

Université de Montréal

**Effet de l'atorvastatine et de l'amlodipine sur le
remodelage vasculaire dans l'hypertension**

par

Marielle Doyon

Département de pharmacologie

Faculté de médecine

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

Décembre 2008

© Marielle Doyon, 2008

Université de Montréal
Faculté des études supérieures

Ce mémoire intitulé :

Effet de l'atorvastatine et de l'amlodipine sur le remodelage vasculaire dans l'hypertension

présenté par :
Marielle Doyon

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Dr. Guy Rousseau, président-rapporteur
Dr. Denis deBlois, directeur de recherche
Dr. Jean-François Gauchat, membre du jury

Résumé

Introduction L'amlodipine et l'atorvastatine offrent des avantages thérapeutiques au-delà de leur indication primaire, soit la réduction de la pression artérielle et des lipides sanguins, respectivement. L'amlodipine induit l'apoptose des cellules de muscle lisse vasculaire (CMLV) *in vivo*, contribuant à la régression de l'hypertrophie aortique chez le rat spontanément hypertendu (SHR). L'atorvastatine induit l'apoptose des CMLV *in vitro*, un effet proportionnel à la dose. Toutefois, cet effet reste à être démontré *in vivo*. Nous postulons que l'atorvastatine induira la régression de l'hypertrophie aortique *via* l'apoptose des CMLV chez le SHR, et que la combinaison de l'amlodipine et de l'atorvastatine aura un effet synergique sur la régression de l'hypertrophie aortique *via* l'apoptose des CMLV chez le SHR.

Méthodologie L'amlodipine et l'atorvastatine ont été administrées à des SHR âgés de 11 semaines durant trois ou six semaines, individuellement ou en combinaison. Les points principaux à l'étude étaient le remodelage vasculaire et la pression artérielle. La fragmentation et le contenu en ADN, le stress oxydant, le taux de cholestérol et les niveaux de nitrates ont aussi été mesurés.

Résultats Lorsque l'atorvastatine a été administrée seule, une diminution significative du stress oxydant et de la pression artérielle a été observée après trois et six semaines de traitement, respectivement. Par contre, aucune différence n'a pu être décelée quant au remodelage vasculaire. L'amlodipine a réduit la pression artérielle et l'hypertrophie aortique de façon dépendante de la dose. Une diminution significative de l'hyperplasie a été détectée après trois semaines de traitement avec la combinaison, et après six semaines avec une faible dose d'amlodipine.

Conclusion Nos résultats ne supportent pas l'hypothèse que l'atorvastatine induit l'apoptose des CMLV *in vivo*. Par contre, lorsque combinée à l'amlodipine, elle pourrait ajouter un bénéfice supplémentaire au niveau de la réduction de l'hyperplasie aortique.

Mots-clés: Hypertension, remodelage vasculaire, rat spontanément hypertendu, amlodipine, atorvastatine, combinaison thérapeutique.

Abstract

Background and purpose Antihypertensive drugs such as the calcium channel blocker (CCB) amlodipine and cholesterol lowering agents such as statins exhibit pleiotropic effects. Amlodipine reduces aortic hypertrophy and hyperplasia in spontaneously hypertensive rat (SHR) by inducing a transient wave of apoptosis. Atorvastatin induces apoptosis of vascular smooth muscle cell (VSMC) *in vitro*, independently of cholesterol synthesis, an effect that remains to be shown *in vivo*. The present studies were designed to test the hypothesis that atorvastatin can induce vascular remodeling by VSMC apoptosis *in vivo* in SHR, and to test whether combined therapy with low dose amlodipine would provide synergistic effects on regression of aortic hypertrophy.

Experimental approach 11-week old SHR were given atorvastatin and amlodipine, alone or in combination, for three or six weeks. Primary end-points were vascular remodeling and blood pressure. Secondary end-points included DNA fragmentation and content in the aorta, oxidative stress, cholesterol and serum total nitrite and nitrate (NO_x) concentrations.

Key results Treatment with atorvastatin did not modify vascular structure, although it significantly reduced oxidative stress after three weeks and blood pressure after six weeks. Amlodipine dose-dependently reduced blood pressure and aortic hypertrophy. Significant reduction of cellular hyperplasia was reached after 6 weeks with a low dose of amlodipine alone or after 3 weeks when atorvastatin was combined with low dose amlodipine.

Conclusions and implications Our results do not support the notion that atorvastatin induces VSMC apoptosis *in vivo*, although the data suggest a possible interaction with amlodipine in reducing VSMC hyperplasia in the hypertensive aorta.

Keywords : Hypertension, vascular remodeling, apoptosis, spontaneously hypertensive rat, atorvastatin, amlodipine, combination therapy.

