteric external diameter. \* $P < 0.05$  versus basal level, ANOVA plus Bonferroni correction for multiple comparisons.

pressor dose of L-NA ( $2 \times 50$  mg/kg administered at 2.5-hour intervals) did not enhance mesenteric protein synthesis ( $234.8 \pm 62.0$  cpm/mg protein). On average over the 5 hours of recording, the pressure increased from  $104 \pm 3.9$  to  $134 \pm 6.6$  mm Hg with L-NA ( $P < 0.05$ ).

### DISCUSSION

The use of intravital microscopy enabled us to measure in vivo reactivity of femoral and mesenteric arteries during acute NOS inhibition, and the simultaneous local pressure recording allowed us to directly evaluate local wall stress. We observed that mesenteric contraction in response to acute NOS blockade normalized wall stress, while no contraction was observed in femoral arteries, leading to a rise of wall stress. Furthermore, ERK1/2 activation contributes to mesenteric artery contraction in vivo during acute NOS inhibition. These acute differences were associated with distinct remodeling patterns in long-term conditions.

Long-term administration of L-NAME increased local femoral and mesenteric mean arterial pressure, as expected from numerous studies using this drug to induce hypertension. We have previously reported that the dose used inhibits approximately 50% of tissue NOS activity.<sup>28</sup> The M/L ratio of femoral and small mesenteric arteries increased, suggesting that chronic NOS inhibition caused remodeling. However, the type of remodeling was heterogeneous along the vascular tree. Indeed, in femoral arteries the increase of media thickness was mainly responsible for the elevation of M/L ratio, while a reduction of lumen diameter contributed to the remodeling of mesenteric arteries. Thus, muscular arteries adapted to the pressure elevation by an hypertrophic process, while mesenteric arteries underwent inward eutrophic remodeling. These results are in line with some studies showing eutrophic remodeling in resistance arteries after chronic NOS inhibition<sup>10,11</sup> and others demonstrating hypertrophic remodeling in large arteries.<sup>8</sup> Considering the discrepancy in the literature regarding cardiovascular hypertrophy in the L-NAME model,<sup>27</sup> it was



**FIGURE 3.** (A) Representative Western blot using a phosphospecific ERK1/2 (p44-p42 MAP kinase) antibody in rats treated with saline (Ctl), L-NA, and L-NA plus PD98059 (3 mg/kg, given 1 hour before). (B) Mean relative optical density of phosphorylated ERK1/2. Each bar represents the mean of 4 animals, performed in 3 separate experiments. Values were corrected by the control value (fixed at 100) on each gel. \* $P < 0.05$  versus 100, 1-sample analysis.

important to demonstrate, for the first time, the heterogeneity in the same animals. Interestingly, this heterogeneous remodeling also seems to occur in essential hypertension,<sup>9,13,29</sup> suggesting that the L-NAME model and essential hypertension could share similar characteristics that are relevant to the heterogeneous remodeling process.

The hallmark of essential hypertension is an enhanced peripheral vascular resistance, and L-NAME administration also elevates arterial pressure by favoring vasoconstriction.<sup>7</sup> Thus, resistance artery vasoconstriction could represent a common characteristic determining the remodeling process. Accordingly, the major aim of this study was to characterize the early vasoactivity changes in different types of arteries during NOS inhibition, in an attempt to lend support to the hypothesis that vasoconstriction (and normalization of wall stress) prevents vascular growth *in vivo*. This concept was elegantly studied *in vitro* by Prewitt et al,<sup>20</sup> who showed that vasoconstriction prevents the expression of early genes involved in the trophic process by normalizing wall stress, while arteries not contracting show signs of hypertrophy. Vasoconstriction was observed only in small resistance arteries *in vivo* during acute NOS inhibition, and this effect normalized (or even reduced) wall stress. In contrast to what was observed in large arteries,<sup>23</sup> there was no elevation of protein synthesis in small arteries. Furthermore, in long-term treatment conditions, small mesenteric arteries did not develop hypertrophy but exhibited eutrophic remodeling. In contrast, wall stress was acutely elevated in the femoral artery, as no vasomotion was observed, and a significant increase in mCSA, an index of hypertrophy/hyperplasia, was observed in long-term treatment conditions. Thus, although the direct relationship between acute wall stress and chronic hypertrophy remains speculative, our observations are in line with such a relationship *in vivo*. Further studies are needed to better identify the mechanisms linking early vasoconstriction to inward eutrophic remodeling during endothelial dysfunction.

Studies performed in cultured cells from SHR<sup>24</sup> or human resistance arteries,<sup>25</sup> or studies that have used intact pressurized rat mesenteric arteries,<sup>26</sup> have reported a contribution of ERK1/2 to contraction during angiotensin II stimulation. In the present study, by using intravital microscopy, we have demonstrated, for the first time *in vivo*, that ERK1/2 contributes to small mesenteric contraction induced by NOS inhibition. Indeed, L-NA-induced vasoconstriction was completely prevented by PD98059 at a dose that we confirmed to inhibit local ERK1/2 phosphorylation *in vivo*. The full response to PD98059 was rather surprising, considering the known alternative or complementary mechanisms responsible for vasoconstriction. Although PD98059 inhibited ERK1/2 phosphorylation, it may also produce other effects *in vivo* that have not been identified so far, and our interpretation relies on our current knowledge of the drug. The MAP kinase ERK1/2 is generally known to be part of an important cellular signaling path-

way leading to hypertrophy in vascular smooth muscle cells and other cell types.<sup>30</sup> It was thus of interest that ERK1/2 phosphorylation was enhanced acutely by L-NA in small arteries, but that these arteries do not have enhanced protein synthesis and do not develop hypertrophy. In agreement, we have previously reported that 5 hours of NOS inhibition leads to ERK1/2 phosphorylation both in the aorta and small arteries, but protein synthesis was enhanced only in the former in basal and angiotensin II-stimulated conditions.<sup>23</sup> However, this previous study was done with nonpressor doses of L-arginine analogs, and since elevated pressure was found to stimulate early index of hypertrophy in isolated mesenteric arteries,<sup>18,19</sup> we measured *in vivo* protein synthesis during acute administration of a pressor dose of L-NA in the current study. Our results have 2 implications: (1) the measurement of protein synthesis is a good early index of the type of remodeling that will ensue (enhanced in hypertrophic remodeling, but normal in eutrophic remodeling), and (2) the function of ERK1/2 in small arteries may not be related to growth. The mechanism by which the function of ERK1/2 is redirected is not known. However, the involvement of ERK1/2 in the vasoconstriction of arteries that will eventually undergo eutrophic remodeling is of great interest, considering the growing body of evidence indicating that specific members of MAPKs, including ERKs, mediate ECM and integrin-derived signaling events in vascular responses.<sup>31-33</sup> Indeed, the contribution of factors involved in the interaction of vascular smooth muscle cells with extracellular matrix components represent an avenue to determine the transition of vasoconstriction to eutrophic remodeling.<sup>22</sup>

Since PD98059 abrogated ERK1/2 phosphorylation and L-NA-induced contraction in mesenteric arteries, it was expected to lower L-NA-induced elevation of arterial pressure. This was clearly not the case, and we believe that these results could be related to the site of injection of PD98059. Indeed, it is possible that because of its chemical properties,<sup>34</sup> with limited tissue diffusion after intraperitoneal injection, the action of PD98059 could have been most prominent in the mesenteric bed, which contributes only partially to total peripheral vascular resistance under NOS inhibition.<sup>35</sup> Thus, other vascular beds unaffected by PD98059 could still explain the elevation of arterial pressure.

### Limitations

The increased mCSA observed after chronic NOS inhibition in femoral arteries in the present study suggests that NO modulates vascular growth. Alternatively, the pressure increase produced by small artery vasoconstriction could also influence growth of femoral arteries, as an elevation of transmural pressure has been shown to induce growth of vascular smooth muscle cells in large arteries through ERK1/2 phosphorylation.<sup>17</sup> However, we have previously reported that acute treatment with a nonpressor dose of 3 different L-arginine analogs increased protein synthesis in large arteries,<sup>23</sup>



suggesting that NO has a pressure-independent growth-inhibitory effect. In the present study, the pressure dependence of the responses cannot be accounted for, and it is likely that both pressure and NOS inhibition contribute to the trophic response. One further limitation of working in vivo is the presence of several modulatory mechanisms. Thus, it is not possible to rule out the involvement of neurohumoral influences on large-artery SMC growth or proliferation during chronic NOS inhibition. Indeed, NO has been shown to interact with several systems, such as sympathetic nerve fibers, the renin-angiotensin system, and endothelin-1,<sup>36-38</sup> all of which could contribute to the trophic process. Furthermore, all of these systems also stimulate the ERK1/2 signaling pathway.<sup>39-41</sup> However, considering that these trophic factors also cause hypertrophy of small arteries,<sup>23,27,42</sup> their activation would have to be localized only to larger muscular arteries in the L-NAME model, since small arteries did not develop hypertrophy. Alternatively, their activation in small arteries could contribute only to the initial vasoconstriction, as it was previously suggested that the elevation of arterial pressure during acute NOS inhibition depends mainly on endothelin.<sup>43,44</sup> It was not the aim of the present study to examine the intermediate effectors between NOS inhibition and the parameters studied, but to document the final effects in vivo. Nonetheless, measurement of plasma renin activity confirms that the circulating renin-angiotensin system is not implicated in NOS-induced vasoconstriction.

### CONCLUSION

Our results do not prove that wall stress is a determinant of vascular hypertrophy, but do lend further support to the concept. Indeed, normalization of this parameter in small resistance arteries through vasoconstriction blunts protein synthesis, and is associated with eutrophic remodeling in this vascular bed. In contrast, larger muscular arteries tend to normalize the elevated wall stress by thickening their wall. According to our working hypothesis, this could be secondary to the observation that they are not acutely compensating by a reduction of lumen diameter. The signaling element ERK1/2 appears to be involved in both conditions, but heterogeneity seems to occur in its effects. Indeed, our previous report suggested that ERK1/2 contributed to large artery hypertrophy under NOS inhibition,<sup>23</sup> and our new findings suggest that ERK1/2 contributes to small-artery vasoconstriction in vivo. These observations obtained from intravital microscopy could explain, at least in part, the heterogeneous vascular remodeling observed during NOS inhibition and, eventually, in essential hypertension.

