

Université de Montréal

Étude de la longueur des télomères cardiovasculaires et de leur modulation pharmacologique chez le rat
hypertendu

par

Caroline Robillard

Département de Pharmacologie et Physiologie, Faculté de Médecine

Mémoire présenté en vue de l'obtention du grade de M.Sc.
en Pharmacologie

Août, 2020

© Caroline Robillard, 2020

Université de Montréal

Département de Pharmacologie et de Physiologie, Faculté de Médecine

Ce mémoire intitulé

Étude de la longueur des télomères cardiovasculaires et de leur modulation pharmacologique chez le rat hypertendu

Présenté par :

Caroline Robillard

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes

Guy Rousseau

Président-rapporteur

Denis DeBlois

Directeur de recherche

Pavel Hamet

Codirecteur

Gerardo Ferbeyre

Membre du jury

Résumé

Objectif : L'hypertension est associée à une hyperplasie cardiovasculaire, un taux de renouvellement cellulaire accéléré et une diminution de la longueur des télomères. Nous avons postulé que le renversement de l'hyperplasie par apoptose sélective observé avec les inhibiteurs du système rénine-angiotensine (iSRA) chez le rat spontanément hypertendu (SHR) est associé à une modulation de la longueur des télomères cardiovasculaires.

Méthodes : La mesure relative du poids du ventricule gauche (VG) et son contenu en ADN ont été mesurés. Dans l'aorte, l'hypertrophie a été mesurée histologiquement et l'hyperplasie par décompte des cellules de muscle lisse (CML). La longueur des télomères (TRF) a été mesurée par immunobuvardage de type Southern. Ces mesures ont été effectuées chez des rats SHR traités avec un placebo, un iSRA (énalapril ou losartan) ou l'hydralazine pendant 21 jours, ainsi que chez les rats normotendus Wistar-Kyoto (WKY).

Résultats : Les iSRA ont partiellement normalisé le contenu en ADN dans le VG et complètement normalisé le décompte cellulaire des CML dans l'aorte. Comparativement aux rats WKY, les SHR-placebo ont montré un plus haut pourcentage de TRF courts dans le ventricule gauche (50,2% vs 64,6%; $p < 0,05$) ainsi qu'une longueur moyenne des TRF plus courte (62,6 Kb vs 57,1Kb; $p < 0,05$). Ces différences ont été abolies par l'énalapril et le losartan mais pas par l'hydralazine. Dans l'aorte, les résultats préliminaires n'ont pas révélé de différence significative. Ils suggèrent que les rats SHR-placebo ont des télomères plus longs que les rats WKY et que les inhibiteurs du SRA tendent à normaliser cette différence.

Conclusion : Les iSRA ont normalisé la longueur des télomères dans le VG. Nous spéculons que les iSRA agissent comme agents sénolytiques et éliminent préférentiellement les fibroblastes cardiaques avec télomères courts. Dans l'aorte, d'autres études sont requises afin de confirmer une possible régulation différentielle spécifique à ce tissu.

Mots-clés : hypertension, télomères, inhibiteurs du SRA, sénolyse, hyperplasie, ventricule gauche, remodelage cardiovasculaire.

Abstract

Objective: Hypertension is associated with cardiovascular hyperplasia, an increased cell turnover and a decrease in telomere length. We postulated that the reversal of hyperplasia by selective apoptosis observed with renin-angiotensin inhibitors (RASi) in the spontaneously hypertensive rat (SHR) is associated with a modulation of cardiovascular telomere length.

Methods: Relative weight of the left ventricle (LV) and its DNA content were measured. In the aorta, hypertrophy was measured histologically and hyperplasia was measured through smooth muscle cell (SMC) count. Telomere restriction fragment (TRF) length was measured using Southern blot. Those measures were taken on SHR treated with either a placebo, a RAS inhibitor (enalapril or losartan) or hydralazine for 21 days, as well as on Wistar-Kyoto (WKY) normotensive rats.

Results: RAS inhibitors partially normalized DNA content in the LV and completely normalized the SMC count in the aorta. Comparatively to the WKY rats, SHR-placebo displayed a higher percentage of short TRF in the LV (50,2% vs 64,6%; $p < 0,05$) as well as a shorter mean TRF length (62,6 Kb vs 57,1Kb; $p < 0,05$). Those differences were eliminated by enalapril and losartan, but not with hydralazine. In the aorta, preliminary results did not yield to significant differences. They suggest that SHR-placebo have longer telomeres than WKY rats and that RAS inhibitors tend to normalize this difference.

Conclusion: RAS inhibitors normalized telomere length in the LV. We speculate that RAS inhibitors act as senolytic agents and preferentially eliminate cardiac fibroblasts with short telomeres. In the aorta, more studies are required to confirm the possible differential regulation specific to this tissue.

Keywords : hypertension, telomeres, RAS inhibitors, senolysis, hyperplasia, left ventricle, cardiovascular remodeling

Table des matières

Résumé.....	5
Abstract	7
Table des matières	9
Liste des tableaux.....	13
Liste des figures.....	15
Liste des abréviations	17
Remerciements	24
1. Chapitre 1 - Introduction.....	25
1.1 L'hypertension artérielle	25
1.1.1 L'hypertension : Définition, conséquences et statistiques	25
1.1.2 Gestion de l'hypertension	25
1.1.3 Mécanismes de régulation de la pression artérielle	26
1.1.3.1 Facteurs humoraux.....	27
1.1.3.1.1 Système rénine-angiotensine-aldostérone.....	27
1.1.4 Étiologie de l'hypertension	30
1.1.5 Le traitement de l'hypertension artérielle	31
1.1.5.1 Buts et approches thérapeutiques	31
1.1.5.2 Traitements pharmacologiques.....	32
1.1.5.2.1 Les diurétiques.....	33
1.1.5.2.2 Les sympatholytiques.....	34
1.1.5.2.3 Les vasodilatateurs directs.....	34
1.1.5.2.4 Les bloqueurs de canaux calciques	35
1.1.5.2.5 Les inhibiteurs du système rénine-angiotensine-aldostérone.....	36
1.1.6 Modèles expérimentaux d'hypertension artérielle.....	39
1.1.6.1 Le rat spontanément hypertendu.....	39
1.2 Remodelage cardiovasculaire en tant que dommage aux organes cibles dans l'hypertension	41
1.2.1 Le système vasculaire.....	41
1.2.1.1 La structure vasculaire	41
1.2.1.2 Pathophysiologie du remodelage vasculaire dans l'hypertension	42
1.2.1.2.1 Remodelage des petites artères	44
1.2.1.2.2 Remodelage des gros vaisseaux.....	44
1.2.2 Remodelage cardiaque.....	45
1.2.2.1 Structure histologique du myocarde	46
1.2.2.2 L'hypertrophie ventriculaire gauche.....	47
1.2.2.2.1 Implication du compartiment myocytaire	49
1.2.2.2.2 Implication du compartiment non-myocytaire.....	50
1.2.3 Pharmacothérapie du remodelage cardiovasculaire	50

1.2.3.1	Effets vasculaires	51
1.2.3.2	Effets cardiaques	52
1.3	Rôle de l'angiotensine II dans le système cardiovasculaire.....	55
1.3.1	Systèmes tissulaires et voies alternatives de synthèse	56
1.3.2	Types de récepteurs et signalisation cellulaire	56
1.3.2.1	Le récepteur AT ₁	57
1.3.2.1.1	Événements classiques de transduction de signaux	57
1.3.2.1.2	Phosphorylation des tyrosines kinases	58
1.3.2.1.3	Stress oxydant et espèces réactives oxygénées.....	58
1.3.2.2	Le récepteur AT ₂	59
1.4	Description et implication de l'apoptose dans l'hypertension	61
1.4.1	Description	61
1.4.1.1	Autres types de mort cellulaire	62
1.4.2	L'apoptose dans l'hypertension artérielle.....	63
1.4.3	Potentiel thérapeutique de la modulation pharmacologique de l'apoptose par des antihypertenseurs 65	65
1.4.3.1	Modulation de l'apoptose dans le cœur.....	65
1.4.3.2	Modulation de l'apoptose dans le réseau vasculaire	67
1.4.3.2.1	Les antagonistes AT ₁ et l'apoptose des CML.....	68
1.4.3.2.2	Apoptose des CML et les iECA.....	69
1.5	Les télomères et la pathologie hypertensive	70
1.5.1	Historique de la découverte des télomères et de leurs fonctions	70
1.5.2	Description du système télomère-téломérase.....	71
1.5.2.1	Structure des télomères	71
1.5.2.2	Régulation de la longueur des télomères et la télomérase	72
1.5.2.2.1	Différences entre le rongeur et l'humain	75
1.5.3	Sénescence cellulaire et vieillissement	76
1.5.3.1	Caractérisation de la sénescence cellulaire	76
1.5.3.2	Rôle de la sénescence dans le vieillissement et maladies associées au vieillissement	76
1.5.3.3	Sénolyse.....	78
1.5.4	Les télomères et les maladies cardiovasculaires.....	79
1.5.4.1	Les données provenant de modèles expérimentaux.....	80
1.5.4.2	Les données provenant de modèles cliniques.....	80
1.5.5	Les télomères et l'hypertension artérielle	83
1.5.5.1	Les études chez les modèles animaux	83
1.5.5.2	Les études chez l'humain.....	85
1.5.6	La modulation pharmacologique des télomères dans le contexte des maladies cardiovasculaires....	86
1.6	Hypothèses et objectifs généraux	89
2	Chapitre 2 - Méthodologie.....	91
2.1	Procédures animales	91
2.2	Mesures d'hypertrophie et d'hyperplasie.....	91
2.3	Manipulation de l'ADN	92
2.3.1	Extraction de l'ADN	92
2.3.2	Évaluation de la dégradation de l'ADN	92

2.4	Isolation des télomères	92
2.5	Analyse et quantification de la longueur des télomères.....	93
2.6	Analyses statistiques	94
3	Chapitre 3 - Résultats	95
3.1	Paramètres hémodynamiques et masse corporelle des animaux	95
3.2	Cœur.....	95
3.2.1	Changement des paramètres structuraux.....	95
3.2.2	Modulation de la longueur des télomères dans le ventricule gauche	96
3.3	Aorte	98
3.3.1	Changement des paramètres structuraux.....	98
3.3.2	Modulation de la longueur des télomères.....	98
4	Chapitre 4 - Discussion.....	110
4.1	Ventricule gauche	111
4.1.1	Modulation du remodelage pathologique et de la longueur des télomères dans le ventricule gauche 111	
4.1.1.1	Renversement du remodelage pathologique	111
4.1.1.2	Longueur des télomères cardiaques.....	112
4.1.1.2.1	Effet des traitements sur les télomères du ventricule gauche	114
4.1.1.2.2	Hypothèse sur le mécanisme d'action des inhibiteurs du SRA sur la longueur des télomères cardiaques. 115	
4.2	Aorte	118
4.2.1	Modulation du remodelage pathologique et de la longueur des télomères dans l'aorte	118
4.2.1.1	Renversement du remodelage pathologique	118
4.2.1.2	Modulation de la longueur des télomères de l'aorte	119
4.3	Considérations méthodologiques et technologiques	122
4.4	Limitations de l'étude.....	127
4.5	Conclusion et perspectives de recherche.....	129
5	Bibliographie.....	131

Liste des tableaux

Tableau 1. - Classes principales d'agents antihypertenseurs.....	33
Tableau 2. - Comparaison des avantages et inconvénients des techniques de Southern blot et qPCR pour la mesure de la longueur des télomères	124

Liste des figures

Figure 1. - Principales voies enzymatiques connues et postulées, responsables de la formation et du métabolisme des peptides angiotensines	29
Figure 2. - Les différents modes du remodelage vasculaire.....	43
Figure 3. - Architecture cellulaire cardiaque	47
Figure 4. - Effets de l'angiotensine II dans la maladie hypertensive	55
Figure 5. - Représentation schématique des effets des inhibiteurs de l'Ang II et des bloqueurs de canaux calciques en fonction du temps et du type cellulaire sur l'apoptose dans le cœur hypertendu.	67
Figure 6. - Structure du télomère.....	71
Figure 7. - Pression artérielle moyenne au terme des 21 jours de traitement.....	100
Figure 8. - Changements structuraux dans le ventricule gauche au terme des 21 jours de traitement...	101
Figure 9. - Indice de masse du ventricule droit au terme des 21 jours de traitement	102
Figure 10. - Longueur moyenne des TRF dans le ventricule gauche	103
Figure 11. - Illustration de la distribution du signal télomérique dans le ventricule gauche.....	104
Figure 12. - Pourcentage du signal de la densité optique attribuable aux petits, moyens et longs TRF par rapport au signal entier dans le ventricule gauche	105
Figure 13. - Changements structuraux dans l'aorte au terme des 21 jours de traitement	106
Figure 14. - Longueur moyenne des TRF dans l'aorte.....	107
Figure 15. - Illustration de la distribution du signal télomérique dans l'aorte.....	108
Figure 16. - Pourcentage du signal de la densité optique attribuable aux petits, moyens et longs TRF par rapport au signal entier dans l'aorte	109

Liste des abréviations

AA	Acide Arachidonique
ADN	Acide désoxyribonucléique
AGT	Angiotensinogène
ALLHAT	<i>Antihypertensive and Lipid-Lowering Treatment to Prevent Heart Attack Trial</i>
ALTITUDE	<i>Aliskiren Trial In Type 2 diabetes Using cardio-renal Disease Endpoints</i>
AMPC	Adénosine monophosphate cyclique
Ang	Angiotensine
Ang I	Angiotensine I (décapeptide)
Ang II	Angiotensine II (octapeptide)
Ang III	Angiotensine III (Ang 2-8)
Ang IV	Angiotensine IV (Ang 3-8)
ANOVA	Analyse de variance
AP-1	Protéine activatrice-1
ARA	Antagoniste des récepteurs AT ₁
ARN	Acide ribonucléique
Asc2P	Acide ascorbique 2-phosphate
AT ₁	Récepteur de type 1 de l'Ang II
AT ₂	Récepteur de type 2 de l'Ang II
ATP	Adénosine 5' –triphosphate
AVC	Accident vasculaire cérébral
BCC	Bloqueur de canaux calciques
BH ₄	Tétrahydrobioptérine
BK	Bradykinine
C21	<i>Compound 21</i>
CAGE	<i>Chymostatin-sensitive angiotensin II generating enzyme</i>
CEP	Cellules endothéliales progénitrices
Chk2	Kinase essentielle au déclenchement du point de contrôle en G2

CHS	<i>Cardiovascular Health Study</i>
Cl ⁻	Ion chlorure
CM	Cardiomyocyte
CML	Cellule de muscle lisse
CMLV	Cellule de muscle lisse vasculaire
CV	Cardiovasculaire
DAG	Diacylglycérol
DOCA	Déoxycorticostérone acétate
DTT	Dithiothréitol
ECA	Enzyme de conversion de l'angiotensine
EGF	Facteur de croissance épidermal
eNOS	Forme endothéliale de la synthèse de l'oxyde nitrique
ET	Endothéline
Fb	Fibroblaste
FGF-2	Facteur de croissance 2 des fibroblastes
FMK	Fluorométhyl cétone
G	Protéine à activité GTPase
γH2AX	Histone 2 AX phosphorylé
GMPC	Guanosine monophosphate cyclique
HIF-1	Facteur 1 inductible par hypoxie
HMG-CoA	β-Hydroxy β-methylglutaryl-CoA
HVG	Hypertrophie ventriculaire gauche
HTA	Hypertension artérielle
HTN	Hypertension
H ₂ O ₂	Peroxyde d'hydrogène
ICAM	Molécule d'adhésion intercellulaire
iECA	Inhibiteur de l'enzyme de conversion de l'angiotensine
IGF	Facteur de croissance semblable à l'insuline
IL	Interleukine
IMC	Indice de masse corporelle
ISH	Société Internationale d'Hypertension
IP3	Inositol 1,4,5-triphosphate

JAK	Janus kinases
K ⁺	Ion potassique
kD	Kilo Dalton
LIFE	<i>Losartan Intervention For Endpoint reduction in hypertension study</i>
L-NAME	N(ω)-nitro-L-arginine methyl ester
LV	<i>Left ventricle</i>
MAP	<i>Mean arterial pressure</i>
MAPK	Protéines kinases activées par des mitogènes
MCP	Mort cellulaire programmée
MEC	Matrice extracellulaire
mm Hg	Millimètres de mercure
MMP	Métalloprotéinases de la matrice
MCV	Maladie cardiovasculaire
Na ⁺	Ion sodique
NAC	N-acétylcystéine
NADH	Nicotinamide adénine dinucléotide
NADPH	Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate-oxydase
NCCD	Nomenclature Committee on Cell Death
NCM	Non-cardiomyocyte
NF- κ B	Facteur de transcription nucléaire kappa B
NHANES	National Health and Nutrition Examination Survey
NO	Monoxyde d'azote
OMS	Organisation Mondiale de la Santé
O ₂ ⁻	Anion superoxyde
PA	Pression artérielle
PAI-1	Inhibiteur de l'activateur du plasminogène 1
PAM	Pression artérielle moyenne
PDGF	Facteur de croissance dérivé des plaquettes
PKC	Protéine kinase C
PLA ₂	Phospholipase A ₂
PLC	Phospholipase C
PLD	Phospholipase D

POT1	<i>Protection of Telomere 1</i>
PPAR- γ	Récepteur gamma activé par les proliférateurs de peroxyosomes
PS	Phosphatidylsérine
Q-FISH	Fluorescence quantitative par hybridation <i>in situ</i>
qPCR	Amplification en chaîne par polymérase en temps réel
Qt	Débit cardiaque
RAP1	<i>Repressor/Activator Protein 1</i>
RAS	<i>Renin-angiotensin system</i>
Rb	Rétinoblastome
RB ₁	Récepteur de type 1 des kinines
RB ₂	Récepteur de type 2 des kinines
RCPG	Récepteur couplé aux protéines G hétéro-trimériques
Redox	Réduction-oxydation
ROS	Espèces réactives dérivées de l'oxygène
RTK	Récepteur à activité tyrosine kinase
RVP	Résistance vasculaire périphérique
SADS	Distension des satellites à la sénescence
SAHF	Foyers d'hétérochromatine associés à la sénescence
SASP	Phénotype sécrétoire associé à la sénescence
SCHA	Société Canadienne d'Hypertension Artérielle
SEM	Erreur standard sur la moyenne
SHR	Rat spontanément hypertendu
SHRSP	Rat spontanément hypertendu susceptible à l'AVC
SMC	Smooth muscle cell
SRA	Système rénine-angiotensine
SRAA	Système rénine-angiotensine-aldostérone
STAT	Transducteurs du signal et activateurs de la transcription
STELA	<i>Single Telomere Length Analysis</i>
TERC	Composant ARN de la télomérase
TERT	Transcriptase inverse de la télomérase
TeSLA	<i>Telomere Shortest Length Assay</i>
TGF- β	Facteur de croissance transformant bêta / <i>Transforming Growth Factor beta</i>

TIN2	<i>TRF1-Interacting Protein 2</i>
TPP1	<i>Tripeptidyl Peptidase 1</i>
TRF	Fragment terminal télomérique / <i>Telomere restriction fragment</i>
TRF1	Facteur 1 de fixation des répétitions télomériques / <i>Telomeric Repeat Factor 1</i>
TRF2	Facteur 2 de fixation des répétitions télomériques / <i>Telomeric Repeat Factor 2</i>
WOSCOPS	<i>The West of Scotland Coronary Prevention Study</i>
WKY	Wistar-Kyoto

À Marcelle et Jean

Remerciements

En premier lieu, je tiens à remercier mon directeur de recherche, Denis DeBlois. Je te remercie Denis d'avoir de m'avoir généreusement accueillie et d'avoir cru en mon potentiel. Tu m'as grandement aidée à aller jusqu'au bout cette dernière année, et pour ta patience et ton soutien, je te remercie infiniment. Je remercie également mon co-directeur, le Dr Pavel Hamet. L'excellence et la reconnaissance de son travail à plusieurs égards m'ont énormément inspirée.

Je tiens également à remercier mon mari, Cristian. Beaucoup de fin de semaines, soirées et jours de vacances ont dû être sacrifiés pour terminer cet ouvrage, et sans son support, je n'aurais pas pu arrimer vie professionnelle, vie de famille et vie académique. Je remercie également mon fils, mon grand miraculé, Gabriel. Mon petit garçon que j'aime plus que tout, tu es le petit être le plus brave que je connaisse. Tu m'inspires à être la meilleure version de moi-même, à tous les jours.

Je garde mes remerciements les plus chers à mes yeux pour le dessert - ceux qui me connaissent bien s'entendront pour dire que c'est tout un honneur d'être aussi important que du dessert. Ces remerciements précieux vont à Marcelle et Jean, mes parents que j'aime tant. On a si peu l'occasion de rendre à nos parents le mérite qui leur revient, alors je profite de l'opportunité pour les remercier. Papa, maman, je ne pourrai jamais assez dire merci pour tout ce que vous avez fait pour moi. Je vous serai éternellement reconnaissante pour tous les sacrifices que vous avez faits, et faites toujours, pour me donner le meilleur. Sans vous, je ne me serais jamais autant accomplie; vous êtes mes piliers et un modèle. Vous avez su me donner me donner un environnement qui favorise le dépassement de soi, qui m'a bien servie et me sert toujours dans tout ce que j'entreprends. Toute l'aventure a commencé devant mon petit tableau à craie noir; qui aurait cru que j'aimerais autant aller à l'école? Merci!

1. Chapitre 1 - Introduction

1.1 L'hypertension artérielle

1.1.1 L'hypertension : Définition, conséquences et statistiques

L'hypertension artérielle (HTA) est une affection commune du 21^e siècle et, selon les lignes directrices d'Hypertension Canada, se définit communément comme une pression systolique/diastolique supérieure ou égale à 140/90 mmHg. Les principaux facteurs de risque pour le développement de l'hypertension (HTN) sont (1) le diabète; (2) la maladie rénale chronique; (3) une faible consommation de fruits et légumes; et (4) la sédentarité (1). L'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) a conclu que l'HTA est le principal facteur de risque modifiable menant au développement de maladies cardiovasculaires (MCV) en contribuant environ à la moitié de celles-ci. Les MCVs, elles, sont responsables du tiers des décès globaux dans le monde entier, plaçant l'hypertension au 1^{er} rang des facteurs de risque de mortalité (2). Plusieurs chiffres indiquent que l'HTA est un véritable défi de santé publique. À cet égard, Statistiques Canada rapporte que l'hypertension a affecté près d'un adulte canadien sur quatre de 2012-2015 et est présentement au 1^{er} rang des facteurs de risque de mortalité au pays. Cette statistique est toujours valide en 2020 (1). En appliquant un seuil de 130/80 mmHg, la prévalence augmente de 9% chez les sujets mâles adultes et de 16% chez les femmes. En 2010, les coûts attribuables à l'hypertension au Canada étaient estimés à 13,9 milliards de dollars, et il est estimé qu'ils seront de 20,5 milliards en 2020 (3). La Société Canadienne d'Hypertension Artérielle (SCHA) rapporte également que le risque des Canadiens de développer cette maladie au cours de leur vie est de 95%, s'ils ont une durée de vie moyenne (4).

1.1.2 Gestion de l'hypertension

La gestion de l'hypertension quant à l'initiation d'une thérapie antihypertensive et les cibles tensionnelles visées est une approche basée sur le risque cardiovasculaire (CV) accru et progressif. Ce dernier est dépendant de la présence ou non et du nombre d'autres facteurs de risques, de dommages aux organes cibles, d'association avec d'autres conditions cliniques et des valeurs de tests de laboratoires de routine. Cette stratification du risque est basée sur l'évolution de la définition et du traitement de l'HTA, qui

auparavant était strictement basée sur la valeur de la mesure de pression artérielle et qui aujourd'hui a évolué vers une considération du «risque absolu» d'évènements CV et des facteurs de risques associés à une pression artérielle élevée chez une personne (4, 5).

1.1.3 Mécanismes de régulation de la pression artérielle

Selon l'équation hydraulique, la pression artérielle (PA) est directement proportionnelle au produit du débit sanguin (débit cardiaque, Qt) et de la résistance lors du passage du sang au travers des artérioles pré-capillaires (résistance vasculaire périphérique, RVP) :

$$PA = Qt \times RVP$$

Physiologiquement, chez les individus normotendus et hypertendus, la pression artérielle est maintenue par une régulation hémodynamique instantanée du débit cardiaque et de la résistance vasculaire périphérique, exercée sur trois sites anatomiques : les artérioles, les veinules post-capillaires (vaisseaux de capacitance) et le cœur. Un quatrième site de contrôle anatomique, le rein, contribue au maintien de la pression artérielle en régulant le volume des fluides intravasculaires. En outre, les baroréflexes étant régis par le système nerveux autonome, agissent en combinaison avec les mécanismes humoraux. Cette conjugaison se fait principalement par le système rénine-angiotensine-aldostérone (SRAA), afin de coordonner la fonction à ces quatre sites de contrôle et maintenir une pression normale. Finalement, la relâche locale de substances vasoactives provenant de l'endothélium vasculaire (ex : monoxyde d'azote (NO), endothéline-1 (ET-1)) peuvent aussi être impliqués dans la régulation de la résistance vasculaire (6).

1.1.3.1 Facteurs humoraux

De nombreuses données indiquent que l'hypertension essentielle ou secondaire est liée à une mésadaptation du contrôle de certains facteurs humoraux. Parmi ces facteurs humoraux, il existe d'une part des agents vasodilatateurs tels que la sérotonine, l'histamine, les prostaglandines, les peptides natriurétiques, la bradykinine (BK) et, d'autre part, des agents vasoconstricteurs tels l'épinéphrine, la norépinéphrine, la vasopressine, l'endothéline et l'angiotensine. L'angiotensine II (Ang II) joue un rôle de premier plan dans le développement de l'hypertension, participant directement à sa pathogénie et à ses complications (7). Comme l'intérêt de ce mémoire se concentre particulièrement autour de la modulation du système rénine-angiotensine (SRA), une emphase particulière sera portée sur ce système. Une description plus détaillée au Chapitre 1.3 de certaines de ses composantes, ainsi que la définition de leurs implications et mécanismes, complètera la brève description qui suit.

1.1.3.1.1 *Système rénine-angiotensine-aldostérone*

Depuis la découverte de la rénine en tant que substance pressive en 1898, le système rénine-angiotensine-aldostérone a été étudié de façon approfondie, car il est demeuré un candidat de premier plan comme système causal dans le développement et le maintien de l'hypertension. Il joue effectivement un rôle pivot dans la régulation du sodium (Na^+) rénal et de l'excrétion d'eau, et par conséquent dans le maintien du sodium dans le corps et l'équilibre des fluides. La cascade, illustrée à la **Error! Reference source not found.**, prend naissance au niveau de la rénine, une aspartyl-protéase produite par le rein, qui clive l'angiotensinogène (AGT) dérivée du foie pour former l'angiotensine I (Ang I) dans la circulation systémique. L'Ang I est convertie en Ang II, le principal acteur du SRA, par l'enzyme de conversion de l'angiotensine (ECA) et aussi connue sous le nom de kininase II. Elle est également responsable de la dégradation de la bradykinine, un peptide possédant des propriétés vasodilatatrices.

L'Ang II exerce ses effets via la stimulation des récepteurs de l'Ang II, lesquels au moins deux types ont été décrits, AT₁ et AT₂. De multiples voies enzymatiques forment l'Ang I et l'Ang II, tout comme d'autres peptides dérivés pouvant posséder des actions biologiques significatives. Il existe toutefois des voies alternatives pour la conversion de l'Ang I dans des tissus variés, tel que la chymase dans le tissu cardiaque (8). Par ailleurs, des endopeptidases peuvent contourner l'Ang II et convertir directement l'Ang I en Ang-(1-7). Finalement, le métabolisme de l'Ang II en Ang III (2-8) et Ang IV (3-8) est catalysé par les aminopeptidases A, N et B et la dipeptidylaminopeptidase II (9).

Un homologue de l'ECA, l'ECA 2, agirait comme la contrebalance physiologique de l'ECA et fournirait une régulation homéostatique des niveaux circulants de l'Ang II. L'ECA clive un acide aminé provenant de l'Ang I pour former l'Ang-(1-9) (10) et de l'Ang II pour former l'Ang-(1-7) (11, 12). Ces actions diminuent donc la quantité de substrat disponible pour générer l'angiotensine II, et limite la stimulation du récepteur AT₁. La liaison de l'Ang-(1-7) à son récepteur Mas et au récepteur AT₂ contrecarreraient également les actions pressives de AT₁ (13). Le rôle physiologique précis de cette enzyme demeure à l'étude, tout comme la réelle portée clinique de l'action de l'Ang (1-7) sur son récepteur Mas. Les effets protecteurs de l'axe l'ECA 2/Ang-(1-7)/récepteur Mas passeraient principalement par la réduction de l'Ang II et de cytokines pro inflammatoires et l'inhibition de voies de signalisation impliquées dans la fibrose tissulaire (14). Les données cliniques sont cependant limitées et contradictoires et son effet sur la pression artérielle fait l'objet d'études cliniques (NCT02245230, NCT02646475, NCT03001271). D'autres récepteurs en relation avec le SRA ont été décrits, à savoir des sites de liaison AT₄, qui ont été retrouvés dans une variété de tissus de mammifères et qui causeraient une vasodilatation (15). La présence du récepteur de la (pro)rénine, qui lie à la fois la rénine et la prorénine, a été décelée dans le cœur, le cerveau, le placenta, le rein et le foie, et augmente l'activité catalytique de la rénine qui clive l'AGT tout en rendant active la prorénine (16).

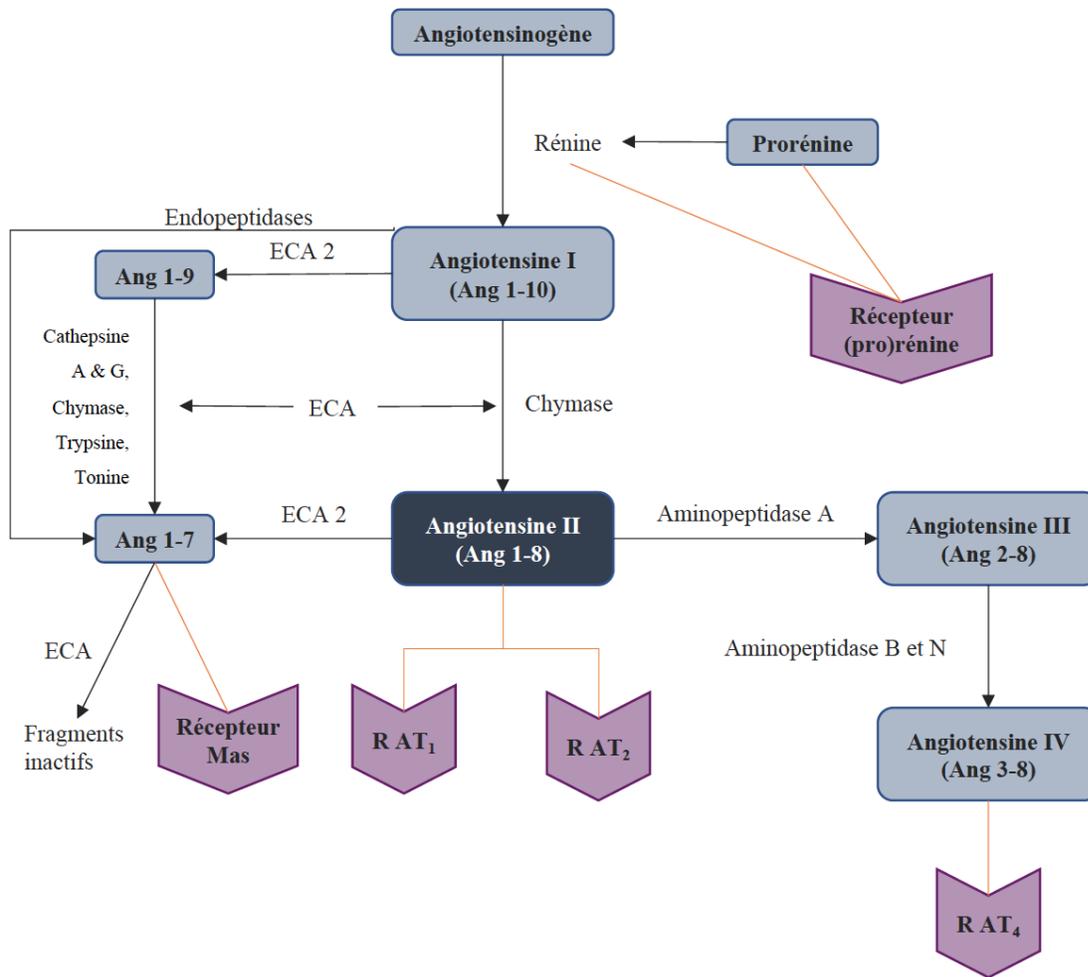


Figure 1. - Principales voies enzymatiques connues et postulées, responsables de la formation et du métabolisme des peptides angiotensines

Les lignes orange indiquent la liaison à un récepteur. Référer au texte pour plus de détails et références.

Ang : angiotensine; R AT: récepteur à l'angiotensine

Le SRA systémique régule la pression artérielle et la balance du sodium en contrôlant le volume des fluides extracellulaires et à travers les actions de l'Ang II et ses peptides dérivés notamment sur les cellules de muscle lisse (CML). L'Ang II induit une augmentation de la contractilité myocardique et une élévation de la pression artérielle en causant une vasoconstriction, directement et indirectement, en stimulant les récepteurs AT₁ présents dans le réseau vasculaire, et en augmentant le tonus sympathique et la relâche de vasopressine. De façon chronique, l'Ang II régule la pression artérielle en modulant le sodium rénal et

la réabsorption d'eau directement, en stimulant les récepteurs AT₁ du rein, ou indirectement, en stimulant la production et la sécrétion d'aldostérone ou la sensation de soif dans le système nerveux central (17). L'importance du SRA va au-delà de la régulation de la pression sanguine et inclut l'homéostasie structurale et cardiovasculaire, un phénomène illustré par la valeur ajoutée des inhibiteurs du SRA, notamment les inhibiteurs de l'ECA et les antagonistes des récepteurs AT₁, et qui sera décrit plus en détail au Chapitre 1.3.

1.1.4 Étiologie de l'hypertension

L'étiologie de l'hypertension a toujours été et est encore un sujet de recherche. La théorie classique d'aujourd'hui, pour la première fois proposée par Irvine H. Page en 1949, peut encore être endossée avec encore plus d'enthousiasme à la lumière des connaissances actuelles. La contribution de Page était la reconnaissance de la nature multifactorielle du contrôle de la pression artérielle et que l'hypertension représente un dérèglement parmi ces nombreux facteurs (18). Effectivement, l'hypertension essentielle ne comporte pas de cause identifiable, contrairement à l'hypertension secondaire, qui elle résulte de pathologies sous-jacentes telles que la défaillance rénale, le phéochromocytome ou l'aldostéronisme primaire. Quoique l'étude de la génétique de l'hypertension mette en lumière une héritabilité polygénique, quelques formes rares d'hypertension familiale monogénique ont été découvertes, notamment par Richard Lifton. (19, 20) Son travail a identifié des mutations et mécanismes biochimiques qui régulent l'équilibre hydrosodé, permettant ainsi de mieux en comprendre son importance et fournir une rationnelle scientifique aux stratégies de prévention et de traitement de l'hypertension visant à réduire la rétention sodique. L'hypertension essentielle compte pour 90 à 95% des causes d'hypertension et serait le produit de divers facteurs génétiques et environnementaux affectant les mécanismes régulateurs de la pression sanguine (5, 21). Parmi les facteurs prédisposants, on y retrouve l'âge, l'histoire familiale d'hypertension, l'obésité, le tabagisme, la consommation d'alcool, la sédentarité, la pauvre consommation de fruits et légumes, la consommation de sel et le stress. D'autres facteurs comme certaines conditions cliniques telles que la résistance à l'insuline et la dyslipidémie, et probablement des facteurs comportementaux et de personnalité, contribuent au développement de l'HTA. Également, la prévalence de l'HTA peut être stratifiée selon l'âge (augmente avec l'âge), le sexe, la région géographique, l'origine ethnique et le statut socio-économique du pays (5, 22). Cette stratification révèle bien le

caractère diversifié des facteurs influençant la régulation de la pression artérielle et contribue à orienter la démarche thérapeutique vers une approche diversifiée.

1.1.5 Le traitement de l'hypertension artérielle

1.1.5.1 Buts et approches thérapeutiques

L'hypertension est le diagnostic primaire le plus commun en Amérique avec 35 millions de visites en tant que diagnostic primaire (23). La mesure de la baisse de pression artérielle ne serait par contre qu'un substitut au réel but visé. Le but ultime de santé publique de la thérapie antihypertensive est de réduire le risque total de morbidité et de mortalité cardiovasculaires, (4, 23, 24) probablement conséquentes des dommages aux organes cibles associés avec l'hypertension. Cette évolution dans le traitement de l'hypertension est née du fruit de plusieurs études cliniques démontrant le lien entre l'HTA et le risque cardiovasculaire. En ce sens, les données d'études prospectives observationnelles impliquant plus de 1 million d'individus ont indiqué que la mort résultant d'incidents vasculaires augmente progressivement et de façon linéaire à partir de pressions artérielles aussi basses que 115/75 mmHg. Ces études rapportent également que le risque de MCV doublerait pour chaque élévation de 10 mmHg de la pression artérielle diastolique et de 20 mmHg de la pression artérielle systolique. D'autre part, une réduction de 5 mmHg peut réduire la mortalité reliée aux AVC et aux maladies cardiovasculaires par 14% et 9%, respectivement (25, 26). Cette approche basée sur la diminution du risque total, ou risque absolu, sous-entend une évaluation de celui-ci.

Cependant, traiter adéquatement l'hypertension signifie atteindre la cible visée, et ce but n'est pas simple à atteindre. Effectivement, même si les canadiens semblent avoir généralement une meilleure connaissance de leur condition hypertensive et un meilleur contrôle de celle-ci que d'autres nations, une analyse démontre qu'un bon nombre d'individus, particulièrement les jeunes adultes, ne sont pas diagnostiqués et/ou traités adéquatement (3). Afin d'optimiser le traitement des patients hypertendus, le clinicien dispose d'un arsenal thérapeutique imposant qui passe en premier lieu par des modifications du style de vie (cessation du tabagisme, réduction du poids corporel, modération de la consommation d'alcool, réduction de l'apport sodique, changements diététiques plus complexes, augmentation de l'activité physique, diminution du stress, etc). Ensuite, il fait appel à l'initiation d'un traitement pharmacologique de première ligne, et, dans la majorité des cas, par la combinaison de 2 ou plusieurs

classes d'antihypertenseurs, car les deux tiers des individus hypertendus ne peuvent être contrôlés avec un seul médicament (27).

1.1.5.2 Traitements pharmacologiques

Étant donné la grande complexité de l'étiologie, de la physiopathologie, des facteurs génétiques et environnementaux qui façonnent la maladie hypertensive, les traitements qui existent et qui se sont développés au fil du temps ont donné naissance à des médicaments aussi complexes et diversifiés que leurs cibles thérapeutiques et la maladie le sont. Il existe un choix de plus de 100 agents antihypertenseurs et plus de 50 combinaisons de produits disponibles (5). Au Canada, la cible tensionnelle visée par un traitement initial suite aux modifications des habitudes de vie est de 135/85 mmHg (par mesure oscillométrique en série). Les différents agents recommandés comme traitement de première intention au Canada sont les suivants : les inhibiteurs de l'enzyme de conversion de l'angiotensine II (iECA), les antagonistes du récepteur AT₁ de l'angiotensine II (ARA), les bloqueurs de canaux calciques (BCC) à action prolongée et les diurétiques thiazidiques. Les bêta-bloquants peuvent aussi être utilisés en première intention pour les patients plus jeunes avec hypertension non compliquée. Les associations de médicaments en monocomprimé recommandées sont celles qui se composent d'un iECA et d'un BCC, d'un ARA et d'un BCC ou encore d'un iECA ou d'un ARA et d'un diurétique. Dans le **Error! Reference source not found.**, on y trouve les principales classes d'agents antihypertenseurs et quelques exemples de médicaments correspondants les plus couramment utilisés :

CLASSE DE MÉDICAMENT	NOM GÉNÉRIQUE quelques exemples
Diurétiques	
Thiazidiques ou de type thiazidique	hydrochlorothiazide, chlorthalidone, indapamine
De l'anse de Henle	furosémide
Épargneurs de potassium	amiloride
Sympatholytiques	
Antagonistes α_1 -adrénergiques	prazosine, doxazosine
À action centrale	clonidine, α -méthyldopa
Antagonistes β -adrénergiques	aténolol, propranolol, acebutolol
Vasodilatateurs directs	
	hydralazine, minoxidil
Bloqueurs de canaux calciques	
Dihydropyridines	amlodipine, nifédipine
Non dihydropyridines	
• Phényalkylamines	vérapamil
• Benzothiazépines	diltiazem
Inhibiteurs du SRAA	
Antagonistes du récepteur minéralocorticoïde à l'aldostérone	spironolactone, eplerenone
Inhibiteurs de l'ECA	enalapril, captopril
Antagonistes du récepteur AT1	losartan, valsartan
Inhibiteurs de la rénine	aliskirène

Tableau 1. - Classes principales d'agents antihypertenseurs

SRAA : Système rénine-angiotensine-aldostérone; ECA : Enzyme de conversion de l'angiotensine II; AT1 : Récepteur de type 1 de l'angiotensine II.

1.1.5.2.1 Les diurétiques

De façon générale, cette classe d'antihypertenseurs abaisse principalement la pression artérielle en diminuant la rétention d'eau et de sodium dans les tubules rénaux, diminuant ainsi le volume sanguin et la demande cardiaque. À plus long terme, la demande cardiaque revient à la normale, tandis que la résistance périphérique diminue. Les trois sous-classes agissent à des niveaux différents, soit en bloquant le symporteur Na^+Cl^- du tubule rénal collecteur (**thiazidiques ou de type thiazidique**), soit en inhibant le symporteur $\text{Na}^+\text{K}^+2\text{Cl}^-$ de l'anse de Henle (**diurétiques de l'anse**), ou soit en inhibant le canal Na^+ épithélial du tubule collecteur (**épargneurs de potassium**). Les diurétiques thiazidiques et de type thiazidique sont en général recommandés comme traitement de première intention, principalement dû à leur efficacité

globale et à leur excellent rapport coût-efficacité (2, 27, 28). Cependant, les diurétiques à action prolongée (de type thiazidique) sont privilégiés par rapport à ceux à courte action (thiazidiques) (28).

1.1.5.2.2 Les sympatholytiques

Les **antagonistes α_1 -adrénergiques** produisent leur effet en bloquant le récepteur α post-synaptique, empêchant ainsi la norépinéphrine d'agir sur son récepteur. L'effet final résulte en la diminution de la résistance artériolaire et la capacitance veineuse (29). Par contre, depuis l'étude ALLHAT (Antihypertensive and Lipid-Lowering treatment to prevent Heart Attack Trial), cette classe ne peut dorénavant plus être recommandée en traitement de première intention, principalement à cause des résultats finaux ayant montré une augmentation significative (26%) d'AVC, d'événements cardiovasculaires combinés (20%) et de défaillance cardiaque (80%) comparativement à la chlorthalidone, un diurétique thiazidique (5). Les sympatholytiques à **action centrale** agissent en stimulant les récepteurs α -adrénergiques du système nerveux central, lesquels diminuent ou inhibent l'activité nerveuse sympathique en diminuant la relâche des catécholamines (norépinéphrine), résultant principalement en une diminution de la résistance périphérique et du débit cardiaque. Finalement, les **antagonistes β -adrénergiques** compétitionnent pour la liaison des catécholamines et autres agonistes β -adrénergiques sur ces mêmes récepteurs. Ils réduisent donc la pression artérielle en diminuant la contractilité myocardique et le débit cardiaque et en inhibant la relâche de la rénine, provoquant une réduction de la formation d'angiotensine II et de la sécrétion de l'aldostérone, résultant en une réduction de la résistance périphérique (6). Cette classe médicamenteuse est recommandée comme traitement de première intention au Canada, excepté chez les patients de 60 ans et plus (28).

1.1.5.2.3 Les vasodilatateurs directs

Ces médicaments exercent leur action vasodilatatrice par un effet direct sur le muscle lisse artériolaire. L'hydralazine en est un exemple et fait partie des drogues utilisées au cours des études présentées dans ce mémoire. En dépit du fait que la base moléculaire de son action reste inconnue, plusieurs mécanismes ont été proposés. Parmi eux, on y retrouve l'inhibition de l'influx de calcium dans la cellule de muscle lisse, la relâche intracellulaire de calcium, l'inhibition de la phosphorylation de la myosine et le chelatage de certains métaux requis pour la contraction du muscle lisse. Il est cependant clair que son effet est plus

grand sur les vaisseaux de résistance précapillaires que post-capillaires et qu'il existe une diminution préférentielle de la résistance dans les lits vasculaires coronariens, cérébraux et rénaux, par opposition à ceux de la peau et des muscles. L'hydralazine n'a pas d'effet direct sur le cœur, mais cause par contre une et augmentation de la contractilité cardiaque et de l'activité de la rénine via une stimulation médiée par les barorécepteurs du système nerveux central (30). Elle cause aussi une rétention des fluides consécutive à la baisse de pression, stimulant ainsi le SRAA, ou est peut-être causée par des actions intrarénales directes, consécutives à la vasodilatation. L'hydralazine est indiqué dans le traitement de l'hypertension essentielle et est utilisée en combinaison avec d'autres anti-hypertenseurs tel que les bêta-bloquants et les diurétiques (31). Dans notre étude, nous avons utilisé l'hydralazine afin d'isoler l'effet de la simple baisse de pression sur les paramètres mesurés, par opposition aux autres drogues, qui elles possèdent un bénéfice thérapeutique supérieur à cette simple baisse de pression et qui améliorent le pronostic de la maladie en termes de morbidité et mortalité (6).

1.1.5.2.4 Les bloqueurs de canaux calciques

Les bloqueurs de canaux calciques (BCC) diminuent la pression artérielle en agissant sur la contractilité vasculaire, la contractilité cardiaque et le débit cardiaque. Les BCC sont regroupés en trois familles chimiques : **dihydropyridines**, **phénylalkylamines** et **benzothiazépines**, qui possèdent toutes des structures, propriétés pharmacocinétiques et indications cliniques très différentes. Cependant, le mécanisme d'action antihypertenseur est similaire, soit l'inhibition de l'influx de calcium par une liaison à la sous-unité α_1 du canal calcique voltage-dépendant de type L (Ca_v1) dans les cellules de muscle lisse vasculaires (dihydropyridines) et cardiaques (phénylalkylamines et benzothiazépines), provoquant une vasodilatation ou une diminution de l'excitabilité des cellules cardiaques (6).