Table des matières

HYPERTENSION ARTÉRIELLE	2
DÉFINITION, PRÉVALENCE ET ÉTIOLOGIE	2
MÉCANISMES DE RÉGULATION DE LA PRESSION ARTÉRIELLE	3
<i>Facteurs hémodynamiques</i>	4
<i>Système nerveux central</i>	5
<i>Facteurs humoraux</i>	6
<i>Système rénal</i>	8
COMPOSANTES PATHOLOGIQUES	9
<i>Remodelage vasculaire et dommage aux organes cibles</i>	9
<i>Dysfonction endothéliale</i>	12
<i>Stress oxydant</i>	14
<i>Inflammation</i>	17
LIEN ENTRE L'HYPERTENSION ET L'HYPERLIPIDÉMIE	19
MÉDICAMENTS CIBLANT LE SYSTÈME CARDIOVASCULAIRE	20
<i>Antihypertenseurs</i>	20
<i>Agents sympatholytiques</i>	21
<i>Inhibiteurs du système rénine-angiotensine</i>	23
<i>Diurétiques</i>	25
<i>Vasodilatateurs directs</i>	25
<i>Bloqueurs de canaux calciques</i>	26
Cas de l'amlodipine.....	27
<i>Combinaisons fixes</i>	29
<i>Hypolipidémiants</i>	30
Statines	31
Cas de l'atorvastatine	32
RÔLE DE L'APOPTOSE DANS LA CORRECTION DU REMODELAGE VASCULAIRE PATHOLOGIQUE.....	33
EFFETS PLÉIOTROPIQUES DE L'AMLODIPINE.....	34
<i>Induction de l'apoptose in vivo et réduction de l'hyperplasie et de l'hypertrophie aortique</i>	34
<i>Correction du remodelage vasculaire pathologique chez l'humain</i>	35
<i>Amélioration de la fonction endothéliale</i>	35
<i>Diminution du stress oxydant</i>	36
<i>Réduction de l'inflammation</i>	37

EFFETS PLÉIOTROPIQUES DE L'ATORVASTATINE.....	38
<i>Induction de l'apoptose in vitro</i>	38
<i>Amélioration de la fonction endothéliale</i>	42
<i>Diminution du stress oxydant</i>	43
<i>Réduction de l'inflammation</i>	45
LOGIQUE DE LA COMBINAISON AMLODIPINE/ATORVASTATINE.....	46
<i>Études mettant en évidence les effets bénéfiques de la combinaison</i>	47
<i>Amélioration de la fonction endothéliale pouvant mener à l'apoptose</i>	48
MÉTHODOLOGIE	52
BAINS À ORGANES ISOLÉS.....	53
IMMUNOBUVARDAGE DE TYPE <i>WESTERN</i>	54
DÉTERMINATION DE L'INDEX D'HYPERPLASIE AORTIQUE.....	54
RÉSULTATS	56
PUBLICATION NO 1.....	57
<i>Effect of atorvastatin and amlodipine, alone or in combination, on vascular remodeling in the spontaneously hypertensive rat</i>	57
RÉSULTATS ADDITIONNELS.....	91
<i>Pression pulsée</i>	91
<i>Vasorelaxation à un donneur de NO</i>	92
<i>Fonction endothéliale</i>	93
<i>Expression de p21^{Waf1/Cip1}</i>	94
<i>Expression de Akt</i>	95
<i>Expression de eNOS</i>	96
DISCUSSION.....	97
HYPERPLASIE AORTIQUE.....	98
<i>Atorvastatine</i>	98
<i>Amlodipine</i>	98
<i>Combinaison</i>	99
INDUCTION DE L'APOPTOSE.....	101
PRESSION ARTÉRIELLE.....	103
FONTION ENDOTHÉLIALE.....	105
STRESS OXYDANT.....	106

NIVEAUX DE CHOLESTÉROL107

CONCLUSION.....108

BIBLIOGRAPHIE.....110

Liste des Tableaux

Publication

Table 1: Lipid profile and serum NOx concentrations following treatment with atorvastatin and amlodipine 84

Table 2: Cardiac hypertrophy indices following treatment with atorvastatin and amlodipine85

Liste des Figures

Introduction

Figure 1: Sources de stress oxydant dans les cellules vasculaires	16
Figure 2: Localisation de l'amlodipine à la membrane plasmique	29
Figure 3: Cascade signalétique du mévalonate	40
Figure 4: Mécanismes antioxydants des statines	44

Résultats additionnels

Figure 5: Pression pulsée chez les SHR traités avec l'amlodipine et l'atorvastatine, seule ou en combinaison, pendant six semaines	91
Figure 6: Vasorelaxation en présence d'un donneur de NO chez les SHR traités avec l'amlodipine et l'atorvastatine, seule ou en combinaison, pendant trois semaines	92
Figure 7: Fonction endothéliale chez les SHR traités avec l'amlodipine et l'atorvastatine, seule ou en combinaison, pendant six semaines	93
Figure 8: Niveau d'expression de p21 ^{Waf1/Cip1} dans les aortes de SHR traités avec l'atorvastatine pendant trois semaines	94
Figure 9: Ratio de l'expression de Akt phosphorylée sur la forme totale de Akt dans les aortes de SHR traités avec l'amlodipine et l'atorvastatine, seule ou en combinaison, pendant trois semaines	95
Figure 10: Ratio de l'expression de eNOS phosphorylée sur la forme totale de eNOS dans les crosses aortiques de SHR traités avec l'atorvastatine pendant trois semaines	96