### REFERENCES

1. Rees D, Palmer R, Moncada S. Role of endothelium-derived nitric oxide relaxing factor in the regulation of blood pressure. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1989;86:3375-3378.
2. Riberio M, Antunes E, De Nucci G, et al. Chronic inhibition of nitric oxide synthesis: a new model of arterial hypertension. *Hypertension*. 1992;20:298-303.
3. Taddei S, Virdis A, Mattei P, et al. Vasodilation to acetylcholine in primary and secondary forms of human hypertension. *Hypertension*. 1993;21:929-933.
4. Falloon B, Heagerty A. In vitro perfusion studies of human resistance artery function in essential hypertension. *Hypertension*. 1994;24:16-23.
5. Dominiczak A, Bohr D. Nitric oxide and its putative role in hypertension. *Hypertension*. 1995;25:1202-1211.
6. Vallance P, Collier J, Moncada S. Effects of endothelium-derived nitric oxide on peripheral tone in man. *Lancet*. 1989;2:997-1000.
7. Sakai H, Hara H, Tsai A, et al. Constriction of resistance arteries determines L-NAME-induced hypertension in a conscious hamster model. *Microvasc Res*. 1999;60:21-27.
8. Kato H, Hou J, Chobanian AV, et al. Effects of angiotensin II infusion and inhibition of nitric oxide synthase on the rat aorta. *Hypertension*. 1996;28:153-158.
9. Laurent S. Arterial wall hypertrophy and stiffness in essential hypertension patients. *Hypertension*. 1995;26:355-362.
10. Deng L, Thibault G, Schiffrin E. Effect of hypertension induced by nitric oxide synthase inhibition on structure and function of resistance arteries in the rat. *Clin Exp Hypertens*. 1993;15:527-537.
11. Moreau P, Takase H, Kung C, et al. Structure and function of the rat basilar artery during chronic nitric oxide synthase inhibition. *Stroke*. 1995;26:1922-1929.
12. Mulvany MJ, Baumbach GL, Aalkjaer C, et al. Vascular remodeling (letter). *Hypertension*. 1996;28:505-506.
13. Mulvany M. Small artery remodeling in hypertension. *Curr Hypertens Rep*. 2002;4:49-55.
14. Boudier H. Arteriolar and capillary remodeling in hypertension. *Drugs*. 1999;58:43-47.
15. le Noble F, Stassen F, Hacking W, et al. Angiogenesis and hypertension. *J Hypertens*. 1998;16:1563-1572.
16. Vicaut E. Microcirculation and arterial hypertension. *Drugs*. 1999;58:1-11.
17. Xu Q, Liu Y, Gorosope M, et al. Acute hypertension activates mitogen-activated protein kinases in arterial wall. *J Clin Invest*. 1996;97:508-514.
18. Allen S, Liang H, Hill M, et al. Elevated pressure stimulates protooncogene expression in isolated mesenteric arteries. *Am J Physiol*. 1996;271:H1517-H1523.
19. Wesselman J, Dobrian A, Schriver S, et al. Src tyrosine kinases and extracellular signal-regulated kinase 1/2 mitogen-activated protein kinases mediate pressure-induced C-Fos expression in cannulated rat mesenteric small arteries. *Hypertension*. 2001;37:955-960.
20. Allen S, Wade S, Prewitt R. Myogenic tone attenuates pressure-induced gene expression in isolated small arteries. *Hypertension*. 1997;30:203-208.
21. Bakker EN, van Der Meulen ET, Spaan JA, et al. Organoid culture of cannulated rat resistance arteries: effect of serum factors on vasoactivity and remodeling. *Am J Physiol*. 2000;278:H1233-H1240.
22. Bakker EN, van der Meulen ET, van den Berg BM, et al. Inward remodeling follows chronic vasoconstriction in isolated resistance arteries. *J Vasc Res*. 2002;39:12-20.
23. Martens FM, Demeilliers B, Girardot D, et al. Vessel-specific stimulation of protein synthesis by nitric oxide synthase inhibition: role of extracellular signal-regulated kinases 1/2. *Hypertension*. 2002;39:16-21.
24. Thouyz R, Mabrouk E, He G, et al. Mitogen-activated protein/extracellular signal-regulated kinase inhibition attenuates angiotensin II-mediated signaling and contraction in SHR vascular smooth muscle cells. *Circ Res*. 1999;84:505-515.
25. Thouyz R, He G, Deng L, et al. Role of extracellular signal-regulated kinases in angiotensin II-stimulated contraction of smooth muscle cells from human resistance arteries. *Circulation*. 1999;99:392-399.
26. Matrougui K, Eskildsen-Helmond Y, Fiebeler A, et al. Angiotensin II stimulates extracellular signal-regulated kinase activity in intact pressurized rat Mesenteric Resistance Arteries. *Hypertension*. 2000;36:617-621.
27. Moreau P. Effect of chronic nitric oxide deficiency on angiotensin II-induced hypertrophy of rat basilar artery. *Stroke*. 1998;29:1031-1036.
28. Takase H, Moreau P, Kung C, et al. Antihypertensive therapy prevents

- endothelial dysfunction in chronic nitric oxide deficiency. *Hypertension*. 1996;27:25–31.
29. Heagerty A, Izzard A. Small-artery changes in hypertension. *J Hypertens*. 1995;13:1560–1565.
  30. Servant MJ, Giasson E, Meloche S. Inhibition of growth factor-induced protein synthesis by a selective MEK inhibitor in aortic smooth muscle cells. *J Biol Chem*. 1996;271:16047–16052.
  31. Boudreau N, Jones P. Extracellular matrix and integrin signalling: the shape of things to come. *Biochem Soc*. 1999;339:481–488.
  32. Giancotti F, Ruoslahti E. Integrin Signaling. *Science*. 1999;285:1028–1032.
  33. Goldschmidt M, McLeod K, Taylor W. Integrin-mediated mechanotransduction in vascular smooth muscle cells: frequency and force response characteristics. *Circ Res*. 2001;88:674–680.
  34. Alessi D, Cuanda A, Cohen P, et al. PD 098059 is a specific inhibitor of the activation of MAPK in vitro and in vivo. *J Biol Chem*. 1995;270:27489–27494.
  35. Greenblatt E, Loeb A, Longnecher D. Marked regional heterogeneity in the magnitude of EDRF/NO-mediated vascular tone in awake rats. *J Cardiovasc Pharmacol*. 1992;21:235–240.
  36. Moreau P, Takase H, Kung C, et al. Blood pressure and vascular effects of endothelin blockade in chronic nitric oxide-deficient hypertension. *Hypertension*. 1997;29:763–769.
  37. Takemoto M, Egashira K, Tomita H, et al. Chronic angiotensin-converting enzyme inhibition and angiotensin II type 1 receptor blockade: effects on cardiovascular remodeling in rats induced by long-term blockade of nitric oxide synthesis. *Hypertension*. 1997;30:1621–1627.
  38. Zanchi A, Schaad N, Osterheld M-C, et al. Effects of chronic NO synthase inhibition in rats on renin-angiotensin system and sympathetic nervous system. *Am J Physiol*. 1995:H2267–H2273.
  39. Suzuki E, Nagata D, Kakoki M, et al. Molecular mechanisms of endothelin-1-induced cell-cycle progression: involvement of extracellular signal-regulated kinase, protein kinase C, and phosphatidylinositol 3-kinase at distinct points. *Circ Res*. 1999;84:611–619.
  40. Thouyz R, Deng L, He G, et al. Angiotensin II stimulates DNA and protein synthesis in vascular smooth muscle cells from human arteries: role of extracellular signal-regulated kinases. *J Hypertens*. 1999;17:907–916.
  41. Yu S, Tsai S, Guh J, et al. Mechanisms of catecholamine-induced proliferation of vascular smooth muscle cells. *Circulation*. 1996;94:547–554.
  42. Dao HH, Martens FM, Lariviere R, et al. Transient involvement of endothelin in hypertrophic remodeling of small arteries. *J Hypertens*. 2001;19:1801–1812.
  43. Banting J, Friberg P, Adams M. Acute hypertension after nitric oxide synthase inhibition is mediated primarily by increased endothelin vasoconstriction. *J Hypertens*. 1996;14:975–981.
  44. Richard V, Hogue M, Clozel M, et al. In vivo evidence of an endothelin-induced vasopressor tone after inhibition of nitric oxide synthesis in rats. *Circulation*. 1995;91:771–775.

**Hypertension - Original Scientific Contribution**

*Resubmission of Hypertension/2005/057075*

*September 29, 2005*

*Abstract word count: 248*

*Methods word count: 641*

*Total word count (without figures): 4626*

*Number of figures: 3*

**P21-ACTIVATED PROTEIN KINASE 1,  
AN EARLY AND STABLE SIGNALING MARKER OF  
EUTROPHIC REMODELING IN RESISTANCE ARTERIES**

Daphné Girardot, M.Sc. <sup>1</sup>, Denis deBlois, Ph.D. <sup>2</sup>, and Pierre Moreau, Ph.D. <sup>1</sup>

**<sup>1</sup>Faculty of Pharmacy and <sup>2</sup>Department of Pharmacology, Faculty of Medicine, Université  
de Montréal, Québec, Canada**

**Condensed title:** PAK1 as a marker of eutrophic remodeling

**Corresponding author:**

Pierre Moreau, Ph.D.

Associate Professor, Faculty of Pharmacy

Université de Montréal

P.O. Box 6128, Station "Centre-Ville"

2900 Edouard Montpetit, Pavillon Jean-Coutu, room 3197

Montréal, Québec

H3C 3J7 Canada

Phone: (514) 343-6111 x3313

Fax: (514) 343-7073

E-mail: XXXXXXXXXX

**ABSTRACT**

As in essential hypertension, L-NAME-induced hypertension leads to eutrophic remodeling (reduced lumen diameter without change in cross-sectional area) in small resistance arteries. During this process, small resistance arteries could reorganize their actin-based cytoskeleton by altering signaling involved in this cellular process. Our objective was to identify a specific marker for eutrophic remodeling by measuring the kinetic of expression of proteins implicated in actin polymerization, such as Dia1, p38 MAPK and p21-activated protein kinase (PAK1), during NOS inhibition. Wistar rats were treated with L-NAME (50 mg/kg/day) during 1, 3, 6 and 24 hours, and 3, 7 and 14 days. Another group of rats received angiotensin II (as a comparative model of hypertrophic remodeling) at a dose of 200 ng/kg/min for similar durations. A third group of rats served as controls. Mesenteric arteries were harvested and used for the measurement of their structure and of protein expression by western immunoblotting. In the L-NAME group, Dia1 increased transiently to become reduced after 3 days. The expression of p38 MAPK increased after 3 and 7 days of treatment, while that of PAK1 increased up to four folds throughout the treatment interval. In the ANG II-treated rats, p38 MAPK increased after 1 hour to return to baseline values. Ang II did not modify Dia1 and PAK1 protein expression. In conclusion, we observed a marked and sustained over expression of PAK1 in mesenteric arteries during chronic L-NAME-induced hypertension. Considering that PAK1 is known to stabilize polymerized actin filaments, this process appears significant during the development hypertension-induced eutrophic remodeling.

**Keywords:** vascular remodeling, L-NAME-induced hypertension, resistance arteries, actin polymerization, PAK1

## INTRODUCTION

Small resistance arteries adapt to chronic elevation of arterial pressure by increasing their media to lumen ratio (M/L), in order to normalize their wall stress<sup>1</sup>. In essential hypertension, these arteries undergo a reduction of their lumen diameter without alteration of cross-sectional area (CSA), a process known as inward eutrophic remodeling<sup>2,3</sup>. This remodeling is probably not without consequences. Indeed, considering Poiseuille's relation which dictates that the resistance varies inversely with the fourth power of the blood vessel radius, eutrophic remodeling is likely to contribute to the total peripheral resistance elevation seen in hypertension<sup>1</sup>. Moreover, there is mounting evidence that eutrophic remodeling contributes to hypertension-induced target organ damage<sup>4,5</sup>. Endothelial dysfunction is another key vascular alteration of essential hypertension, resulting mainly from an impairment of nitric oxide (NO) availability<sup>6,7</sup>. Interestingly, chronic nitric-oxide synthase (NOS) inhibition with N $\gamma$ -nitro-arginine-methyl ester (L-NAME), leads to hypertension in rats<sup>8</sup>, characterized by increased peripheral resistance<sup>9</sup> and inward eutrophic remodeling of resistance arteries<sup>10,11</sup>.

Since small arteries contribute to the elevation of arterial pressure by reducing their lumen (contraction leading to peripheral resistance), they simultaneously normalize their wall stress, which is believed to eliminate the need for a hypertrophic response to the pressure load<sup>12,13</sup>. Additional studies, including ours, have proposed that sustained small artery vasoconstriction precedes inward eutrophic remodeling<sup>14,15</sup>. However, there is a lack of understanding of how active vasoconstriction evolves into structural remodeling. Recent studies have demonstrated that smooth muscle cells adapt to changes in their external environment by reorganizing their actin-based cytoskeleton and by altering signaling pathways that regulate contractile protein activation and function<sup>16,17</sup>. Small GTPases, such as Rho and Rac have been reported as molecular switches for actin cytoskeletal reorganization<sup>18,19</sup>.