1.1.5.2.5 *Les inhibiteurs du système rénine-angiotensine-aldostérone*

Les **antagonistes de l'aldostérone** exercent une inhibition de type compétitive pour la liaison de l'aldostérone au récepteur des minéralocorticoïdes. Ils inhibent donc les effets physiologiques de cette hormone surrénalienne sur les tubules rénaux, le myocarde et le réseau vasculaire. En conséquence, on y remarque une inhibition de la réabsorption du Na⁺ dans le tubule distal, une réduction de l'excrétion urinaire du potassium ainsi qu'une faible augmentation de l'excrétion d'eau. Cette classe médicamenteuse est utilisée dans le traitement de l'hypertension depuis les années 1970, et depuis il y a eu très peu de développement de nouveaux agents. Cependant, un nouvel antagoniste non-stéroïdien du récepteur des minéralocorticoïdes, l'esaxerenone, a récemment été approuvé au Japon pour le traitement de l'hypertension essentielle (3).

Les **inhibiteurs de l'enzyme de conversion de l'angiotensine II (iECA)** sont nombreux à avoir été développés jusqu'à ce jour depuis la venue du premier composé de cette classe, le captopril. Le développement de celui-ci a été l'un des premiers exemples réussis d'une modélisation de drogue basée sur la connaissance chimique de la cible pharmacologique (32). Les iECAs peuvent être classifiés en trois groupes selon la structure chimique de leur région active. Le captopril est le prototype des iECAs contenant un groupement sulfhydryque. Le deuxième groupe contient un groupement phosphore (ex : fosinopril) et le dernier groupe, comme la majorité des iECAs, contient un groupement carboxyle. Lors de notre étude, nous avons utilisé l'énalapril, qui lui contient un groupement carboxyle. L'énalapril, comme la plupart des autres iECAs, est administré comme pro-médicament qui demeure inactif jusqu'à qu'il soit estérifié dans le foie. Ces pro-médicaments ont une biodisponibilité accrue comparativement au métabolite actif, ce pourquoi ce dernier n'est pas directement administré par voie orale (33). Ses propriétés antihypertensives proviennent d'actions diversifiées sur le SRA. L'action principale consiste en l'inhibition compétitive de l'ECA et ainsi bloquer la conversion de l'Ang I en Ang II vasoconstrictrice. Cette diminution d'Ang II provoque plusieurs événements contribuant à diminuer la pression artérielle, notamment une diminution de l'activité du système nerveux sympathique, une relaxation des cellules de muscle lisse vasculaires (CMLV) ainsi qu'une diminution de la production d'aldostérone. De plus, tel que décrit précédemment, l'ECA est aussi appelée kininase II et son inhibition entraîne l'accumulation de la bradykinine, qui elle est normalement dégradée en peptides inactifs par l'ECA. La bradykinine, elle, possède des propriétés vasodilatatrices, notamment en raison de sa capacité à libérer le NO et des prostaglandines vasodilatatrices. Les iECA activent également les boucles de rétro-inhibition de la rénine.

Ils augmentent ainsi la relâche de rénine et la production d'Ang I, alors convertie par des voies alternatives en peptides, tel que l'Ang (1-7), pouvant participer aux effets pharmacologiques des iECA. Ultiment, l'iECA a donc des effets sur l'angiotensine II, la bradykinine, autres kinines et peptides, le NO et les prostaglandines, lesquels ont tous des propriétés de baisse de pression artérielle, et peut-être aussi importantes, des propriétés anti-prolifératives dans les tissus rénaux, vasculaires et cardiaques. Un facteur limitant potentiel à l'efficacité des iECAs serait le blocage de la formation d'Ang II. En effet, nous avons précédemment effleuré le concept que l'ECA n'est qu'une des plusieurs enzymes qui peuvent démontrer une action protéolytique afin de convertir l'angiotensine I en angiotensine II. Par exemple, la chymase, peut représenter une voie alternative importante. De plus, les effets secondaires reliés à l'accumulation de bradykinine tels la toux et l'angioedème peuvent limiter l'utilisation de ces médicaments. Pour ces raisons, les antagonistes des récepteurs AT₁ de l'angiotensine II peuvent fournir une approche plus spécifique et efficace pour bloquer les actions de l'angiotensine II (34).

Les **antagonistes des récepteurs AT₁ de l'angiotensine II** (ARA) possèdent une très haute affinité pour les récepteurs AT₁ (ordre des nanomolaires) et pratiquement aucune affinité pour les récepteurs AT₂. Le losartan, le troisième antihypertenseur utilisé pour cette étude, a été le premier antagoniste AT₁ oral actif disponible sur le marché, et donc l'antagoniste ayant accumulé la plus grande expérience clinique. Il est à noter que le losartan produit très peu d'effets indésirables, un taux comparable à celui du placebo. Il compétitionne donc avec l'angiotensine II pour la liaison au récepteur AT₁ et possède aussi un métabolite actif majeur, l'EXP 3174. Lors d'une administration par voie intraveineuse (i.v.), l'EXP 3174 est 10 à 20 fois plus puissant et a une plus grande durée d'action que le losartan. Cependant, tout comme les iECAs, son métabolite actif a une très faible biodisponibilité. Le mécanisme par lequel les ARAs abaisseraient la pression artérielle et confèreraient une protection accrue vis-à-vis les complications cardiovasculaires pourrait être double. Dans un premier temps, en empêchant les effets délétères de l'angiotensine II sur son récepteur AT₁, qui seront discutés plus en détails dans d'autres sections, mais qui brièvement sont la vasoconstriction, la stimulation du système nerveux sympathique, la sécrétion d'aldostérone, la rétro-inhibition de la relâche de la rénine et la prolifération cellulaire. Dans un deuxième temps, via la sur-stimulation du récepteur AT₂ par l'angiotensine II, qui elle est produite en excès en raison de l'interruption de la boucle de rétro-inhibition de la rénine. La stimulation du récepteur AT₂ par l'Ang II médie des effets eux aussi décrits plus en détails plus loin, mais qui consistent principalement en une vasodilatation, une action antiproliférative et une activation d'autres facteurs tel le NO et la BK (35).

Les **inhibiteurs de la rénine** ont constitué un sujet d'intérêt depuis plusieurs décennies, mais ce n'est qu'en 2007 que le premier inhibiteur non peptidique actif oralement, l'aliskirène, a vu le jour. Les autres inhibiteurs de rénine développés dans le passé n'ont jamais percé le marché en raison de leur faible biodisponibilité orale, leur courte demi-vie et leur coût extrêmement élevé. Cette nouvelle classe médicamenteuse est la dernière percée thérapeutique dans le domaine de l'hypertension depuis la commercialisation des ARAs. L'inhibition directe de la rénine constituait originalement une promesse thérapeutique considérable, car celle-ci est positionnée comme l'étape enzymatique première et limitante dans la cascade du SRAA. L'inhibition empêche non seulement la conversion d'angiotensinogène en Ang I, et donc la production d'Ang II, mais elle diminue également l'aldostérone et l'activité de la rénine plasmatique, qui, tel que cité précédemment, augmente avec les iECAs ou les ARAs. Une étude conduite en 2007 chez des volontaires sains normotendus a révélé que la vasodilatation rénale en réponse à l'aliskirène était 2 fois et 30% plus élevée qu'avec les iECAs et les ARAs, respectivement, suggérant une meilleure inhibition du SRAA dans le rein (36). La vasodilatation résiduelle persistait pendant plus de 48 heures et le traitement était associé avec une natriurèse significative, plaçant initialement l'aliskirène comme un important joueur potentiel dans le traitement de l'hypertension et des maladies cardiovasculaires concomitantes. Les premiers essais cliniques ont révélé une efficacité similaire et dépendante de la dose à baisser la pression artérielle, comparativement aux autres classes déjà existantes (37, 38). Cependant, l'étude ALTITUDE (ALiskiren Trial In Type 2 diabetes Using cardio-renal Disease Endpoints) a dû être terminée de façon prématurée. L'étude tentait d'évaluer l'effet du médicament chez les patients diabétiques étant susceptibles de subir une hausse compensatoire des niveaux plasmatiques de la rénine et des autres composantes du SRAA induite par les iECAs et les ARAs. Au lieu de contrebalancer les effets délétères potentiels de l'activation compensatoire de la rénine, les résultats d'une analyse intérimaire montraient une augmentation des effets indésirables et une absence de bénéfices pour les patients randomisés à l'aliskirène (39). À l'heure actuelle, l'aliskirène n'est pas recommandé comme traitement de première intention au Canada, mais il peut être utilisé en combinaison si le deuxième agent n'est pas un iECA ou un ARA (40). Un deuxième inhibiteur direct de la rénine, le SPH3127, est présentement en développement clinique de Phase II (NCT03756103).

1.1.6 Modèles expérimentaux d'hypertension artérielle

Tel qu'abordé précédemment, l'hypertension est une maladie multifactorielle et polygénique impliquant des interactions complexes entre des mécanismes de contrôle homéostatiques génétiquement déterminés et des facteurs environnementaux, et son exploration requiert la disponibilité de modèles animaux expérimentaux manipulables. Le modèle animal idéal pour la recherche en hypertension devrait avoir une anatomie cardiovasculaire, une hémodynamie et une physiologie qui se rapproche de l'humain et qui développerait les caractéristiques et les complications propres à la maladie dans un intervalle de temps semblable, toutes proportions gardées, ou encore de manière accélérée. Inévitablement, aucune espèce ne peut rencontrer tous ces besoins, et la modélisation expérimentale et autres contraintes dictent souvent le choix des modèles animaux pour des applications de recherche spécifiques. Il existe des modèles non génétiques d'hypertension artérielle, par exemple induits par une chirurgie (ex :coarctation aortique, néphrectomie), une diète (ex : riche en sel, en fructose) ou une action endocrinienne (ex : infusion d'Ang II) ou métabolique (ex :rat DOCA (déoxycorticostérone acétate)-sel), et finalement des modèles génétiques basés sur soit le génotype, soit le phénotype (41). Ce modèle génétique basé sur le phénotype est le plus utilisé dans la recherche en hypertension, et ce pour plusieurs raisons. Comme le type d'hypertension le plus commun est l'hypertension essentielle, dans laquelle plusieurs gènes contribuent au phénotype individuel, chacun ayant divers effets, pénétrance ou contributions d'allèles. Cette approche expérimentale tire donc avantage de la variation naturelle parmi les souches consanguines. Ceci fait opposition à l'approche basée sur le génotype, qui elle étudie un gène connu avec des interventions génétiques (surexpression ou ablation).

1.1.6.1 Le rat spontanément hypertendu

Le rat spontanément hypertendu, communément appelé le SHR (Spontaneously Hypertensive Rat), est un modèle génétique d'hypertension basé sur le phénotype. La souche a été développée à l'Université de Kyoto en 1963 par Okamoto et Aoki. Elle dérive de la souche Wistar-Kyoto (WKY) à la suite d'un croisement sélectif entre un mâle et une femelle ayant les valeurs de pression artérielles les plus élevées (42). À partir de la sixième génération d'accouplement consanguin, les animaux ont développé une hypertension systolique surpassant dans plusieurs cas les 190 mmHg à environ 20 semaines d'âge. Les différences entre les WKY et les SHR peuvent être observées dès la première journée post-natale, où la pression dans des conditions basales des rats SHR est légèrement plus élevée (43, 44). D'autres études toutefois montrent

un développement de l'hypertension plus tardif. Il reste que plusieurs études ont permis d'observer des changements de structure cardiovasculaire, de croissance ou d'apoptose dès la naissance (45-47). À partir de trois semaines d'âge, les artères du SHR démontrent des changements trophiques au niveau vasculaire, comme l'augmentation du ratio média : lumière, associé au développement et au maintien de la maladie. L'élévation de pression artérielle ainsi que les propriétés prolifératives des CMLs sont impliquées dans ces changements structuraux (43, 44, 48). Par ailleurs, il semble exister une discordance entre la corrélation de la pression artérielle et l'hypertrophie ventriculaire gauche (HVG). Certains ont démontré que l'HVG corrélait avec la pression artérielle (49, 50) tandis que d'autres ont affirmé le contraire (51, 52), suggérant la contribution d'autres facteurs (53) et rappelant ainsi le débat existant depuis toujours quant à l'ordre d'apparition des événements de hausse de pression artérielle et des changements structuraux associés.

1.2 Remodelage cardiovasculaire en tant que dommage aux organes cibles dans l'hypertension

Ces dernières décennies, le remodelage cardiaque et artériel a émergé comme un concept clé de la physiopathologie de l'hypertension artérielle. Le remodelage cardiovasculaire pathologique est un processus actif de l'altération structurale qui implique des changements au niveau d'au moins quatre processus cellulaires : la croissance cellulaire, la mort cellulaire, la migration cellulaire et la production ou la dégradation exacerbées de la matrice extracellulaire (MEC). Il est aussi dépendant d'une interaction dynamique entre les facteurs de croissance générés localement, les substances vasoactives et des stimuli hémodynamiques (54). Cet amalgame entraîne ultimement des dommages structuraux et fonctionnels aux organes cibles tel le réseau vasculaire, le cœur, les reins, les yeux et le cerveau (55). L'intérêt de ce projet de maîtrise se concentre surtout aux dommages associés à la structure vasculaire (vaisseaux à gros calibre principalement) et cardiaque.

1.2.1 Le système vasculaire

1.2.1.1 La structure vasculaire

La paroi d'un vaisseau normal est constituée de trois couches concentriques de tissu. Elles sont précisément, de l'extérieur vers la lumière vasculaire : l'adventice, la média et l'intima.

- L'adventice est composée de trousseaux de fibres de collagène et de protéoglycanes et est traversée de *vasa vasorum* (si diamètre supérieur à 200 μ m), de nerfs, de fibroblastes, de quelques CMLs et de vaisseaux lymphatiques. Les fibres nerveuses vasomotrices participent au contrôle du calibre vasculaire en provoquant soit une vasoconstriction (récepteurs α -adrénergiques) soit une vasodilatation (récepteurs β -adrénergiques) par stimulation directe des cellules musculaires lisses dans la couche externe de la média.
- La média constitue la couche intermédiaire et principale du vaisseau et contient plusieurs lamelles élastiques concentriques et fenêtrées. La lamelle élastique externe délimite la média de l'adventice. Entre chacune d'elles se trouvent des CMLs, des fibres de collagène de type I ou III, des microfibrilles d'élastine et des glycosaminoglycanes de la substance fondamentale. Cet ensemble constitue une unité lamellaire dont le nombre est proportionnel au diamètre de l'artère, et ce nombre d'unités décroît graduellement vers la périphérie du système artériel. Les

CMLs constituent 30% du volume de la média et jouent un double rôle : elles synthétisent les composantes de la paroi vasculaire ainsi que leurs précurseurs, et agissent de façon active sur l'élasticité de la paroi grâce à leurs propriétés contractiles.

- L'intima tapisse l'intérieur des vaisseaux et est constituée successivement d'une monocouche de cellules endothéliales (endothélium), de la membrane basale, de la couche sous-endothéliale et de la limitante élastique basale. La surface luminale des cellules endothéliales est recouverte d'une mince couche de mucopolysaccharides chargés négativement, formant le glycocalyx, et dont le rôle essentiel en conditions normales est d'empêcher la formation de thromboses sur la surface endothéliale. L'intégrité de l'endothélium est en fait critique, car un dommage à cet endroit peut conduire à l'athérosclérose. Également, cette couche est responsable de la synthèse et de la libération de plusieurs médiateurs contrôlant des processus primordiaux de contractilité vasculaire et de prolifération des CMLs.

1.2.1.2 Pathophysiologie du remodelage vasculaire dans l'hypertension

La paroi vasculaire est un tissu actif, intégré dont les composantes sont couplées à un amalgame d'interactions autocrines-paracrines. Le réseau vasculaire est capable de sentir les changements de son milieu, intégrant ces signaux par communication intracellulaire, et se changeant lui-même par la production locale de médiateurs qui influencent la structure aussi bien que la fonction. Habituellement, le remodelage est un processus adaptatif qui survient en réponse à des changements à long terme des conditions hémodynamiques, mais pourrait subséquemment contribuer à la pathophysiologie des maladies vasculaires et désordres circulatoires, tel l'hypertension. Le remodelage vasculaire hypertensif consiste en un épaississement de la paroi artérielle (média et intima majoritairement) caractérisé par une augmentation du ratio média : lumière. Le spectre des changements structuraux applicables aux vaisseaux sanguins sont illustrés à la

Figure 2, tel que proposé par Mulvany et collègues (56) en 1996. Les conséquences structurales du remodelage hypertensif diffèrent selon que l'on s'intéresse aux petites artères de résistance ou aux artères de conduction.

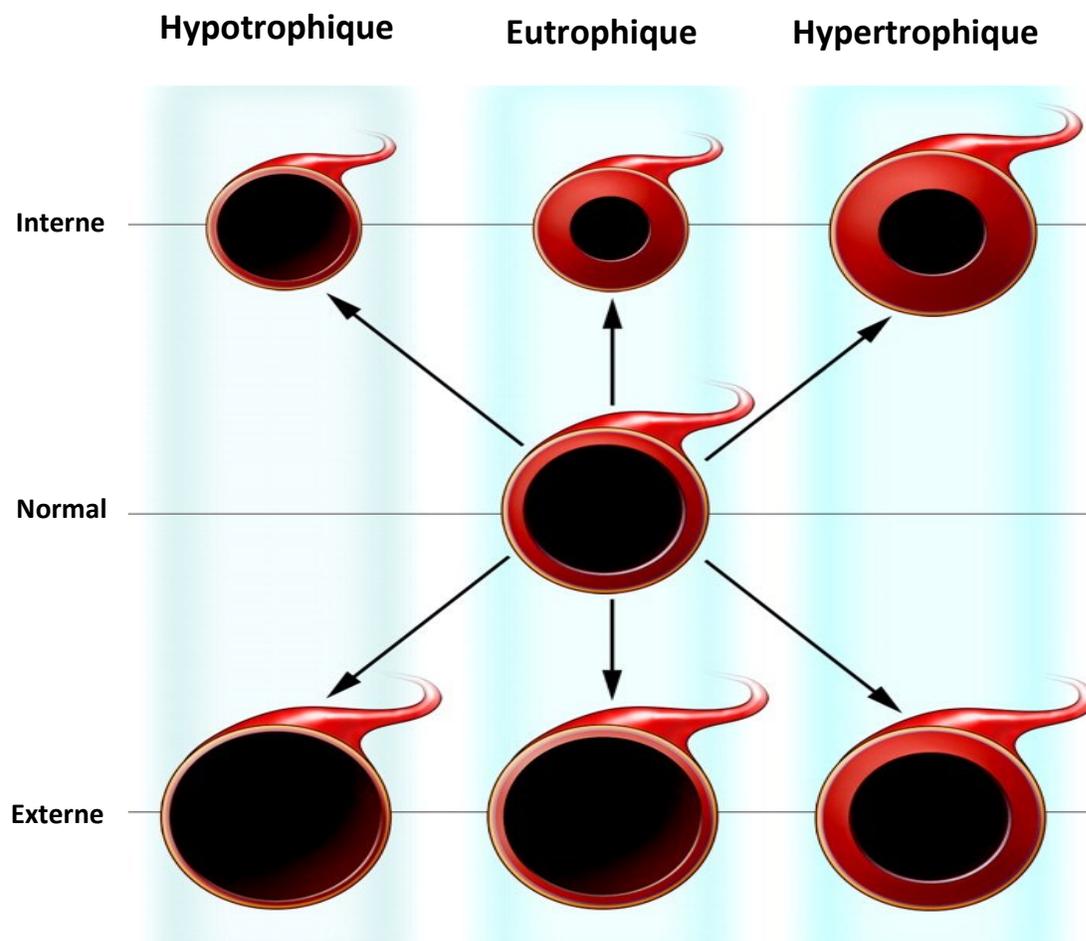


Figure 2. - Les différents modes du remodelage vasculaire

Le diagramme montre de quelle façon le remodelage peut modifier la coupe transversale des artères. Le vaisseau du centre représente une artère normale. Le remodelage peut être hypotrophique, représenté par une aire de section transversale réduite (gauche); eutrophique, sans changement de l'aire de section (centre); ou hypertrophique, caractérisé par une augmentation de l'aire de section (droite). Ces formes de remodelage peuvent être internes, montrant une diminution du diamètre de la lumière (haut); ou externe, avec une augmentation du diamètre de la lumière (bas). Modifié de (56, 57).

1.2.1.2.1 *Remodelage des petites artères*

Brièvement, les artères de résistance subissent trois types de phénomène :

1. Un remodelage concentrique, dit eutrophique interne, qui signifie une réorganisation de la même quantité de tissu autour d'un diamètre plus petit (58). Contrairement au remodelage hypertrophique, dont il sera question dans la section suivante, il n'y a pas d'évidences d'hypertrophie et d'hyperplasie (augmentation du nombre de cellules) des CMLs (59), suggérant une contribution accrue de l'apoptose des CMLs et de déposition de matrice extracellulaire (60).
2. Une raréfaction du lit artériolaire, c'est-à-dire une densité artériolaire diminuée par unité pondérale de tissu perfusé.
3. Une atteinte précoce de la fonction endothéliale, avec diminution de la biodisponibilité du NO.

La conséquence globale est une augmentation de la résistance périphérique, une altération des capacités de vasodilatation et une ischémie tissulaire en condition critique de perfusion. Le remodelage des petites artères de résistance serait une des manifestations, sinon la manifestation la plus précoce des dommages causés aux organes cibles dans l'hypertension (61).

1.2.1.2.2 *Remodelage des gros vaisseaux*

L'atteinte des grosses artères est particulièrement d'intérêt pour le présent projet de recherche, qui porte une attention particulière à l'aorte. Le remodelage observé est de type hypertrophique interne et est synonyme d'augmentation de la masse tissulaire caractérisée par l'épaississement de la média, qui elle est consécutive de plusieurs facteurs tels l'hypertrophie des CMLs (62, 63) (augmentation de la taille des cellules, sans modification du contenu en ADN), l'hyperplasie des CMLs (64, 65) (augmentation du nombre total de cellules et du contenu en ADN (acide désoxyribonucléique)), ou les deux phénomènes (62). Également, l'hypertrophie rencontrée dans les grosses artères est également accompagnée de polyploïdie (augmentation du contenu en ADN sans division cellulaire) des CMLs (66, 67). Cette augmentation de la taille et du nombre de CMLs est accompagné d'une augmentation de la mort cellulaire des CMLs par apoptose (mort cellulaire programmée) (65, 68-71). Ce phénomène pourrait être un mécanisme compensatoire pour contrebalancer la croissance excessive. Ce dérèglement entre la croissance et

l'apoptose est à la base du renouvellement cellulaire accéléré observé dans l'aorte du SHR (48, 72), et supporte la théorie du vieillissement accéléré associé avec l'hypertension, un concept qui sera élaboré plus en détails ultérieurement. De nouveaux outils ont émergé dans le domaine afin de mieux comprendre les mécanismes moléculaires impliqués dans l'hypertension. Par exemple, Sehgel et coll. ont montré que les CMLV aortiques du SHR arborent une plus grande rigidité cellulaire que celles du WKY dû à une augmentation de l'expression des protéines contractiles (73). Ces altérations sont présentes dans le contexte du vieillissement physiologique, et la rigidité des cellules et des vaisseaux est augmentée lorsque le vieillissement et l'hypertension sont tous les deux présents (74).

Tous ces processus énumérés ci-haut font opposition au remodelage eutrophique des petites artères, tel que discuté précédemment. Toutefois, l'augmentation de la synthèse et de la déposition des composantes de la MEC, à savoir les fibrilles de collagène, lamelles élastiques et protéoglycanes, représente un aspect également retrouvé dans le remodelage hypertrophique. Les dommages engendrés par ces dérèglements sont dominés, à court et à moyen terme, par l'augmentation de la rigidité et la perte de compliance, et, à long terme, par l'hypertension systolique isolée et par la potentialisation de l'athérosclérose. Ces modifications seraient en fait une réponse adaptative destinée au maintien constant de la contrainte pariétale malgré l'augmentation de la pression intraluminale, mais contribueraient à la perte de compliance en limitant la distension des artères (75, 76). Cette distension entraîne une rigidité accrue qui est mesurée par une augmentation de la vitesse de l'onde de pouls, c'est-à-dire la vitesse de voyage de l'onde pulsée, qui elle constitue une valeur prédictive de la survenue de cardiopathie ischémique (77) et d'AVC (78). Cette hyperpulsatilité est également un facteur de développement de l'hypertrophie ventriculaire gauche (79) et de l'augmentation de l'épaisseur intima : média des artères de gros calibre et des artérioles de l'ordre de 15-40% (80), réalisant ainsi un véritable cercle vicieux d'auto-aggravation des lésions (81).

1.2.2 Remodelage cardiaque

Cette notion de développement de l'hypertrophie ventriculaire gauche conduit à discuter du remodelage cardiaque observé au cours de l'hypertension. L'hypertension artérielle est la cause la plus fréquente de surcharge pressive et mécanique du ventricule gauche (82). Le remodelage cardiaque fait partie des dommages aux organes cibles engendrés par l'hypertension et est le siège de modifications structurales caractérisées par l'hypertrophie ventriculaire gauche, la fibrose cardiaque et l'épaississement des artères

coronaires intramyocardiques, et ces changements se traduisent par des perturbations du débit sanguin myocardique, une arythmogénicité et une dysfonction diastolique (83). Dans l'intérêt de ce projet, nous discuterons seulement de l'aspect hypertrophique du ventricule gauche, les autres aspects du remodelage cardiaque n'ayant pas été étudiés.

Principalement, le remodelage cardiaque hypertensif implique une hypertrophie des cardiomyocytes (CM), une hyperplasie des non-cardiomyocytes (NCM) (fibroblastes), une raréfaction des capillaires (cellules endothéliales), ainsi qu'une infiltration leucocytaire (84).

1.2.2.1 Structure histologique du myocarde

Le muscle cardiaque fonctionne en tant que syncytium de cardiomyocytes et de non-cardiomyocytes. Le compartiment non-myocytaire est formé principalement de fibroblastes, représentant 60 à 70% des cellules. Dans un cœur en santé, les fibroblastes cardiaques maintiennent l'homéostasie de la production et la dégradation de collagène, un processus critique pour le maintien fonctionnel des parois cardiaques. Le collagène forme un réseau tri-dimensionnel autour des faisceaux de cardiomyocytes (85) Le cœur est aussi formé de péricytes, de cellules de muscle lisse, macrophages, mastocytes, cellules dendritiques, lymphocytes ainsi qu'un réseau complexe de protéines de la MEC et de molécules de signalisation (84). Les protéines de la MEC sont divisées en protéines fibrillaires (collagène de type I et de type III) et les protéines non fibrillaires (glycosaminoglycanes, glycoprotéines et protéoglycanes, facteurs de croissance et protéases) qui jouent un rôle actif dans la régulation des réponses cellulaires et moléculaires essentielles au tissu cardiaque durant l'usure normale et la réparation suite aux dommages (86).

Le compartiment myocytaire est composé exclusivement de cardiomyocytes. Malgré qu'ils occupent environ 70 à 75% de l'espace et de la masse structurels vu le volume de l'appareil contractile, ils ne représentent qu'environ 30% du nombre total de cellules (87). L'organisation spatiale de ces types cellulaires est schématisée à la Figure 3.

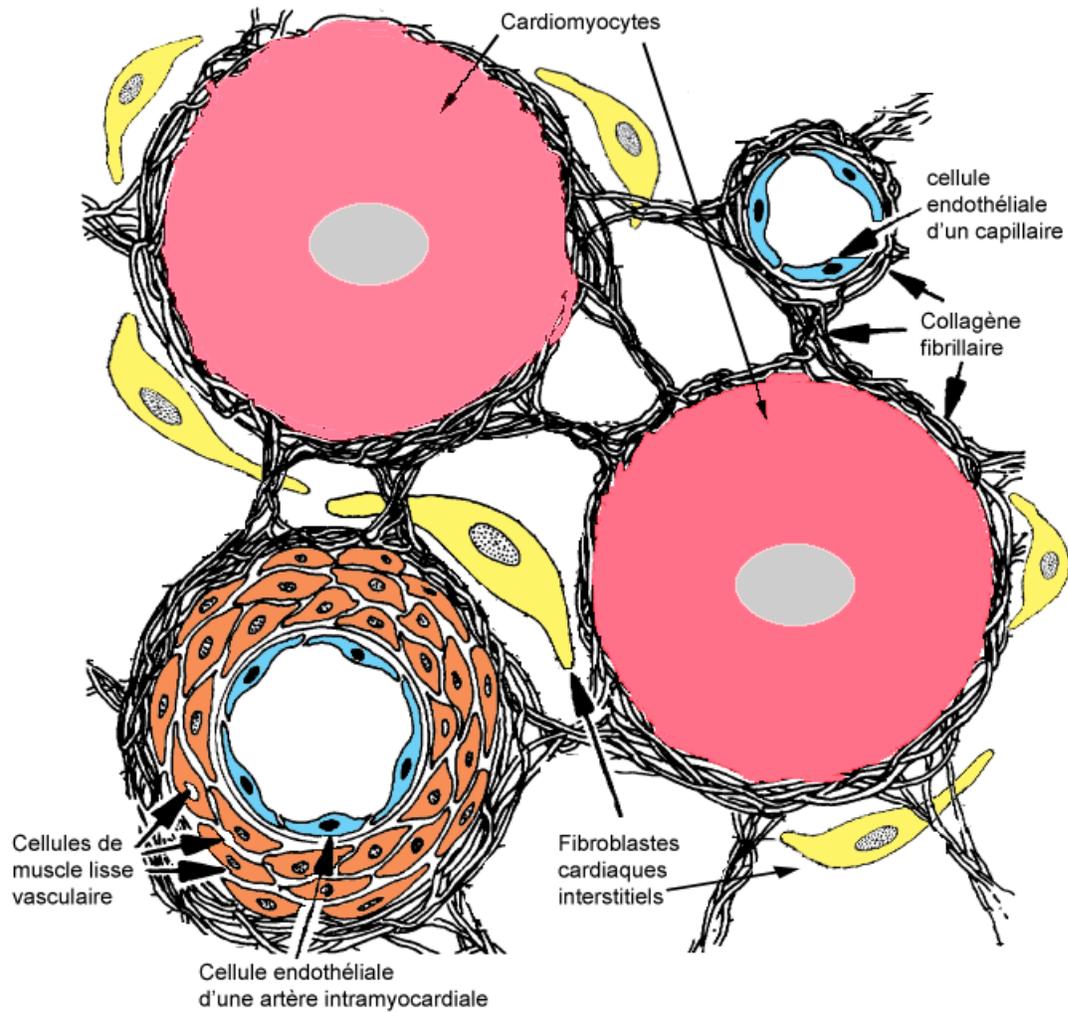


Figure 3. - Architecture cellulaire cardiaque

Les non-cardiomyocytes présents en très faible proportion ne sont pas représentés (mastocytes, macrophages, cellules souches embryonnaires, etc.)(88).

1.2.2.2 L'hypertrophie ventriculaire gauche

L'hypertrophie ventriculaire gauche est en soi un facteur de risque puissant et indépendant de mort cardiovasculaire (89) et est associé à un risque accru de maladies coronariennes, de défaillance cardiaque, d'AVC, d'arythmies ventriculaires et de mort soudaine (90). Il est donc devenu primordial d'avoir comme objectif de cibler sa prévention et sa régression au moyen de la thérapie antihypertensive.

Au stade initial, cette surcharge causée par l'augmentation de la résistance vasculaire périphérique entraîne une hypertrophie dite compensée, caractérisée par un épaississement de la paroi et du septum ventriculaires, mais avec un volume normal de la chambre interne du ventricule (ratio masse/volume ventriculaire interne élevé). Avec la persistance de la maladie, l'hypertrophie décompensée apparaît, suite à l'installation de la fibrose interstitielle et périvasculaire. Les ventricules deviennent donc plus larges avec un volume diastolique élevé, résultant en un ratio masse/volume réduit et une dysfonction diastolique se détériorant vers la défaillance cardiaque (91).

De façon générale, la croissance des cardiomyocytes et l'augmentation de la masse est le dénominateur commun de l'hypertrophie du ventricule gauche (84). Chez les athlètes, la croissance des compartiments musculaires et non musculaires du cœur est proportionnelle; l'homogénéité du tissu est alors préservée. Une telle hypertrophie adaptative contribue à améliorer la performance cardiaque. La masse myocardique qui accompagne l'entraînement physique est comparable à celle rencontrée lors de l'HVG hypertensive (92),(93). Lorsque l'HVG est engendrée par l'hypertension, cependant, l'homogénéité du tissu laisse place à l'hétérogénéité, conséquence de l'implication disproportionnée des non-cardiomyocytes, contribuant au remodelage pathologique de la structure du tissu (88). Ce n'est pas la quantité, mais plutôt la qualité du myocarde qui distingue l'hypertrophie du ventricule gauche dans l'hypertension et l'hypertrophie adaptative de l'athlète. L'homéostasie tissulaire réfère à une auto-détermination de la composition cellulaire et de la structure, basées sur la différenciation cellulaire, la réplication et la mort cellulaire programmée. L'homogénéité structurale d'un myocarde adulte normal est gouverné par un équilibre balancé entre des signaux stimulateurs et inhibiteurs qui, respectivement, régulent la croissance (et l'apoptose) et le comportement phénotypique et métabolique (94). Les stimulateurs incluent des substances produites localement et dans la circulation, qui accèdent au fluide interstitiel pour créer un état désigné pour la croissance. Ils comprennent principalement l'Ang II, l'aldostérone, la déoxycorticostérone, les endothélines et les catécholamines. Ce remodelage peut inclure la croissance d'éléments cellulaires et la synthèse de protéines structurales. Ces signaux stimulateurs sont normalement contrebalancés par des signaux inhibiteurs, qui eux ont des effets opposés sur les cellules et le renouvellement de la matrice, et qui majoritairement incluent le monoxyde d'azote, la bradykinine, les prostaglandines, les peptides natriurétiques et les glucocorticoïdes (87).

1.2.2.2.1 *Implication du compartiment myocytaire*

Tel qu'énoncé précédemment, l'hypertrophie du ventricule gauche est un phénomène adaptatif à l'augmentation de la charge pressive afin d'abaisser la tension pariétale. L'hypertrophie observée est de type concentrique, et est la conséquence de l'augmentation de la taille des CMs plutôt que de leur nombre (95). Par contre, on observe une polyploïdisation des CMs associée à l'hypertrophie (96). En effet, il a été démontré que le degré de polyploïdie corrèle avec le volume des myocytes, corrigé pour la surface corporelle, et est plus prononcé dans le ventricule gauche que dans le ventricule droit (97). Outre ce phénomène, c'est tout de même l'augmentation de la taille des CMs qui contribue majoritairement à l'augmentation de la masse cardiaque. Plus précisément, c'est l'apparition de nouveaux isoformes d'actine et de myosine (98) et l'ajout de nouveaux sarcomères en parallèle qui occasionnent un épaissement des cardiomyocytes, caractérisé par une hausse de l'aire de section de ceux-ci (99). Chez le SHR, ce même type d'hypertrophie est rencontré, et notre groupe a effectivement observé un nombre comparable de cardiomyocytes entre le SHR et le WKY, associé à une aire de section augmentée des CMs du SHR relativement au WKY (100, 101).

Le paradigme accepté considère le cœur en tant qu'organe post-mitotique qui possède un nombre relativement constant de myocytes à partir de peu après la naissance jusqu'à la vie adulte et la sénescence cellulaire. Par contre, même si la plupart des cardiomyocytes entrent dans cette catégorie, une sous-population de cellules est continuellement renouvelée par la différenciation des cellules souches cardiaques. Cette notion a émergé dans les années 1990 dans le groupe d'Anversa, qui a montré que l'hyperplasie des CMs pourrait survenir lors du remodelage hypertensif (102-104). Les connaissances ont évolué et il semble qu'une petite sous-population de cellules est continuellement renouvelée par la différenciation des cellules souches cardiaques (105, 106). Il semblerait donc que la mort des myocytes et leur régénération seraient des déterminants majeurs de l'homéostasie cardiaque mais aussi des altérations de l'anatomie et de la fonction ventriculaire en conditions physiologiques et pathologiques (107). Il a d'ailleurs été démontré que les CMs provenant de SHR subissent une augmentation de l'apoptose/susceptibilité à l'apoptose (108, 109). Les données provenant du laboratoire d'Anversa sont désormais à prendre avec prudence, car suite à des controverses émergentes suite à l'impossibilité de reproduire certains résultats sur les cellules souches cardiaques, un article a été officiellement rétracté et

le Harvard Medical School et le Brigham and Women's Hospital ont recommandé la rétractation de 31 publications sur les travaux effectués sur les cellules souches cardiaques.¹

1.2.2.2 Implication du compartiment non-myocytaire

Tel que discuté précédemment au début de la section, le remodelage hypertrophique du ventricule gauche peut être un processus homogène ou hétérogène, selon qu'il y a une croissance proportionnée ou disproportionnée des NCMs. Le dernier cas est donc rencontré lors du remodelage pathologique, faisant opposition au remodelage adaptatif. Effectivement, il existe une disproportion de la croissance des NCMs, et, subséquemment, une fibrose myocardique. Cette fibrose est le reflet d'une prolifération (hyperplasie) et/ou suractivité sécrétoire des fibroblastes interstitiels entraînant une accumulation accrue de collagène. Dans ce contexte, cette fibrose pathologique est causée par un phénotype activé et différencié des fibroblastes, que l'on nomme myofibroblastes, qui eux engendrent une augmentation des protéines de la MEC (110). En plus d'être dotés d'une capacité mitotique, les NCMs peuvent également s'hypertrophier (88). Il est à noter que la croissance des CMs et l'hyperplasie des NCMs peuvent survenir de façon indépendante et s'observe chez le SHR (100). Cette surproduction de collagène est impliquée dans la fibrose interstitielle et péricardique, ainsi que dans la cicatrisation du myocarde suite à l'ischémie. Outre le dérèglement majeur impliquant l'hyperplasie des fibroblastes, on observe une raréfaction des capillaires (111, 112). ainsi qu'une infiltration accrue de cellules inflammatoires dans le myocarde (113, 114).

1.2.3 Pharmacothérapie du remodelage cardiovasculaire

L'arsenal pharmacologique disponible pour traiter l'hypertension vise et parvient à non seulement baisser la pression artérielle, mais également à normaliser la structure et la fonction cardiovasculaires afin de réduire le risque de morbidité et mortalité (40). En ce sens, cette pharmacothérapie a comme objectif de normaliser les variables cardiovasculaires altérées au cours de la maladie hypertensive en interférant avec les médiateurs du remodelage. Plusieurs classes d'agents antihypertenseurs influencent le remodelage hypertensif, en ciblant spécifiquement la croissance hypertrophique et le déséquilibre prolifératif observés dans le cœur (115-117) et les vaisseaux (116, 118-120). Par contre, il est important de noter que

¹ <https://www.nytimes.com/2018/10/29/health/dr-piero-anversa-harvard-retraction.html>

toutes les classes médicamenteuses ne sont pas équivalentes quant à leur efficacité à prévenir et corriger le remodelage cardiovasculaire pathologique. Effectivement, il semble que la seule baisse de pression ne soit pas suffisante pour exercer ces effets. Par exemple, il a été observé chez le SHR traité avec soit un bêta-bloquant ou un antagoniste AT₁, que les changements structuraux vasculaires et cardiaques ont été atténués avec l'antagoniste AT₁ seulement, malgré une baisse de pression artérielle similaire. Ceci démontre que nonobstant le contrôle de la pression artérielle comme un facteur dans la prévention du remodelage vasculaire et cardiaque, le mécanisme par lequel le remodelage pathologique est atténué est majoritairement indépendant de la baisse de pression (116, 119).

1.2.3.1 Effets vasculaires

Il a été établi, depuis déjà une trentaine d'années, que le remodelage vasculaire hypertensif pouvait être renversé, du moins partiellement, par la réduction de la tension artérielle en impliquant en partie une réduction de la masse du muscle lisse et/ou une réduction du nombre de cellules (121, 122). Plus tard, il a été suggéré que l'inhibition de l'Ang II puisse contribuer à réduire l'hypertrophie vasculaire au-delà de l'effet prédit par la baisse de pression (123). Finalement, de nombreuses études cliniques démontrent que non seulement les iECA et les antagonistes AT₁ peuvent normaliser la structure des vaisseaux, mais que les BCC également offrent cet avantage thérapeutique (60, 124).

L'amélioration de la structure et de la fonction vasculaires durant le blocage du SRA a largement été démontrée. À des niveaux équivalents de baisse de pression, les inhibiteurs du SRA ont démontré, comparativement aux autres agents antihypertenseurs, une meilleure réduction de l'épaisseur de la média des artères carotides (125, 126), une meilleure amélioration de la fonction endothéliale vasculaire (127, 128) (129) et de la compliance artérielle (127, 130).

L'efficacité des BCC a été démontrée à travers un bon nombre d'études cliniques et montrent par exemple des effets positifs sur les lésions vasculaires, la progression de l'athérosclérose et la réduction du ratio intima : média (55). Une partie des bénéfices vasculoprotecteurs des BCC peut être due à leur action vasodilatatrice. De plus, quelques BCC peuvent exercer des effets antioxydants, lesquels améliorent la structure et la fonction endothéliale des petites artères. De surcroît, le calcium intracellulaire est

important pour certaines cascades de kinases impliquées dans la promotion de la croissance et de la migration cellulaires, ce qui suggère que le blocage de l'entrée de calcium dans la cellule peut, par conséquent, exercer des effets quelque peu semblables à ceux encourus par l'inhibition du SRA (60).

Il est toutefois nécessaire de soulever le fait que tous les antihypertenseurs ne sont pas tous équivalents dans leur capacité à corriger la structure et la fonction vasculaires. Ceci dit, les bêta-bloquants par exemple, même lorsqu'ils induisent une baisse de pression efficace, ne renversent pas le remodelage des vaisseaux de résistance (116, 129). Il en va ainsi de même pour les diurétiques. Dans le même ordre d'idée, l'hydralazine (vasodilatateur direct) n'a pas encore démontré qu'elle pouvait renverser le remodelage aortique en dépit d'une baisse de pression similaire aux autres classes médicamenteuses (120, 131).

Bien que l'efficacité de certaines classes d'antihypertenseurs tels que les inhibiteurs du SRA et les BCC à prévenir ou à induire la régression du remodelage artériel soit généralement admise, les mécanismes impliqués demeurent étudiés en surface. En ce qui concerne la prévention, il est aisé de concevoir que l'inhibition des mécanismes impliqués dans la croissance (hypertrophie), la prolifération (hyperplasie), l'apoptose, la vasoconstriction, la migration et la réorganisation de ces cellules dans une matrice extracellulaire à la composition altérée puisse y contribuer. Parmi les mécanismes qui pourraient gouverner la régression du remodelage vasculaire hypertensif, il a été démontré que l'induction de l'apoptose des CMLs excédentaires puisse initier le renversement des changements structuraux observés dans l'aorte du SHR (120, 132-134).

1.2.3.2 Effets cardiaques

Tel que discuté dans les sections précédentes, le remodelage cardiaque hypertensif, et plus particulièrement l'HVG, est un facteur déterminant dans le pronostic de la maladie et constitue en soi un facteur de risque indépendant. En fait, l'incidence d'événements cardiovasculaires est clairement en lien avec la valeur de la masse ventriculaire gauche atteinte durant le traitement. Effectivement, la réduction de l'HVG durant la thérapie est associée à une amélioration de l'état du patient et à une diminution du risque de morbidité et de mortalité cardiovasculaires (135). Comme il est connu qu'une tension systolique élevée est le déterminant majeur du développement de l'HVG, il est aisé d'anticiper que tout traitement

qui réduira la tension artérielle produira une certaine régression de l'HVG, tel que démontré dans de nombreuses études cliniques (115, 136, 137). L'absence d'une forte corrélation entre la baisse de pression et la réduction de la masse cardiaque laisse envisager la contribution de facteurs non hémodynamiques, ce qui expliquerait pourquoi tous les antihypertenseurs ne sont pas équivalents quant à leur efficacité à moduler le remodelage cardiaque pathologique.

Il a été démontré que, tout comme l'aptitude à moduler le remodelage vasculaire hypertensif, les inhibiteurs du SRA (incluant l'aliskirène, qui a montré une réduction de l'HVG (138)) et les BCC ont une meilleure efficacité que les antihypertenseurs dits «classiques», comme les diurétiques et les β -bloquants à ce niveau (115). L'étude LIFE (Losartan Intervention For Endpoint reduction in hypertension study) a mis en lumière une infériorité des β -bloquants à réduire l'HVG et cette classe n'est donc pas sur la liste des traitements de première intention dans cette population (28). Par ailleurs, les vasodilatateurs directs tels que l'hydralazine et le minoxidil ont une efficacité réduite à induire la régression de l'HVG malgré une baisse de pression comparable aux autres classes (28, 139) (117). Ceci pourrait en partie s'expliquer par l'activation de mécanismes compensatoires qui masqueraient les effets bénéfiques, tel que la stimulation du système nerveux sympathique et du SRA (140). Toutefois, d'autres essais cliniques randomisés sont nécessaires afin de conclure que certaines classes sont plus avantageuses que d'autres chez les patients atteints d'HVG.

Quant à l'effet des différentes classes d'anti-hypertenseurs sur la fibrose cardiaque en particulier, plusieurs d'entre elles peuvent soit inhiber le développement de ou renverser la fibrose dans divers modèles expérimentaux de remodelage cardiaque, et ce dans des contextes non exclusifs à l'hypertension artérielle (85). Parmi ces classes, on y retrouve les iECA (141-146), les antagonistes du récepteur AT_1 (147-149), les antagonistes de l'aldostérone (147), les sympatholytiques (150, 151) et les bloqueurs de canaux calciques (141, 152, 153). Des études cliniques ont également démontré que l'inhibition du SRA avec des iECA ou des antagonistes du récepteur AT_1 réduit la fibrose myocardique (154-158). S'il est vrai que les inhibiteurs du RAS ont été les anti-hypertenseurs les mieux étudiés, d'autres classes ont également été testées. Les bêta-bloquants ont montré des résultats ambigus (154-156, 158), et les bloqueurs de canaux calciques ont montré des résultats prometteurs en études pré-cliniques mais n'ont toutefois pas abouti à des réductions significatives en conditions cliniques (157, 159).