Figure 11: Cinétique proposée pour la réduction de l'hyperplasie aortique chez le SHR traité avec l'amlodipine et l'atorvastatine, seule ou en combinaison	100
---	-----

Publication

Figure 1: Determination of the minimal effective dose of amlodipine inducing blood pressure lowering and regression and regression of vascular hypertrophy	86
Figure 2: Effect of amlodipine and atorvastatin on mean arterial pressure, aortic cross-sectional area and aortic smooth muscle cell number	87
Figure 3: Effect of amlodipine and atorvastatin on superoxide anion production	88
Figure 4: Effect of amlodipine and atorvastatin on aortic DNA content and aortic DNA fragmentation index	89

Liste des symboles

Ach	Acétylcholine
ADMA	Diméthylarginine asymétrique
ADN	Acide désoxyribonucléique
Ang	Angiotensine
ANOVA	Analyse de variance
ARA	Antagoniste des récepteurs AT1
ASCOT	<i>Anglo-Scandinavian Cardiac Outcomes Trial</i>
AT1	Récepteur de type 1 de l'angiotensine
AT2	Récepteur de type 2 de l'angiotensine
AVALON	Atorvastatin and Amlodipine in Patients With Elevated Lipids and Hypertension
BH ₄	Tétrahydrobioptérine
Ca ²⁺	Ion calcique
CDK	Cycline dépendante de cyclines
Cl ⁻	Ion chlorure
CMLV	Cellule de muscle lisse vasculaire
CRP	<i>C-reactive protein</i>
CSA	Aire de section aortique
DHP	Dihydropyridine
ECA	Enzyme de conversion de l'angiotensine
ECL	<i>Enhanced chemiluminescence substrate</i>
EDHF	Facteur hyperpolarisant dépendant de l'endothélium
eNOS	Forme endothéliale de la synthèse du NO
ET-1	Endothéline-1
FPP	Farnesyl pyrophosphate
GGPP	Geranylgeranylpyrophosphate
GMPc	Guanosine monophosphate cyclique
H ₂ O ₂	Peroxyde d'hydrogène
HDL	Lipoprotéines de haute densité
HUVEC	Cellules endothéliales humaines
HVG	Hypertrophie ventriculaire gauche
IAP	Protéines inhibitrices de l'apoptose
ICAM-1	Molécule d'adhésion intracellulaire de type 1
iECA	Inhibiteur de l'ECA
IL	Interleukine
K ⁺	Ion potassique
KCl	Chlorure de potassium

L-NAME	N (G)-Nitro-L-Arginine Méthyl Ester
LDL	Lipoprotéines de faible densité
LDLox	Lipoprotéines de faible densité oxydées
MCP-1	Protéine chimiotactique-1 des monocytes
mmHg	Millimètres de mercure
MMP	Métalloprotéinases matricielles
Na ⁺	Ion sodique
NADPH	Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate
NK-κB	Facteur de transcription nucléaire kappa B
NO	Monoxyde d'azote
ONOO ⁻	Peroxynitrite
PDGF	Facteur de croissance dérivé des plaquettes
PE	Phényléphrine
PGI ₂	Prostacycline
PP	Pyrophosphate
RCPG	Récepteur couplé aux protéines G
ROS	Espèces réactives oxygénées
SHR	Rat spontanément hypertendu
SEM	<i>Standard error of the mean</i>
SNP	Nitroprusside de sodium
SNA	Système nerveux autonome
SOD	Superoxyde dismutase
SRAA	Système rénine-angiotensine-aldostérone
TGF	<i>Transforming growth factor</i>
TNF	<i>Tumor necrosis factor</i>
VCAM-1	Molécule d'adhésion vasculaire de type 1
WKY	Rat Wistar-Kyoto

Let's stay focused

Remerciements

Merci à tous ceux et celles qui ont participé à la réalisation de ce projet de recherche, de près ou de loin. Un merci tout spécial à Dr. Denis deBlois et à Taben Hale pour m'avoir donné cette opportunité et pour m'avoir offert leur soutien et leur expertise tout au long de ce parcours.