The hypothesis tested is that during eutrophic remodeling, vascular smooth muscle cells reorganize their actin-based cytoskeleton by altering signaling dynamically involved in actin remodeling. Since Rho and Rac also contribute to a wide range of cellular responses (growth, migration), measuring the expression of their downstream effectors known to be directly involved in actin polymerization appeared more appropriate. Our objective was thus to determine the kinetic of mDia1 (Rho pathway), p38 MAPK and p21-activated protein kinase (PAK1, Rac

pathway) expression, in an in vivo model of eutrophic remodeling (L-NAME rat model). A comparative in vivo model known to induce hypertrophic remodeling in small resistance arteries (ANG II administration<sup>20, 21</sup>) was used in an effort to find signaling events specific for eutrophic remodeling.

## METHODS

### Treatments

Male Wistar rats weighing between 250 and 275 g were purchased from Charles River (St-Constant, Canada). All protocols were approved by the Animal Care Committee of Université de Montréal. A group of rats were treated with L-NAME at a dose of 50 mg/kg/day and were sacrificed after 1, 3, 6 and 24 hours, and 3, 7 and 14 days. Drug treatments less than 24 h were made by intravenous infusion and for longer times of treatment, L-NAME was added to the drinking water. A second group of rats received ANG II at a dose of 200 ng/kg/minutes following the same time course as L-NAME treated rats. ANG II was administered intravenously for 1, 3 and 6 hour subgroups, and through osmotic pumps (Alzet, models 1002 and 1003D, Cupertino) for other time points. Finally, a third group of rats served as controls. Twenty four hours before sacrifice, a polyethylene catheter (PE10 tubing welded into a PE50 tubing) was inserted in the femoral artery under anesthesia with sodium pentobarbital (50 mg/kg, i.p.). This allowed for measurements of arterial pressure through a pressure transducer in awake and freely moving condition. Rats were sacrificed by pentobarbital overdose (150 mg/kg) and a third order artery from the mesenteric tree was used for measurement of arterial structure in rats treated for 14 days with L-NAME or Ang II and in age-matched control rats (n=8/group). In our experience, 14 days represent the minimal period to observe significant remodeling<sup>22</sup>. Mesenteric artery structure was determined in a perfused vessel chamber (Living System Instrumentation, Burlington, USA) at a constant perfusion pressure of 40 mmHg in fully relaxed conditions, as previously described<sup>23</sup>. This allowed for the measurements of lumen diameter, external diameter and media thickness of small mesenteric arteries, from which media to lumen ratio (M/L) and cross-sectional area (CSA) were calculated. Mesenteric CSA was calculated as  $(\pi/4) \times [(\text{External diameter})^2 - (\text{internal diameter})^2]$ .

### **Western immunoblotting**

All the arterial mesenterium, excluding the superior mesenteric artery, were harvested and frozen at  $-80^{\circ}\text{C}$ . Samples were pulverized in dry ice and liquid nitrogen and homogenized using polytron in ice-cold lysis buffer (PBS 20%, Igepal CA-630 1%, Na-deoxycholate 0.5%, SDS 0.1%, PMSF 0.25% and aprotinine 0.1%). After 30 minutes of incubation at  $4^{\circ}\text{C}$ , the protein supernatant was separated by centrifugation ( $4^{\circ}\text{C}$ , 30 minutes, 14,000g) and protein concentration obtained with a Micro BCA Protein Reagent Kit (Pierce). The kinetic expression of proteins implicated in remodeling the actin-based cytoskeleton, such as mDia1, p38 and PAK1 was determined by western immunoblotting, using equal amount of protein ( $20\ \mu\text{g}$ ) loaded on a 6 % SDS polyacrilamide gel for p140mDia and PAK1 and on a 10 % SDS polyacrilamide gel for p38. Proteins were transferred to a nitrocellulose membrane overnight at  $4^{\circ}\text{C}$ . Membranes were then incubated with specific mDia1 (final dilution 1:500, BD Transduction Laboratories, Mississauga, Ontario, Canada) p38 and PAK1 (both from at a final dilution of 1:100 and from Cell Signaling Technology, Pickering, Ontario, Canada) antibodies overnight at  $4^{\circ}\text{C}$ . Membranes were washed and incubated for 90 minutes at room temperature with a secondary antibody (p38 and PAK1: anti-rabbit IgG, H&L, HRP-linked; mDia1: anti-mouse IgG, H&L, HRP-linked, Cell Signaling Technology). After the final wash, membranes were incubated 5 minutes with a chemiluminescent substrate (ChemiGlow, Alpha Innotech, San Leandro, CA, USA). Results were normalized to control values on each gel to account for methodological variation.

### **Drugs and Statistical analysis**

L-NAME and Ang II were obtained from Sigma (Oakville, Ontario, Canada). Data are presented as mean  $\pm$  SEM. Protein expression from western immunoblotting was expressed as the percent change from control values obtained on the same gel. Statistical analysis was performed by ANOVA followed by Bonferroni's correction for multiple comparisons (hemodynamic and mesenteric artery structure) and by One-sample analysis for Western blots (comparing to the reference value of 100%). A *P* value less than 0.05 was considered significant.

## RESULTS

### Haemodynamic and resistance arteries structure

Inhibition of eNOS with L-NAME increased significantly the mean arterial pressure already from 1 hr until 14 days of treatment (**Fig. 1A**). In contrast, mean arterial pressure remained similar to control values in ANG II-treated rats.

After 14 days of L-NAME and ANG II treatment, internal and external diameters were modified. In the L-NAME group, internal diameter was reduced (from  $244.4 \pm 8.1 \mu\text{m}$  in controls to  $236.9 \pm 5.5 \mu\text{m}$ ,  $p < 0.05$ ), while the external diameter was unaltered ( $284.3 \pm 8.3$  and  $283.2 \pm 6.6 \mu\text{m}$ , respectively). In Ang II-treated rats, both internal ( $299.3 \pm 19.2 \mu\text{m}$ ) and external ( $361.3 \pm 16.9 \mu\text{m}$ ) diameters increased ( $p > 0.05$ ). Thus, M/L ratio was increased in both groups (**Fig. 1B**), but CSA was only enhanced in the ANG II group (**Fig. 1C**).

### Kinetic of protein expression

The expression of mDia1 increased rapidly after 1 hour of L-NAME administration but decreased significantly at 3 days and remained below control values thereafter (n.s.) (**Fig. 2A**). In contrast, ANG II had no significant effect on mDia1 expression in mesenteric arteries (**Fig. 2A**). The mesenteric artery expression of p38 MAPK increased slowly at 3 and 7 days to return to baseline levels at 14 days of L-NAME treatment (**Fig. 2B**). In contrast, Ang II induced only a transient elevation of p38 MAPK at 1 hr (**Fig. 2B**). In L-NAME treated rats, PAK1 expression was increased significantly throughout the time course, except for the 6 hr and 14 days time points where the elevation did not reach statistical significance (**Fig. 2C**). Mesenteric artery PAK1 expression in the ANG II group was not different from controls (**Fig. 2C**). To further confirm that PAK1 was limited to eutrophic remodeling, its kinetic of expression was measured in the aorta of the same L-NAME treated rats. As shown in **figure 3A**, PAK1 expression in the aorta did not differ from control values.

Since mDia1 and PAK1 are effectors of the Rho and the Rac pathways, respectively, and that these pathways appear to have antagonistic effects (see discussion), we are proposing that the PAK1/mDia1 ratio could represent an index of the dominant pathway in terms of actin



polymerization. **Figure 3B** illustrates that in small mesenteric arteries undergoing eutrophic remodeling, the Rac pathway predominates, reaching significance after the first day of the remodeling process.

## DISCUSSION

Nitric oxide synthase inhibition led to a predictable elevation of mean arterial pressure from 1 hour to 14 days of treatment. Moreover, the structural measurement of mesenteric arteries after 14 days of L-NAME treatment, showing an increase of the M/L ratio without elevation of the CSA, confirmed the type of remodeling expected in this model<sup>10, 11</sup>, which is comparable to small artery remodeling found in patients with essential hypertension<sup>2</sup>. Previous studies have shown that Ang II induces hypertrophy of small arteries partially by a pressure-independent mechanism<sup>21, 24</sup>. For that reason, the Ang II model was selected to compare the kinetic of expression of candidate proteins with that of the L-NAME model. The dose of Ang II selected was previously reported to produce an elevation of arterial pressure of approximately 30 mmHg<sup>20, 24</sup>. However, our results did not show any significant elevation of blood pressure for reasons that we are unable to explain. Nonetheless, the expected increase in small artery M/L ratio and CSA characterizing hypertrophic remodeling was observed, lending strong support to the proposed pressure-independent trophic effect of Ang II.

Our general hypothesis is that an initial vasoconstriction of small arteries, which contributes to the elevation of arterial pressure, evolves into eutrophic remodeling. We explored the involvement of VSMC actin-based cytoskeleton reorganization as a link between vasoconstriction and remodeling. Current evidence suggests that dynamic remodeling of the actin cytoskeleton may provide an important mechanism for mechanical adaptation in smooth muscle cells<sup>17</sup>. Indeed, there is increasing evidence that in response of external mechanical change, contractile activation of the smooth muscle cell involves an array of cytoskeletal processes that extend beyond cross-bridge cycling and sliding of thick and thin filaments<sup>16</sup>. Moreover, in smooth muscle cells, long-term mechanical stimulus leads to a plasticity due to a rearrangement of the contractile apparatus<sup>25</sup>. This mechano-adaptation mechanism, involving actin polymerization, would lead to long-term contraction opposing the increased wall tension with limited energy consumption<sup>17</sup>. It has been well documented that the Rho pathway is implicated in

sustained smooth muscle cell contraction by a mechanism underlying  $\text{Ca}^{2+}$ -sensitization through the inhibition of myosin phosphatase activity, in addition of its action on myosin light chain phosphorylation<sup>26</sup>. More recently, it has been reported that Rho leads to contraction by a mechanism implicating actin polymerization through its downstream effector mDia1 (mammalian homolog of *Drosophila diaphanous*)<sup>27</sup>. Indeed, Watanabe et al. have reported that mDia1 could provide a direct molecular link between Rho and profilin, which have been characterized separately as regulators of the actin cytoskeleton<sup>28</sup>. Actin polymerization by mDia1 seems an important contraction mechanism when external stimuli or contraction-generated force is applied on cells<sup>29</sup>. In the present study, we have shown a marked over expression of mDia1 after 1 hour of L-NAME in mesenteric arteries, while in ANG II treated rats, mDia1 expression was unchanged at all times. These findings are in agreement with our hypothesis suggesting that an initial vasoconstriction evolves into eutrophic remodeling. Indeed, the early overexpression of mDia1 in L-NAME treated rats suggests a contribution of the Rho pathway in the very early phase by fostering acute actin polymerization. Since a significant reduction of mDia1 was observed after 3 days of treatment with L-NAME, we can speculate that other mechanisms are responsible for the consolidation of the remodeling process.

It has been suggested that the downstream effectors of Rac, such as p38 MAPK, are activated in response to mechanical stress *in vitro*, leading to sustained contraction of VSMC<sup>30</sup>. Indeed, it has been previously reported that p38 MAPK, together with heat shock protein 27 (HSP 27), was implicated in the maintenance of the contractile response and actin polymerization<sup>31, 32</sup>. Moreover, another recent study has demonstrated a specific involvement of the p38 MAPK pathway in the mechanotransduction of wall tension in pressurized skeletal arterioles<sup>33</sup>. Taking these considerations into account, the late overexpression of p38 MAPK observed in our study (days 3 and 7) suggests that it could be implicated in the transition from vasoconstriction to eutrophic remodeling.