Bien que les mécanismes exacts impliqués dans la protection contre la fibrose induite par certains anti-hypertenseurs ne soient pas complètement élucidés, certaines pistes sont établies, tel que l'augmentation de la collagénase, la diminution de la production de collagène et l'inhibition de la voie de signalisation du TGF- β (facteur de croissance transformant bêta) (160-162). Il a été démontré, entre autres, que l'angiotensine II induit l'activation et la prolifération des fibroblastes et la production de collagène (163). Il a aussi été démontré qu'un traitement avec un antagoniste des récepteurs AT₁ induit l'apoptose des fibroblastes et réduit le contenu en collagène (164). Ceci suggère donc que l'apoptose des fibroblastes est un des mécanismes par lesquels les iSRA limitent la fibrose non contrôlée dans le cœur en remodelage. Ce concept est abordé plus en détail à la section 1.4.3.1.

1.3 Rôle de l'angiotensine II dans le système cardiovasculaire

À la section 1.1.3.1.1, et plus particulièrement à la Figure 1, il a été question de la biocascade impliquée dans la synthèse de l'angiotensine II. Les actions physiologiques de l'Ang II sont résumées ci-bas dans la Figure 4, et la prochaine section traitera donc de son action sur ses récepteurs, d'un bref survol des voies de signalisation intracellulaires ainsi que de ses actions physiologiques et moléculaires autres que sur la pression artérielle, lesquelles sont largement impliquées dans la physiopathologie de l'hypertension.

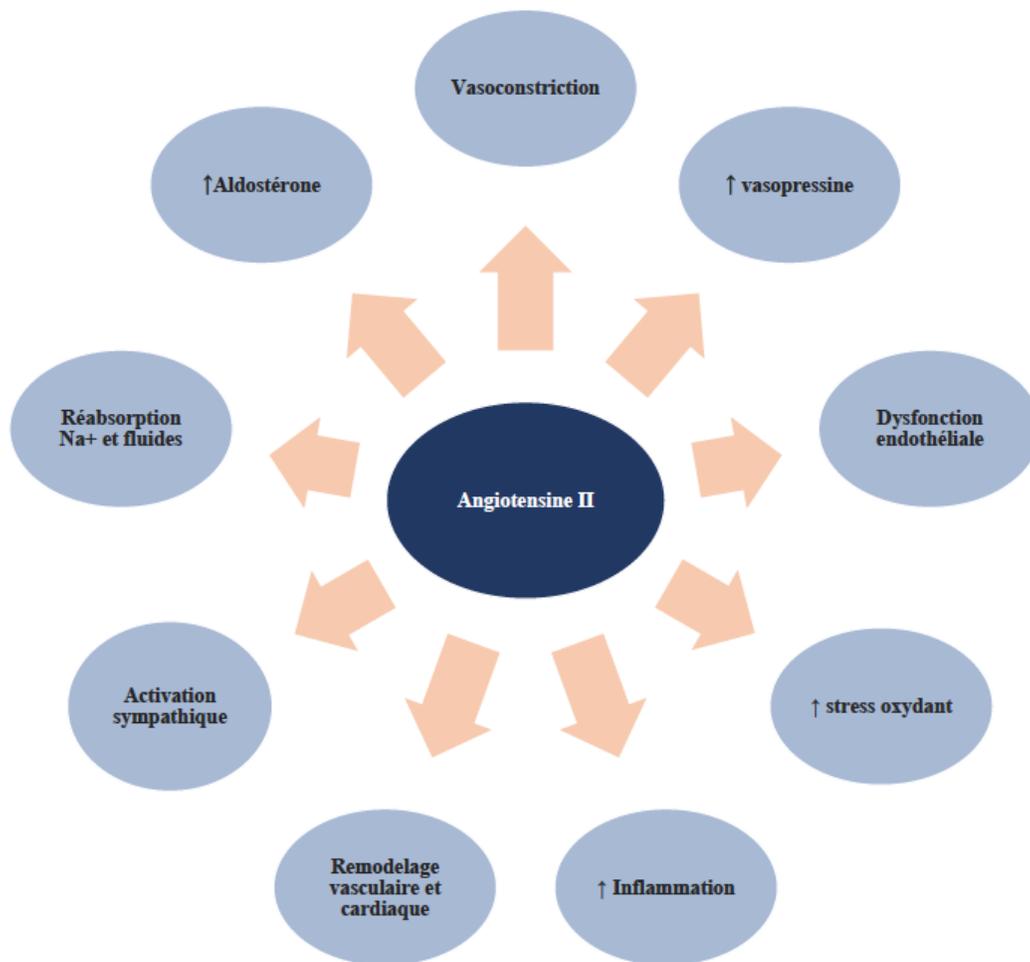


Figure 4. - Effets de l'angiotensine II dans la maladie hypertensive

1.3.1 Systèmes tissulaires et voies alternatives de synthèse

Initialement, il était admis que l'effet du SRA sur la pression artérielle était médié par la voie endocrine classique, qui impliquait la génération d'Ang II circulante avec des actions sur les tissus cibles. Plus récemment cependant, il est question de l'existence d'un SRA avec des actions autocrines et paracrines dans un nombre de tissus, et ceux-ci peuvent jouer un rôle significatif dans la régulation de la pression. Ceci signifie que certains tissus possèdent toutes les composantes nécessaires à la génération locale d'Ang II et à son action. En effet, toutes les composantes du SRA peuvent être décelées dans le cerveau, le cœur, le réseau vasculaire, le tissu adipeux, les gonades, le pancréas, le placenta et le rein. Le SRA tissulaire participe à la pathophysiologie des complications de l'hypertension, incluant l'athérosclérose, l'hypertrophie cardiovasculaire et l'insuffisance rénale, ce qui pourrait expliquer les effets bénéfiques des iECA et des antagonistes AT₁ observés dans divers modèles arborant une activité normale ou même réduite de la rénine plasmatique (165).

Dans quelques tissus, seulement quelques composantes du SRA sont retrouvées, menant à la spéculation sur l'existence de voies alternatives pour la production d'Ang II. Pour l'instant, la génération d'Ang II par des enzymes autre que l'ECA, telles la cathepsine G, CAGE (chymostatin-sensitive Ang-II-generetaing enzyme), la kallikréine, la trypsine, la tonine et la chymase ont été rapportées (166).

1.3.2 Types de récepteurs et signalisation cellulaire

L'Ang II possède deux récepteurs auxquels il peut se lier : le récepteur AT₁ et le récepteur AT₂. Deux autres récepteurs ont été décrits, AT₃ et AT₄ et le récepteur orphelin Mas, mais il n'en sera pas question dans ce mémoire. La nomenclature a été clarifiée en 1990 par un comité établi par l'American Heart Association Council for Blood Pressure Research (167). Ce comité a proposé la désignation AT₁ pour le type qui est inhibé par le losartan et le DTT (dithiothréitol) et qui médie l'effet presseur de l'Ang II. L'autre type, lequel est inhibé par le PD123177 et ses analogues structuraux, sera désigné AT₂. Les récepteurs AT₁ et AT₂ présentent une homologie de séquence d'environ 34% seulement et possèdent des effets distincts, mais présentent une affinité égale pour leur agoniste. Les deux récepteurs présentent une structure à sept passages transmembranaires et font partie de la grande famille des récepteurs couplés aux protéines G (RCPG) (168).

1.3.2.1 Le récepteur AT₁

Le récepteur AT₁, qui a été cloné la première fois en 1991 (169, 170), consiste en une séquence de 359 acides aminés et dont la masse moléculaire est de 41 kDa. Deux sous-types ont été décrits chez le rongeur, AT_{1a} et AT_{1b}, partageant plus de 94% d'homologie dans la séquence d'acides aminés (171). Ils possèdent apparemment des propriétés pharmacologiques similaires, mais une distribution tissulaire différente (172). Chez l'humain, par ailleurs, un seul type de récepteur AT₁ existe et est localisé sur le chromosome 3. Il est exprimé abondamment dans les tissus adultes tels que les vaisseaux sanguins, le cœur, le rein et les surrénales, le cerveau, le foie et les poumons (173). Dans les vaisseaux sanguins, AT₁ est exprimé principalement dans les cellules de muscle lisse et très peu dans l'adventice. Dans le cœur, il est présent dans les cardiomyocytes et les fibroblastes (172). Il a été démontré que la majorité des effets biologiques connus de l'Ang II sont médiés pratiquement de façon exclusive par AT₁ (173).

1.3.2.1.1 Événements classiques de transduction de signaux

La signalisation intracellulaire qui survient suite à la liaison de l'Ang II à son récepteur AT₁ se traduit par cinq mécanismes de transduction classiques : l'activation des phospholipase A₂ (PLA₂), phospholipase C (PLC), phospholipase D (PLD) et des canaux calciques de type L, ainsi que l'inhibition de l'adénylate cyclase. Tel qu'observé lors de la liaison d'un ligand à un RCPG, celle de l'Ang II sur les récepteurs AT₁ ne fait pas exception et entraîne une internalisation rapide de ceux-ci, permettant une désensibilisation du système. AT₁ se couple principalement à la protéine hétérodimérique G_{αq/11} et entraîne le recrutement et l'activation de la phospholipase C-β, résultant en la génération de deux seconds messagers : l'inositol 1,4,5-triphosphate (IP3) et le diacylglycérol (DAG). L'IP3 stimule la relâche de calcium à partir des réserves intracellulaires, et DAG est responsable de l'activation de la protéine kinase C (PKC), lesquels sont tous deux impliqués dans la vasoconstriction, la protection des cardiomyocytes et l'hypertrophie cardiaque (174-176). La stimulation d'AT₁ active également les phospholipases A₂ et D, stimulant la libération d'acide arachidonique, le précurseur de la génération d'eicosanoïdes vasodilatateurs et vasoconstricteurs. Cette activation des PLA₂ et PLD est également impliquée dans la croissance des CMLVs induite par l'Ang II et dans l'hypertrophie cardiaque (177). Le récepteur AT₁ se couple également à la protéine G_{i/o}, qui inhibe l'adénylate cyclase dans une variété de tissus, atténuant ainsi la production d'AMPc (adénosine monophosphate cyclique) et résultant en une vasoconstriction (178).

1.3.2.1.2 *Phosphorylation des tyrosines kinases*

De récentes études ont également montré que de multiples tyrosines kinases jouent des rôles importants relayés par l'Ang II, notamment dans l'hypertrophie et la prolifération et survie cellulaires, dans la déposition de MEC et dans l'expression de molécules d'adhésion. En effet, la liaison à AT₁ active plusieurs protéines à activité tyrosine kinase relayant l'activation de la voie des MAPK (protéines kinases activées par des mitogènes). Les voies tyrosine kinases majeures initiées par la stimulation d'AT₁ incluent l'activation de c-Src, de FAK (kinase d'adhésion focale), des membres de la voie JAK (Janus Kinases)/STAT (transducteurs du signal et activateurs de la transcription), RhoA et p130Cas. AT₁ initie également la transactivation de récepteurs de facteurs de croissance à activité tyrosine kinase (RTK), comme le récepteur à l'EGF (facteur de croissance épidermal), à l'IGF (facteur de croissance à l'insuline) et au PDGF (facteur de croissance dérivé des plaquettes) (177, 179). Plus récemment, des voies de signalisation indépendantes des protéines G, reliées plutôt à l'activation de protéines de la famille des arrestines, ont été décrites et participeraient entre autres à l'activation des MAPK (180, 181).

1.3.2.1.3 *Stress oxydant et espèces réactives oxygénées*

Les autres effets physiologiques/pathophysiologiques relayés par l'Ang II impliquent également la génération d'espèces réactives oxygénées (ROS, pour «*reactive oxygen species*»). Une pléthore de données expérimentales et cliniques indiquent l'importance de l'implication des actions induites par l'Ang II au niveau de la production de ROS et des cascades de signalisation cellulaires dépendantes des réactions de réduction-oxydation (redox) (182, 183). Tous les types de cellules vasculaires, à savoir les cellules endothéliales, les CMLs, les fibroblastes adventitiels et macrophages résidants produisent des ROS. La source majeure de ROS dans la paroi vasculaire est la NAD(P)H (nicotinamide adénine dinucléotide phosphate) oxydase, qui est régulée par des agents vasoactifs tel que l'Ang II, et également par des cytokines et facteurs de croissance (182). Il a été démontré que l'Ang II active la NAD(P)H oxydase vasculaire, menant à la production de ROS, notamment de peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) et d'anion superoxyde (•O₂⁻).

En conditions physiologiques, les ROS sont générés d'une manière contrôlée à basses concentrations à titre d'importants seconds messagers intra et intercellulaires afin de moduler une panoplie de molécules de signalisation, tel que des protéines tyrosine phosphatases, tyrosine kinases, des facteurs de transcription (NF-κB, AP-1, HIF-1), des MAPKs et canaux ioniques (184). Leur rôle, dans de telles

conditions, est de maintenir l'intégrité vasculaire en régulant la contraction-relaxation des CMLVs, leur croissance ainsi que la fonction endothéliale. Dans l'hypertension, le stress oxydant promouvoit la prolifération et l'hypertrophie des CMLVs, la déposition de collagène, l'inflammation, la peroxydation lipidique et des altérations dans l'activité des MMPs (métalloprotéinases de la matrice). Cet amalgame d'événements conduit à l'épaississement de la média et au remodelage artériel pathologique, contribuant aux dommages vasculaires et changements structuraux observés en hypertension (185).

1.3.2.2 Le récepteur AT₂

Le récepteur AT₂, le deuxième isoforme majeur des récepteurs à l'Ang II, et pour sa part constitué de 363 acides aminés, a été cloné dans une variété d'espèces incluant l'humain (186), le rat (187) et la souris (188). Il est d'ordinaire fortement exprimé lors du développement fœtal, et son expression décline rapidement après la naissance. Chez l'adulte, l'expression du récepteur AT₂ est détectable dans le pancréas, le cœur, le rein, les surrénales, le système squelettique, les tissus conjonctifs, le myomètre, les ovaires, le cerveau et le réseau vasculaire (189). Dans les vaisseaux sanguins, les récepteurs AT₂ prédominent dans l'adventice et sont détectables dans la média. En outre, il est réexprimé chez l'adulte après une lésion cardiaque ou vasculaire, pendant la guérison de blessures et une obstruction rénale, suggérant un rôle dans la croissance et/ou le développement tissulaires (190-192).

Bien que faisant partie de la famille des RCPG, le récepteur AT₂ ne s'internalise pas suite à la liaison de son ligand. La plupart des effets généralement acceptés engendrés par AT₂ se résument à l'opposition aux actions du récepteur AT₁. Brièvement, le récepteur AT₂ est connu pour ses actions vasodilatatrices, pro-apoptotiques, anti-prolifératives, anti-inflammatoires, anti-hypertrophiques, natriurétiques et anti-fibrotiques (193). En 2000, Nouet et Nahmias ont suggéré trois mécanismes de transduction majeurs : (a) l'activation d'une variété de protéines phosphatases causant la déphosphorylation de protéines diverses, (b) la relâche de bradykinine et de NO/guanine monophosphate cyclique (GMPc) et (c) la stimulation de la PLA2 qui conduit à la relâche d'acide arachidonique (AA) (194). Par ailleurs, la cascade de signalisation et les mécanismes enclenchés lors de la stimulation du récepteur présentent un profil atypique. Depuis sa découverte et sa caractérisation en 1989 (195, 196), les connaissances sur le récepteur AT₂ se sont développées, mais le sujet demeure néanmoins controversé et complexe. Il semble que ces divergences quant aux réponses engendrées seraient spécifiques du contexte et du type cellulaire, et seraient

également dues à l'absence d'agonistes hautement sélectifs. Depuis 2004 cependant, Wan et coll. ont mis au point un nouvel agoniste, le composé 21 (C21)(197), ce qui a révolutionné l'étude du récepteur AT₂. Cet agoniste non peptidique peut être administré par voie orale et permet la stimulation in vitro et in vivo du récepteur AT₂, et ce sans affecter le récepteur AT₁. La découverte du C21 a ouvert de nouvelles possibilités thérapeutiques. La molécule a été testée avec succès en Phase I (EudraCT Number 2017-004923-63) et est présentement évaluée en Phase II (EudraCT Number 2019-003203-35). Pour le moment, les développeurs ont choisi de tester la molécule pour le traitement de maladies pulmonaires interstitielles et le phénomène de Raynaud secondaire à la sclérodermie systémique. Par ailleurs, les données recueillies suggèrent un potentiel pour la prévention des dommages aux organes cibles dans l'HTN et une alternative aux traitements actuels pour réduire l'inflammation (198).

1.4 Description et implication de l'apoptose dans l'hypertension

Tel qu'abordé précédemment, l'hypertension est associée à une perturbation de l'équilibre entre la croissance et la mort cellulaires, qui sont impliquées dans le développement de l'hypertrophie cardiovasculaire. Cependant, nous avons vu que certaines classes d'antihypertenseurs corrigent le remodelage pathologique en favorisant entre autres la mort cellulaire des CML vasculaires et les fibroblastes cardiaques, au détriment de la prolifération. Afin de comprendre et d'élucider les mécanismes enclenchés par ces agents, cette section traitera de la mort cellulaire programmée (MCP), son implication dans les dommages aux organes cibles de l'hypertension et sa modulation par les antihypertenseurs.

1.4.1 Description

Depuis le milieu du XIXe siècle, il est connu que la disparition d'une cellule résulte d'une capacité à s'autodétruire et non de l'incapacité à résister aux agressions externes. Mais ce n'est que depuis moins d'un demi-siècle que la mort cellulaire est considérée par les biologistes comme une fonction à part entière. En 1972, Kerr, Wyllie et Currie ont appelé ce phénomène « apoptose », en référence à la chute des feuilles en automne, pour décrire une forme de mort différente de la nécrose, seule mort connue à cette époque (199). Ensuite, les recherches sur la régulation génétique de l'apoptose se sont accélérées grâce au travail de Horvitz et coll. sur le développement du nématode *Caenorhabditis elegans*, qui a permis d'identifier l'existence d'un programme moléculaire permettant aux cellules de déclencher leur mort ainsi que les gènes régulant ce processus apoptotique (200, 201). Contrairement à la nécrose, la capacité des cellules à s'autodétruire lorsque nécessaire par un processus physiologique permet entre autres aux tissus de contrebalancer une prolifération excessive et contribue à l'homéostasie cellulaire.

L'apoptose est un processus de MCP en réponse à des signaux intra- ou extra-cellulaires déclencheurs de mort, ou à l'absence de signaux de survie dans l'environnement de la cellule. C'est une forme active d'autodestruction qui correspond à une réaction de l'organisme à des stimuli physiologiques ou pathologiques. Elle résulte de l'exécution d'un programme hautement régulé qui consiste en l'activation d'enzymes et l'expression de nombreux gènes pro ou anti-apoptotiques qui vont induire la destruction d'une cellule tout en préservant l'intégrité tissulaire environnante (202, 203).

L'apoptose est caractérisée par un certain nombre de modifications morphologiques et biochimiques très différentes de celles de la nécrose. Parmi les critères morphologiques, on observe une diminution du volume cellulaire, le maintien de l'intégrité de la membrane plasmique au début du processus, une relocalisation des organites cytoplasmiques, une condensation de la chromatine, puis la fragmentation du noyau et du cytoplasme. La cellule se scinde en corps apoptotiques délimités par une membrane intacte contenant des organelles, des fragments nucléaires et un cytoplasme condensé. Parmi les critères biochimiques, on observe une chute du potentiel mitochondrial transmembranaire, une externalisation des résidus phosphatidylsérines (PS) de la membrane plasmique, une activation de la famille de protéases à cystéine communément appelées «caspases» et une fragmentation de l'ADN en fragments de haut poids moléculaires ou en oligonucléosomes. L'initiation de l'apoptose est dépendante de l'activation des caspases, qui elles sont divisées en deux catégories : les caspases initiatrices et les caspases exécutrices (203). En dernier lieu, des marqueurs de surface, dont les résidus PS, permettent la reconnaissance et la phagocytose des cellules apoptotiques par les macrophages environnants, dans lesquels elles subissent une dégradation rapide (204, 205).

Les mécanismes moléculaires impliqués dans la régulation de l'apoptose ont été étudiés de façon intensive dans les 30 dernières années. Il est maintenant établi qu'il existe deux types d'apoptose : l'apoptose intrinsèque et l'apoptose extrinsèque. La voie intrinsèque est initiée par la cellule elle-même, en réponse à un dommage ou un stress. La voie extrinsèque est initiée par des récepteurs membranaires, particulièrement des récepteurs de mort stimulés par des cellules du système immunitaire (205). Les deux voies convergent lorsque la caspase 3 (caspase exécutrice) est activée, résultant en la mort cellulaire. Quoique l'activation des caspase ne garantit pas la mort cellulaire, les caspases 3, 6 et 7 sont considérées comme d'importantes exécutrices (206).

1.4.1.1 Autres types de mort cellulaire

Le système actuel de classification de mort cellulaire a été mis à jour par le Nomenclature Committee on Cell Death (NCCD), qui émet des réglementations pour la définition et l'interprétation de tous les aspects de la mort cellulaire depuis 2005 (207). Le NCCD a publié 5 publications traitant de la classification de la

mort cellulaire (207, 208), les définitions moléculaires des sous-programmes des différentes morts cellulaires (209), les aspects essentiels et accessoires de la mort cellulaire (210) et les mécanismes moléculaires de la mort cellulaire (211). À l'heure actuelle, les cellules peuvent soit mourir de façon accidentelle, ou de façon régulée. La mort cellulaire accidentelle est un processus biologique non contrôlé, alors que la mort cellulaire régulée implique des mécanismes effecteurs hautement structurés été définis (210). Un nombre grandissant de nouvelles formes de mort cellulaire régulée autre que l'apoptose ont été identifiées et sont impliqués dans plusieurs pathologies humaines. Ces formes de mort cellulaire régulées ont été récemment revues en détail par Tang et coll (212). En résumé, les formes non-apoptotiques de mort cellulaire régulée incluent la nécroptose, la pyroptose, la ferroptose, l'entose, la nétose, la parthanatose, la mort cellulaire lysosomale et la mort cellulaire dépendante autophagique (212). La compréhension plus avancée de ces formes de mort cellulaire et leurs conséquences intercellulaires pourraient révéler de nouvelles cibles thérapeutiques visant l'évitement de la perte cellulaire pathogénique.

1.4.2 L'apoptose dans l'hypertension artérielle

L'apoptose se distingue maintenant comme un déterminant majeur des dommages aux organes cibles de plusieurs maladies cardiovasculaires, soit le cœur, le réseau vasculaire, le cerveau et les reins. Par exemple, une hausse de l'apoptose comparativement à la prolifération cellulaire s'observe lors de la progression vers la défaillance cardiaque et de l'infarctus du myocarde (perte de cardiomyocytes) (213), lors de l'atrophie vasculaire menant à un anévrisme (perte de CMLs) et lors de la raréfaction des capillaires associée à l'hypertension (perte de cellules endothéliales). En revanche, une baisse de l'apoptose relativement à la prolifération conduit à l'hyperplasie cellulaire lors du remodelage hypertensif du ventricule gauche (fibroblastes) et lors du remodelage artériel (CMLs) dans l'athérosclérose et l'hypertension (7).

Les premières évidences de l'implication de l'apoptose dans l'hypertension proviennent d'études chez le SHR, qui tel que décrit précédemment, est un modèle génétiquement déterminé d'hypertension arborant une hyperplasie aortique, cardiaque et rénale. En utilisant un marquage radioactif *in situ* de la fragmentation d'ADN internucléosomale, le groupe de Hamet a rapporté une apoptose accrue dans les

organes cibles (CML aortiques, cœur, rein et cerveau) de jeunes rats et souris adultes, comparativement aux témoins normotendus (70). Des études subséquentes ont montré que l'hyperplasie cardiaque néonatale du SHR est associée à une répllication accrue et une apoptose à la baisse à l'intérieur des premières 24 heures après la naissance (45, 46). En outre, le marquage radioactif de l'ADN génomique *in utero* a révélé, comparativement aux rats normotendus, une baisse de 50% de la demi-vie de l'ADN dans le rein, le cœur et l'aorte thoracique des SHRs pré-hypertendus. Certaines études rapportent une hausse de l'apoptose des cardiomyocytes en fonction de l'âge chez le SHR: suite à l'apoptose réduite chez le nouveau-né, une augmentation de l'apoptose des cardiomyocytes est décelée à partir de l'âge de 3 semaines et atteint un plateau à 16 semaines (70, 109, 214), en corrélation avec le développement de l'hyperplasie des fibroblastes. Ces données révèlent un vieillissement et un taux de renouvellement cellulaires accrus dans ce modèle (72, 215), impliquant également la voie de l'Ang II (72, 216). Cet aspect sera en revanche traité plus en profondeur au Chapitre 1.5.

Par ailleurs, une revue exhaustive de la littérature révèle que l'apoptose est régulée de façon distincte dans une grande variété de tissus (cardiovasculaires et non cardiovasculaires) chez le SHR, comparativement aux rats normotendus (217). Il est primordial de soulever le fait que ces différences persistent suite à la réduction de la tension artérielle ou lorsque les cellules sont mises en culture *in vitro*. Ces données indiquent donc que des mécanismes hémodynamiques et non hémodynamiques (génétiques ou humoraux) participent au contrôle de l'apoptose dans l'hypertension.

Cependant, il est intéressant de remarquer que les cardiomyocytes et les CMLs en culture provenant de SHR arborent une plus grande susceptibilité à l'induction d'apoptose en réponse à une privation en sérum ou à la stimulation de la voie de l'AMPc (70, 109, 218-220). Les altérations dans la régulation de l'apoptose ne sont pas spécifiques et exclusives au modèle SHR. Effectivement, les CMLs aortiques provenant des rats *deoxycorticosterone acetate* (DOCA)-sel montrent également une augmentation du marquage de l'ADN, de l'activation de caspase-3 et du ratio Bax/Bcl-2 (Bax étant pro-apoptotique et Bcl-2, anti-apoptotique) (221). D'autres modèles non génétiques d'hypertension (infusion d'Ang II) (222) présentent également une augmentation rapide de l'apoptose des cardiomyocytes bien avant la diminution de la fonction cardiaque. Les mécanismes conduisant à cette activation « chronique » de

l'apoptose demeurent inexpliqués, mais pourraient faire intervenir une tentative de contrebalancer, quoique de façon inadéquate, l'hypertrophie et l'hyperplasie.

1.4.3 Potentiel thérapeutique de la modulation pharmacologique de l'apoptose par des antihypertenseurs

La mise en évidence de l'augmentation de l'apoptose dans les pathologies cardiaques telle la défaillance cardiaque et l'infarctus du myocarde ont entre autres contribué au développement d'une optique négative de l'apoptose dans notre champ d'études (223). Des résultats provenant de différents groupes, incluant le nôtre, montrent toutefois que des thérapies antihypertensives couramment employées modulent l'apoptose soit à la hausse pour renverser le remodelage hypertensif pathologique (133), soit à la baisse pour contrer la progression vers la défaillance cardiaque. (108). Dans la majorité des maladies cardiovasculaires, les fibroblastes cardiaques et les CMLs des gros vaisseaux prolifèrent, ce qui contribue à l'établissement, au maintien et/ou à l'aggravation de la maladie. Pollman et coll. ont démontré que dans une artère carotide de lapin, l'hyperplasie néointimale résultant d'une dénudation de l'endothélium par un ballonnet peut être renversée par l'apoptose (224). Notre laboratoire a ensuite démontré que des antihypertenseurs modulent aussi l'apoptose néointimale afin de prévenir et faire régresser la lésion vasculaire (225, 226). Entre temps, nous avons démontré que les antihypertenseurs capables de renverser l'hypertrophie cardiaque et/ou aortique chez le SHR induisent une apoptose transitoire dans ces organes (117, 120), survenant rapidement suite à l'initiation du traitement (à l'intérieur des dix premiers jours) pour ensuite retourner près des valeurs basales. Cependant, cela ne s'observe pas avec un vasodilatateur ne corrigeant pas l'hypertrophie, tel que l'hydralazine, suggérant une forte composante indépendante de la pression (117, 120).

1.4.3.1 Modulation de l'apoptose dans le cœur

Notre groupe a démontré que les antagonistes des récepteurs AT₁, les iECA et les BCC induisent une apoptose dépendant des caspases des fibroblastes du ventricule gauche chez le SHR (100, 101, 117, 227). De façon intéressante, chacun de ces traitements réduit le nombre de fibroblastes dans le VG d'environ 30%. Même en continuant le traitement au-delà de 2 semaines, on observe une réduction soutenue du nombre de fibroblastes, du contenu en ADN dans le VG et du taux de synthèse de l'ADN sans réduction

supplémentaire du nombre de fibroblastes (101, 117, 133). Il a également été démontré que suivant l'arrêt du traitement par un BCC, il n'y avait pas d'augmentation significative de la synthèse d'ADN, suggérant que les fibroblastes ne se sont pas « re-populés » dans le VG, et ce même si l'hypertension était réapparue (133). Des données non publiées de notre groupe suggèrent que la réduction du contenu en ADN persiste également suite à la cessation du traitement avec un iECA. Étant donné que les fibroblastes cardiaques sont typiquement quiescents dans le cœur adulte (228), et que les iECA induisent l'apoptose des fibroblastes interstitiels sans affecter les cardiomyocytes, les cellules endothéliales ou les CMLVs (100, 227), il est raisonnable de croire que cette réduction soutenue du contenu en ADN soit reliée à une diminution persistante du nombre de fibroblastes dans le VG (85). De plus, notre groupe a démontré que la reprise du traitement par un BCC suite à un arrêt de celui-ci n'a pas résulté en une deuxième induction d'apoptose ou en une diminution du contenu en ADN (133). Ceci implique que les fibroblastes cardiaques qui restent ont développé une résistance au stimulus apoptotique, ou qu'il existe une sous-population de cellules qui est susceptible à l'apoptose et qui a été éliminée par la première intervention. Les caractéristiques des fibroblastes éliminés par les iSRA et la nature de cette élimination sont discutés plus loin dans le Chapitre 4 Chapitre 4 - Discussion.

Il est important de souligner que l'apoptose cardiaque est contrôlée différemment lors de la progression de la maladie ou de son traitement. Cette régulation temporelle permet l'élimination de fibroblastes en excès lors de l'initiation du traitement antihypertenseur chez un animal présentant une HVG compensée, alors qu'elle favorise la sauvegarde des cardiomyocytes lors du traitement antihypertenseur au moment où la préservation de la fonction cardiaque devient critique (229) ; ce concept étant illustré à la Figure 5.

À court terme, ces traitements renversent l'hyperplasie des fibroblastes en éliminant ceux en excès par une vague transitoire d'apoptose. D'ailleurs, dans la séquence des événements qui mènent à la régression de l'HVG, l'apoptose des fibroblastes cardiaques précède la réduction de la masse des cardiomyocytes chez le SHR traité avec l'amlodipine (101). À long terme, les inhibiteurs du SRA préservent la viabilité du myocarde en prévenant l'apoptose de cardiomyocytes. D'autre part, le contrôle de l'apoptose cardiaque s'effectue de façon spécifique au type cellulaire, l'Ang II favorisant aussi bien la prolifération des fibroblastes et l'apoptose des cardiomyocytes via son récepteur AT₁ (230, 231). Ainsi, le losartan prévient

l'apoptose de cardiomyocytes tandis qu'il atténue la prolifération et, parallèlement, la génération de signaux de survie vers les fibroblastes, accroissant leur susceptibilité à l'apoptose (100).

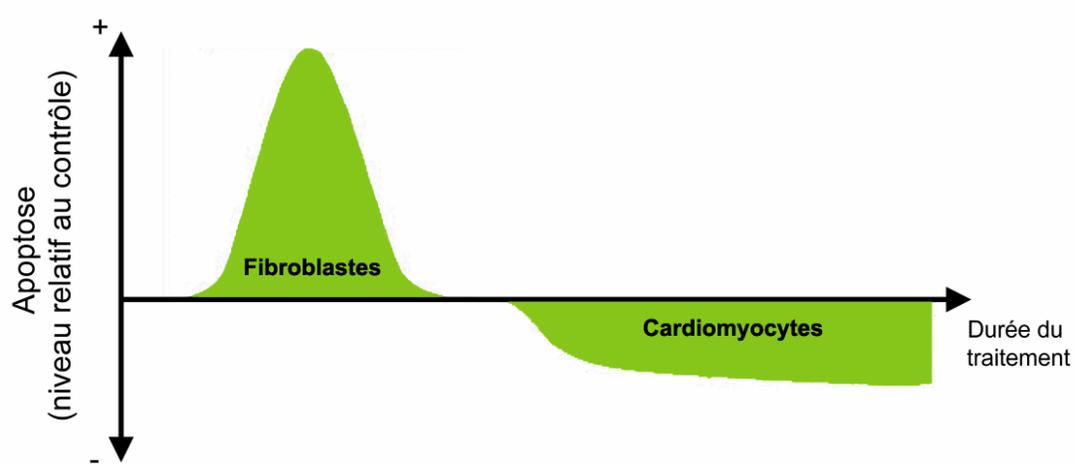


Figure 5. - Représentation schématique des effets des inhibiteurs de l'Ang II et des bloqueurs de canaux calciques en fonction du temps et du type cellulaire sur l'apoptose dans le cœur hypertendu.

Adapté de (229).

1.4.3.2 Modulation de l'apoptose dans le réseau vasculaire

Tel qu'abordé précédemment, le renversement de l'hypertrophie aortique chez le SHR par des antihypertenseurs (iECA, antagoniste AT_1 et BCC) est également accompagnée d'une induction transitoire et rapide de l'apoptose des CML aortiques (120, 132, 232, 233). De façon opposée, malgré une réduction comparable de la tension artérielle, l'hydralazine n'a que peu ou pas d'effets sur le remodelage aortique. Ceci évoque l'existence d'un mécanisme indépendant de la pression artérielle, bien que la baisse de débit sanguin (ou de la tension pariétale) puisse élever d'elle-même l'apoptose de CMLs dans certaines conditions (234) .

La fenêtre apoptotique à l'intérieur de laquelle l'apoptose est détectée précède à la fois la réduction soutenue de la prolifération cellulaire (synthèse d'ADN) et la correction de la masse du vaisseau (120), suggérant que l'apoptose peut jouer un rôle important dans le déclenchement de la régression de l'hypertrophie aortique. Cette hypothèse a été testée en co-administrant à des SHRs le losartan et

l'inhibiteur général de caspases z-VAD-fmk : l'inhibition de l'apoptose par le Z-VAD-fmk, bien que sans effet sur l'action antihypertensive du losartan, a complètement prévenu la régression de l'hypertrophie du vaisseau, démontrant le caractère obligatoire de l'apoptose dans la correction du remodelage aortique pathologique (232). Lorsque le traitement se prolonge sur quatre semaines, aucune perte supplémentaire significative de CML n'est observée (120). De surcroît, notre groupe a précédemment élucidé la voie de signalisation empruntée lors de l'apoptose des CMLs induite par un traitement antihypertenseur, en l'occurrence l'amlodipine. L'inhibition d'Akt survient avant et pendant l'induction d'apoptose, un processus médié par l'activation de caspase-8, suivie de caspase-9 et -3, et associée à l'inhibition des MAPK (235).

La suite portera donc sur l'état actuel des connaissances en matière des mécanismes de modulation de l'apoptose des CML vasculaires par les antihypertenseurs qui ont fait l'objet d'études dans le projet, soit les inhibiteurs du SRA.

1.4.3.2.1 Les antagonistes AT₁ et l'apoptose des CML

La compréhension actuelle des récepteurs à l'Ang II montre que le récepteur AT₁ augmente la croissance et la survie des CML *in vitro*, alors qu'AT₂ médie des effets opposés. Ceci suggère que la stimulation seule d'AT₂ en présence d'un antagoniste AT₁ favoriserait l'apoptose, bien que des données contradictoires *in vivo* accordent aussi un effet pro-croissance au récepteur AT₂ (236, 237). Dans notre modèle, le blocage des récepteurs AT₂ avec le PD123319 supprime l'induction de l'apoptose et la régression de l'hypertrophie aortique chez des SHR recevant le valsartan (132). L'apoptose aortique induite par les antagonistes AT₁ implique donc la suractivation du récepteur AT₂ pro-apoptotique. Il a été rapporté que l'activation de caspase-3 et la diminution de l'expression de Bcl-2 surviennent avant l'activation de caspase-9 et l'expression accrue de Bax lors de l'apoptose de CML initiée par le losartan chez le SHR (232), suggérant que la voie mitochondriale intrinsèque amplifie plutôt qu'initie l'apoptose dans ce modèle. Toutefois, les événements survenant en aval du récepteur AT₂ et en amont de l'activation de Bax et des caspases demeurent inconnus.

1.4.3.2.2 Apoptose des CML et les iECA

Dans le même ordre d'idées, la co-administration de l'antagoniste AT₂ PD123319 avec l'énalapril ne prévient pas les effets pro-apoptotiques de celui-ci (132). Cela n'est guère surprenant, puisque les iECA diminuent la stimulation AT₁ et AT₂. De surcroît, lorsqu'on reproduit l'inhibition de la production d'Ang II par un iECA au moyen d'un blocage simultané des récepteurs AT₁ et AT₂, l'apoptose n'est pas détectée (132). Il est aisé de croire que ceux-ci n'induisent vraisemblablement pas l'apoptose via une réduction d'Ang II.

D'autre part, parmi nos données concernant l'apoptose vasculaire chez le SHR, celles-ci montrent que l'augmentation de la capacité du vaisseau à produire du NO (amplification de la fonction endothéliale par la co-administration du précurseur du NO, L-arginine, et du co-facteur de eNOS, le BH4) ne peut à elle seule initier l'apoptose des CML. Cependant, la supplémentation en L-arginine et BH4, lorsque combinée à l'administration de l'énalapril, devance l'induction de l'apoptose de CML, qui est alors activée en l'espace d'une semaine de traitement (233). Cela suggère que la correction de la dysfonction endothéliale obtenue avec un iECA ne constitue pas l'unique mécanisme menant à l'initiation de la réponse apoptotique, bien qu'elle puisse y participer activement. Il semblerait que l'énalapril sensibilise l'aorte de façon à ce que les CML médiales puissent ensuite tirer profit de l'efficacité accrue de eNOS à générer du NO, un inducteur connu de l'apoptose des CML.

Le mécanisme proposé suggère l'implication d'une autre cascade biochimique modulée par les iECA. À cet égard, la stimulation des récepteurs des kinines suite à la prolongation de la demi-vie de ces peptides par un iECA représente une possibilité intéressante, puisqu'elle est couplée à une hausse de l'activité de eNOS. À la section 1.1.6.2.5, nous avons effleuré le concept que les kinines participent à plusieurs des effets bénéfiques ou secondaires des iECA. Leur récepteur constitutif RB₂ et leur récepteur inductible RB₁ peuvent relayer l'inhibition de la croissance des CML (238). De plus, dans des petites artères de rats, le RB₁ stimule la sphingomyélinase et la libération de céramide (239), un médiateur important dans l'induction de l'apoptose (notamment avec le récepteur AT₂) (240-242). À cet effet, nous avons démontré que l'apoptose des CML n'est pas relayée par l'activation du récepteur constitutif RB₂ des kinines et qu'elle est associée à une expression du récepteur inductible RB₁ (243).

1.5 Les télomères et la pathologie hypertensive

1.5.1 Historique de la découverte des télomères et de leurs fonctions

Dans les années 1930, Hermann J. Muller (Prix Nobel 1946) et Barbara McClintock (Prix Nobel 1983) ont décrit le télomère (provenant du mot grec «telos» signifiant fin, et «meros» signifiant partie) comme une structure protectrice à l'extrémité terminale du chromosome, sans quoi son extrémité pourrait être considérée comme une rupture du double brin d'ADN, pouvant conduire à des soudures de chromosomes par fusion de leur télomère respectif, et mener à la mort cellulaire. Par la suite, dans les années 70, le problème de la réplication de l'extrémité 3' des molécules d'ADN, appelé «The end-replication problem», a été soulevé. Ce problème réside dans le fait que l'ADN polymérase ne peut compléter la réplication à l'extrémité 5'. De ce fait, la première amorce de réplication laisse le simple-brin d'ADN parental seul, qui sera ensuite éliminé sous l'action des exonucléases. Cela aboutit au raccourcissement progressif de la molécule d'ADN après chaque division cellulaire. L'intégrité des télomères est donc apparue comme un élément fondamental pour prévenir la perte de séquences codantes situées en aval des télomères dans l'ADN (244).

Ce n'est que dans les années 1980 que les chercheurs Elizabeth H. Blackburn, Jack Szostak et Carol Greider (à l'époque étudiante d'Elizabeth Blackburn) ont découvert comment fonctionnent les télomères et ont découvert l'enzyme qui les copie - la télomérase. Leurs travaux leur ont d'ailleurs valu le Prix Nobel de la médecine en 2009.

La taille des télomères serait également l'horloge biologique indiquant à quel moment la cellule normale doit entrer en sénescence (245). C'est d'ailleurs Hayflick, dans les années 1960, qui a décrit l'optique biologique du vieillissement et établi ce qui est maintenant appelé la limite de Hayflick (nombre maximal de divisions cellulaires qu'une cellule peut accomplir *in vitro*) (246, 247). Ensuite, en 1973, Olovnikov a relié la sénescence avec le problème de réplication à l'extrémité 3' avec sa théorie de la marginotomie (ou télotomie). Sa théorie soutient que le raccourcissement des télomères est une sorte d'horloge intrinsèque du vieillissement qui suit le nombre de divisions cellulaires avant l'entrée en sénescence de la cellule.

Les télomères sont donc parmi les structures les plus importantes dans les cellules eucaryotes. En créant les terminaisons physiques des chromosomes linéaires, ils jouent un rôle crucial dans le maintien de la stabilité du génome, le contrôle de la division cellulaire, la croissance cellulaire et la sénescence réplivative (248).

1.5.2 Description du système télomère-téломérase

1.5.2.1 Structure des télomères

Les télomères sont composés de complexes spécialisés formés d'ADN et de protéines. Ils sont constitués de séquences répétitives (TTAGGG)_n et se terminent avec une extension 3' simple-brin riche en guanine. Les télomères sont des structures dynamiques et leur longueur varie selon l'organisme ou le type cellulaire. Par exemple, le rongeur peut arborer des télomères aussi longs que 150 kb ou plus, tandis que les télomères humains peuvent varier de 3 à 20 Kb (249, 250). Les études en microscopie électronique ont révélé que l'extrémité du télomère est une large structure en duplex formée de 2 boucles (Figure 6). Ce modèle suggère que le télomère se replie sur lui-même pour former une boucle télomérique (*T-loop*). L'extrémité 3' simple-brin riche en guanine se lie à la séquence double-brin de l'extrémité 5', formant la boucle de déplacement (*D-loop*) (251).

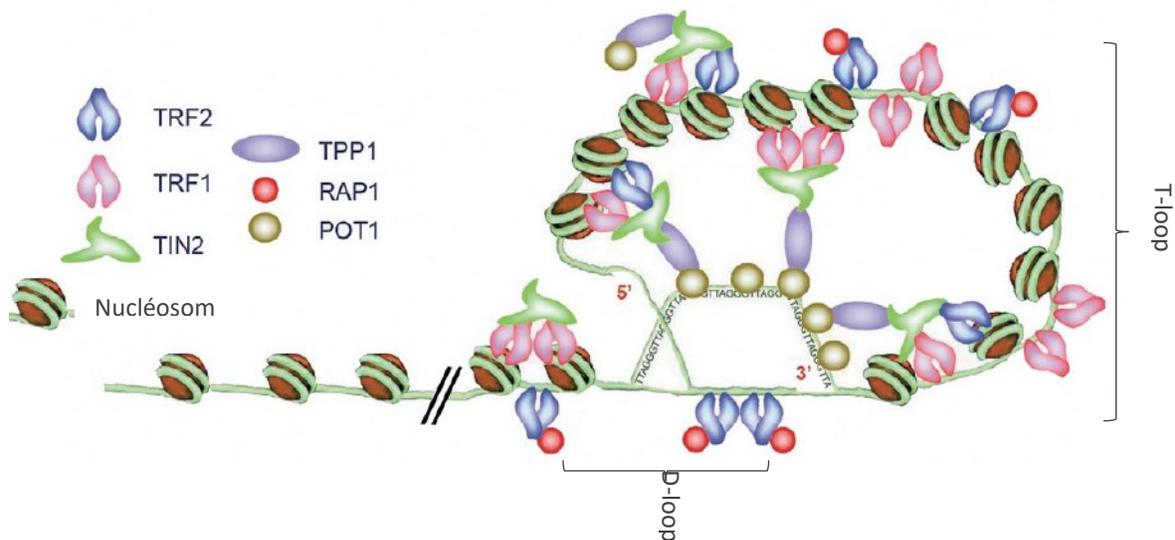


Figure 6. - Structure du télomère.

Structure en duplexe consistant en une boucle télomérique «(T)-loop» et d'une boucle de déplacement «(D)-loop». TRF1: Telomeric Repeat Factor 1; TRF2 Telomeric Repeat Factor 2; TIN2: TRF1-Interacting Protein 2; TPP1 Tripeptidyl Peptidase 1; RAP1: Repressor/Activator Protein 1; POT1: Protection of Telomere 1. Adapté de (252).

Cette structure en boucle est maintenue par plusieurs protéines spécifiques des télomères et d'autres protéines ubiquitaires impliquées dans le traitement de l'ADN et l'organisation structurale (253). Le duplex d'ADN aux bouts des chromosomes est surtout agencé en nucléosomes. L'ADN simple brin ou des extrémités double-brin libres sont toxiques pour la cellule. Le complexe télosome (ou *shelterine*) protège l'ADN télomérique pour prévenir la reconnaissance de l'ADN endommagé (254). Ce dernier est le complexe nucléoprotéique protégeant la partie terminale. Le complexe shelterine humain est formé de TRF1 (*Telomeric Repeat Factor 1*), TRF2 (*Telomeric Repeat Factor 2*), TIN2 (*TRF1-Interacting Protein 2*), TPP1 (*Tripeptidyl Peptidase 1*), RAP1 (*Repressor/Activator Protein 1*) et POT1 (*Protection of Telomere 1*). TRF1 et TRF2 lient directement les télomères sur la portion double-brin, et POT1 se retrouve liée à la portion simple-brin. TPP1, TIN2 et RAP1 sont associées aux télomères indirectement par interaction protéique. TPP1 et TIN2 font le pont entre les portions double-brin et simple-brin (252).