Introduction

Hypertension artérielle

Définition, prévalence et étiologie

La tension artérielle se définit comme étant la pression que le sang exerce sur les parois des vaisseaux sanguins lorsque le cœur pompe le sang pour le faire circuler dans toutes les parties du corps. Elle se mesure selon deux variables, soit la pression systolique et la pression diastolique. La pression systolique est la pression exercée lorsque que le cœur éjecte le sang, et la pression diastolique est la pression exercée lorsque le cœur se remplit, donc lorsqu'il est au repos. Les valeurs cibles pour un adulte devraient être inférieures à 120/80 mmHg. Des valeurs supérieures à ces valeurs cibles indiquent que la personne est hypertendue, c'est-à-dire qu'elle souffre d'hypertension artérielle. Trois grades, définis selon l'Organisation Mondiale de la Santé, permettent de mieux qualifier le degré d'hypertension. Le grade 1 se rapporte à des pressions de 140-159/90-99 mmHg, le grade 2 à 160-179/100-109 mmHg et finalement le grade 3 à $\geq 180 / \geq 110$ mmHg. Une pression normale élevée survient tout juste avant le grade 1 (130-139/85-89 mmHg)¹. À partir de ces deux valeurs mesurables, il est possible d'obtenir de l'information complémentaire sur la fonction cardiovasculaire en s'attardant sur la pression pulsée. La pression pulsée est la différence entre la pression systolique et la pression diastolique. Elle est un indice de la rigidité des artères et de la performance cardiaque.

L'hypertension est un facteur de risque majeur de plusieurs maladies cardiovasculaires, notamment les maladies vasculaires cérébrales, l'insuffisance cardiaque, les coronaropathies et les maladies vasculaires périphériques². En fait, l'hypertension demeure le facteur de risque auquel est attribuable le plus de décès à travers le monde, soit plus de sept millions de décès par année en 2000. Au Canada, 22% des canadiens de 18 à 70 ans souffrent d'hypertension, et ce pourcentage s'élève à 50% auprès de la population âgée de plus de 65 ans³. Sachant que pour chaque augmentation de 20/10 mmHg à partir de la valeur limite de 115/75 mmHg, le taux de mortalité associé à une maladie cardiovasculaire

double⁴, l'importance du contrôle de la pression artérielle devient évidente. Par exemple, chez les patients hypertendus de plus de 60 ans, le traitement de l'hypertension résulte en une diminution de 20% de la mortalité globale. Le simple fait de diminuer d'environ 5 mmHg la pression diastolique chez des hypertendus d'âge moyen réduit de 42% le risque d'accident vasculaire cérébral et de 16% le risque d'évènement coronarien.

L'hypertension artérielle se divise en deux sous-catégories: l'hypertension primaire, dite "essentielle", qui n'a pas de cause unique et définie, et l'hypertension secondaire, qui possède une cause sous-jacente et est souvent une conséquence d'un désordre rénal ou adrénergique. Ce dernier type d'hypertension ne touche qu'environ 5% des patients, la grande majorité des patients hypertendus souffrant d'hypertension essentielle⁵. Plusieurs mécanismes physiologiques régulent la pression artérielle, et c'est à ces différents niveaux qu'il importe de s'attarder pour tenter d'expliquer les causes de l'hypertension. C'est en effet lorsque les mécanismes homéostasiques sont incapables ou insuffisants pour réguler la pression sanguine que cette dernière augmente. Le débit cardiaque, la résistance artérielle, le système rénine-angiotensine-aldostérone (SRAA), le système nerveux autonome et la fonction endothéliale sont tous des facteurs impliqués dans la régulation de la pression artérielle⁶. Ces mécanismes se combinent aux facteurs environnementaux et génétiques pour moduler le développement de l'hypertension. Parmi ces facteurs se retrouvent le tabagisme, la consommation accrue de sel et/ou d'alcool, la résistance à l'insuline, l'obésité et le stress.

Mécanismes de régulation de la pression artérielle

Tel que mentionné ci-haut, les mécanismes de contrôle de la pression artérielle sont nombreux, complexes et hautement reliés. Ils sont nécessaires pour fournir un apport sanguin adéquat dans toutes les parties du corps, tout spécialement au cerveau, et ce, à tout

moment. Cet apport sanguin constant permet à l'organisme de maintenir ses activités métaboliques. Les mécanismes impliqués permettent de conserver la pression artérielle d'un individu à une valeur donnée, selon les caractéristiques de ce dernier et les conditions dans lesquelles il se trouve, par exemple son degré d'activité ou sa température corporelle. Différents mécanismes permettent la régulation de la pression artérielle à court et à long terme.