Evidence is mounting that PAK1 has an important role in the regulation of the actin cytoskeleton dynamics<sup>34, 35</sup>. It has been identified as a direct effector of Rac and a potential upstream activator of p38 MAPK. The contribution of PAK1 on actin-based cytoskeleton remodeling seems to be antagonistic to Rho-dependant MLC phosphorylation via inhibition of the MLCK or by direct phosphorylation of myosin II heavy chain<sup>34-37</sup>. Another target of PAK for

its regulation of actin dynamics is LIM Kinase (LIMK). When activated by PAK, LIMK inactivates cofilin and thus promotes stabilization of actin filaments<sup>34, 35</sup>. Our experiments have revealed, for the first time, a marked and sustained over expression of PAK1 in mesenteric arteries during L-NAME treatment. Considering the *in vivo* nature of our experiments, where modulations are often subtle, the magnitude of the increase suggest a prominent role of PAK1 in the remodeling process. Interestingly, PAK1 expression was not elevated by Ang II, which produced hypertrophic remodeling of resistance arteries. Moreover, we have measured the kinetic of PAK1 expression in the aorta of L-NAME treated rats to confirm that its over expression in mesenteric arteries was not explained by NOS blockade or pressure elevation. We have previously reported that there is heterogeneous vascular remodeling in L-NAME-induced hypertension according to the artery type, as in essential hypertension<sup>15, 22, 38</sup>. Indeed there is hypertrophic remodeling of large arteries, but eutrophic remodeling of small arteries following L-NAME treatment. Thus, PAK1 appears to be specifically up regulated in small mesenteric arteries undergoing eutrophic remodeling, where it could promote actin filament stabilization.

As mentioned above, Rho and Rac pathways are increasingly suggested to be antagonistic. Looking at some of their downstream effectors, our results support that such a functional interaction occurs *in vivo*. The early overexpression of mDia1 is probably implicated in the actin polymerization process to ensure the translation of the global vasoconstriction force to the cell, so that wall tension is normalized. PAK 1 could then be over expressed to stabilize the polymerized actin, preventing it from depolymerization. Simultaneously, p38 MAPK could take over the actin polymerization process, maybe through PAK1 signaling. If we accept that mDia1 is a direct effector of Rho involved in actin polymerization and that PAK1 is a direct effector of Rac involved in stabilization of polymerization, the ratio between PAK1 and mDia1 expression could provide a visual representation of the dynamics of actin polymerization. A ratio below one would suggest active actin polymerization, while a ratio over one represents stabilization. From figure 3B, one can clearly see that during the remodeling process, actin stabilization seems to predominate. In addition, this process appears to be engaged early on, although it became significant at day 3.

In the ANG II-induced hypertrophic remodeling model, few of the signaling elements that were measured in this study were modified. In the past, we have demonstrated early ERK 1/2

activation and the involvement of a rapamycin-sensitive pathway in the trophic response<sup>39</sup>. The early activation of the p38 MAPK pathway by Ang II has been previously reported and related to the generation of local reactive oxygen species<sup>40</sup>.

## Perspectives

The difficulty to dissociate the local vascular effects from the hemodynamic conditions represents a limitation of *in vivo* studies. However, in the present study both cannot and should not be dissociated, and working *in vivo* becomes a distinct advantage. Indeed, according to our hypothesis, eutrophic remodeling will only occur if the arteries first constrict, which will inevitably elevate pressure. Accordingly, in a previous study using the same L-NAME model, we have shown that if arterial pressure is prevented from increasing by vasodilators, the remodeling process is completely blunted<sup>11</sup>. Since the majority of studies measuring cell signaling of actin-based cytoskeleton reorganization have been made *in vitro*, our study offers the advantage of studying the expression of target proteins with time during the whole remodeling process. Thus, the kinetic of protein expression presented here, together with a previous paper reporting the time-course of remodeling development<sup>22</sup>, could be valuable to others wishing to study the transition from vasoconstriction to overt remodeling. Indeed, studies of eutrophic remodeling *in vivo* have traditionally been limited to long-term studies, since there were no surrogate markers of the process. Although our finding of PAK1 overexpression needs to be substantiated in other models, and its involvement confirmed by some kind of pharmacological intervention, we believe that it could serve as an early marker, thus allowing shorter studies to be performed with pharmacological agents difficult to administer *in vivo* for prolonged periods due to toxicity or cost.

## Conclusion

By comparing a model of small artery eutrophic remodeling to conditions of small and large artery hypertrophic remodeling *in vivo*, our study allowed the identification of a signaling element, PAK1, that is specific for eutrophic remodeling. Indeed, this downstream effector of the small GTPase Rac involved in the stabilization of polymerized actin filaments was markedly up regulated during the remodeling process, along with p38 MAPK also stimulated by the Rac pathway. Thus, according to the known effects of PAK1, actin filament stabilization appears to be an intermediate step between acute vasoconstriction and chronic remodeling.

**Acknowledgements**

This work has been supported by an operating grant from the Heart and Stroke Foundation of Canada. PM is a Junior 2 scholar from the “Fonds de la recherche en santé du Québec (FRSQ). DG was financially supported by a research and development (Rx&D) / Canadian Institutes for Health Research (CIHR) studentship. The authors acknowledge the skillful technical assistance of Louise Ida Grondin.

## References

1. Heagerty AM, Aalkjaer C, Bund SJ, Korsgaard N, Mulvany MJ: Small artery structure in hypertension. Dual processes of remodeling and growth. *Hypertension* 1993;21:391-7.
2. Mulvany MJ: Small artery remodeling in hypertension. *Curr Hypertens Rep* 2002;4:49-55.
3. Mulvany MJ, Baumbach GL, Aalkjaer C, Heagerty AM, Korsgaard N, Schiffrin EL, Heistad DD: Vascular remodeling. *Hypertension* 1996;28:505-6.
4. Park JB, Schiffrin EL: Small artery remodeling is the most prevalent (earliest?) form of target organ damage in mild essential hypertension. *J Hypertens* 2001;19:921-30.
5. Rizzoni D, Porteri E, Boari GE, De Ciuceis C, Sleiman I, Muiesan ML, Castellano M, Miclini M, Agabiti-Rosei E: Prognostic significance of small-artery structure in hypertension. *Circulation* 2003;108:2230-5.
6. Falloon BJ, Heagerty AM: In vitro perfusion studies of human resistance artery function in essential hypertension. *Hypertension* 1994;24:16-23.
7. Taddei S, Virdis A, Mattei P, Salvetti A: Vasodilation to acetylcholine in primary and secondary forms of human hypertension. *Hypertension* 1993;21:929-33.
8. Ribeiro MO, Antunes E, de Nucci G, Lovisollo SM, Zatz R: Chronic inhibition of nitric oxide synthesis. A new model of arterial hypertension. *Hypertension* 1992;20:298-303.
9. Sakai H, Hara H, Tsai AG, Tsuchida E, Intaglietta M: Constriction of resistance arteries determines l-NAME-induced hypertension in a conscious hamster model. *Microvasc Res* 2000;60:21-7.
10. Deng LY, Thibault G, Schiffrin EL: Effect of hypertension induced by nitric oxide synthase inhibition on structure and function of resistance arteries in the rat. *Clin Exp Hypertens* 1993;15:527-37.
11. Moreau P, Takase H, Kung CF, van Rooijen MM, Schaffner T, Luscher TF: Structure and function of the rat basilar artery during chronic nitric oxide synthase inhibition. *Stroke* 1995;26:1922-8; discussion 1928-9.
12. Osol G: Mechanotransduction by vascular smooth muscle. *J Vasc Res* 1995;32:275-92.
13. Allen SP, Wade SS, Prewitt RL: Myogenic tone attenuates pressure-induced gene expression in isolated small arteries. *Hypertension* 1997;30:203-8.

14. Bakker EN, van der Meulen ET, van den Berg BM, Everts V, Spaan JA, VanBavel E: Inward remodeling follows chronic vasoconstriction in isolated resistance arteries. *J Vasc Res* 2002;39:12-20.
15. Girardot D, Demeilliers B, deBlois D, Moreau P: ERK1/2-mediated vasoconstriction normalizes wall stress in small mesenteric arteries during NOS inhibition in vivo. *J Cardiovasc Pharmacol* 2003;42:339-47.
16. Gunst SJ, Tang DD, Opazo Saez A: Cytoskeletal remodeling of the airway smooth muscle cell: a mechanism for adaptation to mechanical forces in the lung. *Respir Physiol Neurobiol* 2003;137:151-68.
17. Cipolla MJ, Gokina NI, Osol G: Pressure-induced actin polymerization in vascular smooth muscle as a mechanism underlying myogenic behavior. *Faseb J* 2002;16:72-6.
18. Ridley AJ, Hall A: The small GTP-binding protein rho regulates the assembly of focal adhesions and actin stress fibers in response to growth factors. *Cell* 1992;70:389-99.
19. Ridley AJ, Paterson HF, Johnston CL, Diekmann D, Hall A: The small GTP-binding protein rac regulates growth factor-induced membrane ruffling. *Cell* 1992;70:401-10.
20. Moreau P, d'Uscio LV, Shaw S, Takase H, Barton M, Luscher TF: Angiotensin II increases tissue endothelin and induces vascular hypertrophy: reversal by ET(A)-receptor antagonist. *Circulation* 1997;96:1593-7.
21. Griffin SA, Brown WC, MacPherson F, McGrath JC, Wilson VG, Korsgaard N, Mulvany MJ, Lever AF: Angiotensin II causes vascular hypertrophy in part by a non-pressor mechanism. *Hypertension* 1991;17:626-35.
22. Bouvet C, Gilbert LA, Girardot D, deBlois D, Moreau P: Different involvement of extracellular matrix components in small and large arteries during chronic NO synthase inhibition. *Hypertension* 2005;45:432-7.
23. Dao HH, Martens FMAC, Larivière R, Yamaguchi N, Cernacek P, de Champlain J, Moreau P: Transient involvement of endothelin in hypertrophic remodeling of small arteries. *Journal of Hypertension* 2001;19:1801-1812.
24. Moreau P, Takase H, d'Uscio LV, Luscher TF: Effect of chronic nitric oxide deficiency on angiotensin II-induced hypertrophy of rat basilar artery. *Stroke* 1998;29:1031-5; discussion 1035-6.
25. Halayko AJ, Solway J: Molecular mechanisms of phenotypic plasticity in smooth muscle cells. *J Appl Physiol* 2001;90:358-68.
26. Fukata Y, Amano M, Kaibuchi K: Rho-Rho-kinase pathway in smooth muscle contraction and cytoskeletal reorganization of non-muscle cells. *Trends Pharmacol Sci* 2001;22:32-9.



27. Narumiya S, Ishizaki T, Watanabe N: Rho effectors and reorganization of actin cytoskeleton. *FEBS Lett* 1997;410:68-72.
28. Watanabe N, Madaule P, Reid T, Ishizaki T, Watanabe G, Kakizuka A, Saito Y, Nakao K, Jockusch BM, Narumiya S: p140mDia, a mammalian homolog of *Drosophila* diaphanous, is a target protein for Rho small GTPase and is a ligand for profilin. *Embo J* 1997;16:3044-56.
29. Riveline D, Zamir E, Balaban NQ, Schwarz US, Ishizaki T, Narumiya S, Kam Z, Geiger B, Bershadsky AD: Focal contacts as mechanosensors: externally applied local mechanical force induces growth of focal contacts by an mDia1-dependent and ROCK-independent mechanism. *J Cell Biol* 2001;153:1175-86.
30. Meloche S, Landry J, Huot J, Houle F, Marceau F, Giasson E: p38 MAP kinase pathway regulates angiotensin II-induced contraction of rat vascular smooth muscle. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2000;279:H741-51.
31. Yamboliev IA, Hedges JC, Mutnick JL, Adam LP, Gerthoffer WT: Evidence for modulation of smooth muscle force by the p38 MAP kinase/HSP27 pathway. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2000;278:H1899-907.
32. Gerthoffer WT, Gunst SJ: Invited review: focal adhesion and small heat shock proteins in the regulation of actin remodeling and contractility in smooth muscle. *J Appl Physiol* 2001;91:963-72.
33. Massett MP, Ungvari Z, Csiszar A, Kaley G, Koller A: Different roles of PKC and MAP kinases in arteriolar constrictions to pressure and agonists. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2002;283:H2282-7.
34. Daniels RH, Bokoch GM: p21-activated protein kinase: a crucial component of morphological signaling? *Trends Biochem Sci* 1999;24:350-5.
35. Cotteret S, Chernoff J: The evolutionary history of effectors downstream of Cdc42 and Rac. *Genome Biol* 2002;3:REVIEWS0002.
36. Sanders LC, Matsumura F, Bokoch GM, de Lanerolle P: Inhibition of myosin light chain kinase by p21-activated kinase. *Science* 1999;283:2083-5.
37. van Leeuwen FN, van Delft S, Kain HE, van der Kammen RA, Collard JG: Rac regulates phosphorylation of the myosin-II heavy chain, actinomyosin disassembly and cell spreading. *Nat Cell Biol* 1999;1:242-8.
38. Martens FM, Demeilliers B, Girardot D, Daigle C, Dao HH, deBlois D, Moreau P: Vessel-specific stimulation of protein synthesis by nitric oxide synthase inhibition: role of extracellular signal-regulated kinases 1/2. *Hypertension* 2002;39:16-21.