Certaines études ont démontré que l'intégrité et la fonction des télomères et des cellules requièrent au moins trois facteurs : (a) une longueur minimale de la séquence répétitive TTAGGG (255), (b) l'intégrité de l'extension 3' et (c) la régulation des protéines télomériques (256), principalement TRF1 et TRF2. Par ailleurs, un niveau minimal de la protéine TRF2, qui favorise la formation de la structure en boucle, est nécessaire à la protection des chromosomes, sans quoi l'absence de TRF2 induit la dégradation du simple-brin télomérique. La dégradation de la partie simple-brin serait un des signaux qui conduirait la cellule vers la sénescence répliquative ou vers une voie apoptotique (257). Finalement, la région subtélomérique adjacente à la boucle télomérique est hétérochromatique et contient des séquences télomériques répétitives aussi bien que corrompues et peuvent s'étendre jusqu'à 10 à 500 Kb vers le centromère (258).

1.5.2.2 Régulation de la longueur des télomères et la télomérase

Tel qu'expliqué au Chapitre 1.5.1, le problème de réplication à l'extrémité 3' entraîne une perte progressive des télomères à chaque division cellulaire, de l'ordre de 20-200 pb par division cellulaire (250).

Conséquemment, les télomères courts mènent à l'activation des points de contrôle de dommages à l'ADN, médiant ainsi la sénescence répllicative. Une série de changements sont alors initiés, inhibant la prolifération et menant à l'apoptose (259). La sénescence répllicative induite par les télomères dépend du taux d'attrition des télomères, de la longueur initiale du télomère et la longueur du télomère le plus court (260). Certaines études révèlent que non pas un seul, mais un sous-groupe de télomères très courts sont requis pour engager les cellules vers la sénescence (261-263). Pendant longtemps, l'érosion des télomères était associée à l'état prolifératif des tissus (i.e., prolifératif ou statique). Cependant, une importante étude n'a pas soutenu ce dogme. En effet, l'érosion des télomères survient dans les tissus prolifératifs comme la peau et le sang, mais aussi dans les organes considérés « post-mitotiques » ayant un taux de renouvellement minimal tel que le muscle squelettique, le cœur ou le tissu adipeux. Même en prenant en considération les processus de régénération survenant suite à une blessure au tissu musculaire ou suite à des maladies, les taux d'érosion observés étaient similaires (264). À ce jour, le raccourcissement des télomères dans les tissus somatiques a été peu étudié et une multitude de facteurs peuvent être impliqués, comme les espèces réactives oxygénées, l'épuisement des cellules souches nécessaires à la régénération tissulaire ou l'implication des composantes du complexe shelterine (263).

La façon la plus commune de contrer le problème de réplication à l'extrémité 3' est médiée par l'enzyme ribonucléoprotéique télomérase, isolée chez le *Tetrahymena thermophila* en 1985 par Carol Greider et Elizabeth H. Blackburn (265). La télomérase contient une sous-unité ARN (TERC) (266) avec une séquence complémentaire aux répétitions télomériques (267), servant de patron pour la transcription inverse (268). L'autre sous-unité est la transcriptase inverse de la télomérase (TERT) qui elle catalyse la transcription inverse de la sous-unité ARN en répétitions télomériques (269).

Bien que l'expression de la télomérase chez l'humain soit constitutive dans la plupart des organismes unicellulaires, les cellules somatiques adultes présentent typiquement une activité télomérase faible, voire absente, expliquant le raccourcissement progressif des télomères associé à la réplication. Contrairement aux cellules somatiques, les cellules germinales, les cellules souches et les cellules tumorales ainsi que les lignées de cellules immortalisées maintiennent un haut niveau d'activité, et par le fait même arborent des télomères plus longs et maintiennent un potentiel de prolifération supérieur (248). Il est intéressant de noter les évidences qui démontrent l'occurrence d'une régulation spécifique

du tissu au niveau de l'activité de l'enzyme au cours du développement embryonnaire aussi bien que durant la vie adulte (270, 271). De la même façon, la longueur des télomères est grandement variable parmi les individus du même âge, autant chez le rongeur (270, 272) que chez l'humain (273, 274).

Dans les cellules exprimant la télomérase, l'accès de la télomérase aux télomères est coordonné avec la progression du cycle cellulaire et la structure du complexe formé des protéines et des télomères. Les dernières évidences concernant la fenêtre d'élongation des télomères révèlent que la télomérase peut exercer son action et allonger les télomères durant la phase S du cycle cellulaire (275). Durant le cycle cellulaire, seulement une faible proportion des télomères les plus courts sont apparemment disposés à l'élongation, possiblement grâce à leur structure plus ouverte, favorisant ainsi l'accès à la télomérase (276). La régulation de l'accessibilité à l'extension 3' simple-brin par la télomérase est donc probablement dépendante de la phase du cycle cellulaire, mais également de la longueur du télomère. Elle dépend également du nombre et de la conformation des protéines télomériques. Par exemple, un plus grand nombre de molécules TRF1, toute proportion gardée avec la longueur du télomère, pourrait mener à des connexions plus solides, une structure plus compacte et un accès réduit (253).

La télomérase n'est pas le seul intervenant dans la régulation de la longueur des télomères. En effet, tel que décrit précédemment, les télomères sont également influencés le stress oxydant. Le stress oxydant résulte d'un déséquilibre entre le niveau d'espèces réactives oxygénées et les défenses antioxydantes. Chez l'humain, une corrélation inverse entre le niveau de stress oxydant des individus et la longueur des télomères a été observée (277-279). D'ailleurs, une supplémentation en antioxydants dans divers types cellulaires a dans tous les cas ralenti le rétrécissement des télomères et prévenu l'entrée en sénescence de la cellule (280). Le stress oxydant contribue à la pathogenèse de plusieurs maladies, comme le cancer, le diabète, l'arthrite, l'athérosclérose, l'obésité et certaines maladies neurologiques, pulmonaires et cardiovasculaires (281). Un ensemble d'études en culture cellulaire confirme l'hypothèse selon laquelle l'entrée en sénescence des cellules serait accélérée en présence de stress oxydant (282).

En contraste avec la sénescence répliquative, la sénescence prématurée induite par le stress (SIPS, pour *stress-induced premature senescence*) mène à l'activation prématurée du processus de sénescence sans association au raccourcissement des télomères. Presque tout type de stress, de nature physique ou

chimique, peut causer les cellules à entrer en sénescence en provoquant une hausse en stress oxydant et/ou des dommages à l'ADN. La liste semble infinie et plusieurs modèles existent et il est pratiquement impossible de tous les nommer. Cependant, les principales classes de modèles de stress décrits dans la littérature incluent la liste suivante : le stress physique (radiation UV / radiographie X), les agents oxydants et l'hyperoxie, l'inflammation, les cytokines/adipokines, les agents chimiothérapeutiques et le cuivre (283).

1.5.2.2.1 Différences entre le rongeur et l'humain

Bien qu'il y ait des similarités entre le rongeur et l'humain, il existe des différences fondamentales qui compliquent les comparaisons biologiques par analogie. Les rongeurs ont une durée de vie beaucoup plus courte que l'humain, et tel qu'énoncé précédemment, ont des télomères 5 à 10 fois plus longs que ceux de l'humain (284). De plus, les télomères ne servent pas d'horloge mitotique chez le rongeur, puisque la télomérase est exprimée de façon constitutive dans la plupart des cellules et tissus (270, 285). Les télomères de rongeur ne jouent donc pas de rôle dans la sénescence répllicative, contrairement à l'humain. La limite de Hayflick est déterminée par le raccourcissement des télomères chez l'humain, mais les fibroblastes murins arrêtent de se diviser après 10 à 15 doublements de la population en culture *in vitro*, donc avant que l'on puisse détecter le raccourcissement des télomères (286). Le stress oxydatif, et les dommages à l'ADN en général, semblent être la cause principale de l'entrée en sénescence des cellules murines en culture (287-289). Le fait que les télomères de rongeur soient beaucoup plus longs que ceux de l'humain compliquent l'interprétation des données qui corrélient la longueur des télomères avec la longévité. Chez les mammifères, la longueur des télomères est inversement corrélée à la durée de vie de l'espèce et l'expression de la télomérase est inversement corrélée à l'indice de masse corporel (290), suggérant que les télomères ont un rôle différent dépendamment de l'espèce et que l'élongation des télomères et l'activation de la télomérase pourraient représenter un avantage d'adaptation acquis avec l'évolution des mammifères à courte durée de vie, en échange de mécanismes de protection aux dommages oxydatifs à l'ADN à haute dépense énergétique (290). Il faut donc user de prudence lorsque nous extrapolons les données observées chez le rat ou la souris.

1.5.3 Sénescence cellulaire et vieillissement

1.5.3.1 Caractérisation de la sénescence cellulaire

Les cellules sénescents partagent des caractéristiques communes. On y observe entre autres une augmentation de la SA- β gal (bêta-galactosidase associée à la sénescence), des modifications nucléaires et dommages à l'ADN, un arrêt stable du cycle cellulaire et une altération de la morphologie et du phénotype sécrétoire associé à la sénescence (SASP, pour *senescence-associated secretory phenotype*) (283). Elles sécrètent entre autres de l'IL-6 (interleukine 6), de l'IL-8, la molécule d'adhésion intercellulaire ICAM-1, des métalloprotéinases, l'inhibiteur de l'activateur du plasminogène 1 et des facteurs de croissance (291, 292). L'entrée en sénescence des cellules et l'arrêt permanent du cycle cellulaire est principalement médiée par l'activation des cascades de signalisation p53 et p16, et ce, qu'il s'agisse de la sénescence répllicative ou la sénescence induite par le stress. La préférence vers la voie p53 ou p16 dépend du type cellulaire et varie selon les espèces (293, 294).. La voie p53 est principalement activée par les dommages à l'ADN et la dysfonction des télomères, alors que la voie p16 est principalement liée au stress mitotique et au stress général de la cellule (293-295). Il est maintenant généralement reconnu que la grande majorité des stressseurs qui induisent la sénescence cellulaire activent la voie p53/p21 et/ou la voie p16/protéine du rétinoblastome (Rb) (296). Il est important de noter que l'activation de ces voies signalétiques ne constitue pas une évidence concluante que les cellules sont sénescents. Parmi les autres marqueurs de sénescence cellulaire décrits dans la littérature, nous y trouvons également la MAP kinase p38 et l'histone 2 AX phosphorylé (γ H2AX), reflétant l'activation de réponses au dommage à l'ADN. Les foyers d'hétérochromatine associés à la sénescence (SAHF) et la distension des satellites (SADS) constituent également des marqueurs de sénescence (297, 298). Le phénotype des cellules sénescents présente plusieurs variations et la sénescence cellulaire doit être définie à travers une combinaison de marqueurs. L'exploration de ces marqueurs reflétant une évidence directe est présentement un important sujet de recherche (299, 300).

1.5.3.2 Rôle de la sénescence dans le vieillissement et maladies associées au vieillissement

Le vieillissement chronologique est caractérisé, pour ne nommer que quelques exemples, par des changements de communication intercellulaire, l'instabilité génomique, des altérations épigénétiques, l'attrition des télomères, la dysfonction mitochondriale, l'épuisement des cellules souches et la sénescence cellulaire (301). Ceci contribue à la détérioration au niveau de l'organe, de la cellule et au

niveau moléculaire, menant ainsi au déclin de l'activité physiologique. Le vieillissement, à proprement dit, est un processus physiologique. Il est cependant associé avec de multiples aspects indésirables et prédispose à des maladies liées au vieillissement, tel que la défaillance cardiaque, le diabète et l'athérosclérose. Le vieillissement et les maladies liées au vieillissement progressent par une intégration complexe de processus biologiques, et ne permettent pas une approche simple afin d'obtenir une vue d'ensemble (302). Des études *in vitro* ont montré que l'exposition de cellules somatiques jeunes à des cellules sénescences entraîne la sénescence des jeunes cellules, et ceci est décrit comme « l'effet spectateur » ou « *bystander effect* ». Les cellules sénescences endommagent leur environnement local et promeuvent le remodelage tissulaire (303). Les cellules sénescences contribuent à l'inflammation et facilitent l'apoptose, le remodelage tissulaire et la réparation via leur SASP. En conséquence, l'inflammation chronique initie un cercle vicieux qui aggrave la dysfonction des télomères et l'accumulation de cellules sénescences. La sénescence cellulaire, elle, aggrave l'inflammation et accélère le vieillissement et le développement de maladies associées avec l'âge (291, 304).

Des études récentes indiquent que la sénescence cellulaire pourrait jouer un rôle pivot dans la progression des maladies liées au vieillissement, comme par exemple dans l'athérosclérose et la défaillance cardiaque (296, 305, 306). Le rôle de la sénescence vasculaire dans les maladies cardiovasculaires et métaboliques ainsi que le rôle de la sénescence dans les maladies cardiaques ont récemment été revus par Katsuumi et coll. et Shimizu et coll., respectivement (300, 302). Il a été rapporté que la liaison de p53 au promoteur de p21 est augmenté chez les patients atteints d'hypertension, et que le décoiffage des télomères est deux fois plus élevé chez ces patients (307). La notion de l'association entre la sénescence et l'hypertension a aussi été observée chez des modèles animaux. Une étude dans un modèle murin d'instabilité génomique a démontré que celle-ci était associée à la sénescence des cellules endothéliales et des CMLV de l'aorte, mais aussi à une vasodilatation altérée, une rigidité vasculaire accrue et à l'hypertension (308). Chez le rat DOCA-sel, une surexpression de p16 a été détectée dans les reins et le cœur (309). L'expression de p16 dans l'aorte s'est également trouvée à être élevée dans un autre modèle murin d'hypertension, indiquant l'existence d'un cercle vicieux entre la sénescence cellulaire et l'hypertension (310).

1.5.3.3 Sénolyse

La mise en évidence d'un rôle délétère de la sénescence dans le développement de pathologies a fait naître la volonté de développer de nouvelles stratégies thérapeutiques anti-sénescence, tel que la restriction calorique, l'inhibition pharmacologique de la voie mTOR via la rapamycine et l'utilisation chronique de la metformine, pour n'en nommer que quelques-unes (311). Même si ces stratégies s'avèrent efficaces dans une certaine mesure, aucune d'entre elles n'est spécifiquement destinée à l'élimination de cellules sénescents. Très récemment, des interventions génétiques ou pharmacologiques visant à éliminer les cellules sénescents ont émergé et semblent contribuer au renversement du phénotype de vieillissement dans des modèles de vieillissement chronologique ou de maladies liées au vieillissement (312-314). Cette suppression sélective des cellules sénescents est décrite comme étant de la « sénolyse ». Le concept de drogues sénolytiques a émergé avec les travaux du groupe de Kirkland en 2015. Ils émettent l'hypothèse selon laquelle l'inhibition du système de résistance à l'apoptose des cellules sénescents favoriserait leur élimination spécifique. Afin d'identifier les voies moléculaires impliquées dans la survie, les auteurs ont utilisé une approche d'analyse transcriptomique haut débit sur une population de pré-adipocytes sénescents (315).

Dans les cinq dernières années, l'étude de la sénolyse a bourgeonné dans plusieurs domaines, incluant le domaine des maladies cardiovasculaires, et a été récemment revue (300, 302). Parmi les agents testés, la combinaison dasatinib (D) + quercetin (Q) et un agent anti-apoptotique, le ABT-263 (navitoclax) sont testés de façon plus intensive. L'administration *in vivo* de D + Q dans un modèle murin d'hypercholestérolémie a amélioré la fonction vasomotrice des souris âgées, un effet qui était associé à une réduction de la calcification aortique et une augmentation de la durée de vie (316). Zhu et coll. ont montré que D + Q améliorait de façon significative la fonction systolique cardiaque et réduisait la dimension ventriculaire gauche télésystolique chez la souris âgée de 24 mois (315). L'élimination globale des cellules sénescents chez la souris âgée par voie pharmacologique D + Q ou génétique (INK-ATTAC) a mené à l'activation des cellules progénitrices cardiaques dans le cœur âgé, et un nombre accru de cardiomyocytes en prolifération (317). À ce jour, seulement D + Q a été évaluée dans un contexte clinique, et aucun de ces essais cliniques n'a évalué si les agents sénolytiques sont efficaces dans le contexte des maladies cardiovasculaires.

Il est cependant important de noter que l'efficacité des drogues sénolytiques est variable en fonction du type cellulaire sénescence. Cette variabilité suggère qu'il n'est pas possible d'universaliser la complexité du phénotype sénescence à toutes les cellules de l'organisme. Dans l'optique de mieux comprendre la fonction biologique des cellules sénescence, il apparaît donc important de considérer que chaque type cellulaire étudié possède une signature moléculaire qui lui est propre (318). À l'heure actuelle, même si les effets secondaires de ces stratégies thérapeutiques innovantes ne sont pas clairement caractérisés, elles demeurent prometteuses et fortement associées à une volonté de dynamiser ce secteur de recherche qui est aujourd'hui en pleine expansion. L'ensemble des données disponibles indiquent que l'élimination des cellules sénescence a le potentiel de renverser la dysfonction et le vieillissement des tissus et que les agents sénolytiques pourraient devenir la thérapie de prochaine génération dans les MCV (319-321).

1.5.4 Les télomères et les maladies cardiovasculaires

Au cours des 20 dernières années, l'idée que les télomères puissent jouer un rôle dans l'augmentation de la morbidité et mortalité causée par différents facteurs a rapidement gagné en popularité scientifique. En particulier, les télomères offrent le potentiel d'être un biomarqueur qui intègre l'expérience de l'organisme en termes de stress et d'état psychologique, de contexte environnemental et social ainsi que le dommage physique, dans une seule devise commune (322). Les télomères ont été étudiés en association avec un large spectre de variables incluant le stress (323), la maladie mentale (324), le statut socio-économique (325), les polluants environnementaux (326), la nutrition (327), l'usage de la cigarette (328), le sexe (329) et l'activité physique (330). Plusieurs études démontrent également une corrélation entre des télomères plus courts et plusieurs maladies liées au vieillissement tel que l'infertilité, l'arthrite, le diabète, le cancer, les maladies neurodégénératives et cardiovasculaires (331).

Parce que le vieillissement est un facteur de risque cardiovasculaire majeur (332), questionner si l'épuisement des télomères en fonction de l'âge affecte la pathophysiologie cardiovasculaire a été le centre de recherches intensives ces dernières années. Cependant, certaines questions primordiales demeurent à éclaircir, à savoir si le raccourcissement des télomères soit une cause ou une conséquence de la maladie cardiovasculaire, et si la modulation pharmacologique des télomères est une avenue pertinente. Les deux sections suivantes sont un résumé de l'état des connaissances actuelles quant à l'association entre la longueur des télomères et la maladie cardiovasculaire.

1.5.4.1 Les données provenant de modèles expérimentaux

Un nombre appréciable d'études en culture cellulaire ont montré l'implication des télomères et leur régulation dans la pathobiologie cardiovasculaire, notamment dans les cellules de muscles lisse vasculaires, les cellules endothéliales et les cardiomyocytes (280). La régulation transcriptionnelle dépendante de la télomérase de gènes impliqués dans la croissance cellulaire a récemment été suggérée comme un mécanisme additionnel par lequel la télomérase promeut la prolifération cellulaire, indépendamment du maintien de la longueur des télomères (333). Par exemple, dans les CMLVs, l'activité télomérase corrèle avec la prolifération (334, 335). Conséquemment, l'inhibition de la télomérase fait rapidement chuter la prolifération. De plus, la surexpression forcée de TERT (sous-unité catalytique de la télomérase) prolonge la durée de vie des CMLVs, des cardiomyocytes et des cellules endothéliales et renverse le phénotype sénescence de ces cellules, et ce malgré la présence soutenue des télomères courts (280). Pareillement, la surexpression de TERT dans les cardiomyocytes induit également une hypertrophie et inhibe l'apoptose (336). Dans les CMLVs provenant de plaques d'athérosclérose humaine, celles-ci arborent un dommage oxydatif à l'ADN, une expression élevée de marqueurs de sénescence et des télomères plus courts (337, 338). Finalement, il semblerait que des télomères dysfonctionnels et une susceptibilité accrue à l'apoptose dans les cardiomyocytes fassent partie des mécanismes menant à la défaillance cardiaque. En effet, l'inactivation de TRF2 dans des CM humains cause une érosion des télomères et augmente l'apoptose suite à une activation de Chk2, une kinase essentielle pour le déclenchement du point de contrôle en G2, sensible aux dommages de l'ADN (339).

1.5.4.2 Les données provenant de modèles cliniques

Chez l'humain, la plupart des études ont étudié la longueur des télomères sur les globules blancs, et quelques études ont été conduites à partir de biopsies de tissu cardiaque et sur des cellules provenant de divers vaisseaux sanguins. L'ensemble des données suggère une association entre des télomères courts dans le cœur de patients adultes avec défaillance cardiaque et autre MCV (340-342). De façon intéressante, une récente étude a démontré que les télomères plus courts chez des patients avec défaillance cardiaque sont spécifiques aux cardiomyocytes et non aux CML (341). Des études conduites sur des cellules endothéliales humaines ont montré que celles provenant d'artères coronaires de patients avec athérosclérose arborent des télomères plus courts que leurs comparses sains, suggérant une

implication des télomères courts dans l'athérogenèse (343). L'analyse des cellules endothéliales de l'aorte abdominale a révélé que la longueur des télomères corrèle plutôt avec le taux de renouvellement cellulaire qu'avec le grade d'athérosclérose (344). Il semble donc que les endroits de la vasculature étant soumis à un plus grand stress sur la paroi subissent un taux de renouvellement accru et ont en conséquence des télomères plus courts (344-346).

Tel qu'énoncé ci-haut, la majorité des données chez l'humain proviennent d'études conduites sur les leucocytes et autres globules blancs. Une étude systématique du National Health and Nutrition Examination Survey (NHANES) provenant de 7,252 participants a rapporté l'existence d'associations entre divers biomarqueurs cardiovasculaires et la longueur des télomères des leucocytes humains, dont l'adiposité (IMC, circonférence du tour de taille, pourcentage de gras corporel), la protéine C-réactive, le cholestérol (lipoprotéine à haute densité), les triglycérides, la résistance à l'insuline, la pression artérielle et la fréquence cardiaque (347). Il existe un nombre considérable d'études démontrant une association entre la présence de télomères courts dans les leucocytes et un risque accru d'infarctus du myocarde et de maladie cardiaque, ainsi qu'avec un taux de mortalité CV plus élevé (348-350). Il a été documenté dans des études observationnelles que les télomères courts extraits de globules blancs de la circulation sanguine périphérique (leucocytes, monocytes, lymphocytes) sont associés à l'hypertension (277), le diabète de type 2 (278), l'insuffisance cardiaque (351, 352), les accidents vasculaires cérébraux (353) et l'anévrisme de l'aorte abdominale (354). Par exemple, l'étude CHS (*Cardiovascular Health Study*) a révélé des associations inverses entre la longueur des télomères (TRF, pour *terminal restriction fragment*) et le diabète, le glucose, l'insuline, la pression artérielle diastolique, l'épaisseur de la carotide et l'interleukine-6. Après stratification selon l'âge, l'étude a également démontré que chaque paire de kilobase perdue en TRF correspondait à un risque trois fois plus élevé d'infarctus du myocarde et d'AVC (355).

L'étude la plus exhaustive répertoriée examinant l'association de la longueur des télomères et les maladies cardiovasculaires était une méta-analyse de 2014 comprenant 44,000 participants et 8,400 patients. L'étude résume les études prospectives et rétrospectives sur le sujet (356). Le risque relatif global pour les maladies coronariennes était de 1.54 dans toutes les études, 1.40 dans les études prospectives et 1.80 dans les études rétrospectives. Une seconde revue systématique et méta-analyse datant de 2015 rapporte une association positive constante entre une longueur réduite des télomères

provenant de leucocytes d'individus avec incidents cardiométaboliques, où une diminution d'une déviation standard en longueur de télomères est associée de façon significative à une augmentation de 21%, 24% et 37% du risque d'AVC, d'infarctus du myocarde et de diabète de type II, respectivement (357).

Un groupe a étudié la longueur absolue et la proportion de télomères courts dans les leucocytes dans un sous-groupe (n = 1271) de patients de l'étude LIFE (*Lifestyle Interventions and Independence for Elders*) avec un diagnostic d'hypertension et une hypertrophie du ventricule gauche (358). Il a été observé que la longueur des télomères au début de l'étude était associée avec une histoire médicale de maladie coronarienne chez l'homme et avec des incidents ischémiques transitoires chez la femme. La proportion de télomères très courts (< 5kb), mais pas la longueur moyenne des télomères, était associée avec le score du risque Framingham et avec les maladies cérébrovasculaires et le diabète de type 2 chez l'homme. Tout au long du suivi, la proportion de télomères courts au début de l'étude s'est avérée être un prédicteur de mortalité cardiovasculaire combinée, d'accidents vasculaires cérébraux et d'angine de poitrine chez l'homme et la femme, mais pas de l'infarctus du myocarde ni de la mortalité totale.

Paradoxalement, deux études ont observé une longueur des télomères leucocytaires à la hausse chez des patients avec une hypertrophie ventriculaire gauche, indépendamment de la pression artérielle (359, 360). L'explication n'est pas claire et les attentes étaient contraires aux résultats obtenus, compte tenu que l'HVG est souvent la conséquence de facteurs de risque comme l'hypertension. Malheureusement, l'étude LIFE n'a pas de données à ce sujet, malgré le fait que l'HVG était un critère d'inclusion.

L'ensemble de ces données suggère donc une relation entre le système télomères-téломérase dans le système cardiovasculaire. La plupart des résultats sont alignés avec les attentes et montrent une corrélation inverse entre la longueur des télomères et les facteurs de risque et MCV, mais le lien exact demeure à clarifier.

1.5.5 Les télomères et l'hypertension artérielle

Au début de cette section, nous avons couvert le concept voulant que les télomères soient en quelque sorte une horloge biologique des cellules et un marqueur du vieillissement cellulaire. Effectivement, nombreuses sont les études qui démontrent que la longueur des télomères est dépendante de l'âge et du nombre de divisions cellulaires (361, 362). Nous avons également soulevé que l'hypertension semble être une condition associée à un vieillissement accéléré des organes cible, conséquent à un taux accru de renouvellement cellulaire et résultant d'une prolifération et d'une apoptose à la hausse (65, 215). Il est donc aisé de conceptualiser l'association de la maladie hypertensive avec le système télomères-téломérase. En outre, la maladie hypertensive est associée à des niveaux de stress oxydant plus élevés qu'en conditions normales et la perte télomérique est elle aussi accélérée par le stress oxydant. Plusieurs groupes se sont penchés sur la question et ont fait évoluer les connaissances à cet égard. Les deux prochaines sections traiteront donc sommairement des évidences qui se sont dégagées de ces études.

1.5.5.1 Les études chez les modèles animaux

Plusieurs d'études dans différents modèles animaux et chez les humains ont fait le lien entre la télomérase, l'altération des télomères, une sénescence cellulaire accrue et l'hypertension, et ce dans différents tissus et types cellulaires. Notamment, des études chez les rats Dahl sensibles au sel et chez le SHR, deux modèles animaux établis d'hypertension artérielle, ont rapporté des niveaux à la hausse de stress oxydant combiné avec une longueur réduite des télomères dans le rein (215, 363) et le cœur (364).

Un autre groupe a étudié les effets du L-NAME (N(ω)-nitro-L-arginine methyl ester), un inhibiteur de la forme endothéliale de synthase du monoxyde d'azote, sur la sénescence vasculaire *in vivo* dans le tissu aortique de la souris (310). Ils ont observé que le tissu aortique des souris traitées avec le L-NAME arborait des niveaux d'expression plus élevés de p16, un médiateur clé de la sénescence induite par le stress, et une longueur de télomères réduites. Ces effets ont été renversés par un antagoniste oral du PAI-1 (inhibiteur de l'activateur du plasminogène 1). Un autre groupe démontré que les souris déficientes en TERC (*Terc*^{-/-}) développent l'hypertension et un raccourcissement des télomères progressif à chaque génération (365). Ce phénomène était associé à des niveaux sanguins et urinaires plus élevés d'ET-1. Ces souris présentaient en outre des niveaux élevés de ROS, comparativement à leurs comparses témoin. Les auteurs ont donc émis l'hypothèse que la déficience en activité télomérase et le raccourcissement des

télomères modifie les caractéristiques phénotypiques des cellules vasculaires de façon à favoriser le développement de l'hypertension (i.e. la production d'ET-1). De façon similaire, certaines études ont révélé que les cellules endothéliales progénitrices (CEP) provenant de patients hypertendus, de SHR et de rats DOCA-sel subissent une sénescence accélérée concomitante à une activité télomérase à la baisse (366).

Concernant le rôle que pourrait jouer la télomérase dans la prolifération des CMLV, nous avons vu à la section 1.5.4.1 que certaines études ont démontré que la prolifération des CMLV corrèle avec une activité accrue de la télomérase. Minamino et coll. ont démontré que la protéine kinase H7 supprime l'activation de la télomérase dans le cytoplasme et le noyau, et réduit également la croissance des CMLV aortique provenant du rat (334). Ils proposent un modèle mécanistique qui relie l'activation de la télomérase et la prolifération des CMLV. L'activation de TERT par modification post-transcriptionnelle via la phosphorylation pourrait allonger la durée de vie et la capacité de prolifération cellulaires, offrant un mécanisme de régulation qui permettrait de manipuler l'attrition des télomères et la sénescence cellulaire dans des maladies associées au vieillissement (304). Le groupe de Cao et coll. a pour leur part étudié l'expression de TERT et l'activité télomérase dans les CMLV de l'aorte de rats SHR en culture. Leurs résultats sont cependant contradictoires aux attentes, montrant une augmentation de l'expression de TERT et de l'activité télomérase. Ces changements sont survenus avant l'apparition de l'hypertension, et étaient accompagnés d'une élongation des télomères et d'une prolifération des CMLV de l'aorte. La régulation à la baisse de TERT par thérapie anti-sens a inhibé la prolifération et augmenté l'apoptose des CMLV en culture, une réponse abolie par une surexpression ectopique de p53 (335). Ces résultats suggèrent que l'activation précoce de la télomérase dans les CMLV de l'aorte contribuerait aux phases initiales de remodelage vasculaire pathologique dans l'hypertension. Leurs études ont cependant démontré que l'activité à la hausse de la télomérase était observée spécifiquement dans l'aorte du rat SHR. Effectivement, ils ont mesuré l'activité dans d'autres tissus, tel le cœur, le rein, le cerveau, les poumons, le foie, la rate, les testicules et du tissu de muscle squelettique et aucune différence n'a été observée entre les WKY et les SHR. Ceci suggère donc que la télomérase serait régulée de façon spécifique à l'organe chez le SHR, un concept qui est discuté plus loin au Chapitre 4 Chapitre 4 - Discussion.

1.5.5.2 Les études chez l'humain

Nous avons vu précédemment que la longueur des télomères dans les leucocytes et autres cellules blanches du sang proposait une valeur prédictive du risque de maladies cardiovasculaires; cette potentielle association est aussi documentée dans l'hypertension. Notamment, des études démontrent une corrélation inverse entre la longueur des télomères et la pression artérielle (367-369). Parmi ces études, il existe d'une part une sous-étude découlant de l'étude Framingham (277) et d'autre part l'étude CHS (355), ayant toutes deux confirmé l'association entre des leucocytes avec des télomères courts et l'hypertension. La première étude est particulièrement intéressante, car elle a à la fois établi le lien entre la résistance à l'insuline, le stress oxydant, l'hypertension et la longueur des télomères chez les sujets masculins de l'étude Framingham. Ils ont observé non seulement que les sujets hypertendus ont des télomères plus courts que leurs acolytes normotendus (après ajustement pour l'âge), mais aussi qu'un niveau plus élevé de stress oxydant est associé à des télomères plus courts (370).

Une étude réalisée sur une population chinoise a montré que les télomères étaient significativement plus courts ($p < 0,001$) chez les patients hypertendus ($n = 767$) comparativement aux sujets normotendus ($n = 379$). Au terme d'un suivi de 5 ans, les sujets avec télomères courts étaient à plus grand risque de développer une maladie coronarienne que ceux avec télomères plus longs (371).

Une autre étude a étudié l'association entre le polymorphisme A1166C du gène AT1R (récepteur de type I à l'Ang II) et la longueur des télomères avec l'hypertension artérielle (40 sujets avec HTA et 15 sujets contrôles normotendus) (372). La longueur moyenne des télomères leucocytaires était significativement plus courte chez les sujets hypertendus comparativement aux normotendus ($p = 0,049$). L'allèle homozygote AA1166 était la plus fréquente (92,8%) et était détectée chez 97,5% des patients hypertendus (versus 80% chez les normotendus; $p = 0,001$). Les auteurs ont conclu que l'allèle homozygote A1166 de gène AT1R et des télomères courts pourraient être des facteurs prédisposants pour l'HTA.

Tel que décrit dans la section 1.5.4.2, un groupe a étudié la longueur absolue et la proportion de télomères courts dans les leucocytes d'un sous-groupe de patients de l'étude LIFE ayant un diagnostic d'hypertension artérielle et d'HVG. Contrairement aux attentes, aucune association n'a été observée entre la longueur des télomères et la pression artérielle (358).

Une méta-analyse des études chez l'humain parue en 2017 a été conduite sur les données de la littérature disponibles jusqu'à 2015 et a examiné l'hypothèse que la longueur des télomères des leucocytes est reliée à l'hypertension. Les auteurs ont conclu que la longueur des télomères des leucocytes pourraient être plus courts chez les sujets hypertendus que chez les individus normotendus, mais que de plus grandes études contrôlant pour les facteurs confondants sont nécessaires afin de confirmer ces observations et explorer les sources d'hétérogénéité (373).

L'étude des télomères dans les maladies cardiovasculaires, et particulièrement dans l'hypertension, soulève de nombreuses questions, notamment la relation de cause à effet. Il n'est pas encore clair si la valeur de ce biomarqueur dépend d'une longueur réduite des télomères à la naissance ou si elle est la réflexion d'un rétrécissement accéléré au cours de la vie, consécutive à la pathologie, ou d'autre part, une combinaison des deux. Également, il reste à éclaircir si la détermination de la longueur des télomères dans les cellules blanches périphériques est un indicateur fiable la longueur des télomères dans les tissus cardiovasculaires, et si la longueur moyenne des télomères est la mesure la plus pertinente dans ce contexte. Ces points sont abordés plus loin dans le Chapitre 4.

1.5.6 La modulation pharmacologique des télomères dans le contexte des maladies cardiovasculaires

Malgré le nombre d'études grandissant sur les télomères et leur modulation, le niveau de connaissances sur leur modulation au moyen d'actions pharmacologiques est modeste dans le contexte des maladies cardiovasculaires.

Il a été démontré que l'aspirine pouvait prévenir la baisse de l'activité télomérase qui survient durant la sénescence endothéliale, notamment en prévenant la formation de ROS (374). Plusieurs études ont également démontré que la prévention de la génération de ROS contribue à restreindre le raccourcissement télomérique. D'ailleurs, une étude a démontré que le glutathion régule l'activité télomérase dans les fibroblastes (375) et que le N-acétylcystéine (NAC) et l'atorvastatine inhibent l'export

nucléaire de TERT et retardent donc la sénescence répliquative des cellules endothéliales (376). D'autre part, l'acide ascorbique (Asc2P) ralentit le raccourcissement des télomères relié à l'âge (377), et la catalase ralentit la vitesse à laquelle les télomères raccourcissent dans les cellules endothéliales (378). Finalement, la littérature suggère que le *ginkgo biloba* retarde la sénescence des CEP expliquée par une augmentation de l'activité télomérase (379).

Diverses études s'intéressant au rôle des statines dans la biologie des télomères ont également été publiées. Entre autres, il a été démontré que les inhibiteurs de la β -Hydroxy β -methylglutaryl-CoA (HMG-CoA) réductase augmentent l'activité de la télomérase, réduisent la sénescence des cellules endothéliales et des CEPs et augmentent leur prolifération (380, 381). Une étude subséquente a par la suite évalué l'implication des statines dans la biologie des télomères en cause dans l'amélioration fonctionnelle des CEPs. Les auteurs ont conclu que la sénescence de ces cellules ne découlait pas d'une érosion des télomères, mais bien d'une présence insuffisante de TRF2 et d'une expression quatre fois plus élevée de la kinase Chk2. Il a donc été proposé que les statines augmenteraient donc la capacité migratoire des CEPs en augmentant l'expression de TRF2 et en supprimant l'induction de Chk2 (382). D'autres études ont aussi démontré une influence sur les leucocytes. Une étude a révélé une plus grande activité de la télomérase et des télomères plus longs dans les cellules mononucléaires périphériques de sujets traités avec une statine. De plus, la diminution de la longueur des télomères reliée à l'âge était réduite par le traitement (383). L'étude WOSCOPS (*West of Scotland Primary Prevention Study*) a aussi révélé des résultats intéressants. Ils ont divisé les individus de l'étude en tertiles, selon la longueur des télomères des leucocytes. L'étude a non seulement révélé que la longueur des télomères dans les leucocytes était un prédicteur du risque de maladies coronariennes (risque presque 2 fois plus élevé dans les deux premiers tertiles), mais que les statines réduisaient ce risque chez les individus dans les deux premiers tertiles, i.e. ceux avec les télomères les plus courts (384). Cette observation remarquable mérite de l'attention, car la longueur des télomères pourrait donc également servir à identifier les individus qui pourraient éventuellement le mieux bénéficier de la thérapie, menant à de nouvelles avenues pharmacogénomiques.

Des données de la littérature démontrent une modulation de la télomérase, la prolifération et la longueur des télomères par la pioglitazone, un agoniste du récepteur gamma activé par les proliférateurs de

peroxyosomes (PPAR- γ), normalement utilisé pour le traitement du diabète de type 2. Il existe une évidence croissante que la pioglitazone améliore également les fonctions vasculaires et prévient la progression de l'athérosclérose (385). Une étude chez la souris a montré qu'un traitement de quatre semaines à la pioglitazone mène à une augmentation de l'activité de la télomérase, des protéines de liaisons aux télomères (TRF-2) et réduisait les marqueurs de sénescence cellulaires des cellules vasculaires (386). En contraste avec les observations dans les cellules endothéliales, la surexpression de PPAR- γ et la pioglitazone bloquent l'activité de la télomérase dans les CMLVs chez la souris. De plus, il a été rapporté que la pioglitazone réduit l'activité de la télomérase dans l'artère fémorale ayant subi une insulte par dénudation de l'endothélium (387). Ces observations laissent présager une possible régulation de la télomérase spécifique au type cellulaire, un concept similaire à la régulation spécifique à l'organe de la télomérase suggéré par Cao et coll. et décrit plus haut dans la section 1.5.5.1.

Il existe peu de données dans la littérature concernant la modulation pharmacologique des télomères dans le contexte de la maladie hypertensive. Chez l'animal, une étude a été répertoriée, et chez l'humain, des données d'un sous-groupe de patients de l'étude LIFE ont été analysées. L'étude répertoriée chez l'animal, effectuée par Baumann et coll., a étudié l'effet de l'hydralazine et du losartan sur le taux de renouvellement cellulaire et le vieillissement cellulaire dans le rein de rats SHR. De façon intéressante, seulement le losartan était associé à une réduction du stress oxydant et du taux de renouvellement cellulaire et des télomères plus longs, et ce malgré que l'hydralazine et le losartan aient réduit la pression artérielle de façon similaire (363). Cependant, l'étude LIFE, mentionnée à la section 1.5.5.2, a montré des résultats contradictoires quant à la modulation pharmacologique des télomères, et dans le cas actuel, par des antihypertenseurs (358). L'étude a été réalisée dans un sous-groupe de patients ayant un diagnostic d'hypertension et une hypertrophie du ventricule gauche et a étudié la longueur absolue et la proportion de télomères courts dans les leucocytes. Il est intéressant de noter que les deux médicaments utilisés dans cette étude, le losartan et l'aténolol, n'ont eu aucune influence sur les télomères.

L'ensemble de ces données révèle donc que d'autres études sont nécessaires afin de clarifier les mécanismes possibles de modulation pharmacologique des télomères, spécifiquement dans le contexte de la thérapie antihypertensive.

1.6 Hypothèses et objectifs généraux

L'hyperplasie cardiovasculaire associée à l'hypertension artérielle implique un déséquilibre entre la prolifération et la mort cellulaires. Ceci contribue à augmenter le taux de renouvellement cellulaire. Il a été démontré que les divisions cellulaires successives contribuent au vieillissement des cellules, notamment en induisant un raccourcissement télomérique. Au moment de l'élaboration et de la réalisation du projet, le concept que l'hypertension est associée à une modulation des télomères avait été démontré à plusieurs reprises, sans toutefois étudier l'aspect de la modulation des télomères par des antihypertenseurs. Les connaissances à ce sujet sont encore limitées à ce jour. Certaines classes d'antihypertenseurs peuvent renverser le remodelage cardiovasculaire pathologique. Les études initiales de notre laboratoire ont été parmi les premières à démontrer que cette régression s'accompagne d'une vague transitoire d'apoptose qui touche sélectivement une sous-population de CMLs aortiques et de fibroblastes du ventricule gauche.

Nous avons donc testé l'hypothèse que la régression de l'hyperplasie cardiovasculaire lors du traitement de l'hypertension par des inhibiteurs du SRA est associée à une modulation de la longueur des télomères. Les attentes consistaient à ce que l'administration de traitements connus pour éliminer les cellules et renverser l'hyperplasie soit associée à une augmentation de la longueur moyenne des télomères dans l'organe.

L'objectif de ce mémoire est donc de mesurer les changements dans la longueur des télomères du ventricule gauche et de l'aorte suite à des traitements antihypertenseurs connus pour réduire l'hyperplasie cardiovasculaire chez le SHR.

2 Chapitre 2 - Méthodologie

2.1 Procédures animales

Des rats mâles SHR et WKY (âgés de 12 semaines, pesant ~ 250g) ont été achetés chez Charles River (St-Constant, Canada) et hébergés pendant une semaine avant l'initiation de toute manipulation ou traitement. La nourriture et l'eau ont été administrées *ad libitum*. Les SHR (n=6-12/groupe) ont été assignés au hasard à un traitement soit à l'inhibiteur de l'enzyme de conversion de l'angiotensine énalapril maléate (30 mg•kg⁻¹•jour⁻¹ p.o. ; Sigma-Aldrich, Oakville, ON, Canada), soit à l'antagoniste sélectif des récepteurs AT₁, losartan (30 mg•kg⁻¹•jour⁻¹ p.o. ; courtoisie de Merck Frosst, Montréal, Canada) ou le vasodilatateur et relaxant de cellules de muscle lisse hydralazine (40 mg•kg⁻¹•jour⁻¹ p.o. ; Sigma-Aldrich). Les traitements ont été administrés dans l'eau de breuvage pendant 3 semaines. Les rats étaient pesés deux fois par semaine et le dosage des médicaments était ajusté selon le poids corporel et la quantité d'eau consommée. Les SHR témoin et les WKY ont reçu un véhicule (eau de breuvage seulement). Les rats ont été pesés et anesthésiés après les 3 semaines de traitement avec une injection intrapéritonéale de pentobarbital de sodium (60 mg•Kg⁻¹ Bimeda-MTC Animal Health Inc., Cambridge, ON, Canada). La pression artérielle a été mesurée directement dans l'animal par canulation de l'artère carotide avec un cathéter de polyéthylène PE50, utilisant un transducteur de pression (Harvard Apparatus, St Laurent, QC, Canada) et un système digital d'acquisition de données (Modèle MP 100, Biopac System, Harvard Apparatus). Les rats ont été tués par injection intraveineuse de 1 mL de CdCl₂ (100mmol⁻¹) afin d'induire un arrêt diastolique. L'aorte thoracique (sans l'adventice et dénudée de l'endothélium) et les deux ventricules du coeur ont été isolés et pesés. Une section équatoriale du ventricule gauche a été prélevée et un anneau de la média aortique a été isolé entre les troisième et quatrième artères intercostales. Ces échantillons de tissus ont été fixés dans une solution de paraformaldéhyde 4% pendant 24 heures avant d'être déshydratés et inclus dans la paraffine, selon les procédures histologiques habituelles. Le reste des organes a été congelé dans l'azote liquide et conservé à -80°C, jusqu'à l'extraction d'ADN.

2.2 Mesures d'hypertrophie et d'hyperplasie

L'aire de section de la média aortique a été évaluée sur des sections (3 µm d'épaisseur) de tissus colorées à l'hématoxyline (Sigma). Les photomicrographies ont été prises à un grossissement de 40X, numérisées

et analysées avec le logiciel NIH Image 1.61 (développé aux *National Institutes of Health*; <http://rsb.info.nih.gov/nih-image/>, maintenant ImageJ <https://imagej.nih.gov/ij/>). La moyenne des trois mesures a été calculée comme mesure finale. Les sections aortiques, au nombre de trois, ont été utilisées pour mesurer le nombre de cellules par unité de longueur dans la média aortique, utilisant la méthode du disecteur tridimensionnel, tel que décrite précédemment (120). Le ratio du poids de l'aorte et des ventricules gauche et droit sur le poids corporel ont également été calculés.

2.3 Manipulation de l'ADN

2.3.1 Extraction de l'ADN

La média aortique en entier et le ventricule gauche ont été pulvérisés dans l'azote liquide à l'aide d'un mortier et pilon. L'ADN tissulaire a été extrait par la méthode du phénol-chloroforme, suivant la digestion à la RNase A et protéinase K en présence d'EDTA, tel que décrit précédemment (46, 388). La concentration d'ADN a été déterminée par spectrophotométrie. Le contenu en ADN par mg de tissu extrait a été obtenu en multipliant la quantité d'ADN par le poids de l'aorte ou du ventricule gauche. La valeur obtenue a été ensuite ajustée pour la longueur de l'aorte, et ajustée pour le poids corporel dans le ventricule.

2.3.2 Évaluation de la dégradation de l'ADN

La dégradation de l'ADN a été évaluée par la migration de 200 ng d'ADN de chaque échantillon dans un gel d'agarose 1% pré-coloré au bromure d'éthidium (EtBr). L'électrophorèse a été faite dans du tampon TBE (Tris-Borate-EDTA) 0,5X à 80v pendant 1h. Une photo du gel a été révélée sous lumière UV. L'absence d'une trainée sous la bande d'ADN indiquait une bonne intégrité et qualité d'ADN.