Facteurs hémodynamiques

Deux paramètres déterminent la pression artérielle, soit le débit cardiaque et la résistance périphérique. La résistance périphérique est la résistance qu'offrent les petits vaisseaux de résistance composant la microcirculation. Le débit cardiaque dépend de la fréquence cardiaque, de la force de contraction du cœur et de la pression de remplissage du cœur. Il représente le débit nécessaire pour irriguer le lit vasculaire, en litres par minute. La résistance artérielle représente en quelque sorte le tonus myogénique des artères et dépend surtout du volume artériel. Pour rendre compte de l'impact de l'interaction entre ces deux variables sur la pression artérielle, une équation simple a été suggérée: débit cardiaque \times résistance artérielle \approx pression artérielle. Cette équation signifie que la pression artérielle est directement proportionnelle au produit du débit cardiaque et de la résistance artérielle. Ainsi, une augmentation du débit cardiaque peut survenir dans le cas d'une augmentation du volume de sang ou d'une augmentation de la contractilité du cœur suite à une stimulation neuronale. En réaction à l'augmentation du volume de fluide circulant, les vaisseaux se contractent et la résistance périphérique augmente. Elle demeurera élevée puisque les vaisseaux subiront alors un remodelage pathologique (diminution de la lumière des vaisseaux, *inward eutrophic remodeling*). Il semblerait en effet que dans cette situation, l'augmentation du débit sanguin ne persiste pas⁷. C'est ce qui est généralement observé chez les patients hypertendus⁸. Au premier stade de l'hypertension, le débit cardiaque augmente,

un effet qui est accompagné d'une résistance périphérique presque normale. Ensuite, cet état progressera vers un retour à la normale du débit cardiaque et du volume de fluide circulant mais sera accompagné d'une augmentation de la résistance périphérique⁹. L'augmentation de la résistance périphérique est due entre autres au remodelage vasculaire pathologique des artérioles précapillaires. L'augmentation de la résistance vasculaire est proportionnelle à la quatrième puissance du rayon vasculaire, selon la loi de Poiseuille⁹. Il est donc facile de constater qu'un faible changement dans le rayon vasculaire va occasionner une très grande augmentation de la résistance vasculaire.

Systeme nerveux central

Le système nerveux autonome (SNA) permet de réguler la pression artérielle de façon rapide et puissante, le cerveau étant en communication constante avec les organes du système circulatoire. Il contribue également au maintien à long terme de la pression, mais ce rôle est toutefois moins clair¹⁰. Les deux déterminants de la pression artérielle mentionnés ci-haut, soit le débit cardiaque et la résistance vasculaire, sont toutes deux des variables contrôlées par le SNA. Le SNA comprend les systèmes sympathique et parasympathique. Les variations à court terme de la pression artérielle qui permettent de s'ajuster à un événement circonscrit dans le temps, par exemple la peur ou un effort physique, surviennent grâce à l'arc réflexe des barorécepteurs. Cet arc réflexe met en jeu des senseurs, les barorécepteurs, situés dans les carotides, pour contrôler l'apport de sang au cerveau, et dans la crosse aortique, pour amener le sang dans le reste de l'organisme. Leur fonction est de déclencher des réponses réflexes pour le maintien de la pression artérielle. Si un changement de la pression transmurale est détecté d'après la distension de la paroi vasculaire, un signal nerveux est envoyé au cerveau, plus précisément dans le centre cardiovasculaire situé dans le tronc cérébral au niveau du bulbe rachidien. Des effecteurs sont alors mis en branle pour ramener la pression artérielle à sa valeur cible. Par exemple, si

une distension réduite de la paroi vasculaire est perçue suite du passage de la position couchée à la position debout, l'activation des barorécepteurs déclenchera l'activité du système nerveux sympathique pour réduire la résistance périphérique en agissant sur le muscle lisse des artérioles et augmenter le débit cardiaque¹¹. De façon opposée, l'activité du système parasympathique sera diminuée pour contribuer également à augmenter le débit cardiaque et la vasoconstriction artériolaire.

L'importance des barorécepteurs dans la régulation de la pression artérielle à court terme a été démontrée expérimentalement chez un modèle de chiens dépourvus de barorécepteurs aortiques, la variabilité de la pression artérielle sur une période de vingt-quatre heures doublant par rapport à celle des chiens normaux⁷. Chez des patients hypertendus, les baroréflexes sont réinitialisés autour d'une valeur cible plus élevée, contribuant ainsi au maintien de l'état hypertendu.

Facteurs humoraux

Des facteurs humoraux s'ajoutent au système des barorécepteurs pour contrôler la pression artérielle. Il s'agit principalement du SRAA, considéré d'ailleurs comme étant le plus important⁵.

La rénine est une protéase sécrétée par les cellules de l'appareil juxta-glomérulaire, au niveau des reins. Elle est relâchée dans la circulation sanguine en réponse à une diminution de la pression artérielle, de la concentration extracellulaire de sodium ou du volume de fluide extracellulaire. Elle est responsable du clivage enzymatique de l'angiotensinogène, une protéine plasmatique produite au niveau du foie, en angiotensine I (Ang I), une protéine inactive précurseur de l'angiotensine II (Ang II). L'Ang I circule dans les vaisseaux sanguins des poumons où elle est convertie en Ang II grâce à l'enzyme de conversion de

l'angiotensine (ECA). L'Ang II est un puissant vasoconstricteur qui contribue activement à la régulation à court terme de la pression artérielle en augmentant la résistance vasculaire, par l'intermédiaire de sa liaison aux récepteurs de type 1 de l'angiotensine (AT1) principalement. Ces récepteurs sont situés sur les artérioles et dans le cortex adrénal. L'Ang II régule également la pression à long terme, en stimulant la sécrétion de l'aldostérone par la glande corticosurrénale. L'aldostérone favorise la réabsorption de l'ion sodium (Na^+) par le tubule rénal, et par osmose, davantage d'eau sera aussi réabsorbée. Cela a pour conséquence d'augmenter le volume sanguin, puisque davantage d'eau est alors retenue dans le compartiment extracellulaire, et ainsi, la pression artérielle sera modulée à la hausse.