39. Daigle C, Martens FM, Girardot D, Dao HH, Touyz RM, Moreau P: Signaling of angiotensin II-induced vascular protein synthesis in conduit and resistance arteries in vivo. *BMC Cardiovasc Disord* 2004;4:6.
40. Touyz RM: The role of angiotensin II in regulating vascular structural and functional changes in hypertension. *Curr Hypertens Rep* 2003;5:155-64.

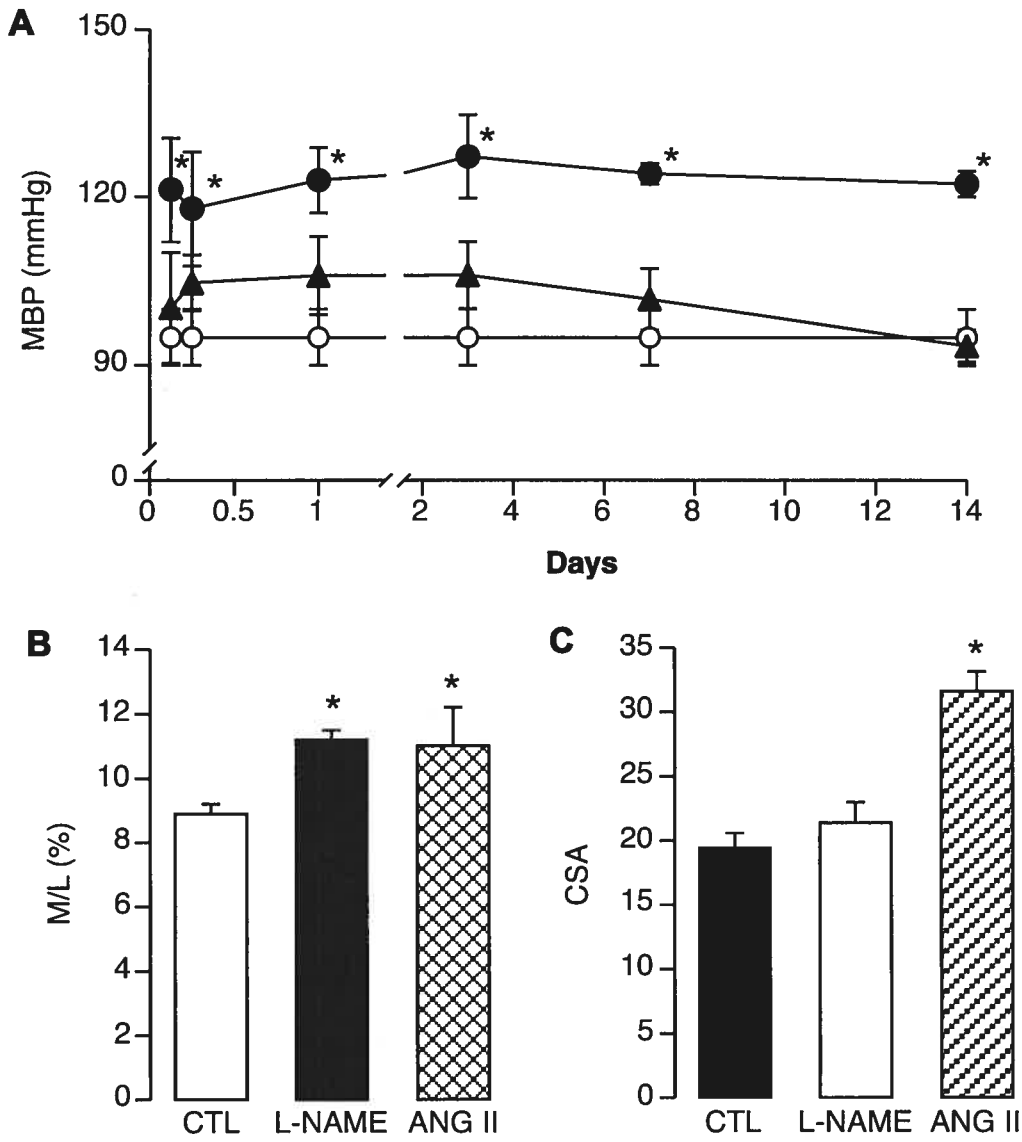
### Figure legends

**Figure 1.** A) Mean blood pressure (MBP, mmHg) evolution during L-NAME (50 mg/kg/day, closed circles) and angiotensin II (200 µg/kg/minute, closed triangles) administration. Open circles represent control rats. B) Media to lumen ratio (M/L) and C) Cross-sectional area (CSA,  $\times 10^3 \mu\text{m}^2$ ) of small mesenteric arteries measured after 14 days of L-NAME and angiotensin II treatments. \*P<0.05 versus control, ANOVA with Bonferroni's correction for multiple comparisons.

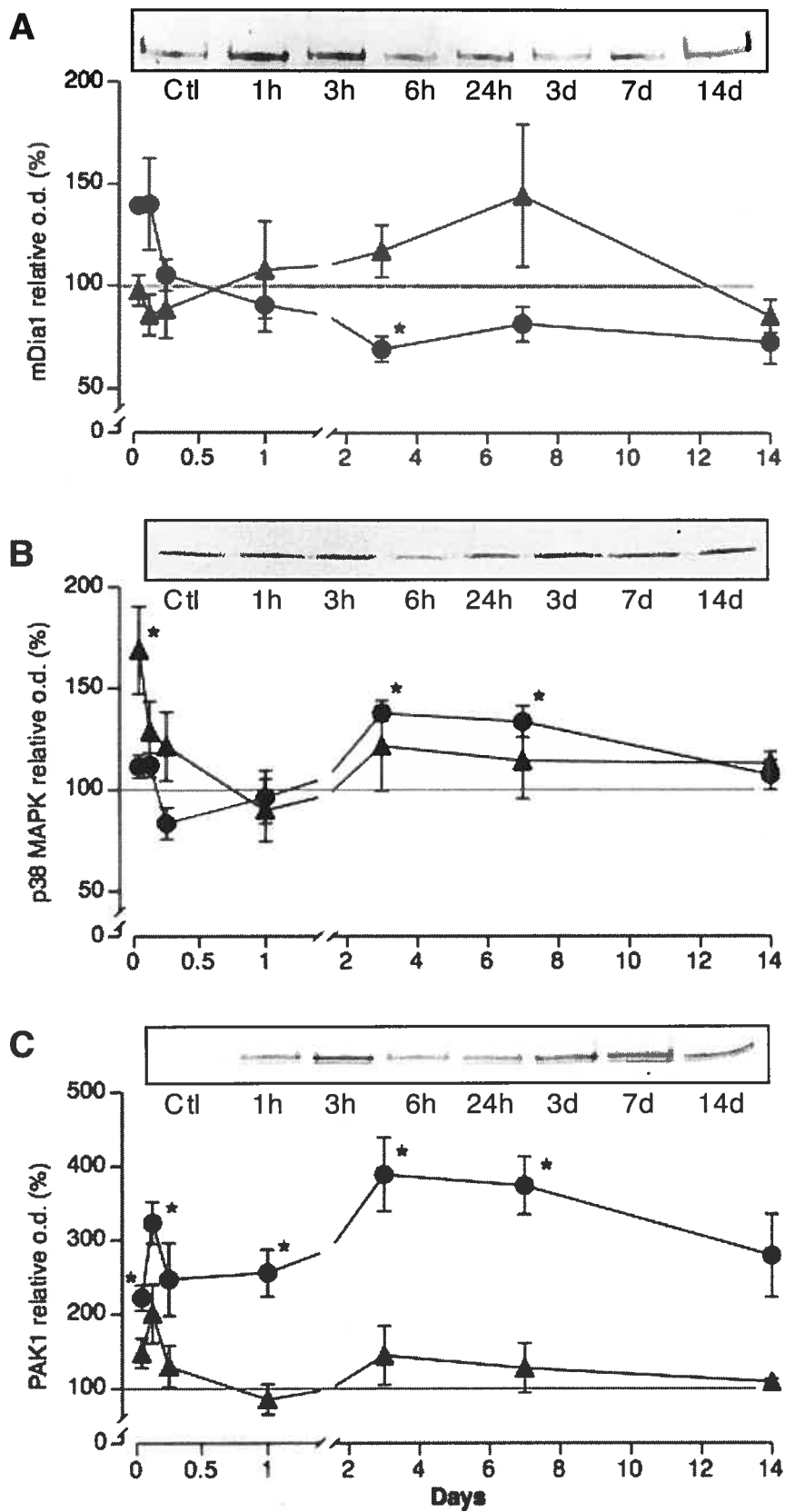
**Figure 2.** Kinetic of expression of A) mDia1, B) p38 MAPK and C) PAK1 during L-NAME (closed circles) and Angiotensin II treatments (closed triangles) in mesenteric arteries. Results are expressed as the relative optical density compared to the control value, which was normalized at 100% (line). Each time point represents the mean of 4 animals. Representative western blots for L-NAME-treated rats are shown above each graph. \*P<0.05 versus 100, One-sample analysis.

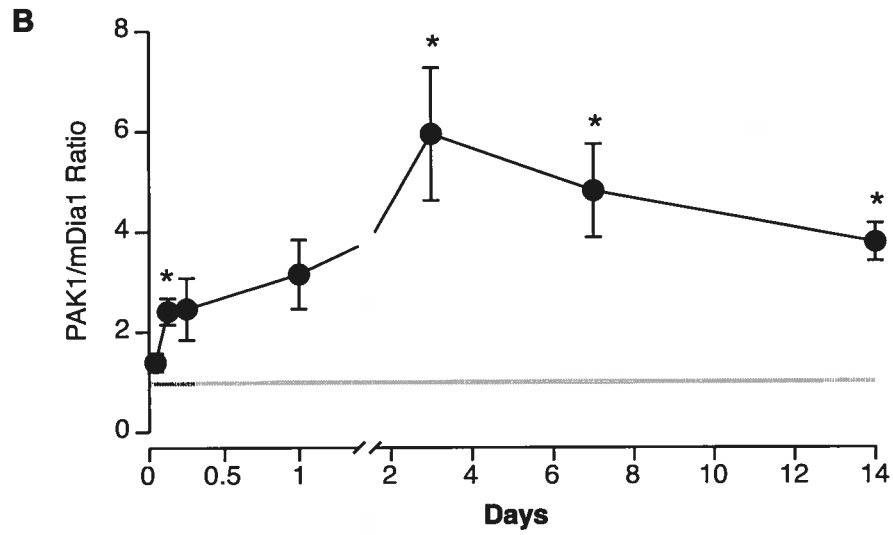
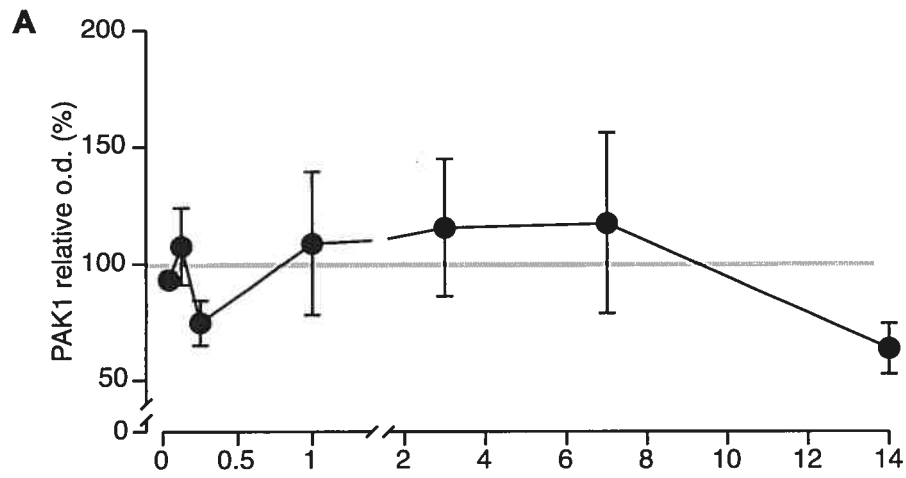
**Figure 3.** A) Kinetic of PAK1 expression during L-NAME treatment in the aorta. Each point represents the mean of 4 animals. \*P<0.05 versus 100, One-sample analysis. B) Ratio of relative PAK1/mDia1 expression in L-NAME-treated rats. \*P<0.05 versus 1, One-sample analysis.