2.4 Isolation des télomères

Des échantillons d'ADN génomique de 8 µg ont été digérés pendant la nuit à 37°C avec les enzymes de restriction *Hinfl* et *RsaI* (Invitrogen), lesquels ne coupent pas à l'intérieur de la séquence télomérique (TTAGGG)_n. (389). L'ADN digéré a été séparé par une électrophorèse sur gel en champ pulsé (PFGE, pour *pulsed field gel electrophoresis*) (CHEF-DR-III, Bio-Rad) sur un gel d'agarose pour champ pulsé (Bio-Rad). Les électrophorèses ont été conduites dans du TBE 0,5X, avec 20 pieds de tube tygon R-3603 pour la recirculation du tampon, enroulé dans un sceau d'eau de 20L, à température pièce (TP). Le gradient de

voltage était de 5V/cm et des intervalles de changement entre 0,4 et 10 sec ont été utilisés pendant 20,5 h. Le « Mid Range PFG Marker I » a été utilisé comme marqueur de poids moléculaire (PM) (New England Biolabs, MA) et un échantillon non digéré a été migré dans chaque gel pour exclure l'effet possible de la dégradation de l'ADN. Des échantillons d'ADN digérés provenant des cinq différents groupes expérimentaux ont été migrés sur le même gel à chaque expérience. Un échantillon standard était également inclus dans chaque gel pour normaliser les valeurs d'un gel à l'autre. Au terme de l'électrophorèse, les gels ont été examinés par une post-coloration à l'EtBr et ensuite photographiés. Les fragments d'ADN ont ensuite été transférés pour une durée de 4 h par immunobuvardage de type Southern sur une membrane de nylon chargée positivement (Hybond-XL, Amersham). Le transfert a été conduit à TP dans un tampon alkali (0,4M NaOH/1M NaCl). Les membranes ont ensuite été pré-hybridées dans le tampon d'hybridation Ultra Oligo-Hyb (Ambion) pour 1 h à 42°C avec agitation, et ensuite hybridées pendant la nuit avec une sonde télomérique. La sonde 5'-(TTAGGG)₄-3' (Gibco BRL), marqué avec du [γ -³²P]-ATP (GE Healthcare) a été utilisée et ensuite purifiée sur colonne de séphadex G-50 (Sigma-Aldrich). Les membranes ont été hybridées pendant la nuit à ³²P-(TTAGGG)₄-3' dans le tampon d'hybridation également à 42°C, avec agitation. Le lendemain, elles ont été lavées avec du SSC 2X, SDS 0,5%, suivi de SSC 0,1X et de SDS 0,1%, et exposées à un écran phosphore (Molecular Dynamics) toute la nuit. L'écran a été par la suite scanné par un Typhoon Trio Phosphor Imager (Amersham) et analysé par un logiciel d'analyse (Image Quant 5.1).

2.5 Analyse et quantification de la longueur des télomères

La longueur des télomères a été comparée en utilisant la méthode la plus conventionnelle, basée sur le calcul de la longueur moyenne des TRF (*terminal restriction fragment*), et selon une méthode décrite dans la littérature (390), basée sur le calcul du pourcentage des télomères se situant dans des intervalles de longueur définis selon le poids moléculaire. Comparativement à la méthode conventionnelle de calcul de la longueur moyenne, cette méthode aurait le potentiel de mieux refléter la sénescence cellulaire d'un sous-groupe de cellules et le vieillissement cardiovasculaire (358). Brièvement, l'intensité a été quantifiée de la façon qui suit : pour chaque échantillon télomérique, l'image du gel de migration a été divisé en 3 intervalles de poids moléculaire (courts, moyens, longs). Ces intervalles ont été définis de façon à maximiser la capacité de détecter la différence entre les souches de rats témoins SHR vs WKY. Dans le ventricule gauche, les télomères courts, moyens et longs ont été définis comme ceux ayant une longueur comprise entre 14-47 Kb, 48-134 Kb et 135-207 Kb, respectivement. Dans l'aorte, les télomères courts, moyens et longs ont été définis comme ceux ayant une longueur comprise entre 15-40 Kb, 41-115 Kb et

116-222 Kb, respectivement. Ces mêmes intervalles ont été ensuite utilisés pour analyser l'effet des traitements. Les intervalles pour ont été déterminés de manière indépendante pour le cœur et l'aorte. Le pourcentage de l'intensité du signal situé dans chaque intervalle de PM a été mesuré :

$\% = (\text{intensité de la région définie} - \text{bruit de fond}) \times 100 / (\text{intensité totale de l'échantillon migré} - \text{bruit de fond})$.

En utilisant la même image, la longueur moyenne des TRF a été évaluée pour chaque échantillon. Toute la longueur du signal a été divisée en intervalles d'environ 2,5 mm. La taille moyenne des TRF a été calculée selon la formule suivante :

$$\frac{\sum(\text{DO}_i - \text{bruit de fond} \times L_i)}{\sum(\text{OD}_i - \text{bruit de fond})}$$

où DO_i est la densité optique du signal et L_i , la longueur du fragment à la position i .

2.6 Analyses statistiques

Les différences intergroupes ont été examinées par analyse de variances (ANOVA) à un facteur avec une correction Dunnett pour comparaisons multiples, à l'aide du logiciel Prism 4.0. Tous les groupes ont été comparés au groupe SHR témoin. Les valeurs sont présentées en moyenne \pm erreur type de la moyenne (ESM). Le seuil de signification a été établi à $P < 0,05$.

3 Chapitre 3 - Résultats

3.1 Paramètres hémodynamiques et masse corporelle des animaux

Les valeurs de pression artérielle moyenne (PAM) sont montrées à la Figure 7. Comparativement aux rats normotendus, la PAM était significativement plus élevée chez les SHR témoin (80 ± 3 mmHg vs 180 ± 5 mmHg; $p < 0,01$). Les traitements avec l'hydralazine, l'énalapril ou le losartan ont provoqué une réduction significative de la PAM de $23 \pm 4\%$, $35 \pm 3\%$ et $20 \pm 3\%$, respectivement ($p < 0,01$). Le poids corporel moyen des rats avant le traitement était de 266 ± 2 g ($n=66$). Tous les rats ont pris du poids durant la procédure expérimentale pour atteindre 312 ± 2 g, mais les valeurs finales de poids corporel n'ont pas été affectées par les traitements (données non présentées).

3.2 Cœur

3.2.1 Changement des paramètres structuraux

Les changements structuraux ayant survécu dans le ventricule gauche sont résumés à la Figure 8. Les rats témoin présentaient une masse ventriculaire gauche (Figure 8A) significativement plus élevée par rapport aux rats normotendus ($2,82 \pm 0,05$ vs $2,38 \pm 0,03$; $p < 0,01$). Une réduction significative de l'HVG est survenue suite au traitement à l'énalapril ($2,17 \pm 0,04$; $p < 0,01$) et au losartan ($2,41 \pm 0,04$; $p < 0,01$). De façon inattendue, l'hydralazine a également induit une réduction significative de l'HVG ($2,49 \pm 0,03$; $p < 0,01$). Finalement, il n'y a eu aucun changement entre les groupes dans le ventricule droit quant à l'indice hypertrophique, tel que démontré à la Figure 9.

Afin d'évaluer l'efficacité des traitements à réduire le nombre de cellules surnuméraires (hyperplasie) dans le ventricule gauche, nous avons effectué une mesure du contenu en ADN, tel que présenté à la Figure 8B. Tel qu'attendu, le contenu en ADN chez les SHR témoin était significativement plus élevé par rapport aux rats normotendus ($4,8 \pm 0,2$ vs $4,1 \pm 0,2 \mu\text{g ADN/ g PC}$; $p < 0,01$). Par contre, seulement l'énalapril a réduit significativement le contenu en ADN ($3,9 \pm 0,1 \mu\text{g ADN/ g PC}$; $p < 0,01$). L'hydralazine et le losartan ont

montré une tendance à réduire le contenu en ADN, sans toutefois atteindre le seuil de significativité (losartan : $4,4 \pm 0,1$ μg ADN/ g PC).

3.2.2 Modulation de la longueur des télomères dans le ventricule gauche

Comme les changements structuraux dans le cœur surviennent dans le ventricule gauche, ce compartiment a été sélectionné pour nos études initiales de la longueur des télomères. Dans un premier temps, nous avons effectué une mesure de la longueur moyenne des TRF (*telomere restriction fragment*), dont les résultats sont présentés à la Figure 10. La longueur moyenne des TRF dans le cœur était significativement réduite ($p < 0,01$) chez les SHR témoins (56 ± 1 Kb), comparativement aux rats WKY (63 ± 1 Kb). En outre, seuls l'énalapril et le losartan ont induit une augmentation significative de la longueur moyenne des TRF ($61,1 \pm 0,5$ Kb et $61,2 \pm 0,6$ Kb, respectivement ; $p < 0,01$). Le traitement à l'hydralazine n'a pas changé la longueur moyenne des TRF ($57,3 \pm 0,2$ Kb), qui est similaire à celle des rats témoin.

Nous avons également effectué une analyse de la distribution des TRF (exprimés en unité de densité optique sur le gel de migration) en fonction de leur poids moléculaire (Kb). Tel qu'illustrée à la Figure 11A, la distribution des TRF chez les rats SHR témoins est déplacée vers les petits poids moléculaires, comparativement à celle des WKY. De plus, le pic du signal chez les SHR témoins est plus intense et situé plus à gauche et donc vers les plus petits poids moléculaires, comparativement au groupe WKY. Ceci révèle une plus grande proportion de télomères courts chez le SHR en comparaison au WKY. La Figure 11B compare les courbes des rats SHR témoins (rose) à celles des rats traités avec l'énalapril (bleu) ou le losartan (mauve). Chez les rats traités avec l'énalapril ou le losartan, on remarque un déplacement général de la courbe de distribution des TRF vers la droite par rapport aux SHR témoin, montrant une proportion réduite de télomères courts chez les rats traités avec les inhibiteurs du SRA.

La deuxième méthode d'analyse que nous avons adoptée consiste à calculer le pourcentage de l'intensité de la DO qui se situe dans trois intervalles de longueur de TRF, soient courts (TRF de 14 à 47 Kb), moyens (TRF de 48 à 134 Kb) et longs (TRF de 135 à 207 Kb). Une telle méthode permet de mieux faire ressortir l'effet des traitements sur la distribution de catégories de longueur des TRF. Ces résultats sont présentés à la Figure 12. Ils révèlent un enrichissement en télomères courts dans le ventricule gauche des

SHR témoin par rapport aux rats WKY ($65\pm 1\%$ vs $50\pm 3\%$; $p<0,01$) (Figure 12A). Il est intéressant de remarquer que seuls les inhibiteurs du SRA, l'énalapril ($55\pm 2\%$) et le losartan ($56\pm 2\%$), ont réduit significativement ($p<0,05$) la proportion de télomères courts chez le SHR. Le traitement à l'hydralazine n'a induit aucun changement ($61\pm 2\%$) et arbore des résultats comparables aux SHR témoin. La Figure 12B illustre l'effet sur la proportion de télomères de longueur moyenne. Les résultats montrent un appauvrissement en télomères moyens chez les SHR témoins, comparativement aux WKY ($29\pm 1\%$ vs $44\pm 3\%$ respectivement ; $p<0,01$). Cependant, seul l'énalapril a démontré un effet significatif (à la hausse) dans cet intervalle de longueur de TRF ($38\pm 2\%$; $p<0,05$). La Figure 12C révèle une tendance, quoique non significative, à l'enrichissement en télomères longs dans le groupe losartan. Aucune différence significative n'a été observée entre les groupes. Finalement, la Figure 12D représente le ratio des TRF courts sur les TRF longs, qui provient de la même analyse, mais exprimant les résultats différemment. Ce ratio est significativement plus bas que le groupe témoin ($9,6\pm 0,7$) chez les groupes WKY ($6,4\pm 0,4$; $p<0,05$) et losartan ($6,0\pm 1,1$; $p<0,05$). La même tendance a été observée dans le groupe énalapril sans toutefois atteindre le seuil de significativité ($7,7\pm 0,6$). L'hydralazine n'a eu aucun effet ($9,8\pm 0,7$) et le ratio semble même légèrement augmenté par rapport au groupe témoin.

3.3 Aorte

3.3.1 Changement des paramètres structuraux

L'effet des traitements sur l'hypertrophie et l'hyperplasie aortiques sont résumés à la Figure 13. Comparativement aux rats normotendus, la masse aortique, qui représente la mesure du poids mouillé de l'aorte, était significativement plus élevée chez les SHR témoins ($3,3 \pm 0,1$ vs $3,8 \pm 0,2$; $p < 0,01$). Les traitements avec l'énalapril et le losartan ont tous les deux réduit significativement la masse aortique de $15 \pm 2\%$ ($p < 0,01$). L'hydralazine a quant à elle induit une baisse non significative de $10 \pm 2\%$ de la masse aortique. L'hypertrophie de l'aorte a été mesurée par l'aire de section de la média aortique. Malgré le fait que la réduction de la masse aortique était exclusive aux inhibiteurs du SRA, il n'en allait pas de même pour l'aire de section aortique, dont les données sont présentées à la Figure 13B. En effet, l'hydralazine et les deux inhibiteurs du SRA ont respectivement induit une régression significative de l'aire de section de $11 \pm 2\%$ et $18 \pm 2\%$ ($p < 0,01$) par rapport aux rats témoins. Finalement, la Figure 13C montre la modulation du nombre de cellules musculaires lisses aortiques, qui a directement été calculée par la méthode du disecteur tridimensionnel. Par rapport aux rats normotendus, une augmentation significative du nombre de CML aortiques (hyperplasie) a été observée chez les rats SHR témoins (81 ± 4 vs 126 ± 6 ; $p < 0,01$). L'hyperplasie (exprimée en nombre de cellules par unité de longueur) observée chez les rats témoins a été normalisée par l'énalapril et le losartan seulement. Ils ont induit une réduction significative du nombre de CML de $27 \pm 3\%$ et $26 \pm 3\%$ respectivement ($p < 0,01$).

3.3.2 Modulation de la longueur des télomères

Les mesures sur les télomères dans l'aorte sont des résultats préliminaires. Nous n'avons pu effectuer de conclusions statistiques valables, dû au faible nombre d'échantillons dans chaque groupe. Tel qu'illustré à la Figure 14, la longueur moyenne des TRF dans l'aorte a été réduite de manière significative seulement avec le traitement au losartan ($67,0 \pm 0,1$ Kb; $p < 0,05$) par rapport au groupe témoin ($74,0 \pm 1,2$ Kb). L'énalapril tendait également à baisser la longueur moyenne des TRF dans l'aorte ($70,6 \pm 1,7$ Kb), sans toutefois atteindre un changement significatif. Quoique très minime, la tendance semble également être à la baisse quant à la longueur moyenne des TRF aortiques du groupe WKY.

L'analyse de la distribution des TRF en fonction de leur poids moléculaire est illustrée à la Figure 15. Tel qu'illustré à la Figure 15A, la distribution des TRF chez les SHR témoins (rose) est légèrement déplacée vers les petits poids moléculaires, comparativement à celle des WKY (gris). De plus, le pic du signal chez les SHR témoins est plus intense et situé plus à gauche comparativement au groupe WKY. La Figure 15B compare les courbes des rats SHR témoins (rose) à celles des rats traités avec l'énalapril (bleu) ou le losartan (mauve). Les pics d'intensité des trois courbes se situent sensiblement au même poids moléculaire. Cependant, chez les rats traités à l'énalapril ou le losartan, on y voit un léger déplacement de la deuxième portion de la courbe vers la droite. Finalement, il semble y avoir une plus faible proportion de télomères très longs chez les rats traités avec le losartan.

La Figure 16 montre les résultats présentés sous la forme de pourcentage de l'intensité de la DO selon différents intervalles de longueur dans l'aorte. Similairement aux résultats de longueur moyenne des TRF, il n'y a aucune différence statistiquement significative entre le pourcentage des TRF courts (15-40 Kb) (Figure 16A), moyens (41-115 Kb) (Figure 16B) et longs (116-222 Kb) (Figure 16C) dans l'aorte. Par contre, contrairement aux observations dans le ventricule gauche, le ratio des TRF courts/TRF longs, illustré à la Figure 16D, montre un résultat significatif à la hausse pour le groupe traité au losartan par rapport au groupe témoin ($3,0 \pm 0,1$ vs $2,1 \pm 0,2$; $p < 0,05$).

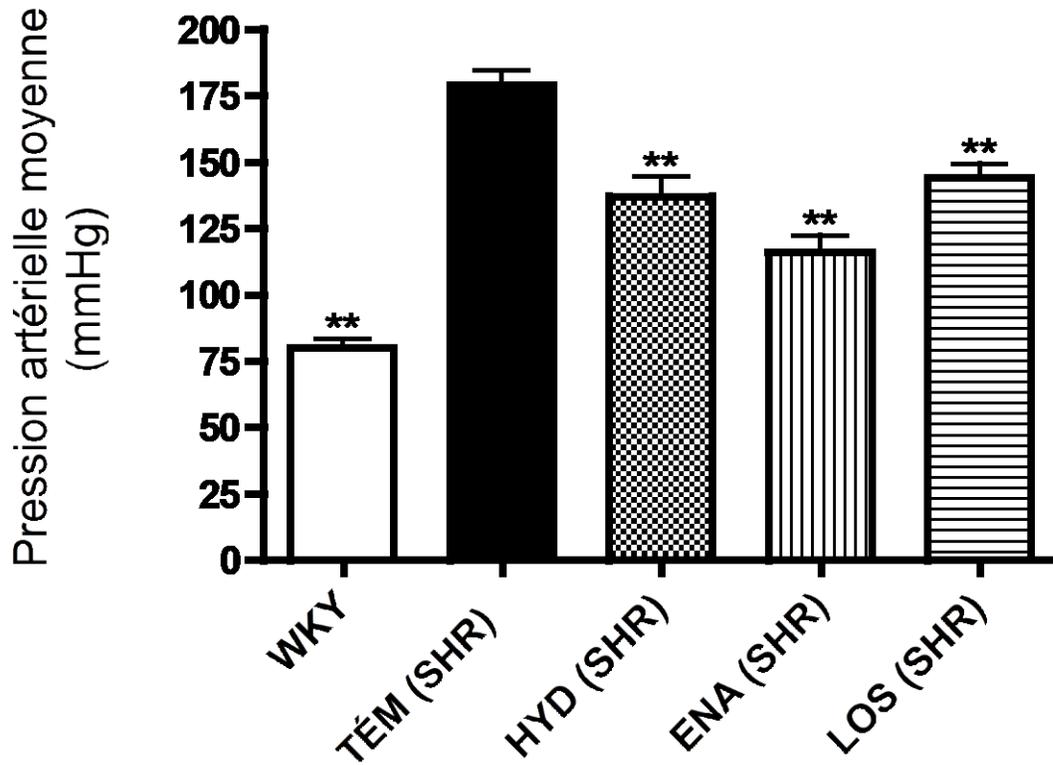


Figure 7. - Pression artérielle moyenne au terme des 21 jours de traitement

Le graphique représente la pression artérielle moyenne des rats normotendus WKY et des SHR traités avec un placebo, l'hydralazine, l'énalapril ou le losartan, telle que mesurée directement par canulation carotidienne au terme du traitement (moyenne \pm ESM). n = 11 (WKY) ; n = 11 (TÊM) ; n = 6 (HYD) ; n = 11 (ENA) ; n = 12 (LOS).

** Significativement différent ($p < 0,01$) du groupe hypertendu non traité (SHR).

TÊM : Témoin ; HYD : hydralazine ; ENA : énalapril ; LOS : losartan.

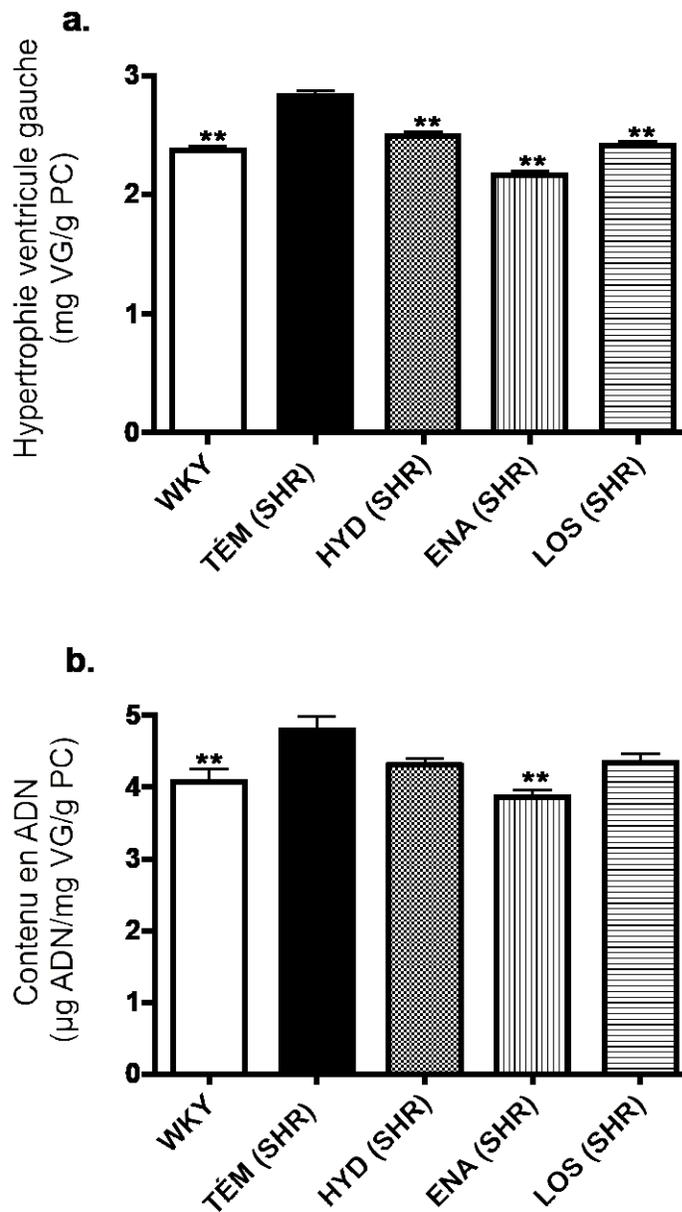


Figure 8. - Changements structuraux dans le ventricule gauche au terme des 21 jours de traitement

A. Hypertrophie ventriculaire gauche, obtenue en calculant le ratio du poids du VG sur le poids corporel (PC) de l'animal (moyenne \pm ESM). **B.** Le contenu en ADN du ventricule gauche (moyenne \pm ESM). n = 11 (WKY) ; n = 11 (TÉM) ; n = 6 (HYD) ; n = 11 (ENA) ; n = 12 (LOS). ** Significativement différent ($p < 0,01$) du groupe hypertendu non traité.

VG : ventricule gauche ; PC : poids corporel ; TÉM : Témoin ; HYD : hydralazine ; ENA : énalapril ; LOS : losartan

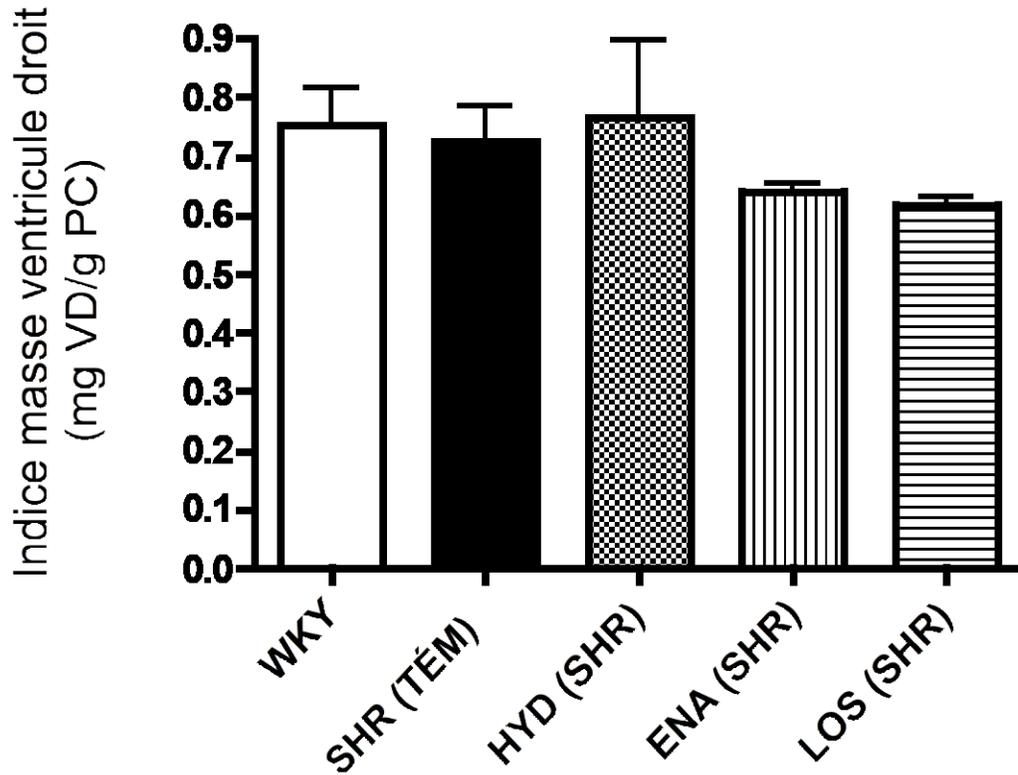


Figure 9. - Indice de masse du ventricule droit au terme des 21 jours de traitement

Le graphique représente l'indice de masse du ventricule droit des rats normotendus WKY et des SHR traités avec un placebo, l'hydralazine, l'énalapril ou le losartan, normalisé sur le poids corporel de l'animal. n = 11 (WKY) ; n = 11 (TÉM) ; n = 6 (HYD) ; n = 11 (ENA) ; n = 12 (LOS)..

VD : ventricule droit ; PC : poids corporel ; TÉM : Témoin ; HYD : hydralazine ; ENA : énalapril ; LOS : losartan

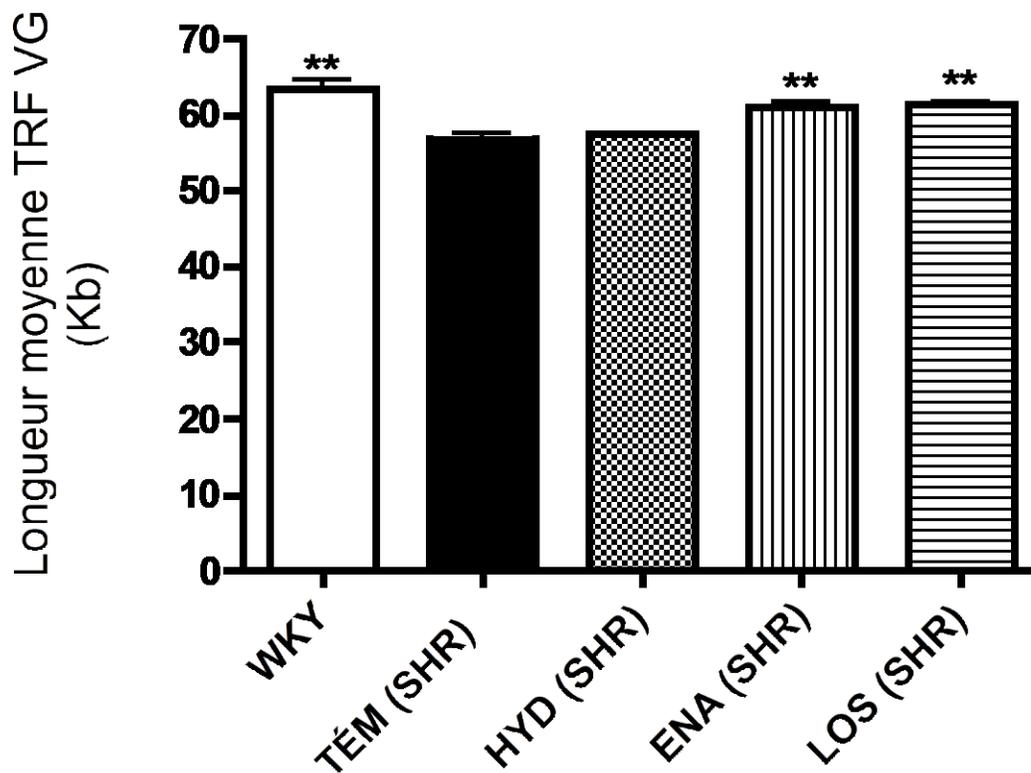


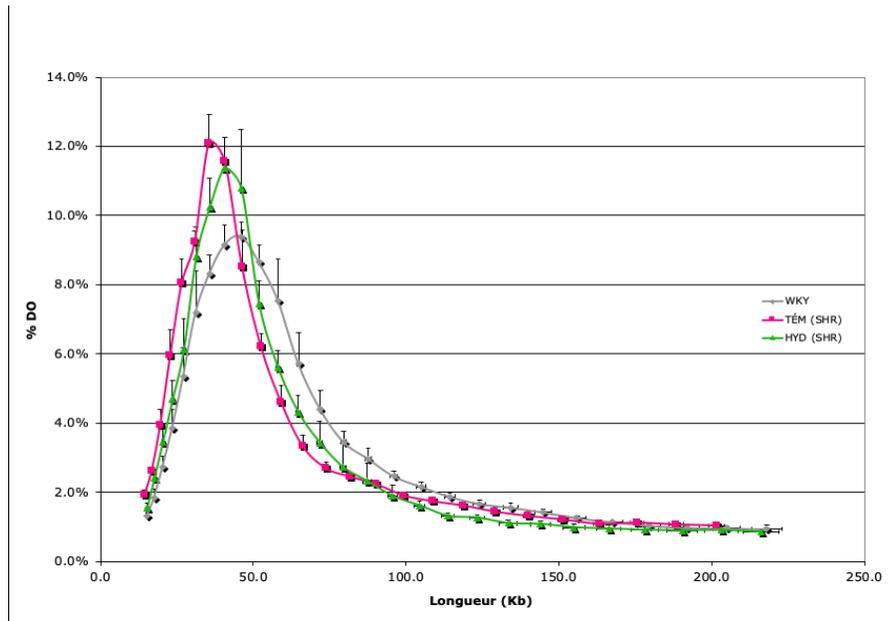
Figure 10. - Longueur moyenne des TRF dans le ventricule gauche

L'histogramme représente la longueur moyenne des télomères dans le ventricule gauche des rats normotendus WKY, des SHR traités avec un placebo, l'hydralazine, l'énalapril ou le losartan (moyenne \pm ESM). n = 5 (WKY) ; n = 5 (TÉM) ; n = 4 (HYD) ; n = 3 (ENA) ; n = 4 (LOS).

** Significativement différent ($p < 0,01$) du groupe hypertendu non traité.

TRF : *telomere restriction fragment* VG : ventricule gauche ; TÉM : Témoin ; HYD : hydralazine ; ENA : énalapril ; LOS : losartan

a.



b.

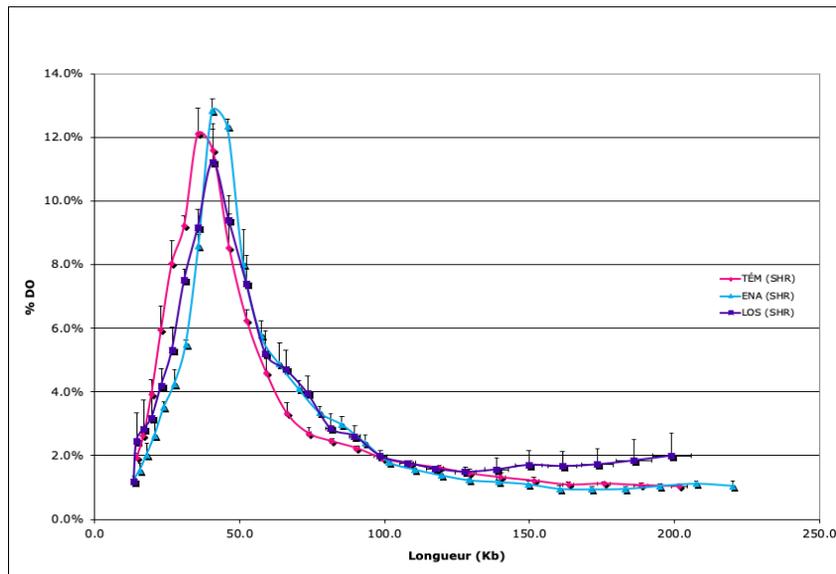


Figure 11. - Illustration de la distribution du signal télomérique dans le ventricule gauche

Les courbes représentent la distribution du signal d'hybridation détecté selon la proportion de la densité optique (DO) en fonction du poids moléculaire des télomères (Kb). **A.** Courbes des rats Wistar-Kyoto, SHR témoins et SHR traités à l'hydralazine. **B.** Courbes des rats SHR témoins, traités à l'énalapril et au losartan. n = 5 (WKY) ; n = 5 (TÉM) ; n = 4 (HYD) ; n = 3 (ENA) ; n = 4 (LOS). TÉM : Témoin ; HYD : hydralazine ; ENA : énalapril ; LOS : losartan

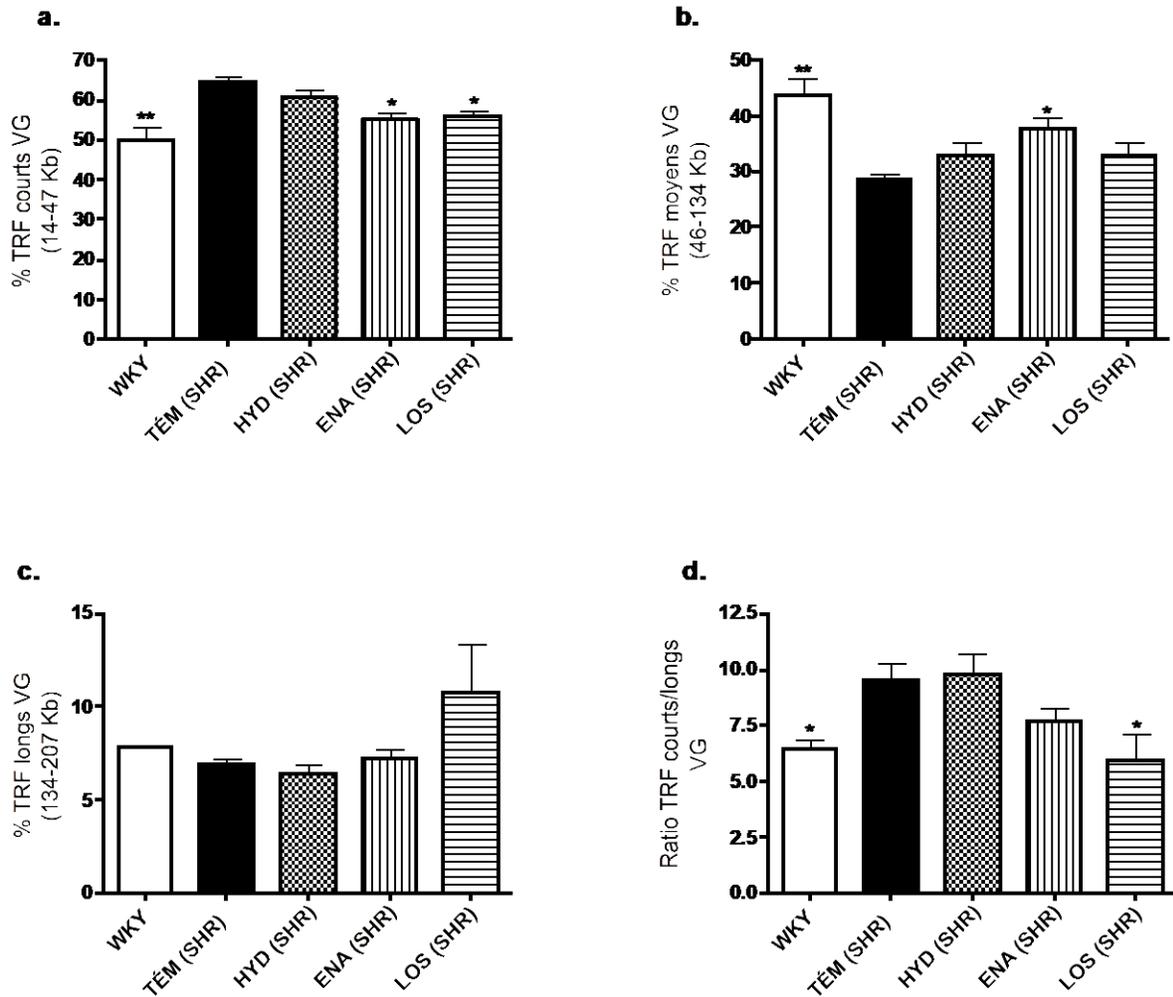


Figure 12. - Pourcentage du signal de la densité optique attribuable aux petits, moyens et longs TRF par rapport au signal entier dans le ventricule gauche

A. Proportion des TRF courts (14-47 Kb) dans le ventricule gauche (moyenne \pm ESM). **B.** Proportion des TRF de longueur moyenne (46-134 Kb) dans le ventricule gauche (moyenne \pm ESM). **C.** Proportion des TRF longs (134-207 Kb) dans le ventricule gauche (moyenne \pm ESM). **D.** Ratio des TRF courts sur les TRF longs dans le ventricule gauche. n = 5 (WKY) ; n = 5 (TÉM) ; n = 4 (HYD) ; n = 3 (ENA) ; n = 4 (LOS).

* Significativement différent ($p < 0,05$) du groupe hypertendu non traité. ** Significativement différent ($p < 0,01$) du groupe hypertendu non traité.

TRF : *telomere restriction fragment* VG : ventricule gauche ; TÉM : Témoin ; HYD : hydralazine ; ENA : énalapril ; LOS : losartan

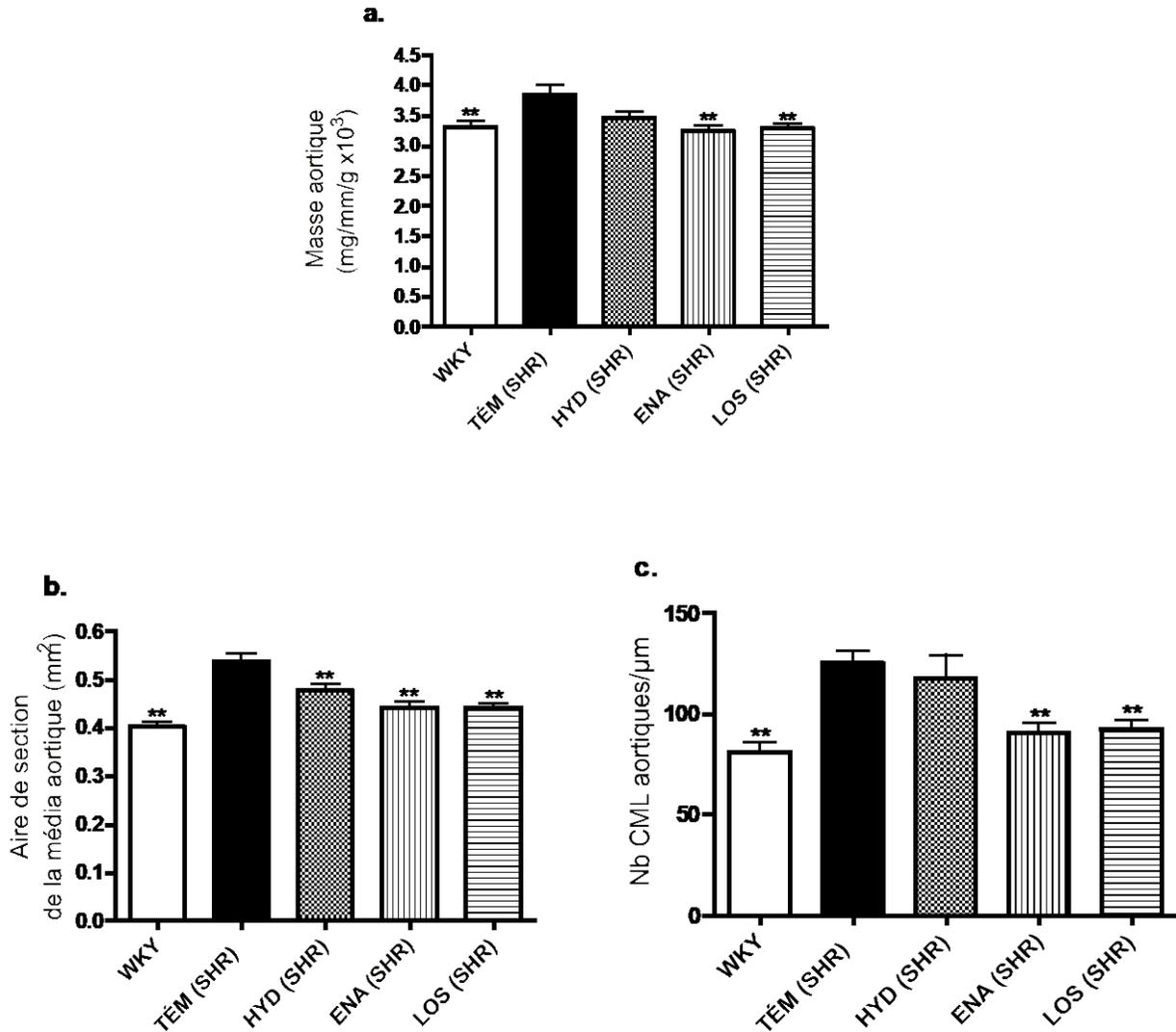


Figure 13. - Changements structuraux dans l'aorte au terme des 21 jours de traitement

- A.** Masse aortique médiale, évaluée par un ratio de la masse de l'aorte sur sa longueur et le poids corporel de l'animal (moyenne \pm ESM). **B.** Hypertrophie aortique médiale, évaluée par l'aire de section de la média aortique (moyenne \pm ESM). **C.** Hyperplasie aortique, évaluée par l'usage de la méthode du disecteur tridimensionnel et présenté comme le nombre de CML par unité de longueur (moyenne \pm ESM). n = 11 (WKY) ; n = 11 (TÉM) ; n = 6 (HYD) ; n = 10 (ENA) ; n = 12 (LOS). ** Significativement différent ($p < 0,01$) du groupe hypertendu non traité.

CML : cellules de muscle lisse; TÉM : Témoin ; HYD : hydralazine ; ENA : énalapril ; LOS : losartan

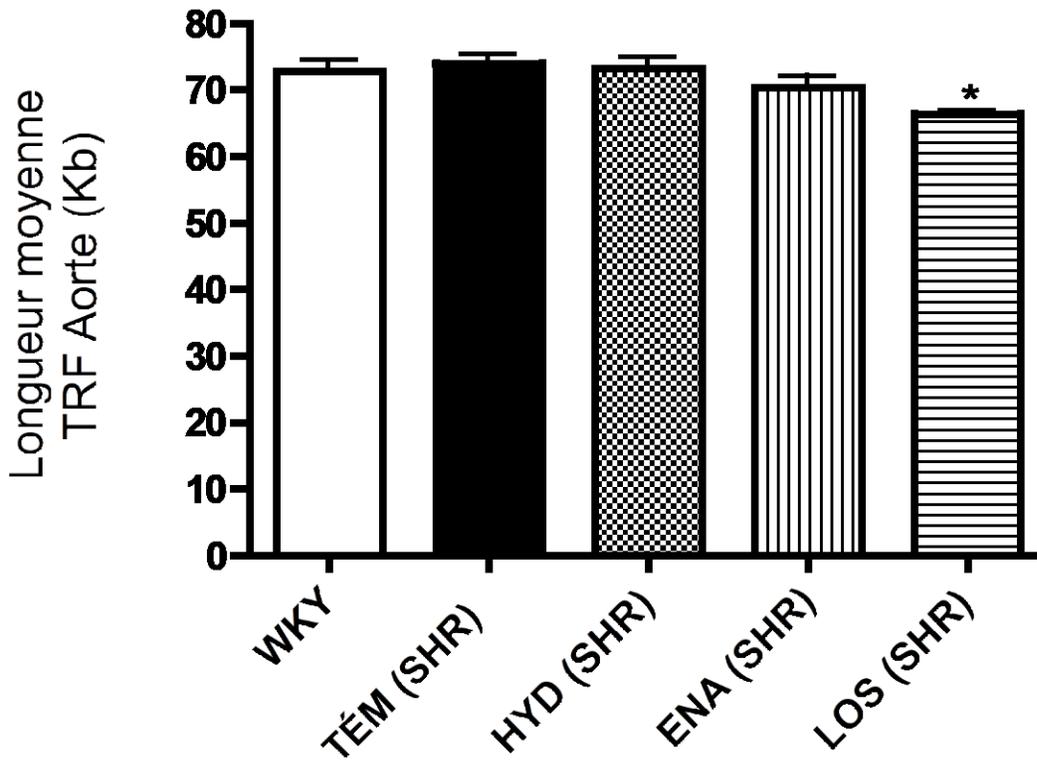


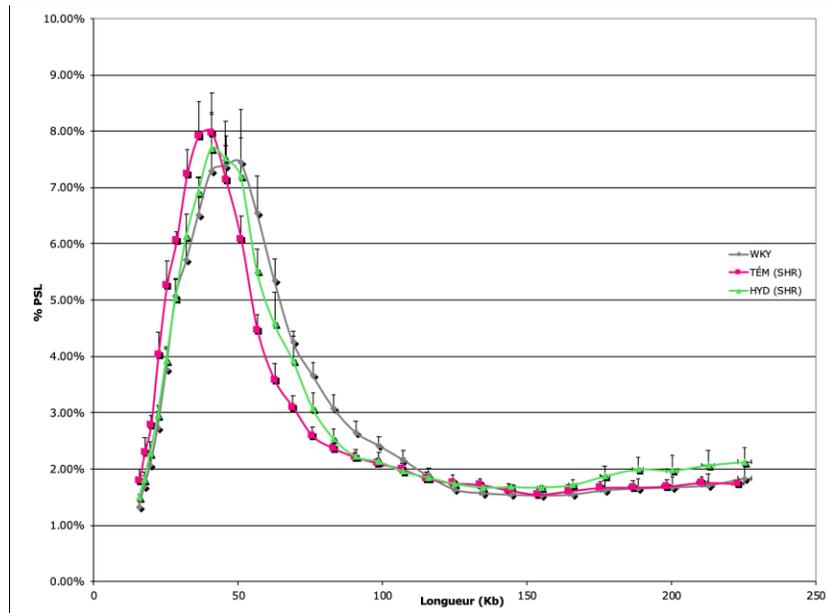
Figure 14. - Longueur moyenne des TRF dans l'aorte

L'histogramme représente la longueur moyenne des télomères dans l'aorte thoracique des rats normotendus WKY, des SHR traités avec un placebo, l'hydralazine, l'énalapril ou le losartan (moyenne \pm ESM). n = 5 (WKY) ; n = 7 (TÉM) ; n = 5 (HYD) ; n = 5 (ENA) ; n = 2 (LOS).