La vasopressine, ou hormone antidiurétique, est sécrétée par l'hypophyse postérieure et libérée dans la circulation sanguine lorsque le liquide extracellulaire est hypertonique et que la réabsorption d'eau est nécessaire. Elle augmente la perméabilité de la membrane du tubule distal et du tube collecteur, favorisant la réabsorption de l'eau. Ainsi, davantage d'eau est réabsorbée et la concentration du filtrat augmente jusqu'à sa sortie du tube collecteur. La vasopressine contribue donc à l'augmentation de la pression artérielle en augmentant le volume sanguin. Elle a un effet vasoconstricteur mais à court terme seulement et ne contribuerait pas à l'élévation à long terme de la pression artérielle.

L'endothéline est un peptide vasoconstricteur, libéré par les cellules endothéliales, qui contribue aussi à l'augmentation de la pression artérielle. Il existe quatre isoformes de l'endothéline, mais l'endothéline-1 (ET-1) est celle dont les rôles dans la fonction cardiovasculaire sont les mieux définis. Elle jouerait un rôle important en particulier dans les cas d'hypertension reliés à une hypersensibilité au sel et dans la défaillance cardiaque. Elle stimule également le système nerveux sympathique. L'ET-1 est dérivée de la pré-endothéline, qui elle est clivée pour former l'endothéline. L'ET-1 exerce son action par l'intermédiaire de sa liaison à deux types de récepteurs, les récepteurs ET_A et ET_B . La

conséquence biologique de cette liaison dépend du type de récepteur activé. Le récepteur ET_A est principalement localisé sur les cellules de muscle lisse. Ce récepteur est un récepteur couplé à la protéine G_q. Il induit une relâche de calcium intracellulaire qui provoque une contraction du muscle lisse. Le récepteur ET_B est lui aussi situé sur le muscle lisse où il induit une vasoconstriction, mais il se retrouve principalement sur les cellules endothéliales où il induit une relaxation en médiant la production de monoxyde d'azote (NO) et de prostacycline (PGI₂). La distribution respective des récepteurs ET_A et ET_B dépend du lit vasculaire¹². L'importance de l'endothéline dans le contrôle de l'hypertension a été mise en évidence lors de l'utilisation d'antagonistes des récepteurs ET_A de l'endothéline. Chez un modèle de rats hypertendus sensibles au sel¹³, l'administration de ce type d'antagonistes avait alors permis d'améliorer la pression artérielle, les changements morphologiques des petites artères et la fonction rénale. Malgré les résultats positifs obtenus chez divers modèles animaux, l'utilisation des antagonistes de l'ET-1 chez l'humain pour le traitement de l'hypertension artérielle s'est avérée plus problématique, dû à des résultats d'études cliniques non-concluants¹⁴. Dans le cadre d'une de celle-ci par exemple, l'administration d'un antagoniste peptidique non-sélectif des récepteurs ET_A et ET_B (le bosentan), a diminué la pression artérielle dans la même ampleur chez les patients normotendus que chez les patients hypertendus¹⁵. Cet antagoniste de l'ET-1 est le seul à être présentement approuvé et il n'est d'ailleurs indiqué que pour le traitement de l'hypertension pulmonaire, et non pour l'hypertension artérielle.

Systeme rénal

Il est maintenant bien établi que les reins occupent un rôle central dans la régulation de la pression artérielle à long terme. Cette régulation a été abordée jusqu'à maintenant sous l'aspect des facteurs humoraux. La fonction rénale comme telle est aussi impliquée dans la régulation de la pression artérielle.