Girardot et al. Figure 1



Girardot et al. Figure 2





## Chronic Nitric Oxide Synthase Inhibition Prevents New Coronary Capillary Generation

Daphné Girardot, MSc,\* Bernard Jover, PhD,† Jean-Pierre Moles, PhD,† Denis deBlois, PhD,‡§ and Pierre Moreau, PhD\*

**Abstract:** L-NAME-induced hypertension has been shown to produce concentric (eutrophic) remodeling of the heart despite an enhanced afterload. We postulated that nitric oxide synthase inhibition could limit coronary capillary growth to explain the nature of remodeling. To test our hypothesis, we aimed at determining the effect of endogenous and exogenous nitric oxide on coronary neovascularization. Aortic and coronary rings from normotensive animals were incubated in a three-dimensional type I collagen matrix in the presence of L-NAME or the nitric oxide donor SNAP. L-NAME inhibited, while SNAP stimulated, neovascularization from aortic and coronary rings after 12 days of in vitro incubation. In arterial rings harvested from rats treated with L-NAME for 14 days and in which no further in vitro treatment was added, only coronary rings showed a reduction in new capillary generation. While confirming that chronic L-NAME-treated rats develop concentric remodeling, the evaluation of capillary density did not reveal any difference as compared with the controls in 3 areas of the myocardium. In conclusion, chronic inhibition of nitric oxide synthesis in vivo produces a long-lasting reduction in the capacity of coronary arteries to generate new capillaries in vitro. Thus, our results lend support to the hypothesis that an inhibition of new capillary formation could prevent the development of compensatory ventricular hypertrophy, in favor of concentric remodeling.

**Key Words:** cardiac remodeling, angiogenesis, nitric oxide, capillary density, hypertension

(*J Cardiovasc Pharmacol*™ 2004;44:322–328)

In patients with essential hypertension, concentric remodeling is the most common change of cardiac morphology. It is characterized by a normal left ventricular mass, but an increased thickness of the ventricular wall.<sup>1</sup> Concentric remodeling decreases the risk of mortality, as compared with eccentric or concentric hypertrophic remodeling.<sup>2</sup> Mechanisms determining the type of remodeling that patients with essential hypertension will develop are still poorly understood. Chronic inhibition of nitric oxide synthase (NOS) activity with N<sup>ω</sup>-nitro-L-arginine-methyl ester (L-NAME) leads to hypertension.<sup>3,4</sup> Recent studies have shown that such a treatment, similarly to essential hypertension, induces concentric eutrophic remodeling of the heart.<sup>5,6</sup> Moreover, these studies have reported that this adaptation of the left ventricle to the chronic pressure overload normalizes cardiac systolic stress. Furthermore, concentric remodeling decreases passive myocardial stiffness, allowing greater muscle strain for a given diastolic stress of preload<sup>5</sup> and an enhanced left ventricular (LV) contractile reserve in response to calcium.<sup>6</sup>

Angiogenesis, defined as new blood vessel growth from existing vessels, has been observed in chronic pathologic ischemia, wound healing, tumor growth, and metastases.<sup>7</sup> Furthermore, it has been observed that angiogenesis and compensatory muscle hypertrophy are temporally coupled, suggesting that muscular hypertrophy requires angiogenesis.<sup>8</sup> Several in vitro and in vivo studies have demonstrated a direct involvement of NO in angiogenesis.<sup>9–12</sup> We hypothesized that endothelial dysfunction (reduction in NO release/availability) in hypertension could affect the compensatory ventricular hypertrophy expected with an enhanced afterload, by limiting coronary capillary growth. To lend support to this hypothesis, we aimed at determining the effect of NO on coronary neovascularization measured in three-dimensional type I collagen cultures following in vitro and in vivo L-NAME treatments, using the aorta as a comparative artery. The effect of chronic

Received for publication August 7, 2003; accepted May 21, 2004.

From the \*Faculty of Pharmacy, Université de Montréal, Montréal, Canada; †Institut Universitaire de Recherche Clinique, Université Montpellier I, Montpellier, France; ‡Department of Pharmacology, Faculty of Medicine, Université de Montréal, Montréal, Canada; and §Centre de recherche du CHUM, Pavillon Hôtel-Dieu, Montréal, Canada.

This work received financial support from the Heart and Stroke Foundation of Canada. DdB and PM are research scholars from the Fonds de la Recherche en Santé du Québec (FRSQ) and the Canadian Institutes for Health Research (CIHR), respectively. JPM and BJ are research scholars from INSSERM, and DG received a studentship from the Société québécoise d'hypertension artérielle.

Reprints: Pierre Moreau, Associate Professor, Canada Faculty of Pharmacy, Université de Montréal, 2900 Edouard-Montpetit, Room R-313, P.O. Box 6128, Stn "Centre-ville" Montréal, Québec H3C 3J7 (e-mail: [REDACTED])

Copyright © 2004 by Lippincott Williams & Wilkins

L-NAME on myocardial structure and capillary density was also assessed to support the hypothesis.

## METHODS

### Treatments

Male Wistar rats weighing between 250 to 275g were purchased from Iffa-Credo (L'Arbresle, France) for the in vitro neovascularization experiments, which were divided in in vitro and in vivo experiments. In the former, culture medium (see below) was either used alone (control group,  $n = 9$ ) or supplemented with L-NAME (1 mmol/L,  $n = 8$ ), the NO donor S-nitroso-N-acetylpenicillamine (SNAP, 0.1 mmol/L,  $n = 7$ ), or both ( $n = 6$ ). In the in vivo study of neovascularization, rats were treated with L-NAME at a dose of 50 mg/kg/d (dissolved in drinking water) during 14 days ( $n = 4$  rats, two rings from each rat were averaged and an  $n$  of 4 was used in statistical analysis). Untreated rats served as controls ( $n = 4$  in replicate). Additional control and in vivo L-NAME-treated rats from Charles River (St-Constant, Qc, Canada) were used for the cardiac structure and capillary density evaluation ( $n = 7$ /group). The local animal care committees approved all protocols.

### Neovascularization

Neovascularization was measured as described previously.<sup>13</sup> Briefly, the abdominal aorta and the heart were removed from untreated (in vitro and control animals for in vivo experiments) or L-NAME-treated (in vivo experiments) rats under a binocular dissection microscope. One-millimeter-thick aortic and coronary rings from the septum were prepared in a sterile Hanks balance salt solution (HBSS) and embedded in a three-dimensional gel of type I collagen on a 24-well plate at 37°C. Type I collagen was obtained from rat-tail tendon as described by Elsdale and Bard.<sup>14</sup> Gels of collagen were prepared according to Montesano et al<sup>15</sup> by quickly mixing at 4°C, 1:2 rat-tail collagen solution (3 mg/ml) 1:2.5 DMEM, 1:17 sodium bicarbonate (0.1 N). Gelation was allowed to take place at 37°C for 30 minutes by coating each well with 0.5 mL of the collagen solution. After gelation, Dolbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) solution supplemented with L-glutamine, endothelial cell growth supplement (ECGS, 15 mg/mL), 10% fetal calf serum, epidermal growth factor (EGF, 10 ng/mL), and insulin (5 µg/mL) was added to the wells. Embedded artery rings were then incubated for 12 days at 37°C. All cultures were observed every second day with an inverted microscope equipped with a 35-mm camera. Final quantification of new tube growth and ramification was performed on images captured after 12 days of culture. The number of tubes emerging from the artery and the number of ramifications from each of these new capillaries were added to obtain a final score. The data are expressed as a percentage of growth relative to the control wells on each plate, to reduce the influence of plate-to-plate variability. In the in vivo study, however, absolute values are given since fewer plates were required.

### Cardiac Morphometry and Capillary Density Measurement

After treatment, rats were anesthetized with sodium pentobarbital (50 mg/kg, i.p.) and instrumented using a polyethylene catheter (P10 tubing welded with a PE 50 tubing) in the right femoral artery. Mean arterial pressure was recorded 24 hours later in the awake and freely moving rats through a pressure transducer. Rats were killed and hearts were removed, transferred in cold Krebs solution, and weighed. Slices from the base of the heart were fixed with 4% paraformaldehyde PBS solution for 24 hours. This method yields similar structural observations such as using KCl to stop the heart in diastole.<sup>16</sup> Structural parameters of the left ventricle (cavity diameter, external diameter, wall thickness, and CSA) were obtained by digital morphometry on 4-µm paraffin-embedded histologic slices. Wall/lumen ratio and wall stress (in dynes/cm<sup>2</sup> = pressure · lumen diameter · 1334/wall thickness) were calculated from the morphometric values.

Capillary density was obtained from serial sections of the basal part of the left ventricle. The tissue sections were first heated and dewaxed with ethanol and then blocked with saponine-EGTA solution for 15 minutes at room temperature. Tissue sections were rinsed with PBS and incubated with lectin TRITC labeled from *Bandeiraria simplicifolia* (5 µg/ml) for 1 hour at 37°C. After 4 washes with PBS, sections were mounted with Vectashield. Slides were kept in the dark at 4°C until microscopic analysis. Capillary density was determined in sections labeled with lectin and was based on quantification of positively labeled structure with <8 µm lumen size and with 1 nucleus (endothelial cell) per mm<sup>2</sup>. Only sections oriented perpendicular to the capillaries were counted. Vessel density was evaluated by a blinded investigator throughout the subendocardium, midmyocardium, and subepicardium of the circumference of the left ventricle, in two different areas for each ventricular layer (the duplicates were averaged). Capillaries were counted (400×) by use of fluorescent microscopy.

### Drugs and Statistics

L-NAME, SNAP, ECGs, EGF, and IGF were obtained from Sigma. HBSS, DMEM, HAM F12, FVS, penicillin, and fungizone were obtained from GibcoBRL-Life Technologies.