* Significativement différent ($p < 0,05$) du groupe hypertendu non traité.

TRF : *telomere restriction fragment* ; TÉM : Témoin ; HYD : hydralazine ; ENA : énalapril ; LOS : losartan

a.



b.

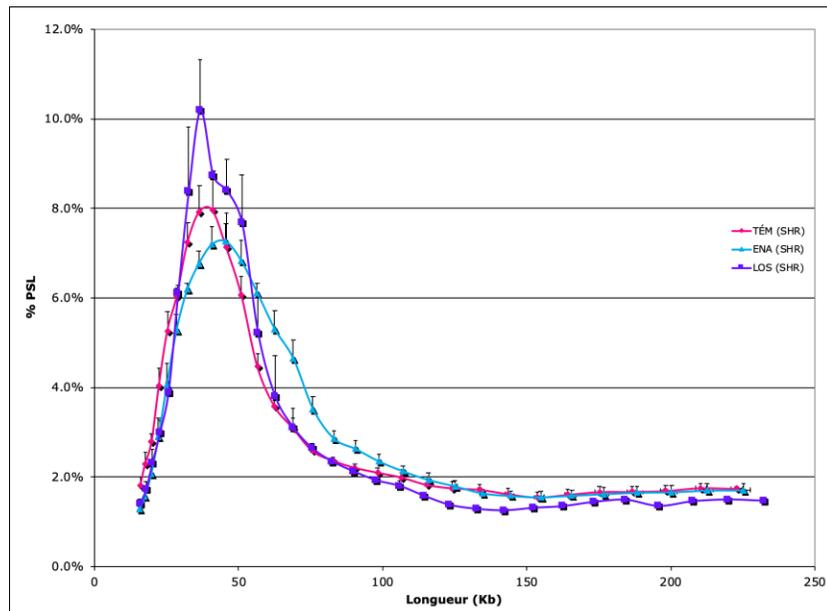


Figure 15. - Illustration de la distribution du signal télomérique dans l'aorte

Les courbes représentent la distribution du signal d'hybridation détecté selon la proportion de la densité optique (DO) en fonction du poids moléculaire des télomères (Kb). **A.** Courbes des rats Wistar-Kyoto, SHR témoins et SHR traités à l'hydralazine. **B.** Courbes des rats SHR témoins, traités à l'énalapril et au losartan. n = 5 (WKY) ; n = 7 (TÉM) ; n = 5 (HYD) ; n = 5 (ENA) ; n = 2 (LOS).

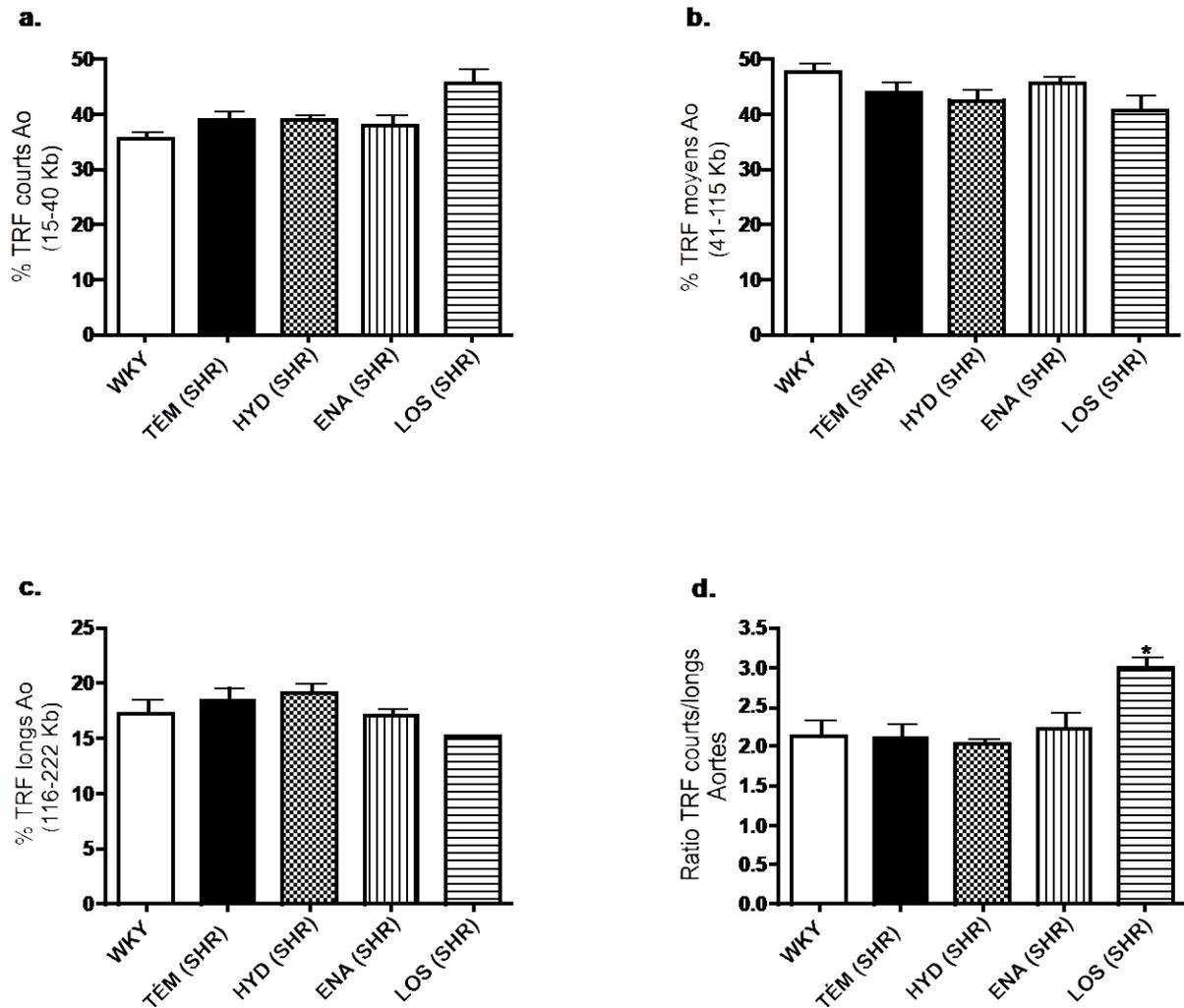


Figure 16. - Pourcentage du signal de la densité optique attribuable aux petits, moyens et longs TRF par rapport au signal entier dans l'aorte

A. Proportion des TRF courts (15-40 Kb) dans l'aorte (moyenne \pm ESM). **B.** Proportion des TRF de longueur moyenne (41-115 Kb) dans l'aorte (moyenne \pm ESM). **C.** Proportion des TRF longs (116-222 Kb) dans l'aorte (moyenne \pm ESM). **D.** Ratio des TRF courts sur les TRF longs dans l'aorte. n = 5 (WKY) ; n = 7 (TÉM) ; n = 5 (HYD) ; n = 5 (ENA) ; n = 2 (LOS).

* Significativement différent ($p < 0,05$) du groupe hypertendu non traité.

TRF : *telomere restriction fragment* Ao : aorte Tém : Témoin ; HYD : hydralazine ; ENA : énalapril ; LOS : losartan

4 Chapitre 4 - Discussion

Les résultats de l'étude démontrent que les télomères du ventricule gauche sont modulés par les traitements antihypertenseurs. Nos données évoquent l'existence d'une association entre la modulation de la longueur des télomères dans le ventricule gauche et, par inférence, des fibroblastes cardiaques, suite au traitement de la pathologie hypertensive avec des inhibiteurs du SRA, tel que l'énalapril et le losartan. En effet, la longueur moyenne des TRF dans le ventricule gauche était significativement plus élevée chez les SHR traités avec l'énalapril et le losartan, comparativement aux SHR témoins. La longueur moyenne des TRF des rats traités avec les iSRA était comparable à celle des rats normotendus WKY. Les analyses par intervalles de longueur de TRF (courts moyen et longs) vont également dans le même sens ; seuls l'énalapril et le losartan ont réduit de façon significative la proportion de télomères courts comparativement aux SHR témoins. On ne peut conclure que ces changements sont extrapolables à d'autres tissus cardiovasculaires cibles de l'HTN, comme le suggèrent nos résultats préliminaires avec l'aorte. En effet, dans ce tissu, une tendance inverse a été observée. Il est difficile d'interpréter les résultats et tirer des conclusions dans l'aorte, dû au très faible échantillonnage. Les résultats sont néanmoins intrigants et la possibilité que la régulation des télomères de l'aorte diffère de celle du cœur et d'autres organes n'est pas à exclure.

L'objectif principal de cette étude était d'étudier les changements dans la longueur des télomères de l'aorte et du ventricule gauche suite à des traitements antihypertenseurs connus pour réduire l'hyperplasie cardiovasculaire chez le SHR. Plus spécifiquement, une comparaison sur l'effet de la longueur des télomères entre un vasodilatateur direct, l'hydralazine, ainsi que deux inhibiteurs du SRA, l'énalapril (inhibiteur de l'ECA) et le losartan (antagoniste des récepteurs AT_1 de l'Ang II), dans un modèle de rat hypertendu. Nous nous sommes donc intéressés à la présence ou non d'une association entre la régression du remodelage cardiovasculaire pathologique observée avec certaines classes d'antihypertenseurs pouvant renverser l'hyperplasie par une vague transitoire d'apoptose et la modulation de la longueur des télomères.

Nous avons en premier lieu validé que les traitements avaient exercé leur action antihypertensive, notamment en mesurant la pression artérielle au terme du traitement. Tel qu'attendu, l'énalapril, le losartan et l'hydralazine ont été aussi efficaces les uns que les autres à réduire la tension artérielle du SHR. De cette façon, la possibilité qu'une éventuelle différence au niveau des autres paramètres mesurés soit attribuable à une différence de pression artérielle fût écartée. Nous avons choisi d'incorporer l'hydralazine dans notre design d'étude sur la base de nos résultats publiés afin d'isoler l'effet de la baisse de pression artérielle. Ce médicament n'avait effectivement pas démontré d'effet au niveau du renversement de l'hyperplasie par une vague transitoire d'apoptose. De cette façon, il était permis d'écarter la possibilité d'expliquer nos changements par un effet hypotenseur et ainsi consolider les avantages thérapeutiques différentiels des médicaments modulant le SRA. Or, comme l'intérêt principal de l'étude était de vérifier la relation entre le renversement de l'hyperplasie et la longueur des télomères, il était souhaitable de vérifier quelques paramètres de nos assomptions de départ quant à l'hyperplasie dans l'aorte et le contenu en ADN dans le ventricule gauche.

4.1 Ventricule gauche

4.1.1 Modulation du remodelage pathologique et de la longueur des télomères dans le ventricule gauche

4.1.1.1 Renversement du remodelage pathologique

Les résultats de l'index d'hypertrophie du ventricule gauche concordent avec ce qui fut précédemment rapporté avec l'énalapril et le losartan (100, 117). L'hypertrophie cardiaque observée chez le SHR (résultats non présentés) est effectivement attribuable à une hypertrophie du ventricule gauche seulement, tel que démontré par l'absence de changement de l'indice de masse du ventricule droit et un indice de masse du ventricule gauche plus élevé comparativement au WKY. L'hydralazine a également réduit la masse du ventricule gauche, illustrant donc que l'HVG est contrôlée par une combinaison de facteurs endocrines et hémodynamiques. La littérature rapporte en effet que la réduction de l'HVG chez le SHR ne serait pas exclusive aux inhibiteurs du SRA et s'observe dans d'autres classes, tel que les BCC et la moxonidine, un agoniste des récepteurs imidazoliques I1 à action centrale (391, 392). À ce jour, la contribution des facteurs hémodynamiques et endocrines à réguler l'HVG est encore mal définie. Il aurait été intéressant

d'effectuer le décompte cellulaire des non-cardiomyocytes, une méthode plus sensible et qui permettrait possiblement d'obtenir des clarifications aux données discordantes entre nos résultats et ceux publiés antérieurement par notre groupe. Il est possible que la taille des cellules ait été modulée, ou, plus probablement, que l'ADN ait perduré dans le tissu, même après la mort cellulaire, particulièrement dans le groupe traité au losartan. Peut-être qu'un traitement plus prolongé aurait permis de mieux différencier les effets sur le remodelage cardiaque entre les différentes classes de médicament. L'énalapril a pour sa part induit une réduction significative du contenu en ADN, un résultat qui rejoint ce qui a déjà été démontré par le passé (117). Une étude précédemment publiée par notre groupe utilisant cette méthode a démontré que l'hydralazine n'induisait aucun effet sur le décompte cellulaire, tandis que le losartan avait diminué de façon significative le nombre de cellules (117). En reproduisant ces résultats, nous serions en mesure de confirmer l'assomption de départ voulant que dans le ventricule gauche, la réduction de l'hyperplasie dans notre modèle passe principalement par des voies endocrines indépendantes de la pression artérielle.

4.1.1.2 Longueur des télomères cardiaques

Nous avons observé un effet exclusif des inhibiteurs du SRA sur la longueur des télomères. En absence de traitement, l'hypertension est associée à une prédominance de cellules avec télomères courts dans le ventricule gauche. Cette observation est notée dans les trois méthodes d'analyse des TRF. Il est intrigant de spéculer qu'une sous-population de non-cardiomyocytes, principalement les fibroblastes, soit responsable de la longueur moyenne plus faible des TRF et, pareillement, de la plus grande proportion de télomères courts dans le ventricule gauche du SHR. Comme il a été rapporté précédemment que les non-cardiomyocytes sont surnuméraires chez le SHR et que ceux-ci sont soumis à un renouvellement cellulaire accru, il est tentant de conceptualiser que cette population de cellules ait des télomères plus courts que les cardiomyocytes, sans compter que l'ADN de VG provient de manière prédominante des cellules du compartiment non--cardiomyocytaire. Le raccourcissement télomérique observé pourrait donc être la conséquence d'un vieillissement cellulaire accéléré dans le ventricule gauche, provenant d'une prolifération cellulaire accrue dans une sous-population de fibroblastes. Outre le renouvellement cellulaire, il est possible qu'une hausse du stress oxydant ait un rôle à jouer. Tel que rapporté dans l'introduction, il a été émis que la longueur des télomères est non seulement dépendante du nombre de divisions cellulaires, mais qu'elle est aussi affectée par les niveaux de stress oxydant (393, 394). Dans la

maladie hypertensive, le stress oxydant engendre des modifications post-transcriptionnelles (oxydation et phosphorylation) de protéines et une signalisation aberrante menant à des dommages cellulaires et tissulaires (395, 396). Il a été démontré que les inhibiteurs du SRA réduisent le stress oxydant dans le cœur de SHR (397-399), supportant ainsi l'hypothèse que l'effet observé par les inhibiteurs du SRA impliquerait une baisse des niveaux d'espèces réactives oxygénées.

De façon globale, nos résultats sur les télomères cardiaques sont compatibles avec de nombreuses études chez l'animal et chez l'humain (367, 368, 373). Bien que certaines études rapportent des résultats contradictoires à nos données, la majorité des études a été effectuée dans des modèles et organes différents aux nôtres. Les données évoquent un lien entre l'altération du système télomères-téломérase et l'hypertension, plus précisément une corrélation inverse entre la longueur des télomères et la pression artérielle. Nous n'avons répertorié aucune étude dans un modèle similaire au nôtre ayant étudié les télomères dans le cœur. Le modèle se rapprochant le plus au nôtre est celui du rat Dahl sensible au sel, un modèle ayant montré des résultats qui supportent nos observations. Dans ce modèle, une diète à teneur élevée en sel induit une hausse significative de la pression artérielle et une hypertrophie du VG comparativement aux rats recevant une diète à teneur normale en sel. Ces observations sont associées à une réduction de la longueur des télomères, de l'activité de la télomérase et des niveaux de TERT (364).

Il n'est pas encore clair si la longueur des télomères est un reflet d'une longueur réduite à la naissance, d'un rétrécissement accéléré au cours de la vie consécutive à la pathologie, ou une combinaison des deux. Il est intéressant de noter que les patients atteints de dyskératose congénitale, une maladie génétique caractérisée par une activité de la télomérase réduite et des télomères très courts, ne semblent pas développer de maladies cardiovasculaires communément associées à l'hypertension. Certaines atteintes vasculaires y sont rapportées, mais les données sont récentes et limitées (400). Une étude chez la souris sans télomérase (*Terc*^{-/-}) a démontré que les télomères courts sont associés à un effet protecteur dans le développement de l'athérosclérose, ne supportant donc pas un rapport causal dans ce modèle (401). Ces deux études n'ont pas étudié l'association avec l'hypertension directement, mais offrent néanmoins une perspective intéressante. Une des études les plus pertinentes à notre modèle est celle du groupe de Chiu et coll., qui supporte que les télomères courts seraient une conséquence et non une cause de l'hypertension (402). L'étude a voulu déterminer s'il existait une différence dans la longueur des télomères

entre des souris hypertendues et normotendues avant l'établissement de l'hypertension (4 semaines) et à des points établis dans le temps suite à l'établissement de l'hypertension (12 et 20 semaines). Les résultats n'ont révélé aucune différence dans la longueur des télomères à 4 semaines d'âge dans le rein et le cœur. Une fois la maladie hypertensive établie, les souris hypertendues arboraient des télomères plus courts comparativement aux souris contrôles à 12 et à 20 semaines, et ce dans le rein et dans le cœur. Leurs résultats suggèrent donc que les différences dans la longueur des télomères sont plutôt une conséquence de l'hypertension et non une cause dans ce modèle de souris (402). Des études supplémentaires dans d'autres modèles et des études longitudinales chez l'humain seraient nécessaires afin de vérifier ces observations.

4.1.1.2.1 Effet des traitements sur les télomères du ventricule gauche

Les données obtenues avec l'inhibiteur de l'enzyme de conversion (énalapril) et l'antagoniste AT₁ (losartan) appuie une partie de l'hypothèse de départ. Il est intrigant de spéculer que la régression de l'hyperplasie cardiaque suite aux traitements, quoi que non testée directement dans ces recherches, soit associée à une modulation de la longueur des télomères cardiaques, qui soit accompagnée par une perte de fibroblastes cardiaques avec télomères courts. La longueur moyenne des TRF chez les SHR traités avec l'énalapril et le losartan est significativement plus élevée par rapport aux SHR témoins et SHR traités avec l'hydralazine. Nous observons même une normalisation de la longueur moyenne des TRF en comparant avec les données des rats WKY normotendus. Le traitement avec l'énalapril et le losartan résultent chacun en une longueur moyenne des TRF à la hausse. Un des éléments intéressants se situe au niveau des très hauts poids moléculaires. Il semble que le losartan conserve mieux les cellules avec des télomères très longs, à en voir l'intensité marquée du signal correspondant aux hauts poids moléculaires.

Tel qu'attendu, nous n'avons observé aucun effet statistiquement significatif sur la modulation des télomères dans le ventricule gauche chez les SHR traités avec l'hydralazine, comparativement aux télomères des SHR témoins. Ce résultat valide une hypothèse importante de notre modèle ; ceci révèle que la baisse de pression artérielle à elle seule ne permette pas une modulation de la longueur des télomères, et que des mécanismes non hémodynamiques, tel que la vague transitoire d'apoptose des non-cardiomyocytes, soient impliqués dans ce phénomène. Les mécanismes suggérés étant la capacité à réduire l'hyperplasie et le taux de renouvellement cellulaires, des effets observés avec les inhibiteurs du

système rénine-angiotensine. Nous spéculons que la normalisation de la longueur des télomères observée avec les inhibiteurs du SRA pourrait être expliquée par l'élimination des cellules surnuméraires dans le ventricule gauche. Les hypothèses concernant les mécanismes impliqués sont discutées ci-bas.

4.1.1.2.2 Hypothèse sur le mécanisme d'action des inhibiteurs du SRA sur la longueur des télomères cardiaques.

À la lumière des observations décrites ci-haut, les SHR traités avec les inhibiteurs du SRA arborent des cellules avec des télomères significativement plus longs que les SHR témoins. Ce phénomène n'est pas observé chez les rats traités avec l'hydralazine, ce qui nous amène donc à nous questionner sur le ou les mécanisme(s) impliqué(s).

L'hypothèse que ces traitements allongent les télomères, impliquant donc une activation de la télomérase, est peu probable. Bien que l'idée que ces antihypertenseurs aux mécanismes d'action complexes et multiples puissent augmenter l'activité de la télomérase cardiaque soit attrayante, elle demeure peu réaliste. En effet, nous croyons que ces médicaments pourraient plutôt renverser le vieillissement tissulaire, en éliminant les vieilles cellules. Même s'il est de plus en plus accepté que certains myocytes cardiaques peuvent se régénérer au cours de la vie (105, 106, 403), le cœur étant un organe constitué principalement de cellules somatiques et la télomérase n'étant que très peu active dans ce type cellulaire, du moins chez l'humain, cette hypothèse est peu envisageable. De plus, la durée du traitement (3 semaines) n'alloue que très peu de temps, même dans l'optique où la télomérase soit activée, pour allonger de quelques milliers de paires de base les télomères cardiaques.

Le mécanisme le plus probable serait plutôt que la vague transitoire d'apoptose cellulaire engendrée par les inhibiteurs du SRA élimine cellules cardiaques surnuméraires, ici les fibroblastes, avec les télomères plus courts, préservant ainsi les fibroblastes avec télomères moyens ou longs de l'élimination. Cette hypothèse est compatible avec les études antérieures démontrant que l'apoptose induite par les iSRA chez le SHR survient dans les fibroblastes cardiaques (85, 100, 117, 133, 227, 229). L'érosion des télomères est une des caractéristiques observées dans les cellules sénescents, et la sénescence cellulaire est intimement reliée à certaines maladies liées au vieillissement, tel que l'hypertension. Il est donc probable que les cellules avec télomères courts expriment des marqueurs de sénescence cellulaire ou arborent

d'autres caractéristiques et modifications nucléaires qui déclencheraient le processus d'activation des caspases menant à la mort cellulaire par apoptose, spécifiquement dans ces cellules plutôt que dans les autres cellules. Par exemple, il est probable que la polypléidie fasse partie des caractéristiques de ces cellules, un phénomène observé lors du remodelage pathologique hypertensif. Effectivement, il a été démontré qu'il y a une accumulation de cellules polypléides dans le cœur (108). Il a également été rapporté que, dans le cœur, l'accumulation de cellules polypléides est renversée suite à un traitement avec l'énalapril et le losartan (108). La présence de ces cellules « âgées » est due, entre autres, au renouvellement cellulaire accéléré causé par une augmentation de la prolifération et de l'apoptose, des phénomènes spécifiques et propres aux rats SHR qui ne sont pas observés chez les rats WKY (133).

L'élimination sélective des cellules avec télomères courts et sénescents est décrite dans la littérature comme étant de la « sénolyse ». Ce phénomène a été décrit dans des modèles génétiques et pharmacologiques qui ont montré un renversement des changements phénotypiques et pathologiques liés au vieillissement (300, 315, 404, 405). Nous supposons que les inhibiteurs agissent comme agents « sénolytiques » et que cette vague transitoire d'apoptose cellulaire engendrée par les inhibiteurs du SRA contribue à maintenir un ventricule gauche avec des cellules plus saines, moins « âgées » et dont la durée de vie sera plus longue. Cette hypothèse d'élimination préférentielle de cellules avec télomères courts est compatible avec les résultats obtenus avec l'hydralazine. En effet, ce dernier traitement n'induit pas de renversement de l'hyperplasie ni de vague d'apoptose, et on n'y a observé aucun changement dans la longueur des télomères. Il est donc peu probable que la seule baisse de pression soit impliquée comme mécanisme important dans notre modèle. Cette hypothèse est alignée avec l'étude de Baumann et coll. (363), qui a démontré que le losartan, et pas l'hydralazine, était associé à des télomères plus longs, comparativement aux SHR témoins dans le rein. Le losartan était également associé à une réduction du stress oxydant et du taux de renouvellement cellulaire, deux pistes potentielles pour expliquer les mécanismes impliqués.

Nous suggérons que les inhibiteurs du SRA induisent une élimination préférentielle des fibroblastes cardiaques présentant des caractéristiques cellulaires aberrantes observées dans les cellules sénescents, et préservent les cellules les plus saines de l'organe. Afin de vérifier cette hypothèse, il serait de mise dans un premier lieu de confirmer l'établissement de la sénescence cellulaire dans notre modèle, et ainsi

observer les différences entre les groupes. Tel que décrit précédemment, il n'existe pas de marqueur direct de la sénescence cellulaire et celle-ci doit être définie par une combinaison de marqueurs. Dans un deuxième temps, il serait pertinent de tester un agent sénolytique connu, comme par exemple la combinaison D + Q ou le ABT-263 (navitoclax), et effectuer des mesures de décompte cellulaire et de longueur des télomères. Si notre hypothèse est vraie, l'attente serait d'observer des résultats similaires aux iSRA sur ces paramètres. Il serait intrigant de mesurer d'autres paramètres reliés au remodelage pathologique hypertensif dans le VG, tel que l'hypertrophie, la compliance et le contenu en collagène et observer si la fonction du VG s'en voit améliorée. Finalement, il serait également intéressant de valider les observations au terme de cette étude en faisant une comparaison directe avec d'autres modulateurs du SRA, comme l'aliskirène, la dernière percée thérapeutique dans le domaine des antihypertenseurs et premier de sa classe (inhibiteur de la rénine). Comme les BCC ont eux aussi la capacité de renverser l'hyperplasie dans notre modèle, il serait sans doute intéressant d'ajouter un groupe de comparaison et ainsi déterminer si les observations découlent d'un passage exclusif et obligatoire par l'inhibition du SRA.

4.2 Aorte

4.2.1 Modulation du remodelage pathologique et de la longueur des télomères dans l'aorte

4.2.1.1 Renversement du remodelage pathologique

Les résultats en lien avec les changements de masse dans la média aortique sont généralement similaires à ceux déjà observés auparavant, à l'exception des résultats sur l'aire de section chez les rats traités avec l'hydralazine. Dans un premier temps, une des caractéristiques importantes du modèle SHR a été validée, soit l'hypertrophie de la média de l'aorte thoracique, se traduisant par une masse et une taille plus élevées, comparativement aux rats normotendus WKY.

Cependant, à l'instar des résultats observés dans le ventricule gauche, nous avons observé de légères discordances sur l'effet de l'hydralazine sur le remodelage pathologique de l'aorte. Bien que l'hydralazine n'ait pas induit de baisse significative de la masse aortique ni du nombre de CMLs, la réduction de l'aire de section est statistiquement significative dans la présente étude. La mesure de l'aire de section est cependant plus précise que la mesure du poids mouillé de l'aorte, qui peut varier en fonction de la quantité d'eau encore présente sur le vaisseau au moment de la pesée. Notre groupe avait notamment démontré que l'hydralazine n'avait aucun effet sur l'index de masse et l'aire de section aortiques, l'apoptose et le contenu en ADN. Le traitement était cependant d'une durée de quatre semaines, une piste potentielle pouvant expliquer ces discordances (120). Néanmoins, un effet potentiel de la baisse de pression sur la diminution de la taille du vaisseau ne peut être totalement exclue suite au traitement à l'hydralazine. Il a été montré dans un modèle de lapin immature que certains facteurs mécaniques, comme la réduction du flot artériel de l'artère carotide externe gauche, puisse moduler la mort/prolifération cellulaire (234). Il existe donc des données qui soutiennent un certain effet des facteurs hémodynamiques sur le renversement du remodelage pathologique dans les vaisseaux de gros calibre dans un contexte de restriction de flot sanguin.

Contrairement aux mesures d'hypertrophie vasculaire, les mesures d'hyperplasie vasculaire sont compatibles avec nos données publiées. Tel qu'attendu, seul l'énalapril et le losartan ont réduit

significativement le nombre de CML. Malgré une baisse de pression similaire et une réduction apparente de l'aire de section, l'hydralazine n'a pas eu d'effet sur la réduction de l'hyperplasie, confirmant nos résultats publiés précédemment (133). Tel que décrit précédemment, la perte de CML suite au traitement avec un iECA ou un antagoniste des récepteurs AT₁ implique un processus apoptotique de nature transitoire et rapide (120, 232).

4.2.1.2 Modulation de la longueur des télomères de l'aorte

Il semble que les inhibiteurs du SRA tendent à normaliser les valeurs et s'approcher de celles des rats WKY normotendus, ce qui est compatible avec les observations dans le ventricule gauche et l'ensemble de l'effet des traitements sur les paramètres de remodelage observés et connus. Il est difficile de tirer des conclusions sur les résultats touchant les télomères de l'aorte vu le faible échantillonnage ; certains groupes avaient aussi peu que 2 échantillons dû aux défis technologiques rencontrés, qui seront discutés plus loin. En conséquent, pratiquement aucune différence statistiquement significative par rapport au groupe SHR témoin n'a été observée, à l'exception du groupe SHR traité avec le losartan. Nos observations sont donc spéculatives et nous discuterons ici des tendances observées. Les différences dans l'aorte semblent demeurer entre les groupes, mais vont cependant dans la direction opposée à nos attentes. Nous croyons que la longueur des télomères pourrait être régulée de façon spécifique à l'organe, ce qui expliquerait la différence dans la direction du changement de la longueur des télomères de l'aorte par rapport au ventricule gauche.

Certaines données dans la littérature appuient cette hypothèse, plus particulièrement une publication de Cao et coll., portant sur l'activation de la télomérase dans les CLMV aortiques en culture provenant de SHR (335). Les auteurs ont conclu que l'activation de la télomérase et le maintien des télomères sont responsables du phénotype hyperprolifératif des CML aortiques chez le SHR, et, conséquemment, que la télomérase pourrait jouer un rôle obligatoire dans l'étiologie du remodelage vasculaire pathologique dans l'hypertension. Ils ont observé principalement que la télomérase était deux fois plus active dans l'aorte de SHR que dans celle des WKY. Il est important de soulever que l'activité de la télomérase s'est trouvée inchangée dans tous les autres tissus mesurés, notamment dans le muscle squelettique, le cœur, le rein, le cerveau, les poumons, le foie, la rate et les testicules. L'étude des mécanismes qui sous-tendent l'étiologie de l'hypertension et de ses mécanismes physiopathologiques tel le remodelage pathologique

soulève plusieurs questions, tel que les événements initiateurs. Cette étude a démontré que l'augmentation de l'activité de la télomérase dans l'aorte survenait tôt dans le développement du SHR, soit entre les 3^e et 6^e semaines après la naissance. Cette découverte suggère que l'activation sélective de la télomérase dans l'aorte n'est pas secondaire à la hausse de pression observée dans l'hypertension génétique. La télomérase serait donc suractivée tôt dans le développement et jouerait potentiellement un rôle obligatoire dans l'étiologie du remodelage vasculaire artériel dans l'hypertension. Cette observation est, elle aussi, contradictoire avec celle faite dans le cœur et les reins de souris hypertendues discutés précédemment, qui suggérait que les différences dans la longueur des télomères étaient plutôt une conséquence de l'hypertension (402). Malgré que la base génétique moléculaire de la prolifération accrue et de l'apoptose dans les CMLV du SHR reste à être élucidée, les auteurs ont rappelé que l'inhibition des récepteurs de l'Ang II diminue les niveaux de Bcl-2 et augment ceux de Bax (68, 406). Il est intéressant de souligner qu'il a été démontré que la prolifération cellulaire accrue et les niveaux cellulaires de c-myc et Bcl-2 sont associés avec une augmentation de l'activité de la télomérase et l'élongation des télomères dans les cellules néoplasiques (407). L'activité accrue de la télomérase spécifique à l'aorte chez le SHR suggère la mise en place d'une régulation de la longueur des télomères spécifique à l'organe, et pourraient expliquer en partie les disparités observées entre l'aorte et le cœur dans cette présente étude.

Il est possible que, dans l'aorte de SHR témoins, l'activité accrue de la télomérase soit responsable du maintien de la longueur des télomères et du caractère hyperprolifératif des CMLV, et que les antihypertenseurs capables de renverser l'hyperplasie aortique causeraient une baisse de l'activité de la télomérase. Ceci causerait donc le renversement de l'hyperplasie par apoptose des cellules avec télomères plus longs et dans lesquelles la télomérase serait la plus active. Ceci n'est qu'une hypothèse qui reste à vérifier. Il sera intéressant pour la suite du projet de mesurer l'activité de la télomérase et vérifier si ce paramètre est normalisée suite au traitement avec l'énalapril et le losartan, mais pas avec l'hydralazine. Il est peu probable, après un traitement de 21 jours, que la télomérase - étant peu active voire même inactive dans les tissus somatiques - ait pu influencer de façon significative la longueur des télomères cardiaques tel que nous l'avons observé. Dans l'aorte toutefois, s'il s'avérait que les inhibiteurs du SRA diminuent effectivement l'activité de la télomérase *in vivo*, et par conséquent éliminent les cellules avec télomères longs, il serait intéressant d'utiliser un inhibiteur de télomérase *in vivo* directement pour parfaire notre compréhension et la validité du mécanisme proposé. Plus précisément, ceci nous permettrait d'observer si le blocage direct de la télomérase entraîne les mêmes effets que les inhibiteurs

du SRA sur la longueur des télomères, l'hypertrophie aortique et le décompte de CMLV. Les effets à long terme et à large échelle du blocage de la télomérase sont méconnus et probablement plus néfastes que les antihypertenseurs connus. Plusieurs inhibiteurs de télomérase ont été et sont présentement évalués en phase pré-clinique et clinique pour certains cancers, rendant ce projet faisable à court terme. Nous retrouvons principalement l'imetelstat (GRN163L), le BIBR1532, 6-thio-dG, VE-822 et le NVP-BEZ235 (408). Le seul inhibiteur ayant fait l'objet d'essais cliniques de phases I et II est le GRN163L (imetelstat) (409). À ce jour, l'imetelstat n'a pas montré d'activité clinique significative dans la plupart des essais cliniques conduits, mais quelques études de phase II ont montré qu'il peut engendrer des réponses hématologiques chez une sous-population de patients atteints de thrombocythémie essentielle et une étude a montré une rémission clinique complète chez certains patients atteints de myélofibrose (410). Plusieurs défis se dressent cependant quant à l'utilisation des inhibiteurs de télomérase. Premièrement, il existe un délai non négligeable entre l'inhibition de la télomérase et le temps où les télomères raccourcissent suffisamment pour produire des effets délétères sur la prolifération cellulaire (411). Également, l'inhibition de la télomérase pourrait potentiellement avoir des effets sur les autres cellules somatiques qui expriment la télomérase, tel que les cellules souches hématopoïétiques, les cellules germinales et les cellules de la couche basale de l'épiderme et de l'intestin (412). Il y a également eu des préoccupations au niveau du potentiel à causer des tumeurs en accentuant l'instabilité génomique des cellules. Ces préoccupations ont émergé suite à des études chez un modèle de souris *knockout* pour la composante hTERC de la télomérase qui ont montré une incidence plus élevée de tumeurs comparativement aux souris normales (413). Pour ces raisons, ce volet de l'étude aurait une portée mécanistique plutôt que thérapeutique, permettant néanmoins d'approfondir notre compréhension du rôle de la télomérase dans notre modèle.

4.3 Considérations méthodologiques et technologiques

Un des défis principaux de la mise en contexte de nos résultats, et ce autant dans l'aorte que dans le ventricule gauche, est la limite qu'impose la comparaison de nos résultats avec les données publiées. Mis à part les études discutées dans le chapitre précédent, la plupart des données disponibles dans la littérature proviennent d'études prospectives, souvent observationnelles et transversales, chez l'humain. Les mesures ont été effectuées pour la majorité sur les cellules blanches périphériques. Cependant, il reste encore à éclaircir si celles-ci offrent une représentation exacte des télomères dans les tissus d'intérêt dans la maladie hypertensive, comme l'aorte et le ventricule gauche. L'attrait principal de leur utilisation est sans doute leur côté pratique et leur accessibilité, et à la fréquence et rapidité de la division cellulaire dans ce type de cellules. Tel que décrit précédemment, la quasi-totalité des études montrent une corrélation inverse entre la longueur des télomères et la pression artérielle. Cependant, des études supplémentaires contrôlant pour les facteurs confondants sont nécessaires afin de confirmer ces observations et explorer les sources d'hétérogénéité (373). Une des caractéristiques les plus frappantes des leucocytes est que la longueur des télomères est hautement variable, et ce même après ajustement pour l'âge. Il existe 3 causes potentielles à cette variabilité : (i) les grandes variations interindividuelles de la longueur des télomères à la naissance, (ii) les grandes variations interindividuelles du taux d'attrition après la naissance et (iii) les variations attribuables à la technique utilisée pour mesurer la longueur des télomères (414). Ce dernier point est discuté plus loin dans ce chapitre.

a. Choix de la méthode de mesure de la longueur des télomères

Une des limitations principales pouvant réduire l'exactitude et la comparabilité des résultats réside dans la variation observée non seulement entre les différentes méthodes utilisées pour mesurer la longueur des télomères, mais aussi la variabilité inhérente à chaque technique. Il existe plusieurs méthodes pour mesurer la longueur des télomères: (i) le Southern blot, (ii) l'amplification en chaîne par polymérase en temps réel, ou qPCR (*quantitative Polymerase Chain Reaction*), (iii) une variété de méthodes d'hybridation *in situ* en fluorescence, ou Q-FISH (*Quantitative Fluorescence In Situ Hybridization*), (iv) la méthode d'analyse de la longueur d'un seul télomère, ou STELA (*Single TElomere Length Analysis*) et (v) la méthode TeSLA (*Telomere Shortest Length Assay*), qui analyse la longueur du télomère le plus court (331). L'interprétation et la comparaison des résultats entre les différentes études est difficile, considérant que toutes ces méthodes emploient différents outils de laboratoire et différentes méthodologies, et génèrent des paramètres de télomères distincts. De plus, ces techniques requièrent une expertise, qui n'est pas uniforme à travers les différents laboratoires. Dans le contexte qui nous intéresse, la majorité des études disponibles dans le domaine des maladies cardiovasculaires et l'hypertension ont utilisé en majorité le qPCR, et à un moindre degré le Southern blot; nous allons donc discuter de ces deux méthodes.

Le Southern blot, tel que décrit à la section 2.4, permet de mesurer la longueur moyenne absolue des TRF et permet de détecter la proportion de TRF de différentes catégories de longueur. Le qPCR mesure le signal télomérique (T) par rapport à un échantillon d'ADN de référence unique (S), donnant un ratio T/S, qui lui est proportionnel à la longueur moyenne des télomères (415). Cette technique donne donc une longueur relative et non absolue. Le **Error! Reference source not found.** ci-dessous résume les avantages et les inconvénients de chacune des deux techniques :

	Avantages	Inconvénients
Southern Blot	<ul style="list-style-type: none"> - Considéré comme l'étalon-or - Hautement reproductible - Mesure la longueur absolue (Kb) - Peut mesurer la proportion de télomères courts 	<ul style="list-style-type: none"> - Grande quantité d'ADN requise - Requier du travail intensif / prend plusieurs jours pour peu d'échantillons testés - Couteux - Requier ADN intact - Résultats peuvent varier en fonction des enzymes de restriction utilisées
qPCR	<ul style="list-style-type: none"> - Rapide - Permet de tester un haut volume d'échantillons à la fois - Infime quantité d'ADN requise - Peu coûteux - Disponibilité de plusieurs études pour fins de comparaison 	<ul style="list-style-type: none"> - Haute variabilité - Capacité limitée de détection de petits changements - Donne une mesure relative (ratio T/S) - Ne donne pas d'information sur les télomères courts

Tableau 2. - Comparaison des avantages et inconvénients des techniques de Southern blot et qPCR pour la mesure de la longueur des télomères

Il existe certainement des concessions considérables à utiliser la méthode facile et rapide comme le qPCR pour les études épidémiologiques impliquant un grand nombre d'individus et d'échantillons versus le bénéfice d'études mécanistiques évaluant la relation de cause à effet en utilisant une méthode plus précise, pouvant fournir de l'information sur la distribution des télomères et particulièrement les télomères les plus courts. La majorité des études publiées auxquelles nous tentons de comparer nos résultats sont des études épidémiologiques chez l'humain, utilisant le qPCR comme méthode pour mesurer les télomères des leucocytes. Il serait intéressant de répéter nos mesures en utilisant cette technique, pour des fins de comparaison, mais également en raison des avantages que confèrent cette technique quant à la quantité d'ADN requise et la rapidité de la procédure. Certaines études ont effectué des comparaisons entre la technique de Southern blot et le qPCR (416-418). Il s'avère que les deux

méthodes produisent des résultats hautement reproductibles ($r > 0,9$) (417), il existe une corrélation positive significative entre les résultats générés par les deux méthodes (416, 417), mais le coefficient de variation (CV) inter-test, représentant l'erreur de mesure, est en moyenne 3,55 fois plus élevée pour le qPCR que pour le Southern blot. En effet, dans ces études précisément, le CV inter-test s'étendait entre 1,5 – 1,74% et 5,3 – 6,45% pour le Southern blot et le qPCR, respectivement. L'étendue de ces variations s'avèrent être encore plus grandes dans la littérature, où les conditions ne sont pas aussi contrôlées que dans ces 3 études (416-418). Dû au CV inter-test élevé du qPCR, cette technique est donc limitée dans sa capacité à détecter de petits changements. Une récente étude a tenté de mesurer les conséquences de l'erreur de mesure du qPCR sur les données en utilisant une approche de simulation par ordinateur (419). Les résultats montrent qu'une petite augmentation de l'erreur peut avoir de grandes conséquences sur la puissance à détecter une réelle association et la possibilité d'interpréter les estimés de qPCR et peuvent mener à une grande hétérogénéité de résultats. Il est possible que, en plus de la variabilité interindividuelle de la longueur des télomères de leucocytes discutée ci-haut, l'erreur de mesure puisse expliquer, en partie du moins, les différences observées dans la littérature entre les différentes études.

Tel que décrit précédemment, les cellules avec de très courts télomères sont intimement associées à la sénescence cellulaire, sans égard à la longueur moyenne des télomères dans la cellule, car un seul télomère court peut être suffisant pour forcer une cellule à entrer en sénescence (260, 261, 420). Il serait intéressant de mesurer les télomères par des méthodes plus modernes, comme le STELA ou TeSLA, qui focussent sur la longueur du ou des télomères les plus courts, qui pourraient s'avérer un indicateur plus pertinent que la longueur moyenne des télomères.

b. Utilisation des cellules blanches périphériques du sang et focus sur la longueur moyenne des télomères

Une étude conduite par Morgan et coll. en 2014 a étudié la dysfonction des télomères provenant de biopsies de l'aorte de sujets humains, pour la première fois. Leurs résultats ont démontré que la longueur des télomères n'était pas différente chez les sujets avec hypertension en comparaison avec les sujets sans hypertension ($p = 0,29$). Ce résultat est contraire aux attentes, mais similaire aux observations provenant de l'étude LIFE qui elles ont été faites sur des leucocytes. Les auteurs ont démontré que le décoiffage (« uncapping ») des télomères et la sénescence cellulaire induite par p53/p21 étaient deux fois plus élevés

chez les sujets hypertendus comparativement aux sujets normotendus ($p = 0,04$ et $p = 0,02$, respectivement). De façon surprenante, en plus de ne pas être associée à l'hypertension, la longueur moyenne des télomères n'était pas associée au décoiffage des télomères ni à la sénescence. Les auteurs ont conclu que le décoiffage des télomères influence le statut d'hypertension plus que la longueur moyenne des télomères (307). Ces résultats sèment donc un doute sur la pertinence biologique des observations précédentes sur les cellules blanches périphériques, et plus d'études similaires sont nécessaires pour confirmer ces observations uniques. Finalement, il apparaît évident que la dysfonction des télomères et la sénescence cellulaire sont des pistes pertinentes dans l'étude des caractéristiques des cellules/organes cible dans l'hypertension artérielle.

c. Manque d'études longitudinales

Il existe d'autres limitations à la mise en contexte de nos résultats et l'exactitude des observations répertoriées dans la littérature avec non seulement nos observations, mais aussi avec entre les études elles-mêmes. Tel que décrit précédemment, le focus de la plupart des études est sur la dynamique des télomères des cellules périphériques du sang, particulièrement des leucocytes, et comportent des lacunes au niveau épidémiologique et technique.

La plupart des études font état d'analyses transversales et il existe donc très peu d'études longitudinales qui utilisent les échantillons séquentiels provenant des mêmes individus. La grande majorité des études testent la longueur des télomères à un point particulier dans le temps, et nos études n'y font pas exception pour des raisons d'accessibilité inhérentes au choix des organes étudiés. Les études longitudinales sont en effet un choix idéal, mais leur utilisation est limitée par la disponibilité des échantillons et par l'inhabilité des techniques disponibles à détecter de petits changements à travers le temps. Des études longitudinales permettraient d'évaluer adéquatement l'impact génétique, de facteurs environnementaux et d'interventions thérapeutiques sur la longueur des télomères, et dans le contexte qui nous intéresse, permettraient d'élucider le lien de cause à effet entre l'hypertension et la longueur des télomères et l'effet dans le temps d'un traitement antihypertenseur.

4.4 Limitations de l'étude

La plus grande limitation de l'étude est le faible échantillonnage de nos mesures, particulièrement dans certains groupes dans l'aorte. Nous avons rencontré plusieurs difficultés dans ce volet de l'étude, notamment technologiques, quant à l'étude de la modulation de la longueur des télomères. Ceci a compliqué l'analyse et l'interprétation des résultats. Nous n'avons pu obtenir un échantillonnage assez grand pour nous permettre de conclure, d'un point de vue statistique, à des différences (ou absence de différence) entre les groupes. La principale raison de ce faible échantillonnage provient de problèmes reliés à la méthodologie. L'analyse des TRF, tel que décrite précédemment, requiert une grande quantité d'ADN génomique, soit 8 µg. Or, il est possible d'extraire, au total, entre 8 et 20 µg d'ADN de l'aorte thoracique de rat, laissant très peu de matériel utilisable et aucune marge de manœuvre pour répéter les mesures.