Une majorité des modèles expérimentaux d'hypertension implique une modification de la fonction rénale. Dans le cas de l'hypertension essentielle chez l'humain, les variables habituellement utilisées pour identifier une altération de la fonction rénale, par exemple le taux de filtration glomérulaire, présentent fréquemment des valeurs considérées comme normales. Par contre, le mécanisme de régulation de l'excrétion du sodium en fonction de la pression artérielle semble toujours être impliqué. Ce mécanisme se réfère à l'excrétion accrue de sodium et d'eau en réponse à une augmentation de la pression artérielle détectée dans la macula densa. Cependant, dans le cas des patients hypertendus, malgré une excrétion normale de sodium et d'eau, la pression artérielle est maintenue élevée¹⁶, démontrant une altération de ce mécanisme de régulation. Dahl et Heine ont utilisé un modèle de transplantation rénale chez le rat afin de démontrer de façon explicite le rôle de la fonction rénale dans le développement de l'hypertension¹⁷. Dans cette expérience, la transplantation des reins provenant de rats hypertendus dans un modèle de rats résistant à l'hypertension a causé une élévation de la pression artérielle, et vice-versa. Cette expérimentation a permis de conclure que le phénotype d'hypertension est effectivement indissociable des reins. De la même façon, lorsque les reins provenant de rats spontanément hypertendus (SHR) ayant subi un cours traitement antihypertensif avec un inhibiteur de ECA (iECA) et dont la pression artérielle a été réduite significativement, ont été transplantés chez des SHR non traités, la pression artérielle de ces derniers a également été réduite de façon similaire¹⁸.

Composantes pathologiques

Remodelage vasculaire et dommage aux organes cibles

L'hypertension artérielle s'accompagne de changements dans la structure et la fonction du réseau vasculaire et du cœur. Ces changements mènent ultimement aux complications de l'hypertension et expliquent la mortalité et la morbidité qui lui sont associée. Une meilleure

compréhension de ces phénomènes est donc cruciale pour la direction de nouvelles avenues de recherche.

Il est difficile de distinguer si le remodelage cardiovasculaire survient comme une conséquence de l'hypertension, ou s'il est plutôt un précurseur et contribue à son développement^{19, 20}. Une chose est certaine toutefois, c'est que le remodelage contribue à l'augmentation de la résistance périphérique totale et au maintien de l'état hypertendu.

Le remodelage vasculaire pathologique se définit comme étant une réorganisation de la structure du vaisseau en réaction au stress exercé sur ses parois ou à l'action de facteurs humoraux comme l'Ang II et l'ET-1, menant à une augmentation du ratio média/lumière du vaisseau. Chez l'humain, les vaisseaux touchés par le remodelage sont surtout les petites artères et les artérioles, constituant les artères de résistance. Ces vaisseaux présentent aussi une sensibilité accrue aux vasoconstricteurs. Tel que prédit par la loi de Poiseuille, un faible changement dans le rayon d'un vaisseau de l'ordre de 5% par exemple, induira une augmentation de près de 25% dans la résistance.

Le remodelage au niveau des gros troncs, donc des artères de conduction, serait déclenché par l'augmentation de la contrainte pariétale, une variable qui est fonction de la pression artérielle, du rayon de la lumière artérielle et de l'épaisseur de la paroi²¹. Cette augmentation amènerait le changement de phénotype des cellules de muscle lisse vasculaire (CMLV), favorisant l'hypertrophie et l'hyperplasie de ces dernières. À cela s'ajoute également l'augmentation de la synthèse protéique menant à la déposition de matrice extracellulaire. L'épaississement de la média se fait vers l'extérieur, résultant en une augmentation de l'aire de section du vaisseau, jusqu'à ce que la contrainte pariétale atteigne à nouveau sa valeur cible et ainsi de suite.

D'autre part, la contrainte pariétale au niveau des petites artères (présentant un diamètre de 100 à 300 μm) n'augmenterait pas, étant donné que le tonus myogénique fait en sorte que le rayon du vaisseau se contracte face à l'élévation de la pression²¹. Les petites artères subissent tout de même un remodelage hypertrophique caractérisé par une augmentation de l'aire de section qui s'explique par l'hypertrophie et/ou l'hyperplasie des cellules de muscle lisse composant le vaisseau. L'hypertrophie des CMLV peut être une conséquence de l'augmentation de la synthèse protéique ou d'ADN, alors que l'hyperplasie est associée à l'augmentation de la synthèse d'ADN²².

Le remodelage des artérioles est quant à lui causé par la réorganisation des cellules de muscle lisse autour de la lumière du vaisseau, accompagné du remodelage de la matrice extracellulaire et de la déposition de fibres de collagène. Ce type de remodelage est qualifié d'eutrophique, c'est-à-dire sans changement dans la quantité de matériel, et présente la même aire de section que le vaisseau correspondant chez un individu normotendu, mais avec une lumière réduite²³. La vasoconstriction soutenue des vaisseaux est suffisante pour déclencher ce mécanisme d'adaptation. D'une façon ou d'une autre, le remodelage vers l'intérieur des artères de résistance, qu'il soit eutrophique ou hypertrophique, mène à une augmentation de la résistance vasculaire, contribuant ainsi à l'augmentation de la pression artérielle.