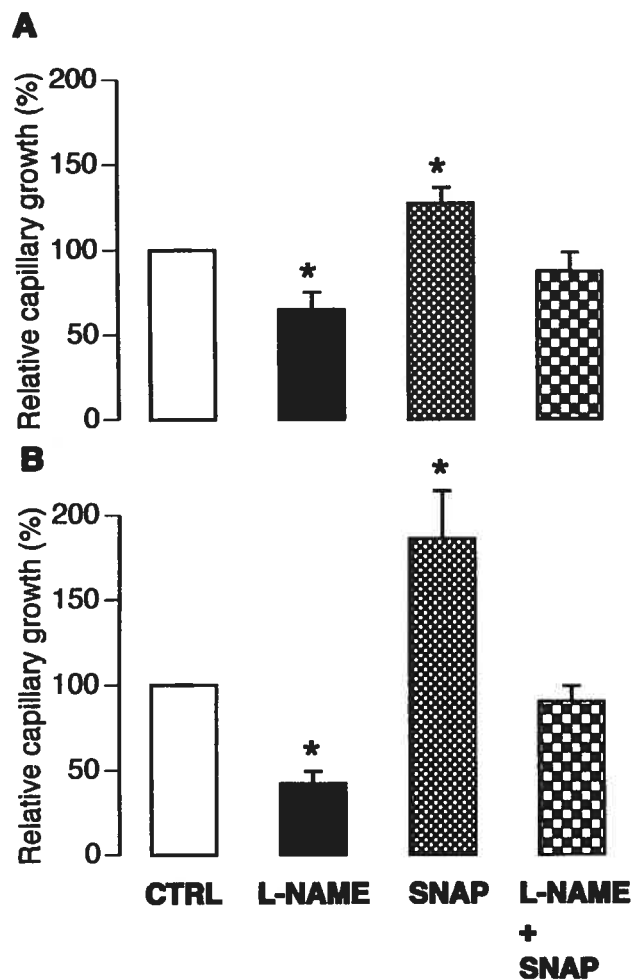
Data are presented as mean ± SEM. Statistical analysis was performed by one sample analysis when controls were normalized to 100 (Fig. 1), or by unpaired *t* test.  $P < 0.05$  was considered significant.

## RESULTS

### Neovascularization

In the in vitro study of neovascularization, the presence of L-NAME (1 mM) in the culture medium significantly decreased the relative (control = 100%) neovascularization from



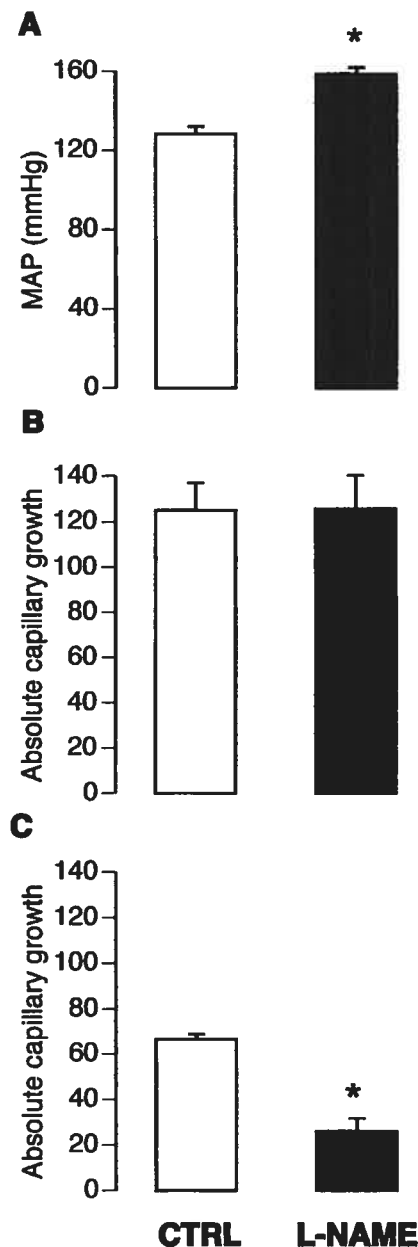


**FIGURE 1.** Relative capillary growth of (A) aortic and (B) coronary artery rings from normotensive rats (normal culture condition (CTRL) was normalized to 100%). Drugs were added only to the culture medium: L-NAME (1 mmol/L), S-nitroso-N-acetylpenicillamine (SNAP, 0.1 mmol/L), or both for 12 days, at which time the capillary growth was quantified (see methods), n = 6–9. Data are presented as mean ± SEM, \*P < 0.05 versus 100, one sample analysis.

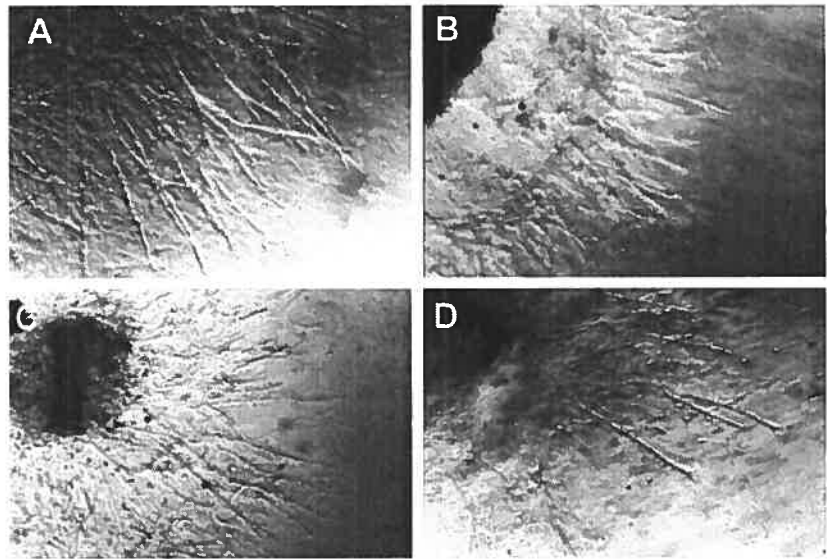
normotensive aortic and coronary rings by 35.5 ± 9.9%, and 57.9 ± 6.7%, respectively (P < 0.05) (Fig. 1). When compared between arteries, the effect had a tendency to be of greater magnitude in coronary arteries (P = 0.08). The addition of SNAP (0.1 mM) in the culture medium significantly increased growth of new vessels from both artery rings (27.3 ± 9.2% in aortic rings; 85.6 ± 28.1% in coronary rings, P < 0.05). Again, coronary arteries had a tendency to be more sensitive (P = 0.07). Simultaneous incubation with L-NAME and SNAP abrogated the effect of either drug used alone.

In the in vivo study, treatment with L-NAME (50 mg/kg/d during 14 days) significantly increased mean arterial

pressure, as expected (Fig. 2). Angiogenesis from aortic rings was not altered in chronic L-NAME treated rats as compared with controls (Figs. 2 and 3). In contrast, however, chronic NOS inhibition led to an impaired neovascularization from



**FIGURE 2.** (A) Mean arterial pressure (MAP) and absolute capillary outgrowth of (B) aortic and (C) coronary artery rings from normotensive (CTRL) and L-NAME-treated rats in vivo (n = 4 rats, two rings from each rat were averaged). No drugs were added to the culture medium. Data are presented as mean ± SEM, \*P < 0.05 versus Control rats, unpaired t test.



**FIGURE 3.** Representative pictures of tube outgrowth after 12 days of incubation from aortic rings harvested from (A) control and (B) L-NAME-treated rats in vivo. (C) Coronary artery tube formation from control and (D) L-NAME-treated rats. The reduction of coronary neovascularization with L-NAME (D versus C) is evident.

coronary rings as compared with control values (Figs. 2 and 3). It must be reemphasized that modulators of NO were not added acutely in the culture medium in these experiments.

**Ventricular Structure and Capillary Density**

In this study, chronic in vivo administration of L-NAME also significantly increased mean arterial pressure (Table 1).

Body weight, heart weight, and heart weight/body weight ratio (HW/BW) of L-NAME hypertensive rats was similar to that of untreated rats (Table 1). Detailed morphologic analysis demonstrated that chronic NOS inhibition induced a change in left ventricular (LV) geometry, as compared with control animals. Specifically, a decreased LV cavity chamber size and an increased relative wall thickness were observed, leading to an

**TABLE 1.** Cardiac Morphological Characteristics and Capillary Density in Control and In Vivo L-NAME-Treated Rats, n = 7/Group

Parameters	Control	L-NAME
Body weight (g)	339 ± 19	362 ± 8
Heart weight (mg)	901 ± 23	995 ± 33
HW/BW ratio (mg/g)	2.66 ± 0.13	2.75 ± 0.69
MAP (mm Hg)	96 ± 5	118 ± 5*
Heart rate (bpm)	385 ± 8	371 ± 19
LV cavity diameter (mm)	3.52 ± 0.05	3.01 ± 0.09*
LV external diameter (mm)	7.79 ± 0.25	8.16 ± 0.23
LV wall thickness (mm)	2.14 ± 0.12	2.58 ± 0.08*
Wall/lumen ratio	0.607 ± 0.035	0.858 ± 0.024*
LV CSA (mm <sup>2</sup> )	38.1 ± 2.9	45.5 ± 2.5
Wall stress (dyn/cm <sup>2</sup> )	274 × 10 <sup>3</sup> ± 14 × 10 <sup>3</sup>	226 × 10 <sup>3</sup> ± 10 × 10 <sup>3</sup> *
Mean capillary density in LV (capillaries/mm <sup>2</sup> )		
Subendomyocardium	1747 ± 113	1621 ± 93
Midmyocardium	1928 ± 154	1606 ± 157
Subepimyocardium	1936 ± 171	1895 ± 107
Subepimyocardium	1201 ± 109	1361 ± 111
Total capillaries in a cross section	78832 ± 2927	78870 ± 3121

HW/BW, heart weight/body weight ratio; MAP, mean arterial pressure; LV, left ventricle; CSA, cross-sectional area.

\*P < 0.05 vs control values (unpaired t-test).

increased wall to lumen ratio (W/L, Table 1). Furthermore, LV cross-sectional area (CSA) was similar in L-NAME-treated and in control rats, confirming the lack of hypertrophy suggested by the normal HW/BW. Altogether, these data suggest that chronic NOS inhibition led to concentric cardiac remodeling. Calculation of ventricular wall stress revealed that the increase in pressure was overcompensated by cardiac remodeling in L-NAME-treated rats (Table 1).

Capillary density analysis showed no significant differences between L-NAME-treated and untreated rats in all 3 myocardial areas, although there was a tendency for lower capillary density in the subendomyocardium L-NAME-treated rats. Estimated total capillaries in a cross-section did not differ between the groups.

## DISCUSSION

According to several *in vitro* and *vivo* studies, NO is directly involved in angiogenesis.<sup>9–12</sup> Compounds of different chemical nature that mimic the effect of NO, like NO donors such as SNP, promote endothelial cell proliferation and migration *in vivo* and *in vitro*, while inhibitors of NOS suppress these responses.<sup>17</sup> Our results of acute neovascularization are consistent with the concept that endogenous NO is involved in the process. Indeed, aortic and coronary angiogenesis was decreased with the addition of L-NAME in the culture medium. Furthermore, supplementation of the culture medium with an NO donor, SNAP, increased neovascularization. When both drugs were used in combination, a net effect could not be observed, suggesting that endogenous NO (inhibited by L-NAME) and exogenous NO have additive effects. In other words, endogenous NO continues to influence neovascularization even in the presence of an NO donor. Interestingly, the magnitude of the response in coronary arteries (to NOS inhibition or exogenous NO), tended to be superior to that of the aorta, suggesting that coronary arteries could be more sensitive or responsive to angiogenesis modulation by NO. In that respect, the dose of L-NAME used in this study (1 mM) was similar<sup>18,19</sup> or even less<sup>20</sup> as compared with other *in vitro* studies measuring the contribution of NO in the angiogenesis process.

The major new finding of this study was that chronic *in vivo* NOS inhibition led to a persistent reduction of the coronary angiogenic capacity. In contrast, the ability of aortic rings to generate new tubes was not modified by treating rats chronically with L-NAME. This difference could be explained by the lower sensitivity or responsiveness of the aorta to NO, as suggested by our *in vitro* experiments. We have also observed that coronary arteries precontracted with phenylephrine also relax significantly more than aortic rings to sodium nitroprusside (79.4 versus 37.8%), suggesting that their general responsiveness to NO is enhanced (data not shown). Our results would therefore implicate that different types of arteries (conductance versus more muscular) could respond differently to an-

giogenic stimuli or inhibitors, including endothelial dysfunction.