Il est probable que le faible échantillonnage ait contribué au manque de reproductibilité de certains résultats précédemment obtenus par notre groupe qui visaient à valider le modèle utilisé et les assumptions de départ, particulièrement dans le VG. Nous n'avons pu démontrer une baisse significative de l'ADN cardiaque avec le losartan, et l'hydralazine a induit une baisse significative de l'HVG. Il serait approprié d'effectuer les mesures de décompte cellulaire dans le VG, sans quoi nous sommes limités à inférer que la modulation de la longueur des télomères par les inhibiteurs du SRA soit bel et bien associée au renversement de l'hyperplasie cardiaque.

En ce qui concerne les limitations quant à la mesure de la longueur des télomères, notre méthode de mesure nous permettait de les mesurer que dans le tissu entier et non dans les cellules individuelles (*in situ*). Également, la méthode utilisée est conçue pour mesurer la longueur moyenne des télomères, alors que des données plus récentes suggèrent que la proportion de télomères très courts, ou même le télomère le plus court, serait une mesure plus pertinente. Il existe des méthodes plus modernes permettant de détecter de plus petites différences et de mesurer les télomères très courts.

Nos recherches n'évaluaient pas les variables connues qui influencent la longueur des télomères. Entre autres, il aurait été intéressant de mesurer l'activité de la télomérase afin de couvrir cet élément clé

important de la régulation de la longueur des télomères. De plus, nous n'avons pas été en mesure de confirmer que l'hypertension du SHR était associée à une augmentation du stress oxydant, ni démontrer que les inhibiteurs du SRA sont associés avec une baisse du stress oxydant. Tel qu'énoncé précédemment, le stress oxydant est bien connu pour influencer la longueur des télomères, il sera donc nécessaire d'étudier en plus en profondeur l'implication de celui-ci.

4.5 Conclusion et perspectives de recherche

Pour la première fois, l'effet *in vivo* d'une pharmacothérapie antihypertensive sur la longueur des télomères du ventricule gauche et de la média aortique a été étudié. Bien que dans le cadre de la présente étude nous n'ayons pas confirmé le renversement de l'hyperplasie cardiaque dans le VG, nous émettons l'hypothèse que les résultats obtenus précédemment représentent l'effet réel des iSRA sur ce paramètre. En supposant que les iSRA auraient dû induire des effets similaires à ceux observés par notre laboratoire à tous les égards, les résultats de l'étude suggèrent que l'hypothèse de départ soit soutenue, soit que la régression de l'hyperplasie cardiovasculaire induite par les iSRA soit associée à une modulation de la longueur des télomères. Cependant, les changements suite aux traitements dans l'aorte et le ventricule gauche s'observent dans deux directions opposées. En comparaison aux SHR témoin, les groupes ayant reçu un inhibiteur du SRA tendent à arborer des télomères plus courts dans l'aorte, tandis que les télomères du ventricule gauche sont plus longs. Également, il semble que l'hypertension génétique du SHR soit associée à des télomères longs dans l'aorte et l'inverse dans le ventricule gauche, comparativement aux rats normotendus. Il apparaît donc, à la lumière de cette étude, qu'il existe possiblement une régulation des télomères spécifique à l'organe dans l'hypertension artérielle. Les inhibiteurs du SRA ont eu des effets opposés sur ce paramètre, mais le dénominateur commun était somme toute une tendance à la normalisation.

En ce qui concerne le ventricule gauche, nos résultats soulèvent l'intrigante possibilité que les iSRA agissent en quelque sorte comme agents « sénolytiques » et préserveraient ainsi les cellules saines de l'organe. Plus précisément, nous proposons que le renversement de l'hyperplasie cardiaque par apoptose implique une élimination préférentielle des fibroblastes cardiaques avec télomères courts. Il est possible que les cellules avec télomères courts expriment des marqueurs de sénescence cellulaire ou autres caractéristiques cellulaires aberrantes qui déclencheraient le processus d'activation des caspases menant à la mort cellulaire par apoptose dans ces cellules.

La recherche sur l'importance de la sénescence cellulaire et le potentiel thérapeutique des agents sénolytiques à renverser la dysfonction et le vieillissement tissulaires pourrait s'avérer être un domaine de recherche prometteur dans l'hypertension et les maladies cardiovasculaires, et d'importantes percées thérapeutiques pourraient émerger dans les prochaines années.

5 Bibliographie

1. Rabi DM, McBrien KA, Sapir-Pichhadze R, Nakhla M, Ahmed SB, Dumanski SM, et al. Hypertension Canada's 2020 Comprehensive Guidelines for the Prevention, Diagnosis, Risk Assessment, and Treatment of Hypertension in Adults and Children. *The Canadian journal of cardiology*. 2020;36(5):596-624.
2. Whitworth JA. 2003 World Health Organization (WHO)/International Society of Hypertension (ISH) statement on management of hypertension. *Journal of hypertension*. 2003;21(11):1983-92.
3. DeGuire J, Clarke J, Rouleau K, Roy J, Bushnik T. Blood pressure and hypertension. *Health Rep*. 2019;30(2):14-21.
4. Padwal RS, Hemmelgarn BR, McAlister FA, McKay DW, Grover S, Wilson T, et al. The 2007 Canadian Hypertension Education Program recommendations for the management of hypertension: part 1- blood pressure measurement, diagnosis and assessment of risk. *The Canadian journal of cardiology*. 2007;23(7):529-38.
5. Elliott WJ. Systemic hypertension. *Current problems in cardiology*. 2007;32(4):201-59.
6. Katzung BG. *Basic and Clinical Pharmacology*, 10th edition. McGraw-Hill Companies. 2007:1179p.
7. Duguay D. *Rôles et mécanismes moléculaires de l'apoptose cardiovasculaire en réponse à des antihypertenseurs [Thèse de Doctorat]: Université de Montréal; 2007.*
8. Urata H, Nishimura H, Ganten D. Chymase-dependent angiotensin II forming systems in humans. *Am J Hypertens*. 1996;9(3):277-84.
9. Ardaillou R, Chansel D. Synthesis and effects of active fragments of angiotensin II. *Kidney international*. 1997;52(6):1458-68.
10. Donoghue M, Hsieh F, Baronas E, Godbout K, Gosselin M, Stagliano N, et al. A novel angiotensin-converting enzyme-related carboxypeptidase (ACE2) converts angiotensin I to angiotensin 1-9. *Circulation research*. 2000;87(5):E1-9.
11. Crackower MA, Sarao R, Oudit GY, Yagil C, Kozieradzki I, Scanga SE, et al. Angiotensin-converting enzyme 2 is an essential regulator of heart function. *Nature*. 2002;417(6891):822-8.
12. Der Sarkissian S, Huentelman MJ, Stewart J, Katovich MJ, Raizada MK. ACE2: A novel therapeutic target for cardiovascular diseases. *Progress in biophysics and molecular biology*. 2006;91(1-2):163-98.
13. Patel VB, Zhong JC, Grant MB, Oudit GY. Role of the ACE2/Angiotensin 1-7 Axis of the Renin-Angiotensin System in Heart Failure. *Circulation research*. 2016;118(8):1313-26.

14. Colafella KM, Hilliard LM, Denton KM. Epochs in the depressor/pressor balance of the renin-angiotensin system. *Clin Sci (Lond)*. 2016;130(10):761-71.
15. Swanson GN, Hanesworth JM, Sardinia MF, Coleman JK, Wright JW, Hall KL, et al. Discovery of a distinct binding site for angiotensin II (3-8), a putative angiotensin IV receptor. *Regulatory peptides*. 1992;40(3):409-19.
16. Nguyen G, Delarue F, Burckle C, Bouzahir L, Giller T, Sraer JD. Pivotal role of the renin/prorenin receptor in angiotensin II production and cellular responses to renin. *The Journal of clinical investigation*. 2002;109(11):1417-27.
17. Corvol P, Jeunemaitre X, Charru A, Kotelevtsev Y, Soubrier F. Role of the renin-angiotensin system in blood pressure regulation and in human hypertension: new insights from molecular genetics. *Recent progress in hormone research*. 1995;50:287-308.
18. Frohlich ED, Dustan HP, Bumpus FM, Irvine H. Page: 1901-1991. The celebration of a leader. *Hypertension*. 1991;18(4):443-5.
19. Lifton RP, Gharavi AG, Geller DS. Molecular mechanisms of human hypertension. *Cell*. 2001;104(4):545-56.
20. Lifton RP, Dluhy RG, Powers M, Rich GM, Cook S, Ulick S, et al. A chimaeric 11 beta-hydroxylase/aldosterone synthase gene causes glucocorticoid-remediable aldosteronism and human hypertension. *Nature*. 1992;355(6357):262-5.
21. Oparil S, Zaman MA, Calhoun DA. Pathogenesis of hypertension. *Annals of internal medicine*. 2003;139(9):761-76.
22. Kearney PM, Whelton M, Reynolds K, Muntner P, Whelton PK, He J. Global burden of hypertension: analysis of worldwide data. *Lancet*. 2005;365(9455):217-23.
23. Chobanian AV, Bakris GL, Black HR, Cushman WC, Green LA, Izzo JL, Jr., et al. Seventh report of the Joint National Committee on Prevention, Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Pressure. *Hypertension*. 2003;42(6):1206-52.
24. 1999 World Health Organization-International Society of Hypertension Guidelines for the Management of Hypertension. Guidelines Subcommittee. *Journal of hypertension*. 1999;17(2):151-83.
25. Lewington S, Clarke R, Qizilbash N, Peto R, Collins R. Age-specific relevance of usual blood pressure to vascular mortality: a meta-analysis of individual data for one million adults in 61 prospective studies. *Lancet*. 2002;360(9349):1903-13.
26. Oparil S, Acelajado MC, Bakris GL, Berlowitz DR, Cifkova R, Dominiczak AF, et al. Hypertension. *Nat Rev Dis Primers*. 2018;4:18014.

27. Chobanian AV, Bakris GL, Black HR, Cushman WC, Green LA, Izzo JL, Jr., et al. 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(19):2560-72.
28. Whelton PK, Carey RM, Aronow WS, Casey DE, Jr., Collins KJ, Dennison Himmelfarb C, et al. 2017 ACC/AHA/AAPA/ABC/ACPM/AGS/APhA/ASH/ASPC/NMA/PCNA Guideline for the Prevention, Detection, Evaluation, and Management of High Blood Pressure in Adults: A Report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Clinical Practice Guidelines. *Journal of the American College of Cardiology*. 2018;71(19):e127-e248.
29. Cubeddu LX. New alpha 1-adrenergic receptor antagonists for the treatment of hypertension: role of vascular alpha receptors in the control of peripheral resistance. *American heart journal*. 1988;116(1 Pt 1):133-62.
30. Powers DR, Papadakos PJ, Wallin JD. Parenteral hydralazine revisited. *The Journal of emergency medicine*. 1998;16(2):191-6.
31. INC. AP. HYDRALAZINE_Product Monograph. <https://www.aapharmaca/downloads/en/PIL/Hydralazinepdf2014>.
32. Rang H, Dale M, Ritter J, Moore P. *Pharmacology*. ELSEVIER Churchill Livingstone. 2003;5th edition.
33. Brown NJ, Vaughan DE. Angiotensin-converting enzyme inhibitors. *Circulation*. 1998;97(14):1411-20.
34. Weber MA. Interrupting the renin-angiotensin system: the role of angiotensin-converting enzyme inhibitors and angiotensin II receptor antagonists in the treatment of hypertension. *Am J Hypertens*. 1999;12(12 Pt 3):189S-94S.
35. Burnier M. Angiotensin II type 1 receptor blockers. *Circulation*. 2001;103(6):904-12.
36. Fisher ND, Jan Danser AH, Nussberger J, Dole WP, Hollenberg NK. Renal and hormonal responses to direct renin inhibition with aliskiren in healthy humans. *Circulation*. 2008;117(25):3199-205.
37. Staessen JA, Li Y, Richart T. Oral renin inhibitors. *Lancet*. 2006;368(9545):1449-56.
38. Azizi M, Webb R, Nussberger J, Hollenberg NK. Renin inhibition with aliskiren: where are we now, and where are we going? *Journal of hypertension*. 2006;24(2):243-56.
39. Parving HH, Brenner BM, McMurray JJ, de Zeeuw D, Haffner SM, Solomon SD, et al. Cardiorenal end points in a trial of aliskiren for type 2 diabetes. *The New England journal of medicine*. 2012;367(23):2204-13.

40. Nerenberg KA, Zarnke KB, Leung AA, Dasgupta K, Butalia S, McBrien K, et al. Hypertension Canada's 2018 Guidelines for Diagnosis, Risk Assessment, Prevention, and Treatment of Hypertension in Adults and Children. *The Canadian journal of cardiology*. 2018;34(5):506-25.
41. Lerman LO, Chade AR, Sica V, Napoli C. Animal models of hypertension: an overview. *The Journal of laboratory and clinical medicine*. 2005;146(3):160-73.
42. Okamoto K, Aoki K. Development of a strain of spontaneously hypertensive rats. *Japanese circulation journal*. 1963;27:282-93.
43. Gray SD. Spontaneous hypertension in the neonatal rat. A review. *Clinical and experimental hypertension*. 1984;6(4):755-81.
44. Gray SD. Pressure profiles in neonatal spontaneously hypertensive rats. *Biology of the neonate*. 1984;45(1):25-32.
45. Walter SV, Hamet P. Enhanced DNA synthesis in heart and kidney of newborn spontaneously hypertensive rats. *Hypertension*. 1986;8(6):520-5.
46. Moreau P, Tea BS, Dam TV, Hamet P. Altered balance between cell replication and apoptosis in hearts and kidneys of newborn SHR. *Hypertension*. 1997;30(3 Pt 2):720-4.
47. Kunes J, Pang SC, Cantin M, Genest J, Hamet P. Cardiac and renal hyperplasia in newborn spontaneously hypertensive rats. *Clin Sci (Lond)*. 1987;72(3):271-5.
48. Hadrava V, Tremblay J, Hamet P. Abnormalities in growth characteristics of aortic smooth muscle cells in spontaneously hypertensive rats. *Hypertension*. 1989;13(6 Pt 1):589-97.
49. Pfeffer MA, Pfeffer JM. Blood pressure and left ventricular dysfunction in the spontaneously hypertensive rat. *Federation proceedings*. 1983;42(10):2698-702.
50. Okamoto K, Aoki K, Nosaka S, Fukushima M. Cardiovascular Diseases in the Spontaneously Hypertensive Rat. *Japanese circulation journal*. 1964;28:943-52.
51. Yamori Y, Mori C, Nishio T, Ooshima A, Horie R, Ohtaka M, et al. Cardiac hypertrophy in early hypertension. *The American journal of cardiology*. 1979;44(5):964-9.
52. Hamet P, Kaiser MA, Sun Y, Page V, Vincent M, Kren V, et al. HSP27 locus cosegregates with left ventricular mass independently of blood pressure. *Hypertension*. 1996;28(6):1112-7.
53. Frohlich ED. Hemodynamics and other determinants in development of left ventricular hypertrophy. *Federation proceedings*. 1983;42(10):2709-15.
54. Gibbons GH, Dzau VJ. The emerging concept of vascular remodeling. *The New England journal of medicine*. 1994;330(20):1431-8.

55. Cohuet G, Struijker-Boudier H. Mechanisms of target organ damage caused by hypertension: therapeutic potential. *Pharmacology & therapeutics*. 2006;111(1):81-98.
56. Mulvany MJ, Baumbach GL, Aalkjaer C, Heagerty AM, Korsgaard N, Schiffrin EL, et al. Vascular remodeling. *Hypertension*. 1996;28(3):505-6.
57. Carretero OA. Vascular remodeling and the kallikrein-kinin system. *The Journal of clinical investigation*. 2005;115(3):588-91.
58. Mulvany MJ. Small artery remodeling and significance in the development of hypertension. *News Physiol Sci*. 2002;17:105-9.
59. Porteri E, Rizzoni D, Mulvany MJ, De Ciuceis C, Sleiman I, Boari GE, et al. Adrenergic mechanisms and remodeling of subcutaneous small resistance arteries in humans. *Journal of hypertension*. 2003;21(12):2345-52.
60. Schiffrin EL. Remodeling of resistance arteries in essential hypertension and effects of antihypertensive treatment. *Am J Hypertens*. 2004;17(12 Pt 1):1192-200.
61. Park JB, Schiffrin EL. Small artery remodeling is the most prevalent (earliest?) form of target organ damage in mild essential hypertension. *Journal of hypertension*. 2001;19(5):921-30.
62. Owens GK. Control of hypertrophic versus hyperplastic growth of vascular smooth muscle cells. *The American journal of physiology*. 1989;257(6 Pt 2):H1755-65.
63. Lee RM. Structural alterations of blood vessels in hypertensive rats. *Canadian journal of physiology and pharmacology*. 1987;65(8):1528-35.
64. Folkow B. Physiological aspects of primary hypertension. *Physiological reviews*. 1982;62(2):347-504.
65. Hamet P. Proliferation and apoptosis of vascular smooth muscle in hypertension. *Current opinion in nephrology and hypertension*. 1995;4(1):1-7.
66. Devlin AM, Davidson AO, Gordon JF, Campbell AM, Morton JJ, Reid JL, et al. Vascular smooth muscle polyploidy in genetic hypertension: the role of angiotensin II. *Journal of human hypertension*. 1995;9(6):497-500.
67. Dominiczak AF, Devlin AM, Lee WK, Anderson NH, Bohr DF, Reid JL. Vascular smooth muscle polyploidy and cardiac hypertrophy in genetic hypertension. *Hypertension*. 1996;27(3 Pt 2):752-9.
68. Diez J, Panizo A, Hernandez M, Pardo J. Is the regulation of apoptosis altered in smooth muscle cells of adult spontaneously hypertensive rats? *Hypertension*. 1997;29(3):776-80.
69. Hamet P, deBlois D, Dam TV, Richard L, Teiger E, Tea BS, et al. Apoptosis and vascular wall remodeling in hypertension. *Canadian journal of physiology and pharmacology*. 1996;74(7):850-61.

70. Hamet P, Richard L, Dam TV, Teiger E, Orlov SN, Gaboury L, et al. Apoptosis in target organs of hypertension. *Hypertension*. 1995;26(4):642-8.
71. Kockx MM, Knaapen MW. The role of apoptosis in vascular disease. *The Journal of pathology*. 2000;190(3):267-80.
72. Thorin-Trescases N, deBlois D, Hamet P. Evidence of an altered in vivo vascular cell turnover in spontaneously hypertensive rats and its modulation by long-term antihypertensive treatment. *Journal of cardiovascular pharmacology*. 2001;38(5):764-74.
73. Sehgel NL, Zhu Y, Sun Z, Trzeciakowski JP, Hong Z, Hunter WC, et al. Increased vascular smooth muscle cell stiffness: a novel mechanism for aortic stiffness in hypertension. *American journal of physiology*. 2013;305(9):H1281-7.
74. Sehgel NL, Sun Z, Hong Z, Hunter WC, Hill MA, Vatner DE, et al. Augmented vascular smooth muscle cell stiffness and adhesion when hypertension is superimposed on aging. *Hypertension*. 2015;65(2):370-7.
75. Safar ME, Laurent S. Behaviour of conduit arteries in hypertension. *Clin Exp Hypertens*. 1993;15(6):1033-45.
76. Brown IAM, Diederich L, Good ME, DeLalio LJ, Murphy SA, Cortese-Krott MM, et al. Vascular Smooth Muscle Remodeling in Conductive and Resistance Arteries in Hypertension. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. 2018;38(9):1969-85.
77. Boutouyrie P, Tropeano AI, Asmar R, Gautier I, Benetos A, Lacolley P, et al. Aortic stiffness is an independent predictor of primary coronary events in hypertensive patients: a longitudinal study. *Hypertension*. 2002;39(1):10-5.
78. Laurent S, Katsahian S, Fassot C, Tropeano AI, Gautier I, Laloux B, et al. Aortic stiffness is an independent predictor of fatal stroke in essential hypertension. *Stroke; a journal of cerebral circulation*. 2003;34(5):1203-6.
79. Boutouyrie P, Laurent S, Girerd X, Benetos A, Lacolley P, Abergel E, et al. Common carotid artery stiffness and patterns of left ventricular hypertrophy in hypertensive patients. *Hypertension*. 1995;25(4 Pt 1):651-9.
80. Laurent S, Boutouyrie P. The structural factor of hypertension: large and small artery alterations. *Circulation research*. 2015;116(6):1007-21.
81. Boutouyrie P, Laurent S. Remodelage des grosses et petites artères dans l'hypertension artérielle. *Sang Thrombose Vaisseaux*. 2004;16(2):81-9.

82. Levy D, Garrison RJ, Savage DD, Kannel WB, Castelli WP. Prognostic implications of echocardiographically determined left ventricular mass in the Framingham Heart Study. *The New England journal of medicine*. 1990;322(22):1561-6.
83. Diamond JA, Phillips RA. Hypertensive heart disease. *Hypertens Res*. 2005;28(3):191-202.
84. Nwabuo CC, Vasan RS. Pathophysiology of Hypertensive Heart Disease: Beyond Left Ventricular Hypertrophy. *Current hypertension reports*. 2020;22(2):11.
85. Hale TM. Persistent phenotypic shift in cardiac fibroblasts: impact of transient renin angiotensin system inhibition. *Journal of molecular and cellular cardiology*. 2016;93:125-32.
86. Dobaczewski M, Gonzalez-Quesada C, Frangogiannis NG. The extracellular matrix as a modulator of the inflammatory and reparative response following myocardial infarction. *Journal of molecular and cellular cardiology*. 2010;48(3):504-11.
87. Weber KT. Fibrosis and hypertensive heart disease. *Current opinion in cardiology*. 2000;15(4):264-72.
88. Weber KT, Brilla CG. Pathological hypertrophy and cardiac interstitium. Fibrosis and renin-angiotensin-aldosterone system. *Circulation*. 1991;83(6):1849-65.
89. Levy BI. How to explain the differences between renin angiotensin system modulators. *Am J Hypertens*. 2005;18(9 Pt 2):134S-41S.
90. Glennon PE, Sugden PH, Poole-Wilson PA. Cellular mechanisms of cardiac hypertrophy. *British heart journal*. 1995;73(6):496-9.
91. Pitoulis FG, Terracciano CM. Heart Plasticity in Response to Pressure- and Volume-Overload: A Review of Findings in Compensated and Decompensated Phenotypes. *Front Physiol*. 2020;11:92.
92. Weiner RB, Baggish AL. Exercise-induced cardiac remodeling. *Prog Cardiovasc Dis*. 2012;54(5):380-6.
93. Shapiro LM, McKenna WJ. Left ventricular hypertrophy. Relation of structure to diastolic function in hypertension. *British heart journal*. 1984;51(6):637-42.
94. Weber KT. Targeting pathological remodeling: concepts of cardioprotection and reparation. *Circulation*. 2000;102(12):1342-5.
95. Rossi MA, Carillo SV. Cardiac hypertrophy due to pressure and volume overload: distinctly different biological phenomena? *Int J Cardiol*. 1991;31(2):133-41.
96. Vliegen HW, van der Laarse A, Cornelisse CJ, Eulderink F. Myocardial changes in pressure overload-induced left ventricular hypertrophy. A study on tissue composition, polyploidization and multinucleation. *European heart journal*. 1991;12(4):488-94.

97. Vliegen HW, Eulderink F, Bruschke AV, van der Laarse A, Cornelisse CJ. Polyploidy of myocyte nuclei in pressure overloaded human hearts: a flow cytometric study in left and right ventricular myocardium. *The American journal of cardiovascular pathology*. 1995;5(1):27-31.
98. Dool JS, Mak AS, Friberg P, Wahlander H, Hawrylechko A, Adams MA. Regional myosin heavy chain expression in volume and pressure overload induced cardiac hypertrophy. *Acta physiologica Scandinavica*. 1995;155(4):396-404.
99. Heineke J, Molkentin JD. Regulation of cardiac hypertrophy by intracellular signalling pathways. *Nature reviews*. 2006;7(8):589-600.
100. Der Sarkissian S, Marchand EL, Duguay D, Hamet P, deBlois D. Reversal of interstitial fibroblast hyperplasia via apoptosis in hypertensive rat heart with valsartan or enalapril. *Cardiovascular research*. 2003;57(3):775-83.
101. Duguay D, Pesant S, Deschepper CF, deBlois D. Fibroblast apoptosis precedes cardiomyocyte mass reduction during left ventricular remodeling in hypertensive rats treated with amlodipine. *Journal of hypertension*. 2007;25(6):1291-9.
102. Anversa P, Palackal T, Sonnenblick EH, Olivetti G, Capasso JM. Hypertensive cardiomyopathy. Myocyte nuclei hyperplasia in the mammalian rat heart. *The Journal of clinical investigation*. 1990;85(4):994-7.
103. Anversa P, Palackal T, Sonnenblick EH, Olivetti G, Meggs LG, Capasso JM. Myocyte cell loss and myocyte cellular hyperplasia in the hypertrophied aging rat heart. *Circulation research*. 1990;67(4):871-85.
104. Anversa P, Capasso JM, Olivetti G, Sonnenblick EH. Cellular basis of ventricular remodeling in hypertensive cardiomyopathy. *Am J Hypertens*. 1992;5(10):758-70.
105. Bergmann O, Zdunek S, Felker A, Salehpour M, Alkass K, Bernard S, et al. Dynamics of Cell Generation and Turnover in the Human Heart. *Cell*. 2015;161(7):1566-75.
106. Rosenzweig A. Medicine. Cardiac regeneration. *Science (New York, NY)*. 2012;338(6114):1549-50.
107. Ellison GM, Torella D, Karakikes I, Nadal-Ginard B. Myocyte death and renewal: modern concepts of cardiac cellular homeostasis. *Nat Clin Pract Cardiovasc Med*. 2007;4 Suppl 1:S52-9.
108. Fortuno MA, Gonzalez A, Ravassa S, Lopez B, Diez J. Clinical implications of apoptosis in hypertensive heart disease. *American journal of physiology*. 2003;284(5):H1495-506.
109. Liu JJ, Peng L, Bradley CJ, Zulli A, Shen J, Buxton BF. Increased apoptosis in the heart of genetic hypertension, associated with increased fibroblasts. *Cardiovascular research*. 2000;45(3):729-35.

110. Frangogiannis NG. Cardiac fibrosis: Cell biological mechanisms, molecular pathways and therapeutic opportunities. *Mol Aspects Med.* 2019;65:70-99.
111. Diez J. Towards a new paradigm about hypertensive heart disease. *Med Clin North Am.* 2009;93(3):637-45.
112. Nadruz W. Myocardial remodeling in hypertension. *Journal of human hypertension.* 2015;29(1):1-6.
113. Kong P, Christia P, Frangogiannis NG. The pathogenesis of cardiac fibrosis. *Cell Mol Life Sci.* 2014;71(4):549-74.
114. Honold L, Nahrendorf M. Resident and Monocyte-Derived Macrophages in Cardiovascular Disease. *Circulation research.* 2018;122(1):113-27.
115. Klingbeil AU, Schneider M, Martus P, Messerli FH, Schmieder RE. A meta-analysis of the effects of treatment on left ventricular mass in essential hypertension. *The American journal of medicine.* 2003;115(1):41-6.
116. Yokoyama H, Averill DB, Brosnihan KB, Smith RD, Schiffrin EL, Ferrario CM. Role of blood pressure reduction in prevention of cardiac and vascular hypertrophy. *Am J Hypertens.* 2005;18(7):922-9.
117. Tea BS, Dam TV, Moreau P, Hamet P, deBlois D. Apoptosis during regression of cardiac hypertrophy in spontaneously hypertensive rats. Temporal regulation and spatial heterogeneity. *Hypertension.* 1999;34(2):229-35.
118. Rehman A, Schiffrin EL. Vascular effects of antihypertensive drug therapy. *Current hypertension reports.* 2010;12(4):226-32.
119. Schiffrin EL. Vascular remodeling in hypertension: mechanisms and treatment. *Hypertension.* 2012;59(2):367-74.
120. deBlois D, Tea BS, Than VD, Tremblay J, Hamet P. Smooth muscle apoptosis during vascular regression in spontaneously hypertensive rats. *Hypertension.* 1997;29(1 Pt 2):340-9.
121. Owens GK. Differential effects of antihypertensive drug therapy on vascular smooth muscle cell hypertrophy, hyperploidy, and hyperplasia in the spontaneously hypertensive rat. *Circulation research.* 1985;56(4):525-36.
122. Wolinsky H. Effects of hypertension and its reversal on the thoracic aorta of male and female rats. Morphological and chemical studies. *Circulation research.* 1971;28(6):622-37.
123. Owens GK. Influence of blood pressure on development of aortic medial smooth muscle hypertrophy in spontaneously hypertensive rats. *Hypertension.* 1987;9(2):178-87.

124. Schiffrin EL, Pu Q, Park JB. Effect of amlodipine compared to atenolol on small arteries of previously untreated essential hypertensive patients. *Am J Hypertens*. 2002;15(2 Pt 1):105-10.
125. Dahlof B, Devereux RB, Kjeldsen SE, Julius S, Beevers G, de Faire U, et al. Cardiovascular morbidity and mortality in the Losartan Intervention For Endpoint reduction in hypertension study (LIFE): a randomised trial against atenolol. *Lancet*. 2002;359(9311):995-1003.
126. Lonn EM, Yusuf S, Doris CI, Sabine MJ, Dzavik V, Hutchison K, et al. Study design and baseline characteristics of the study to evaluate carotid ultrasound changes in patients treated with ramipril and vitamin E: SECURE. *The American journal of cardiology*. 1996;78(8):914-9.
127. Neutel JM. Effect of the renin--angiotensin system on the vessel wall: using ACE inhibition to improve endothelial function. *Journal of human hypertension*. 2004;18(9):599-606.
128. Wilmink HW, Banga JD, Hijmering M, Erkelens WD, Stroes ES, Rabelink TJ. Effect of angiotensin-converting enzyme inhibition and angiotensin II type 1 receptor antagonism on postprandial endothelial function. *Journal of the American College of Cardiology*. 1999;34(1):140-5.
129. Schiffrin EL, Park JB, Intengan HD, Touyz RM. Correction of arterial structure and endothelial dysfunction in human essential hypertension by the angiotensin receptor antagonist losartan. *Circulation*. 2000;101(14):1653-9.
130. Asmar RG, Pannier B, Santoni JP, Laurent S, London GM, Levy BI, et al. Reversion of cardiac hypertrophy and reduced arterial compliance after converting enzyme inhibition in essential hypertension. *Circulation*. 1988;78(4):941-50.
131. Soltis EE. Alterations in vascular structure and function after short-term losartan treatment in spontaneously hypertensive rats. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*. 1993;266(2):642-6.
132. Tea BS, Der Sarkissian S, Touyz RM, Hamet P, deBlois D. Proapoptotic and growth-inhibitory role of angiotensin II type 2 receptor in vascular smooth muscle cells of spontaneously hypertensive rats in vivo. *Hypertension*. 2000;35(5):1069-73.
133. Deblois D, Tea BS, Beaudry D, Hamet P. Regulation of therapeutic apoptosis: a potential target in controlling hypertensive organ damage. *Canadian journal of physiology and pharmacology*. 2005;83(1):29-41.
134. Hamet P, Moreau P, Dam TV, Orlov SN, Tea BS, de Blois D, et al. The time window of apoptosis: a new component in the therapeutic strategy for cardiovascular remodeling. *J Hypertens Suppl*. 1996;14(5):S65-70.

135. Devereux RB, Wachtell K, Gerdts E, Boman K, Nieminen MS, Papademetriou V, et al. Prognostic significance of left ventricular mass change during treatment of hypertension. *Jama*. 2004;292(19):2350-6.
136. Schmieder RE, Martus P, Klingbeil A. Reversal of left ventricular hypertrophy in essential hypertension. A meta-analysis of randomized double-blind studies. *JAMA*. 1996;275(19):1507-13.
137. Schmieder RE, Langenfeld MR, Gatzka CD, Weidinger G, Schobel HP. Impact of alpha- versus beta-blockers on hypertensive target organ damage: results of a double-blind, randomized, controlled clinical trial. *Am J Hypertens*. 1997;10(9 Pt 1):985-91.
138. Solomon SD, Appelbaum E, Manning WJ, Verma A, Berglund T, Lukashevich V, et al. Effect of the direct Renin inhibitor aliskiren, the Angiotensin receptor blocker losartan, or both on left ventricular mass in patients with hypertension and left ventricular hypertrophy. *Circulation*. 2009;119(4):530-7.
139. Tsoporis J, Fields N, Lee RM, Leenen FH. Effects of the arterial vasodilator minoxidil on cardiovascular structure and sympathetic activity in spontaneously hypertensive rats. *Journal of hypertension*. 1993;11(12):1337-45.
140. Griffin SA, Brown WC, MacPherson F, McGrath JC, Wilson VG, Korsgaard N, et al. Angiotensin II causes vascular hypertrophy in part by a non-pressor mechanism. *Hypertension*. 1991;17(5):626-35.
141. Brilla CG. Regression of myocardial fibrosis in hypertensive heart disease: diverse effects of various antihypertensive drugs. *Cardiovascular research*. 2000;46(2):324-31.
142. Ito N, Ohishi M, Yamamoto K, Tataru Y, Shiota A, Hayashi N, et al. Renin-angiotensin inhibition reverses advanced cardiac remodeling in aging spontaneously hypertensive rats. *Am J Hypertens*. 2007;20(7):792-9.
143. Liang B, Leenen FH. Prevention of salt induced hypertension and fibrosis by angiotensin converting enzyme inhibitors in Dahl S rats. *Br J Pharmacol*. 2007;152(6):903-14.
144. Peng H, Carretero OA, Vuljaj N, Liao TD, Motivala A, Peterson EL, et al. Angiotensin-converting enzyme inhibitors: a new mechanism of action. *Circulation*. 2005;112(16):2436-45.
145. Stein M, Boulaksil M, Jansen JA, Herold E, Noorman M, Joles JA, et al. Reduction of fibrosis-related arrhythmias by chronic renin-angiotensin-aldosterone system inhibitors in an aged mouse model. *American journal of physiology*. 2010;299(2):H310-21.
146. Susic D, Varagic J, Frohlich ED. Pharmacologic agents on cardiovascular mass, coronary dynamics and collagen in aged spontaneously hypertensive rats. *Journal of hypertension*. 1999;17(8):1209-15.
147. Baumann M, Hermans JJ, Janssen BJ, Peutz-Kootstra C, Witzke O, Heemann U, et al. Transient prehypertensive treatment in spontaneously hypertensive rats: a comparison of spironolactone and

losartan regarding long-term blood pressure and target organ damage. *Journal of hypertension*. 2007;25(12):2504-11.

148. Baumann M, Janssen BJ, Hermans JJ, Peutz-Kootstra C, Witzke O, Smits JF, et al. Transient AT1 receptor-inhibition in prehypertensive spontaneously hypertensive rats results in maintained cardiac protection until advanced age. *Journal of hypertension*. 2007;25(1):207-15.

149. Peng F, Lin J, Lin L, Tang H. Transient prehypertensive treatment in spontaneously hypertensive rats: a comparison of losartan and amlodipine regarding long-term blood pressure, cardiac and renal protection. *Int J Mol Med*. 2012;30(6):1376-86.

150. Aceros H, Farah G, Cobos-Puc L, Stabile AM, Noiseux N, Mukaddam-Daher S. Moxonidine improves cardiac structure and performance in SHR through inhibition of cytokines, p38 MAPK and Akt. *Br J Pharmacol*. 2011;164(3):946-57.

151. Guerrero EI, Ardanaz N, Sevilla MA, Arevalo MA, Montero MJ. Cardiovascular effects of nebivolol in spontaneously hypertensive rats persist after treatment withdrawal. *Journal of hypertension*. 2006;24(1):151-8.

152. Lu JC, Cui W, Zhang HL, Liu F, Han M, Liu DM, et al. Additive beneficial effects of amlodipine and atorvastatin in reversing advanced cardiac hypertrophy in elderly spontaneously hypertensive rats. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 2009;36(11):1110-9.

153. Sevilla MA, Voces F, Carron R, Guerrero EI, Ardanaz N, San Roman L, et al. Amlodipine decreases fibrosis and cardiac hypertrophy in spontaneously hypertensive rats: persistent effects after withdrawal. *Life sciences*. 2004;75(7):881-91.

154. Ciulla MM, Paliotti R, Esposito A, Cuspidi C, Muiesan ML, Rosei EA, et al. Effects of antihypertensive treatment on ultrasound measures of myocardial fibrosis in hypertensive patients with left ventricular hypertrophy: results of a randomized trial comparing the angiotensin receptor antagonist, candesartan and the angiotensin-converting enzyme inhibitor, enalapril. *Journal of hypertension*. 2009;27(3):626-32.

155. Ciulla MM, Paliotti R, Esposito A, Diez J, Lopez B, Dahlof B, et al. Different effects of antihypertensive therapies based on losartan or atenolol on ultrasound and biochemical markers of myocardial fibrosis: results of a randomized trial. *Circulation*. 2004;110(5):552-7.

156. Diez J, Querejeta R, Lopez B, Gonzalez A, Larman M, Martinez Ubago JL. Losartan-dependent regression of myocardial fibrosis is associated with reduction of left ventricular chamber stiffness in hypertensive patients. *Circulation*. 2002;105(21):2512-7.

157. Fogari R, Mugellini A, Destro M, Corradi L, Lazzari P, Zoppi A, et al. Losartan and amlodipine on myocardial structure and function: a prospective, randomized, clinical trial. *Diabet Med.* 2012;29(1):24-31.
158. Muller-Brunotte R, Kahan T, Lopez B, Edner M, Gonzalez A, Diez J, et al. Myocardial fibrosis and diastolic dysfunction in patients with hypertension: results from the Swedish Irbesartan Left Ventricular Hypertrophy Investigation versus Atenolol (SILVHIA). *Journal of hypertension.* 2007;25(9):1958-66.
159. Ishimitsu T, Kobayashi T, Honda T, Takahashi M, Minami J, Ohta S, et al. Protective effects of an angiotensin II receptor blocker and a long-acting calcium channel blocker against cardiovascular organ injuries in hypertensive patients. *Hypertens Res.* 2005;28(4):351-9.
160. Guo C, Wang Y, Liang H, Zhang J. ADAMTS-1 contributes to the antifibrotic effect of captopril by accelerating the degradation of type I collagen in chronic viral myocarditis. *European journal of pharmacology.* 2010;629(1-3):104-10.
161. Meng G, Wu F, Yang L, Zhu H, Gu J, He M, et al. Synergistic attenuation of myocardial fibrosis in spontaneously hypertensive rats by joint treatment with benazepril and candesartan. *Journal of cardiovascular pharmacology.* 2009;54(1):16-24.
162. Yamada T, Horiuchi M, Dzau VJ. Angiotensin II type 2 receptor mediates programmed cell death. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 1996;93(1):156-60.
163. Porter KE, Turner NA. Cardiac fibroblasts: at the heart of myocardial remodeling. *Pharmacology & therapeutics.* 2009;123(2):255-78.
164. Akashiba A, Ono H, Ono Y, Ishimitsu T, Matsuoka H. Valsartan improves L-NAME-exacerbated cardiac fibrosis with TGF- α inhibition and apoptosis induction in spontaneously hypertensive rats. *J Cardiol.* 2008;52(3):239-46.
165. Lavoie JL, Sigmund CD. Minireview: overview of the renin-angiotensin system--an endocrine and paracrine system. *Endocrinology.* 2003;144(6):2179-83.
166. Paul M, Poyan Mehr A, Kreutz R. Physiology of local renin-angiotensin systems. *Physiological reviews.* 2006;86(3):747-803.
167. Bumpus FM, Catt KJ, Chiu AT, DeGasparo M, Goodfriend T, Husain A, et al. Nomenclature for angiotensin receptors. A report of the Nomenclature Committee of the Council for High Blood Pressure Research. *Hypertension.* 1991;17(5):720-1.
168. de Gasparo M, Catt KJ, Inagami T, Wright JW, Unger T. International union of pharmacology. XXIII. The angiotensin II receptors. *Pharmacological reviews.* 2000;52(3):415-72.

169. Murphy TJ, Alexander RW, Griendling KK, Runge MS, Bernstein KE. Isolation of a cDNA encoding the vascular type-1 angiotensin II receptor. *Nature*. 1991;351(6323):233-6.
170. Sasaki K, Yamano Y, Bardhan S, Iwai N, Murray JJ, Hasegawa M, et al. Cloning and expression of a complementary DNA encoding a bovine adrenal angiotensin II type-1 receptor. *Nature*. 1991;351(6323):230-3.
171. Iwai N, Inagami T. Identification of two subtypes in the rat type I angiotensin II receptor. *FEBS letters*. 1992;298(2-3):257-60.
172. Allen AM, Zhuo J, Mendelsohn FA. Localization and function of angiotensin AT1 receptors. *Am J Hypertens*. 2000;13(1 Pt 2):31S-8S.
173. Timmermans PB, Wong PC, Chiu AT, Herblin WF, Benfield P, Carini DJ, et al. Angiotensin II receptors and angiotensin II receptor antagonists. *Pharmacological reviews*. 1993;45(2):205-51.
174. Capponi AM. Distribution and signal transduction of angiotensin II AT1 and AT2 receptors. *Blood pressure*. 1996;2:41-6.
175. Booz GW, Dostal DE, Singer HA, Baker KM. Involvement of protein kinase C and Ca²⁺ in angiotensin II-induced mitogenesis of cardiac fibroblasts. *The American journal of physiology*. 1994;267(5 Pt 1):C1308-18.
176. Griendling KK, Ushio-Fukai M, Lassegue B, Alexander RW. Angiotensin II signaling in vascular smooth muscle. New concepts. *Hypertension*. 1997;29(1 Pt 2):366-73.
177. Touyz RM, Berry C. Recent advances in angiotensin II signaling. *Brazilian journal of medical and biological research = Revista brasileira de pesquisas medicas e biologicas / Sociedade Brasileira de Biofisica* [et al. 2002;35(9):1001-15.
178. Anand-Srivastava MB. Angiotensin II receptors negatively coupled to adenylate cyclase in rat aorta. *Biochemical and biophysical research communications*. 1983;117(2):420-8.
179. Yin G, Yan C, Berk BC. Angiotensin II signaling pathways mediated by tyrosine kinases. *The international journal of biochemistry & cell biology*. 2003;35(6):780-3.
180. Oro C, Qian H, Thomas WG. Type 1 angiotensin receptor pharmacology: signaling beyond G proteins. *Pharmacology & therapeutics*. 2007;113(1):210-26.
181. Shenoy SK, Lefkowitz RJ. Angiotensin II-stimulated signaling through G proteins and beta-arrestin. *Sci STKE*. 2005;2005(311):cm14.
182. Griendling KK, Sorescu D, Ushio-Fukai M. NAD(P)H oxidase: role in cardiovascular biology and disease. *Circulation research*. 2000;86(5):494-501.

183. Griendling KK, Ushio-Fukai M. Reactive oxygen species as mediators of angiotensin II signaling. *Regulatory peptides*. 2000;91(1-3):21-7.
184. Hanna IR, Taniyama Y, Szocs K, Rocic P, Griendling KK. NAD(P)H oxidase-derived reactive oxygen species as mediators of angiotensin II signaling. *Antioxidants & redox signaling*. 2002;4(6):899-914.
185. Lassegue B, Griendling KK. Reactive oxygen species in hypertension; An update. *Am J Hypertens*. 2004;17(9):852-60.
186. Koike G, Horiuchi M, Yamada T, Szpirer C, Jacob HJ, Dzau VJ. Human type 2 angiotensin II receptor gene: cloned, mapped to the X chromosome, and its mRNA is expressed in the human lung. *Biochemical and biophysical research communications*. 1994;203(3):1842-50.
187. Koike G, Winer ES, Horiuchi M, Brown DM, Szpirer C, Dzau VJ, et al. Cloning, characterization, and genetic mapping of the rat type 2 angiotensin II receptor gene. *Hypertension*. 1995;26(6 Pt 1):998-1002.
188. Nakajima M, Mukoyama M, Pratt RE, Horiuchi M, Dzau VJ. Cloning of cDNA and analysis of the gene for mouse angiotensin II type 2 receptor. *Biochemical and biophysical research communications*. 1993;197(2):393-9.
189. Nahmias C, Strosberg AD. The angiotensin AT₂ receptor: searching for signal-transduction pathways and physiological function. *Trends in pharmacological sciences*. 1995;16(7):223-5.
190. Tsutsumi Y, Matsubara H, Ohkubo N, Mori Y, Nozawa Y, Murasawa S, et al. Angiotensin II type 2 receptor is upregulated in human heart with interstitial fibrosis, and cardiac fibroblasts are the major cell type for its expression. *Circulation research*. 1998;83(10):1035-46.
191. Kimura B, Sumners C, Phillips MI. Changes in skin angiotensin II receptors in rats during wound healing. *Biochemical and biophysical research communications*. 1992;187(2):1083-90.
192. Nio Y, Matsubara H, Murasawa S, Kanasaki M, Inada M. Regulation of gene transcription of angiotensin II receptor subtypes in myocardial infarction. *The Journal of clinical investigation*. 1995;95(1):46-54.
193. Steckelings UM, Kaschina E, Unger T. The AT₂ receptor--a matter of love and hate. *Peptides*. 2005;26(8):1401-9.
194. Nouet S, Nahmias C. Signal transduction from the angiotensin II AT₂ receptor. *Trends in endocrinology and metabolism: TEM*. 2000;11(1):1-6.
195. Whitebread S, Mele M, Kamber B, de Gasparo M. Preliminary biochemical characterization of two angiotensin II receptor subtypes. *Biochemical and biophysical research communications*. 1989;163(1):284-91.

196. Chiu AT, Herblin WF, McCall DE, Ardecky RJ, Carini DJ, Duncia JV, et al. Identification of angiotensin II receptor subtypes. *Biochemical and biophysical research communications*. 1989;165(1):196-203.
197. Wan Y, Wallinder C, Plouffe B, Beaudry H, Mahalingam AK, Wu X, et al. Design, synthesis, and biological evaluation of the first selective nonpeptide AT₂ receptor agonist. *J Med Chem*. 2004;47(24):5995-6008.
198. Faria-Costa G, Leite-Moreira A, Henriques-Coelho T. Cardiovascular effects of the angiotensin type 2 receptor. *Rev Port Cardiol*. 2014;33(7-8):439-49.
199. Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *British journal of cancer*. 1972;26(4):239-57.
200. Horvitz HR, Sternberg PW, Greenwald IS, Fixsen W, Ellis HM. Mutations that affect neural cell lineages and cell fates during the development of the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Cold Spring Harbor symposia on quantitative biology*. 1983;48 Pt 2:453-63.
201. Horvitz HR, Shaham S, Hengartner MO. The genetics of programmed cell death in the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Cold Spring Harbor symposia on quantitative biology*. 1994;59:377-85.
202. Majno G, Joris I. Apoptosis, oncosis, and necrosis. An overview of cell death. *The American journal of pathology*. 1995;146(1):3-15.
203. Elmore S. Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicol Pathol*. 2007;35(4):495-516.
204. Leist M, Jaattela M. Four deaths and a funeral: from caspases to alternative mechanisms. *Nature reviews*. 2001;2(8):589-98.
205. D'Arcy MS. Cell death: a review of the major forms of apoptosis, necrosis and autophagy. *Cell Biol Int*. 2019;43(6):582-92.
206. McIlwain DR, Berger T, Mak TW. Caspase functions in cell death and disease. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2015;7(4).
207. Kroemer G, El-Deiry WS, Golstein P, Peter ME, Vaux D, Vandenabeele P, et al. Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death. *Cell Death Differ*. 2005;12 Suppl 2:1463-7.
208. Kroemer G, Galluzzi L, Vandenabeele P, Abrams J, Alnemri ES, Baehrecke EH, et al. Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2009. *Cell Death Differ*. 2009;16(1):3-11.
209. Galluzzi L, Vitale I, Abrams JM, Alnemri ES, Baehrecke EH, Blagosklonny MV, et al. Molecular definitions of cell death subroutines: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2012. *Cell Death Differ*. 2012;19(1):107-20.

210. Galluzzi L, Bravo-San Pedro JM, Vitale I, Aaronson SA, Abrams JM, Adam D, et al. Essential versus accessory aspects of cell death: recommendations of the NCCD 2015. *Cell Death Differ.* 2015;22(1):58-73.
211. Galluzzi L, Vitale I, Aaronson SA, Abrams JM, Adam D, Agostinis P, et al. Molecular mechanisms of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2018. *Cell Death Differ.* 2018;25(3):486-541.
212. Tang D, Kang R, Berghe TV, Vandenabeele P, Kroemer G. The molecular machinery of regulated cell death. *Cell Res.* 2019;29(5):347-64.
213. Green DR, Kroemer G. Pharmacological manipulation of cell death: clinical applications in sight? *The Journal of clinical investigation.* 2005;115(10):2610-7.
214. Peng L, Bradley CJ, Zulli A, Liu JJ. The relationship between apoptosis and spontaneous hypertension. *Chinese medical journal.* 1999;112(6):562-8.
215. Hamet P, Thorin-Trescases N, Moreau P, Dumas P, Tea BS, deBlois D, et al. Workshop: excess growth and apoptosis: is hypertension a case of accelerated aging of cardiovascular cells? *Hypertension.* 2001;37(2 Part 2):760-6.
216. Choi JH, Yoo KH, Cheon HW, Kim KB, Hong YS, Lee JW, et al. Angiotensin converting enzyme inhibition decreases cell turnover in the neonatal rat heart. *Pediatric research.* 2002;52(3):325-32.
217. Re RN, DiPette DJ, Schiffrin EL, Sowers JR. *Molecular Mechanisms in Hypertension.* Taylor & Francis 2006:p 278-9.
218. Ravassa S, Fortuno MA, Gonzalez A, Lopez B, Zalba G, Fortuno A, et al. Mechanisms of increased susceptibility to angiotensin II-induced apoptosis in ventricular cardiomyocytes of spontaneously hypertensive rats. *Hypertension.* 2000;36(6):1065-71.
219. Klett CP, Palmer A, Gallagher AM, Rioseco-Camacho N, Printz MP. Differences in cultured cardiac fibroblast populations isolated from SHR and WKY rats. *Clinical and experimental pharmacology & physiology.* 1995;22(1):S265-7.
220. Gonzalez A, Lopez B, Ravassa S, Querejeta R, Larman M, Diez J, et al. Stimulation of cardiac apoptosis in essential hypertension: potential role of angiotensin II. *Hypertension.* 2002;39(1):75-80.
221. Sharifi AM, Schiffrin EL. Apoptosis in aorta of deoxycorticosterone acetate-salt hypertensive rats: effect of endothelin receptor antagonism. *Journal of hypertension.* 1997;15(12 Pt 1):1441-8.
222. Diep QN, El Mabrouk M, Yue P, Schiffrin EL. Effect of AT(1) receptor blockade on cardiac apoptosis in angiotensin II-induced hypertension. *American journal of physiology.* 2002;282(5):H1635-41.
223. Li CJ, Chen CS, Yang GT, Tsai AP, Liao WT, Wu MY. Advanced Evolution of Pathogenesis Concepts in Cardiomyopathies. *J Clin Med.* 2019;8(4).

224. Pollman MJ, Hall JL, Mann MJ, Zhang L, Gibbons GH. Inhibition of neointimal cell bcl-x expression induces apoptosis and regression of vascular disease. *Nature medicine*. 1998;4(2):222-7.
225. Lemay J, Hamet P, deBlois D. Losartan-induced apoptosis as a novel mechanism for the prevention of vascular lesion formation after injury. *J Renin Angiotensin Aldosterone Syst*. 2000;1(1):46-50.
226. Lemay J, Tea BS, Hamet P, deBlois D. Regression of neointimal lesions in the carotid artery of nifedipine-treated SHR and WKY rats: possible role of apoptosis. *Journal of vascular research*. 2001;38(5):462-70.
227. Der Sarkissian S, Tea BS, Touyz RM, deBlois D, Hale TM. Role of angiotensin II type 2 receptor during regression of cardiac hypertrophy in spontaneously hypertensive rats. *J Am Soc Hypertens*. 2013;7(2):118-27.
228. Souders CA, Bowers SL, Baudino TA. Cardiac fibroblast: the renaissance cell. *Circulation research*. 2009;105(12):1164-76.
229. deBlois D, Orlov SN, Hamet P. Apoptosis in cardiovascular remodeling--effect of medication. *Cardiovascular drugs and therapy / sponsored by the International Society of Cardiovascular Pharmacotherapy*. 2001;15(6):539-45.
230. Sadoshima J, Izumo S. Molecular characterization of angiotensin II--induced hypertrophy of cardiac myocytes and hyperplasia of cardiac fibroblasts. Critical role of the AT1 receptor subtype. *Circulation research*. 1993;73(3):413-23.
231. Horiuchi M, Akishita M, Dzau VJ. Molecular and cellular mechanism of angiotensin II-mediated apoptosis. *Endocrine research*. 1998;24(3-4):307-14.
232. Marchand EL, Der Sarkissian S, Hamet P, deBlois D. Caspase-dependent cell death mediates the early phase of aortic hypertrophy regression in losartan-treated spontaneously hypertensive rats. *Circulation research*. 2003;92(7):777-84.
233. Der Sarkissian S, Marchand EL, Duguay D, deBlois D. Synergistic interaction between enalapril, L-arginine and tetrahydrobiopterin in smooth muscle cell apoptosis and aortic remodeling induction in SHR. *Br J Pharmacol*. 2004;142(5):912-8.
234. Cho A, Mitchell L, Koopmans D, Langille BL. Effects of changes in blood flow rate on cell death and cell proliferation in carotid arteries of immature rabbits. *Circulation research*. 1997;81(3):328-37.
235. Duguay D, DeBlois D. Differential regulation of Akt, caspases and MAP kinases underlies smooth muscle cell apoptosis during aortic remodelling in SHR treated with amlodipine. *Br J Pharmacol*. 2007.

236. Levy BI, Benessiano J, Henrion D, Caputo L, Heymes C, Duriez M, et al. Chronic blockade of AT₂-subtype receptors prevents the effect of angiotensin II on the rat vascular structure. *The Journal of clinical investigation*. 1996;98(2):418-25.
237. Otsuka S, Sugano M, Makino N, Sawada S, Hata T, Niho Y. Interaction of mRNAs for angiotensin II type 1 and type 2 receptors to vascular remodeling in spontaneously hypertensive rats. *Hypertension*. 1998;32(3):467-72.
238. Dixon BS, Dennis MJ. Regulation of mitogenesis by kinins in arterial smooth muscle cells. *The American journal of physiology*. 1997;273(1 Pt 1):C7-20.
239. Kleine L, Liu G, Leblanc N, Hebert RL. Bradykinin stimulates ceramide production by activating specific BK-B(1) receptor in rat small artery. *American journal of physiology*. 2002;282(1):H175-83.
240. Lehtonen JY, Horiuchi M, Daviet L, Akishita M, Dzau VJ. Activation of the de novo biosynthesis of sphingolipids mediates angiotensin II type 2 receptor-induced apoptosis. *The Journal of biological chemistry*. 1999;274(24):16901-6.
241. Hannun YA, Obeid LM. Ceramide: an intracellular signal for apoptosis. *Trends in biochemical sciences*. 1995;20(2):73-7.
242. Gallinat S, Busche S, Schutze S, Kronke M, Unger T. AT₂ receptor stimulation induces generation of ceramides in PC12W cells. *FEBS letters*. 1999;443(1):75-9.
243. Duguay D, Der Sarkissian S, Kouz R, Ongali B, Couture R, deBlois D. Kinin B₂ receptor is not involved in enalapril-induced apoptosis and regression of hypertrophy in spontaneously hypertensive rat aorta: possible role of B₁ receptor. *Br J Pharmacol*. 2004;141(4):728-36.
244. Greider CW, Blackburn EH. Telomeres, telomerase and cancer. *Scientific American*. 1996;274(2):92-7.
245. Olovnikov AM. A theory of marginotomy. The incomplete copying of template margin in enzymic synthesis of polynucleotides and biological significance of the phenomenon. *Journal of theoretical biology*. 1973;41(1):181-90.
246. Shay JW, Wright WE. Hayflick, his limit, and cellular ageing. *Nature reviews*. 2000;1(1):72-6.
247. Reddel RR. The role of senescence and immortalization in carcinogenesis. *Carcinogenesis*. 2000;21(3):477-84.
248. Matulic M, Sopta M, Rubelj I. Telomere dynamics: the means to an end. *Cell proliferation*. 2007;40(4):462-74.

249. Moyzis RK, Buckingham JM, Cram LS, Dani M, Deaven LL, Jones MD, et al. A highly conserved repetitive DNA sequence, (TTAGGG)_n, present at the telomeres of human chromosomes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1988;85(18):6622-6.
250. Harley CB, Futcher AB, Greider CW. Telomeres shorten during ageing of human fibroblasts. *Nature*. 1990;345(6274):458-60.
251. Griffith JD, Comeau L, Rosenfield S, Stansel RM, Bianchi A, Moss H, et al. Mammalian telomeres end in a large duplex loop. *Cell*. 1999;97(4):503-14.
252. Pisano S, Galati A, Cacchione S. Telomeric nucleosomes: forgotten players at chromosome ends. *Cell Mol Life Sci*. 2008;65(22):3553-63.
253. de Lange T. Shelterin: the protein complex that shapes and safeguards human telomeres. *Genes & development*. 2005;19(18):2100-10.
254. Palm W, de Lange T. How shelterin protects mammalian telomeres. *Annu Rev Genet*. 2008;42:301-34.
255. Ledford H. Minimum telomere length defined for healthy cells. *Nature*. 2007;449(7162):515.
256. Blasco MA. Mammalian telomeres and telomerase: why they matter for cancer and aging. *European journal of cell biology*. 2003;82(9):441-6.
257. de Lange T. Protection of mammalian telomeres. *Oncogene*. 2002;21(4):532-40.
258. Riethman H, Ambrosini A, Paul S. Human subtelomere structure and variation. *Chromosome Res*. 2005;13(5):505-15.
259. Blasco MA. Telomere length, stem cells and aging. *Nat Chem Biol*. 2007;3(10):640-9.
260. Hemann MT, Strong MA, Hao LY, Greider CW. The shortest telomere, not average telomere length, is critical for cell viability and chromosome stability. *Cell*. 2001;107(1):67-77.
261. Zou Y, Sfeir A, Gryaznov SM, Shay JW, Wright WE. Does a sentinel or a subset of short telomeres determine replicative senescence? *Molecular biology of the cell*. 2004;15(8):3709-18.
262. Meier A, Fiegler H, Munoz P, Ellis P, Rigler D, Langford C, et al. Spreading of mammalian DNA-damage response factors studied by ChIP-chip at damaged telomeres. *The EMBO journal*. 2007;26(11):2707-18.
263. Laberthonniere C, Magdinier F, Robin JD. Bring It to an End: Does Telomeres Size Matter? *Cells*. 2019;8(1).
264. Daniali L, Benetos A, Susser E, Kark JD, Labat C, Kimura M, et al. Telomeres shorten at equivalent rates in somatic tissues of adults. *Nat Commun*. 2013;4:1597.

265. Greider CW, Blackburn EH. Identification of a specific telomere terminal transferase activity in *Tetrahymena* extracts. *Cell*. 1985;43(2 Pt 1):405-13.
266. Greider CW, Blackburn EH. The telomere terminal transferase of *Tetrahymena* is a ribonucleoprotein enzyme with two kinds of primer specificity. *Cell*. 1987;51(6):887-98.
267. Greider CW, Blackburn EH. A telomeric sequence in the RNA of *Tetrahymena* telomerase required for telomere repeat synthesis. *Nature*. 1989;337(6205):331-7.
268. Yu GL, Bradley JD, Attardi LD, Blackburn EH. In vivo alteration of telomere sequences and senescence caused by mutated *Tetrahymena* telomerase RNAs. *Nature*. 1990;344(6262):126-32.
269. Lingner J, Hughes TR, Shevchenko A, Mann M, Lundblad V, Cech TR. Reverse transcriptase motifs in the catalytic subunit of telomerase. *Science (New York, NY)*. 1997;276(5312):561-7.
270. Prowse KR, Greider CW. Developmental and tissue-specific regulation of mouse telomerase and telomere length. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1995;92(11):4818-22.
271. Cherif H, Tarry JL, Ozanne SE, Hales CN. Ageing and telomeres: a study into organ- and gender-specific telomere shortening. *Nucleic acids research*. 2003;31(5):1576-83.
272. Coviello-McLaughlin GM, Prowse KR. Telomere length regulation during postnatal development and ageing in *Mus spretus*. *Nucleic acids research*. 1997;25(15):3051-8.
273. Slagboom PE, Droog S, Boomsma DI. Genetic determination of telomere size in humans: a twin study of three age groups. *American journal of human genetics*. 1994;55(5):876-82.
274. Takubo K, Izumiyama-Shimomura N, Honma N, Sawabe M, Arai T, Kato M, et al. Telomere lengths are characteristic in each human individual. *Experimental gerontology*. 2002;37(4):523-31.
275. Masutomi K, Yu EY, Khurts S, Ben-Porath I, Currier JL, Metz GB, et al. Telomerase maintains telomere structure in normal human cells. *Cell*. 2003;114(2):241-53.
276. Teixeira MT, Arneric M, Sperisen P, Lingner J. Telomere length homeostasis is achieved via a switch between telomerase- extendible and -nonextendible states. *Cell*. 2004;117(3):323-35.
277. Demissie S, Levy D, Benjamin EJ, Cupples LA, Gardner JP, Herbert A, et al. Insulin resistance, oxidative stress, hypertension, and leukocyte telomere length in men from the Framingham Heart Study. *Aging cell*. 2006;5(4):325-30.
278. Sampson MJ, Winterbone MS, Hughes JC, Dozio N, Hughes DA. Monocyte telomere shortening and oxidative DNA damage in type 2 diabetes. *Diabetes care*. 2006;29(2):283-9.
279. Benetos A, Gardner JP, Kimura M, Labat C, Nzietchueng R, Dousset B, et al. Aldosterone and telomere length in white blood cells. *The journals of gerontology*. 2005;60(12):1593-6.

280. Fuster JJ, Andres V. Telomere biology and cardiovascular disease. *Circulation research*. 2006;99(11):1167-80.
281. Barnes RP, Fouquerel E, Opresko PL. The impact of oxidative DNA damage and stress on telomere homeostasis. *Mechanisms of ageing and development*. 2019;177:37-45.
282. von Zglinicki T. Oxidative stress shortens telomeres. *Trends in biochemical sciences*. 2002;27(7):339-44.
283. Debacq-Chainiaux F, Ben Ameer R, Bauwens E, Dumortier E, Toutfaire M, Toussaint O. Stress-Induced (Premature) Senescence. In: Rattan SIS, Hayflick L, editors. *Cellular Ageing and Replicative Senescence*. Cham: Springer International Publishing; 2016. p. 243-62.
284. Calado RT, Young NS. Telomere diseases. *The New England journal of medicine*. 2009;361(24):2353-65.
285. Seluanov A, Chen Z, Hine C, Sasahara TH, Ribeiro AA, Catania KC, et al. Telomerase activity coevolves with body mass not lifespan. *Aging cell*. 2007;6(1):45-52.
286. Wright WE, Shay JW. Telomere dynamics in cancer progression and prevention: fundamental differences in human and mouse telomere biology. *Nature medicine*. 2000;6(8):849-51.
287. Parrinello S, Samper E, Krtolica A, Goldstein J, Melov S, Campisi J. Oxygen sensitivity severely limits the replicative lifespan of murine fibroblasts. *Nat Cell Biol*. 2003;5(8):741-7.
288. Mathon NF, Malcolm DS, Harrisingh MC, Cheng L, Lloyd AC. Lack of replicative senescence in normal rodent glia. *Science (New York, NY)*. 2001;291(5505):872-5.
289. Sherr CJ, DePinho RA. Cellular senescence: mitotic clock or culture shock? *Cell*. 2000;102(4):407-10.
290. Gomes NM, Ryder OA, Houck ML, Charter SJ, Walker W, Forsyth NR, et al. Comparative biology of mammalian telomeres: hypotheses on ancestral states and the roles of telomeres in longevity determination. *Aging cell*. 2011;10(5):761-8.
291. Campisi J. Cellular senescence: putting the paradoxes in perspective. *Curr Opin Genet Dev*. 2011;21(1):107-12.
292. Erusalimsky JD, Kurz DJ. Cellular senescence in vivo: its relevance in ageing and cardiovascular disease. *Experimental gerontology*. 2005;40(8-9):634-42.
293. Beausejour CM, Krtolica A, Galimi F, Narita M, Lowe SW, Yaswen P, et al. Reversal of human cellular senescence: roles of the p53 and p16 pathways. *The EMBO journal*. 2003;22(16):4212-22.
294. Campisi J. Senescent cells, tumor suppression, and organismal aging: good citizens, bad neighbors. *Cell*. 2005;120(4):513-22.

295. Donato AJ, Morgan RG, Walker AE, Lesniewski LA. Cellular and molecular biology of aging endothelial cells. *Journal of molecular and cellular cardiology*. 2015;89(Pt B):122-35.
296. van Deursen JM. The role of senescent cells in ageing. *Nature*. 2014;509(7501):439-46.
297. Narita M, Nunez S, Heard E, Narita M, Lin AW, Hearn SA, et al. Rb-mediated heterochromatin formation and silencing of E2F target genes during cellular senescence. *Cell*. 2003;113(6):703-16.
298. Swanson EC, Manning B, Zhang H, Lawrence JB. Higher-order unfolding of satellite heterochromatin is a consistent and early event in cell senescence. *J Cell Biol*. 2013;203(6):929-42.
299. Anderson R, Richardson GD, Passos JF. Mechanisms driving the ageing heart. *Experimental gerontology*. 2018;109:5-15.
300. Shimizu I, Minamino T. Cellular senescence in cardiac diseases. *J Cardiol*. 2019;74(4):313-9.
301. Lopez-Otin C, Blasco MA, Partridge L, Serrano M, Kroemer G. The hallmarks of aging. *Cell*. 2013;153(6):1194-217.
302. Katsuomi G, Shimizu I, Yoshida Y, Minamino T. Vascular Senescence in Cardiovascular and Metabolic Diseases. *Front Cardiovasc Med*. 2018;5:18.
303. Nelson G, Wordsworth J, Wang C, Jurk D, Lawless C, Martin-Ruiz C, et al. A senescent cell bystander effect: senescence-induced senescence. *Aging cell*. 2012;11(2):345-9.
304. Yeh JK, Wang CY. Telomeres and Telomerase in Cardiovascular Diseases. *Genes (Basel)*. 2016;7(9).
305. Childs BG, Durik M, Baker DJ, van Deursen JM. Cellular senescence in aging and age-related disease: from mechanisms to therapy. *Nature medicine*. 2015;21(12):1424-35.
306. Shimizu I, Yoshida Y, Suda M, Minamino T. DNA damage response and metabolic disease. *Cell Metab*. 2014;20(6):967-77.
307. Morgan RG, Ives SJ, Walker AE, Cawthon RM, Andtbacka RH, Noyes D, et al. Role of arterial telomere dysfunction in hypertension: relative contributions of telomere shortening and telomere uncapping. *Journal of hypertension*. 2014;32(6):1293-9.
308. Durik M, Kavousi M, van der Pluijm I, Isaacs A, Cheng C, Verdonk K, et al. Nucleotide excision DNA repair is associated with age-related vascular dysfunction. *Circulation*. 2012;126(4):468-78.
309. Westhoff JH, Hilgers KF, Steinbach MP, Hartner A, Klanke B, Amann K, et al. Hypertension induces somatic cellular senescence in rats and humans by induction of cell cycle inhibitor p16INK4a. *Hypertension*. 2008;52(1):123-9.
310. Boe AE, Eren M, Murphy SB, Kamide CE, Ichimura A, Terry D, et al. Plasminogen activator inhibitor-1 antagonist TM5441 attenuates Nomega-nitro-L-arginine methyl ester-induced hypertension and vascular senescence. *Circulation*. 2013;128(21):2318-24.

311. Longo VD, Antebi A, Bartke A, Barzilai N, Brown-Borg HM, Caruso C, et al. Interventions to Slow Aging in Humans: Are We Ready? *Aging cell*. 2015;14(4):497-510.
312. Anderson R, Lagnado A, Maggiorani D, Walaszczyk A, Dookun E, Chapman J, et al. Length-independent telomere damage drives post-mitotic cardiomyocyte senescence. *The EMBO journal*. 2019;38(5).
313. Baker DJ, Childs BG, Durik M, Wijers ME, Sieben CJ, Zhong J, et al. Naturally occurring p16(Ink4a)-positive cells shorten healthy lifespan. *Nature*. 2016;530(7589):184-9.
314. Childs BG, Baker DJ, Wijshake T, Conover CA, Campisi J, van Deursen JM. Senescent intimal foam cells are deleterious at all stages of atherosclerosis. *Science (New York, NY)*. 2016;354(6311):472-7.
315. Zhu Y, Tchkonina T, Pirtskhalava T, Gower AC, Ding H, Giorgadze N, et al. The Achilles' heel of senescent cells: from transcriptome to senolytic drugs. *Aging cell*. 2015;14(4):644-58.
316. Roos CM, Zhang B, Palmer AK, Ogrodnik MB, Pirtskhalava T, Thalji NM, et al. Chronic senolytic treatment alleviates established vasomotor dysfunction in aged or atherosclerotic mice. *Aging cell*. 2016;15(5):973-7.
317. Lewis-McDougall FC, Ruchaya PJ, Domenjo-Vila E, Shin Teoh T, Prata L, Cottle BJ, et al. Aged-senescent cells contribute to impaired heart regeneration. *Aging cell*. 2019;18(3):e12931.
318. Maggiorani D. Caractérisation de la sénescence des cardiomyocytes et identification de marqueurs associés. [Thèse de Doctorat]: Université Paul Sabatier - Toulouse III; 2017.
319. Kirkland JL, Tchkonina T. Cellular Senescence: A Translational Perspective. *EBioMedicine*. 2017;21:21-8.
320. Kirkland JL, Tchkonina T, Zhu Y, Niedernhofer LJ, Robbins PD. The Clinical Potential of Senolytic Drugs. *J Am Geriatr Soc*. 2017;65(10):2297-301.
321. Walaszczyk A, Dookun E, Redgrave R, Tual-Chalot S, Victorelli S, Spyridopoulos I, et al. Pharmacological clearance of senescent cells improves survival and recovery in aged mice following acute myocardial infarction. *Aging cell*. 2019;18(3):e12945.
322. Pepper GV, Bateson M, Nettle D. Telomeres as integrative markers of exposure to stress and adversity: a systematic review and meta-analysis. *R Soc Open Sci*. 2018;5(8):180744.
323. Parks CG, Miller DB, McCanlies EC, Cawthon RM, Andrew ME, DeRoo LA, et al. Telomere length, current perceived stress, and urinary stress hormones in women. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2009;18(2):551-60.
324. Cai N, Chang S, Li Y, Li Q, Hu J, Liang J, et al. Molecular signatures of major depression. *Curr Biol*. 2015;25(9):1146-56.

325. Cherkas LF, Aviv A, Valdes AM, Hunkin JL, Gardner JP, Surdulescu GL, et al. The effects of social status on biological aging as measured by white-blood-cell telomere length. *Aging cell*. 2006;5(5):361-5.
326. Bassig BA, Zhang L, Cawthon RM, Smith MT, Yin S, Li G, et al. Alterations in leukocyte telomere length in workers occupationally exposed to benzene. *Environ Mol Mutagen*. 2014;55(8):673-8.
327. Marcon F, Siniscalchi E, Crebelli R, Saieva C, Sera F, Fortini P, et al. Diet-related telomere shortening and chromosome stability. *Mutagenesis*. 2012;27(1):49-57.
328. Aviv A, Chen W, Gardner JP, Kimura M, Brimacombe M, Cao X, et al. Leukocyte telomere dynamics: longitudinal findings among young adults in the Bogalusa Heart Study. *American journal of epidemiology*. 2009;169(3):323-9.
329. Gardner M, Bann D, Wiley L, Cooper R, Hardy R, Nitsch D, et al. Gender and telomere length: systematic review and meta-analysis. *Experimental gerontology*. 2014;51:15-27.
330. Cherkas LF, Hunkin JL, Kato BS, Richards JB, Gardner JP, Surdulescu GL, et al. The association between physical activity in leisure time and leukocyte telomere length. *Arch Intern Med*. 2008;168(2):154-8.
331. Lai TP, Wright WE, Shay JW. Comparison of telomere length measurement methods. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. 2018;373(1741).
332. Lusis AJ. Atherosclerosis. *Nature*. 2000;407(6801):233-41.
333. Gesserick C, Blasco MA. Novel roles for telomerase in aging. *Mechanisms of ageing and development*. 2006;127(6):579-83.
334. Minamino T, Kourembanas S. Mechanisms of telomerase induction during vascular smooth muscle cell proliferation. *Circulation research*. 2001;89(3):237-43.
335. Cao Y, Li H, Mu FT, Ebisui O, Funder JW, Liu JP. Telomerase activation causes vascular smooth muscle cell proliferation in genetic hypertension. *Faseb J*. 2002;16(1):96-8.
336. Oh H, Taffet GE, Youker KA, Entman ML, Overbeek PA, Michael LH, et al. Telomerase reverse transcriptase promotes cardiac muscle cell proliferation, hypertrophy, and survival. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2001;98(18):10308-13.
337. Matthews C, Gorenne I, Scott S, Figg N, Kirkpatrick P, Ritchie A, et al. Vascular smooth muscle cells undergo telomere-based senescence in human atherosclerosis: effects of telomerase and oxidative stress. *Circulation research*. 2006;99(2):156-64.
338. Gorenne I, Kavurma M, Scott S, Bennett M. Vascular smooth muscle cell senescence in atherosclerosis. *Cardiovascular research*. 2006;72(1):9-17.

339. Oh H, Wang SC, Prahash A, Sano M, Moravec CS, Taffet GE, et al. Telomere attrition and Chk2 activation in human heart failure. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2003;100(9):5378-83.
340. Booth SA, Charchar FJ. Cardiac telomere length in heart development, function, and disease. *Physiol Genomics*. 2017;49(7):368-84.
341. Sharifi-Sanjani M, Oyster NM, Tichy ED, Bedi KC, Jr., Harel O, Margulies KB, et al. Cardiomyocyte-Specific Telomere Shortening is a Distinct Signature of Heart Failure in Humans. *J Am Heart Assoc*. 2017;6(9).
342. Terai M, Izumiyama-Shimomura N, Aida J, Ishikawa N, Sawabe M, Arai T, et al. Association of telomere shortening in myocardium with heart weight gain and cause of death. *Sci Rep*. 2013;3:2401.
343. Ogami M, Ikura Y, Ohsawa M, Matsuo T, Kayo S, Yoshimi N, et al. Telomere shortening in human coronary artery diseases. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. 2004;24(3):546-50.
344. Okuda K, Khan MY, Skurnick J, Kimura M, Aviv H, Aviv A. Telomere attrition of the human abdominal aorta: relationships with age and atherosclerosis. *Atherosclerosis*. 2000;152(2):391-8.
345. Aviv H, Khan MY, Skurnick J, Okuda K, Kimura M, Gardner J, et al. Age dependent aneuploidy and telomere length of the human vascular endothelium. *Atherosclerosis*. 2001;159(2):281-7.
346. Chang E, Harley CB. Telomere length and replicative aging in human vascular tissues. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1995;92(24):11190-4.
347. Rehkopf DH, Needham BL, Lin J, Blackburn EH, Zota AR, Wojcicki JM, et al. Leukocyte Telomere Length in Relation to 17 Biomarkers of Cardiovascular Disease Risk: A Cross-Sectional Study of US Adults. *PLoS Med*. 2016;13(11):e1002188.
348. Brouillette S, Singh RK, Thompson JR, Goodall AH, Samani NJ. White cell telomere length and risk of premature myocardial infarction. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. 2003;23(5):842-6.
349. Cawthon RM, Smith KR, O'Brien E, Sivatchenko A, Kerber RA. Association between telomere length in blood and mortality in people aged 60 years or older. *Lancet*. 2003;361(9355):393-5.
350. Burnett-Hartman AN, Fitzpatrick AL, Kronmal RA, Psaty BM, Jenny NS, Bis JC, et al. Telomere-associated polymorphisms correlate with cardiovascular disease mortality in Caucasian women: the Cardiovascular Health Study. *Mechanisms of ageing and development*. 2012;133(5):275-81.
351. Collerton J, Martin-Ruiz C, Kenny A, Barrass K, von Zglinicki T, Kirkwood T, et al. Telomere length is associated with left ventricular function in the oldest old: the Newcastle 85+ study. *European heart journal*. 2007;28(2):172-6.

352. Haver VG, Mateo Leach I, Kjekshus J, Fox JC, Wedel H, Wikstrand J, et al. Telomere length and outcomes in ischaemic heart failure: data from the COntrolled ROsuvastatin multiNAtional Trial in Heart Failure (CORONA). *Eur J Heart Fail.* 2015;17(3):313-9.
353. Zee RY, Ridker PM, Chasman DI. Genetic variants in eleven telomere-associated genes and the risk of incident cardio/cerebrovascular disease: The Women's Genome Health Study. *Clin Chim Acta.* 2011;412(1-2):199-202.
354. Atturu G, Brouillette S, Samani NJ, London NJ, Sayers RD, Bown MJ. Short leukocyte telomere length is associated with abdominal aortic aneurysm (AAA). *Eur J Vasc Endovasc Surg.* 2010;39(5):559-64.
355. Fitzpatrick AL, Kronmal RA, Gardner JP, Psaty BM, Jenny NS, Tracy RP, et al. Leukocyte telomere length and cardiovascular disease in the cardiovascular health study. *American journal of epidemiology.* 2007;165(1):14-21.
356. Haycock PC, Heydon EE, Kaptoge S, Butterworth AS, Thompson A, Willeit P. Leucocyte telomere length and risk of cardiovascular disease: systematic review and meta-analysis. *BMJ.* 2014;349:g4227.
357. D'Mello MJ, Ross SA, Briel M, Anand SS, Gerstein H, Pare G. Association between shortened leukocyte telomere length and cardiometabolic outcomes: systematic review and meta-analysis. *Circ Cardiovasc Genet.* 2015;8(1):82-90.
358. Fyhrquist F, Silventoinen K, Saijonmaa O, Kontula K, Devereux RB, de Faire U, et al. Telomere length and cardiovascular risk in hypertensive patients with left ventricular hypertrophy: the LIFE study. *Journal of human hypertension.* 2011.
359. Vasan RS, Demissie S, Kimura M, Cupples LA, White C, Gardner JP, et al. Association of leukocyte telomere length with echocardiographic left ventricular mass: the Framingham heart study. *Circulation.* 2009;120(13):1195-202.
360. Kuznetsova T, Codd V, Brouillette S, Thijs L, Gonzalez A, Jin Y, et al. Association between left ventricular mass and telomere length in a population study. *American journal of epidemiology.* 2010;172(4):440-50.
361. Kimura M, Barbieri M, Gardner JP, Skurnick J, Cao X, van Riel N, et al. Leukocytes of Exceptionally Old Persons Display Ultra-short Telomeres. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2007.
362. Jiang H, Ju Z, Rudolph KL. Telomere shortening and ageing. *Z Gerontol Geriat.* 2007;40(5):314-7.
363. Baumann M, Bartholome R, Peutz-Kootstra CJ, Smits JF, Struijker-Boudier HA. Sustained tubulo-interstitial protection in SHR by transient losartan treatment: an effect of decelerated aging? *Am J Hypertens.* 2008;21(2):177-82.

364. Oyama J, Maeda T, Sasaki M, Higuchi Y, Node K, Makino N. Repetitive hyperthermia attenuates progression of left ventricular hypertrophy and increases telomerase activity in hypertensive rats. *American journal of physiology*. 2012;302(10):H2092-101.
365. Perez-Rivero G, Ruiz-Torres MP, Rivas-Elena JV, Jerkic M, Diez-Marques ML, Lopez-Novoa JM, et al. Mice deficient in telomerase activity develop hypertension because of an excess of endothelin production. *Circulation*. 2006;114(4):309-17.
366. Imanishi T, Moriwaki C, Hano T, Nishio I. Endothelial progenitor cell senescence is accelerated in both experimental hypertensive rats and patients with essential hypertension. *Journal of hypertension*. 2005;23(10):1831-7.
367. Jeanclos E, Schork NJ, Kyvik KO, Kimura M, Skurnick JH, Aviv A. Telomere length inversely correlates with pulse pressure and is highly familial. *Hypertension*. 2000;36(2):195-200.
368. Benetos A, Okuda K, Lajemi M, Kimura M, Thomas F, Skurnick J, et al. Telomere length as an indicator of biological aging: The gender effect and relation with pulse pressure and pulse wave velocity. *Hypertension*. 2001;37(2):381-5.
369. Bhupatiraju C, Saini D, Patkar S, Deepak P, Das B, Padma T. Association of shorter telomere length with essential hypertension in Indian population. *Am J Hum Biol*. 2012;24(4):573-8.
370. Gardner JP, Li S, Srinivasan SR, Chen W, Kimura M, Lu X, et al. Rise in insulin resistance is associated with escalated telomere attrition. *Circulation*. 2005;111(17):2171-7.
371. Yang Z, Huang X, Jiang H, Zhang Y, Liu H, Qin C, et al. Short telomeres and prognosis of hypertension in a chinese population. *Hypertension*. 2009;53(4):639-45.
372. Farrag W, Eid M, El-Shazly S, Abdallah M. Angiotensin II type 1 receptor gene polymorphism and telomere shortening in essential hypertension. *Mol Cell Biochem*. 2011;351(1-2):13-8.
373. Tellechea ML, Pirola CJ. The impact of hypertension on leukocyte telomere length: a systematic review and meta-analysis of human studies. *Journal of human hypertension*. 2017;31(2):99-105.
374. Bode-Boger SM, Martens-Lobenhoffer J, Tager M, Schroder H, Scalera F. Aspirin reduces endothelial cell senescence. *Biochemical and biophysical research communications*. 2005;334(4):1226-32.
375. Borrás C, Esteve JM, Vina JR, Sastre J, Vina J, Pallardo FV. Glutathione regulates telomerase activity in 3T3 fibroblasts. *The Journal of biological chemistry*. 2004;279(33):34332-5.
376. Haendeler J, Hoffmann J, Diehl JF, Vasa M, Spyridopoulos I, Zeiher AM, et al. Antioxidants inhibit nuclear export of telomerase reverse transcriptase and delay replicative senescence of endothelial cells. *Circulation research*. 2004;94(6):768-75.

377. Furumoto K, Inoue E, Nagao N, Hiyama E, Miwa N. Age-dependent telomere shortening is slowed down by enrichment of intracellular vitamin C via suppression of oxidative stress. *Life sciences*. 1998;63(11):935-48.
378. Xu D, Neville R, Finkel T. Homocysteine accelerates endothelial cell senescence. *FEBS letters*. 2000;470(1):20-4.
379. Dong XX, Hui ZJ, Xiang WX, Rong ZF, Jian S, Zhu CJ. Ginkgo biloba extract reduces endothelial progenitor-cell senescence through augmentation of telomerase activity. *Journal of cardiovascular pharmacology*. 2007;49(2):111-5.
380. Assmus B, Urbich C, Aicher A, Hofmann WK, Haendeler J, Rossig L, et al. HMG-CoA reductase inhibitors reduce senescence and increase proliferation of endothelial progenitor cells via regulation of cell cycle regulatory genes. *Circulation research*. 2003;92(9):1049-55.
381. Imanishi T, Hano T, Sawamura T, Nishio I. Oxidized low-density lipoprotein induces endothelial progenitor cell senescence, leading to cellular dysfunction. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 2004;31(7):407-13.
382. Spyridopoulos I, Haendeler J, Urbich C, Brummendorf TH, Oh H, Schneider MD, et al. Statins enhance migratory capacity by upregulation of the telomere repeat-binding factor TRF2 in endothelial progenitor cells. *Circulation*. 2004;110(19):3136-42.
383. Boccardi V, Barbieri M, Rizzo MR, Marfella R, Esposito A, Marano L, et al. A new pleiotropic effect of statins in elderly: modulation of telomerase activity. *FASEB J*. 2013;27(9):3879-85.
384. Brouillette SW, Moore JS, McMahon AD, Thompson JR, Ford I, Shepherd J, et al. Telomere length, risk of coronary heart disease, and statin treatment in the West of Scotland Primary Prevention Study: a nested case-control study. *Lancet*. 2007;369(9556):107-14.
385. Dormandy JA, Charbonnel B, Eckland DJ, Erdmann E, Massi-Benedetti M, Moules IK, et al. Secondary prevention of macrovascular events in patients with type 2 diabetes in the PROactive Study (PROspective pioglitAzone Clinical Trial In macroVascular Events): a randomised controlled trial. *Lancet*. 2005;366(9493):1279-89.
386. Werner C, Gensch C, Poss J, Haendeler J, Bohm M, Laufs U. Pioglitazone activates aortic telomerase and prevents stress-induced endothelial apoptosis. *Atherosclerosis*. 2011;216(1):23-34.
387. Ogawa D, Nomiya T, Nakamachi T, Heywood EB, Stone JF, Berger JP, et al. Activation of peroxisome proliferator-activated receptor gamma suppresses telomerase activity in vascular smooth muscle cells. *Circulation research*. 2006;98(7):e50-9.
388. Teiger E, Than VD, Richard L, Wisniewsky C, Tea BS, Gaboury L, et al. Apoptosis in pressure overload-induced heart hypertrophy in the rat. *The Journal of clinical investigation*. 1996;97(12):2891-7.

389. Hastie ND, Dempster M, Dunlop MG, Thompson AM, Green DK, Allshire RC. Telomere reduction in human colorectal carcinoma and with ageing. *Nature*. 1990;346(6287):866-8.
390. Jennings BJ, Ozanne SE, Dorling MW, Hales CN. Early growth determines longevity in male rats and may be related to telomere shortening in the kidney. *FEBS letters*. 1999;448(1):4-8.
391. Mukaddam-Daher S, Menaouar A, Paquette PA, Jankowski M, Gutkowska J, Gillis MA, et al. Hemodynamic and cardiac effects of chronic eprosartan and moxonidine therapy in stroke-prone spontaneously hypertensive rats. *Hypertension*. 2009;53(5):775-81.
392. Paquette PA, Duguay D, El-Ayoubi R, Menaouar A, Danalache B, Gutkowska J, et al. Control of left ventricular mass by moxonidine involves reduced DNA synthesis and enhanced DNA fragmentation. *British journal of pharmacology*. 2008;153(3):459-67.
393. Briones AM, Touyz RM. Oxidative stress and hypertension: current concepts. *Current hypertension reports*. 2010;12(2):135-42.
394. Touyz RM, Rios FJ, Alves-Lopes R, Neves KB, Camargo LL, Montezano AC. Oxidative Stress: A Unifying Paradigm in Hypertension. *The Canadian journal of cardiology*. 2020;36(5):659-70.
395. Incalza MA, D'Oria R, Natalicchio A, Perrini S, Laviola L, Giorgino F. Oxidative stress and reactive oxygen species in endothelial dysfunction associated with cardiovascular and metabolic diseases. *Vascular pharmacology*. 2018;100:1-19.
396. Mihalj M, Tadzic R, Vcev A, Rucevic S, Drenjancevic I. Blood Pressure Reduction is Associated With the Changes in Oxidative Stress and Endothelial Activation in Hypertension, Regardless of Antihypertensive Therapy. *Kidney Blood Press Res*. 2016;41(6):721-35.
397. Yusoff NSN, Mustapha Z, Sharif SET, Govindasamy C, Sirajudeen KNS. Effect of Antihypertensive Drug Treatment on Oxidative Stress Markers in Heart of Spontaneously Hypertensive Rat Models. *J Environ Pathol Toxicol Oncol*. 2017;36(1):43-53.
398. Benderdour M, Charron G, Comte B, Ayoub R, Beaudry D, Foisy S, et al. Decreased cardiac mitochondrial NADP⁺-isocitrate dehydrogenase activity and expression: a marker of oxidative stress in hypertrophy development. *American journal of physiology*. 2004;287(5):H2122-31.
399. Leary SC, Michaud D, Lyons CN, Hale TM, Bushfield TL, Adams MA, et al. Bioenergetic remodeling of heart during treatment of spontaneously hypertensive rats with enalapril. *American journal of physiology*. 2002;283(2):H540-8.
400. Niewisch MR, Savage SA. An update on the biology and management of dyskeratosis congenita and related telomere biology disorders. *Expert Rev Hematol*. 2019;12(12):1037-52.

401. Poch E, Carbonell P, Franco S, Diez-Juan A, Blasco MA, Andres V. Short telomeres protect from diet-induced atherosclerosis in apolipoprotein E-null mice. *FASEB J.* 2004;18(2):418-20.
402. Chiu CL, Hearn NL, Paine D, Steiner N, Lind JM. Does Telomere Shortening Precede the Onset of Hypertension in Spontaneously Hypertensive Mice? *Twin Res Hum Genet.* 2016;19(5):422-9.
403. Kajstura J, Rota M, Cappetta D, Ogorek B, Arranto C, Bai Y, et al. Cardiomyogenesis in the aging and failing human heart. *Circulation.* 2012;126(15):1869-81.
404. Chang J, Wang Y, Shao L, Laberge RM, Demaria M, Campisi J, et al. Clearance of senescent cells by ABT263 rejuvenates aged hematopoietic stem cells in mice. *Nature medicine.* 2016;22(1):78-83.
405. Baar MP, Brandt RMC, Putavet DA, Klein JDD, Derks KWJ, Bourgeois BRM, et al. Targeted Apoptosis of Senescent Cells Restores Tissue Homeostasis in Response to Chemotoxicity and Aging. *Cell.* 2017;169(1):132-47 e16.
406. Sharifi AM, Schiffrin EL. Apoptosis in vasculature of spontaneously hypertensive rats: effect of an angiotensin converting enzyme inhibitor and a calcium channel antagonist. *American journal of hypertension.* 1998;11(9):1108-16.
407. Liu JP. Studies of the molecular mechanisms in the regulation of telomerase activity. *The FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology.* 1999;13(15):2091-104.
408. Sugarman ET, Zhang G, Shay JW. In perspective: An update on telomere targeting in cancer. *Mol Carcinog.* 2019;58(9):1581-8.
409. Rankin AM, Faller DV, Spanjaard RA. Telomerase inhibitors and 'T-oligo' as cancer therapeutics: contrasting molecular mechanisms of cytotoxicity. *Anticancer Drugs.* 2008;19(4):329-38.
410. Wang X, Hu CS, Petersen B, Qiu J, Ye F, Houldsworth J, et al. Imetelstat, a telomerase inhibitor, is capable of depleting myelofibrosis stem and progenitor cells. *Blood Adv.* 2018;2(18):2378-88.
411. White LK, Wright WE, Shay JW. Telomerase inhibitors. *Trends Biotechnol.* 2001;19(3):114-20.
412. Wright WE, Piatyszek MA, Rainey WE, Byrd W, Shay JW. Telomerase activity in human germline and embryonic tissues and cells. *Dev Genet.* 1996;18(2):173-9.
413. Artandi SE, DePinho RA. Mice without telomerase: what can they teach us about human cancer? *Nature medicine.* 2000;6(8):852-5.
414. Aviv A. The epidemiology of human telomeres: faults and promises. *The journals of gerontology.* 2008;63(9):979-83.
415. Cawthon RM. Telomere measurement by quantitative PCR. *Nucleic acids research.* 2002;30(10):e47.

416. Tarik M, Ramakrishnan L, Sachdev HS, Tandon N, Roy A, Bhargava SK, et al. Validation of quantitative polymerase chain reaction with Southern blot method for telomere length analysis. *Future Sci OA*. 2018;4(4):FSO282.
417. Aviv A, Hunt SC, Lin J, Cao X, Kimura M, Blackburn E. Impartial comparative analysis of measurement of leukocyte telomere length/DNA content by Southern blots and qPCR. *Nucleic acids research*. 2011;39(20):e134.
418. Elbers CC, Garcia ME, Kimura M, Cummings SR, Nalls MA, Newman AB, et al. Comparison between southern blots and qPCR analysis of leukocyte telomere length in the health ABC study. *The journals of gerontology*. 2014;69(5):527-31.
419. Nettle D, Seeker L, Nussey D, Froy H, Bateson M. Consequences of measurement error in qPCR telomere data: A simulation study. *PLoS One*. 2019;14(5):e0216118.
420. Xu Z, Duc KD, Holcman D, Teixeira MT. The length of the shortest telomere as the major determinant of the onset of replicative senescence. *Genetics*. 2013;194(4):847-57.