The evaluation of cardiac morphology revealed that the LV underwent concentric remodeling. Indeed, chronic treatment with L-NAME led to a decreased LV chamber size, and to increases in wall thickness and in wall to lumen cavity ratio. Both HW/BW and CSA of the LV supported an absence of cardiac hypertrophy after chronic NOS inhibition. Our results are in line with previous work reporting that L-NAME-induced hypertension was associated with a distinct pattern of LV remodeling, characterized by a decrease in LV chamber size relative to wall thickness in the absence of an increase in LV mass.<sup>5,6</sup> We found wall stress on the left ventricle to be reduced in L-NAME-treated rats as compared with controls, suggesting that the change in geometry overcompensated the blood pressure increase. Accordingly, functional evaluation of the heart did not reveal any differences between control and L-NAME-treated rats.<sup>5,6</sup> In contrast to the concentric remodeling observed in this and other studies, other groups have reported cardiac hypertrophy in hypertensive rats subjected to chronic NOS inhibition.<sup>21–23</sup> In that respect, Arnal et al<sup>24</sup> found significant myocardial hypertrophy only in 6 of 25 rats with L-NAME-induced hypertension. Interestingly, only these 6 rats showed elevated plasma renin activity (PRA). Thus, as previously discussed elsewhere,<sup>25</sup> the renin angiotensin system appears important to mediate cardiovascular hypertrophy in this experimental model. We found no increased PRA after 14 days of treatment with L-NAME at a dose of 50 mg/kg/d (data not shown). Alternatively, it has been postulated that the development of cardiac hypertrophy could depend on the dosage of L-NAME and the duration of treatment.<sup>21</sup> However, our results are similar to those obtained in rats treated with 50 mg/kg/d for 6 weeks<sup>6</sup> and 100 mg/kg/d for 8 weeks.<sup>5</sup> It is still unclear as to what triggers the activation of the RAS in the L-NAME model, but renal injury appears to be a likely candidate. Nonetheless, our results suggest that the L-NAME model can reproduce the concentric cardiac remodeling observed in essential hypertension when the RAS is not activated.

Blood vessel recruitment is an important feature of normal tissue growth. It has been observed that compensatory muscle hypertrophy and angiogenesis are temporally coupled.<sup>8</sup> Numerous evidences have also shown a positive correlation between coronary vascular growth (and/or capillary growth) and cardiac hypertrophy, depending upon specific factors associated with either species or models of cardiac hypertrophy.<sup>26</sup> During development of pressure overload hypertrophy, structural remodeling and angiogenesis occur. Studies manipulating coronary microvascular growth during the development of LVH suggest that angiogenesis is an important factor in maintaining coronary capillary density.<sup>26–29</sup> Indeed, as cardiac hypertrophy develops, the flow through any given capillary needs to increase in proportion to the magnitude of the enhanced metabolic demand.<sup>26</sup> It is thus interesting that

Kubis et al<sup>30</sup> observed left ventricular hypertrophy and normal capillary density (suggesting proportional capillary growth) in hypertensive mice lacking the eNOS gene. Although these results suggest that NO does not modulate capillary growth and associated hypertrophy, they have not determined the possible contribution of compensatory mechanisms in the angiogenic process, nor the possible contribution of the RAS system in their model. In contrast to the results obtained in eNOS knock-out mice, there was no increase in ventricular mass in L-NAME-treated rats (see above). Since capillary density was similar to controls, this suggests that the net amount of capillaries was not modified. Considering that chronic NOS inhibition reduced the capacity of coronary arteries to generate new vessels *in vitro*, it is tempting to speculate that reduced capacity to stimulate proportional capillary angiogenesis *in vivo* could impede on the development of compensatory ventricular hypertrophy. To support our hypothesis, a study specifically designed to address the capillary/tissue growth relationship reported that mice in which NOS was pharmacologically inhibited or mice lacking eNOS had a marked reduction in compensatory lung growth.<sup>31</sup> Furthermore, 2 studies have reported that chronic NOS inhibition prevents the development of ventricular hypertrophy induced by DOCA-salt treatment<sup>32</sup> or by a carotid arterio-venous shunt.<sup>33</sup>

Our study has limitations, including a very superficial evaluation of the mechanisms explaining the difference in responsiveness to NO between the aorta and coronary arteries. The amount of coronary arteries collectable to measure biochemical parameters, such as cGMP, guanylate cyclase or even NOS, is insufficient. In addition, it is difficult to extrapolate results obtained *in vitro* to the *in vivo* situation. Thus, our study lends support, but does not prove that lack of ventricular hypertrophy is directly linked to inhibition of neovascularization. The method used to harvest and fix the heart did not use KCl to clearly stop the heart in diastole. Nonetheless, we have evidence that the dimensions obtained are in accordance with this technique. Finally, some rats were treated in France, while others came from Canada. The arterial pressure is different between the two sets of experiments and we cannot exclude that other parameters may vary as well.

### CONCLUSION

Chronic inhibition of NO synthesis *in vivo* produces concentric remodeling of the heart and a long-lasting reduction in the capacity of coronary arteries to generate new tubes *in vitro*. Although present experiments do not allow us to causally relate the inhibition of capillary growth to concentric (euthropic) ventricular remodeling, our results nonetheless lend support to the hypothesis that an inhibition of new capillary formation could prevent the development of compensatory ventricular hypertrophy, at least when the RAS is not activated.

### ACKNOWLEDGMENTS

The authors acknowledge the contribution of Shant der Sarkassian and David Duguay, both from Dr deBlois' Laboratory.

### REFERENCES

- Bugra Z, Koynan N, Vural A, et al. Left ventricular geometric patterns and QT dispersion in untreated essential hypertension. *Am J Hypertens*. 1998; 11:1164–1170.
- Koren MJ, Devereux RB, Casale PN, et al. Relation of left ventricular mass and geometry to morbidity and mortality in uncomplicated essential hypertension. *Ann Intern Med*. 1991;114:345–352.
- Rees DD, Palmer RM, Moncada S. Role of endothelium-derived nitric oxide in the regulation of blood pressure. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1989; 86:3375–3378.
- Ribeiro MO, Antunes E, de Nucci G, et al. Chronic inhibition of nitric oxide synthesis. A new model of arterial hypertension. *Hypertension*. 1992;20:298–303.
- Matsubara BB, Matsubara LS, Zornoff LA, et al. Left ventricular adaptation to chronic pressure overload induced by inhibition of nitric oxide synthase in rats. *Basic Res Cardiol*. 1998;93:173–181.
- Bartunek J, Weinberg EO, Tajima M, et al. Chronic N(G)-nitro-L-arginine methyl ester-induced hypertension: novel molecular adaptation to systolic load in absence of hypertrophy. *Circulation*. 2000;101:423–429.
- Folkman J. Angiogenesis: initiation and control. *Ann N Y Acad Sci*. 1982; 401:212–227.
- Plyley MJ, Olmstead BJ, Noble EG. Time course of changes in capillarization in hypertrophied rat plantaris muscle. *J Appl Physiol*. 1998;84: 902–907.
- Granger HJ, Ziche M, Hawker JR Jr, et al. Molecular and cellular basis of myocardial angiogenesis. *Cell Mol Biol Res*. 1994;40:81–85.
- Conway EM, Collen D, Carmeliet P. Molecular mechanisms of blood vessel growth. *Cardiovasc Res*. 2001;49:507–521.
- Murohara T, Asahara T, Silver M, et al. Nitric oxide synthase modulates angiogenesis in response to tissue ischemia. *J Clin Invest*. 1998;101: 2567–2578.
- Noiri E, Lee E, Testa J, et al. Podokinesis in endothelial cell migration: role of nitric oxide. *Am J Physiol*. 1998;274:C236–C244.
- Nicosia RF, Ottinetti A. Modulation of microvascular growth and morphogenesis by reconstituted basement membrane gel in three-dimensional cultures of rat aorta: a comparative study of angiogenesis in matrigel, collagen, fibrin, and plasma clot. *In Vitro Cell Dev Biol*. 1990;26:119–128.
- Elsdale T, Bard J. Collagen substrata for studies on cell behavior. *J Cell Biol*. 1972;54:626–637.
- Montesano R, Orci L, Vassalli P. *In vitro* rapid organization of endothelial cells into capillary-like networks is promoted by collagen matrices. *J Cell Biol*. 1983;97:1648–1652.
- Der Sarkissian S, Marchand EL, Duguay D, et al. Reversal of interstitial fibroblast hyperplasia via apoptosis in hypertensive rat heart with valsartan or enalapril. *Cardiovasc Res*. 2003;57:775–783.
- Ziche M, Morbidelli L. Nitric oxide and angiogenesis. *J Neurooncol*. 2000;50:139–148.
- Papapetropoulos A, Desai KM, Rudic RD, et al. Nitric oxide synthase inhibitors attenuate transforming-growth-factor-beta 1-stimulated capillary organization *in vitro*. *Am J Pathol*. 1997;150:1835–1844.
- Babaei S, Teichert-Kuliszewska K, Monge JC, et al. Role of nitric oxide in the angiogenic response *in vitro* to basic fibroblast growth factor. *Circ Res*. 1998;82:1007–1015.
- Babaei S, Stewart DJ. Overexpression of endothelial NO synthase induces angiogenesis in a co-culture model. *Cardiovasc Res*. 2002;55:190–200.
- Pereira LM, Mandarim-De-Lacerda CA. Quantitative study of myocardial microcirculation in arterial hypertension due to progressive inhibition of NO synthesis. *Arq Bras Cardiol*. 1999;73:407–418.
- Sladek T, Gerova M, Znojil V, et al. Morphometric characteristics of cardiac hypertrophy induced by long-term inhibition of NO synthase. *Physiol Res*. 1996;45:335–338.
- Takemoto M, Egashira K, Usui M, et al. Important role of tissue angiotensin-converting enzyme activity in the pathogenesis of coronary vascu-

- lar and myocardial structural changes induced by long-term blockade of nitric oxide synthesis in rats. *J Clin Invest*. 1997;99:278–287.
24. Amal JF, el Amrani AI, Chatellier G, et al. Cardiac weight in hypertension induced by nitric oxide synthase blockade. *Hypertension*. 1993;22:380–387.
  25. Moreau P, Takase H, d'Uscio LV, et al. Effect of chronic nitric oxide deficiency on angiotensin II-induced hypertrophy of rat basilar artery. *Stroke*. 1998;29:1031–1035; discussion 1035–1036.
  26. Tomanek RJ, Torry RJ. Growth of the coronary vasculature in hypertrophy: mechanisms and model dependence. *Cell Mol Biol Res*. 1994;40:129–136.
  27. Bishop SP, Powell PC, Hasebe N, et al. Coronary vascular morphology in pressure-overload left ventricular hypertrophy. *J Mol Cell Cardiol*. 1996;28:141–154.
  28. Anversa P, Capasso JM. Loss of intermediate-sized coronary arteries and capillary proliferation after left ventricular failure in rats. *Am J Physiol*. 1991;260:H1552–H1560.
  29. Rakusan K, Flanagan MF, Geva T, et al. Morphometry of human coronary capillaries during normal growth and the effect of age in left ventricular pressure-overload hypertrophy. *Circulation*. 1992;86:38–46.
  30. Kubis N, Besnard S, Silvestre JS, et al. Decreased arteriolar density in endothelial nitric oxide synthase knockout mice is due to hypertension, not to the constitutive defect in endothelial nitric oxide synthase enzyme. *J Hypertens*. 2002;20:273–280.
  31. Leuwerke SM, Kaza AK, Tribble CG, et al. Inhibition of compensatory lung growth in endothelial nitric oxide synthase-deficient mice. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2002;282:L1272–L1278.
  32. Li JS, Sventek P, Schiffrin EL. Effect of antihypertensive treatment and N omega-nitro-L-arginine methyl ester on cardiovascular structure in deoxycorticosterone acetate-salt hypertensive rats. *J Hypertens*. 1996;14:1331–1339.
  33. Miyamoto T, Takeishi Y, Shishido T, et al. Role of nitric oxide in the progression of cardiovascular remodeling induced by carotid arteriovenous shunt in rabbits. *Jpn Heart J*. 2003;44:127–137.