La raréfaction des vaisseaux est une autre forme de remodelage vasculaire qui contribue également à l'augmentation de la résistance périphérique totale. Elle se définit comme étant la diminution de la densité des artérioles et des capillaires par unité de volume tissulaire. Cette raréfaction peut survenir suite à une vasoconstriction soutenue du vaisseau, laquelle sera réversible, mais elle peut aussi être irréversible dans le cas de raréfaction structurelle, où l'augmentation du ration média/lumière sera telle qu'il n'y aura tout simplement plus de vaisseau²⁴.

Dysfonction endothéliale

L'endothélium recouvre la surface interne des vaisseaux sanguins. Il est composé d'une monocouche de cellules endothéliales. Le rôle de cette monocouche est de servir de barrière sélective entre l'espace interstitiel et la lumière des vaisseaux. De plus, les cellules endothéliales produisent un nombre important de substances vasoactives qui régulent le tonus vasculaire, dont le NO, le facteur hyperpolarisant dépendant de l'endothélium (EDHF) et la PGI₂ en tant que vasodilatateurs, et enfin l'endothéline et le thromboxane A₂ comme vasoconstricteurs. La conversion de l'Ang I à l'Ang II se fait aussi au niveau de l'endothélium. La fonction endothéliale est déterminée par l'ampleur de la dilatation du vaisseau en réponse à certains agonistes comme l'acétylcholine ou la bradykinine²⁵. L'endothélium a aussi une fonction primordiale dans les phénomènes d'agrégation plaquettaire, de coagulation, de modulation de l'inflammation et l'expression des molécules d'adhésion.

La libération de NO est sans contredit un élément clé de la fonction endothéliale. Non seulement le NO est un puissant vasodilatateur, il est aussi en majeure partie responsable du rôle anti-thrombotique et anti-coagulant de l'endothélium. Il inhibe également la prolifération, la synthèse d'ADN et la mitogénèse des CMLV²⁶.

La dysfonction endothéliale est un marqueur de risque cardiovasculaire et serait présente chez environ la moitié des patients souffrants d'hypertension modérée¹⁹. Les lits vasculaires touchés se situent au niveau des reins, des artères coronaires mais également en périphérie. Cette dysfonction est caractérisée par une biodisponibilité ou une activité réduite du NO, ce qui s'expliquerait principalement par une augmentation du stress oxydant²⁷. D'autres explications pourraient aussi être en cause, comme un changement dans l'activité ou l'expression de la forme endothéliale de la synthèse du NO (eNOS), ou encore une

sensibilité réduite des CMLV au NO²⁸. Les patients hypertendus présentent d'ailleurs une vasodilatation dépendante de l'endothélium qui est altérée lors de l'infusion d'acétylcholine dans l'artère brachiale, sans que cette altération ne soit reliée à une altération du récepteur muscarinique M₃, récepteur sur lequel, lors de telles expériences, l'acétylcholine se lie au niveau de l'endothélium²⁹. En situation physiologique, l'acétylcholine ne se retrouve pas dans la lumière du vaisseau, donc l'utilité de ce récepteur sur l'endothélium n'est pas tout à fait claire. De plus, la relaxation aux nitrates, indépendante de l'endothélium, n'est pas modifiée chez les hypertendus, indiquant que c'est bien la baisse de biodisponibilité du NO qui serait en cause et non une altération fonctionnelle. Étant donné que l'augmentation de la résistance périphérique est une caractéristique intrinsèque de l'hypertension, la réduction de la biodisponibilité du NO est une explication logique de la vasoconstriction soutenue des petites artères³⁰ puisque chez des individus normotendus, le NO contribue à maintenir la résistance à sa valeur optimale.

Une relation a aussi été établie entre la pression pulsée et la relaxation dépendante de l'endothélium chez des patients hypertendus n'ayant jamais reçu de traitement antihypertensif. La pression pulsée est un indice de la rigidité artérielle et son élévation est une caractéristique observée dans l'hypertension. Chez cette cohorte de patients, il a été établi que la pression pulsée était inversement proportionnelle à la vasodilatation induite par l'acétylcholine³¹. L'hypothèse qui soutient cette relation est que le stress oxydant serait augmenté en raison du stress mécanique d'autant plus grand sur les parois vasculaires rigides, diminuant ainsi la biodisponibilité du NO.

Toutefois, un peu comme dans le cas du remodelage vasculaire, il n'est pas déterminé si la dysfonction endothéliale survient avant, donc agirait comme cause de l'hypertension, ou si elle est plutôt une conséquence de l'hypertension, suite au stress imposé aux parois vasculaires.

Stress oxydant

Les espèces réactives oxygénées (ROS) sont le produit du métabolisme de l'oxygène dont l'étape ultime est la formation d'eau. En situation d'équilibre, les mécanismes antioxydants sont suffisants pour contrebalancer cette production. Aussi, une faible concentration de ROS peut servir à activer certaines voies de signalisation qui contribuent à maintenir l'intégrité vasculaire³². Quand cet équilibre est rompu, une production accrue de ROS s'en suit, et par conséquent, l'établissement d'une situation dans laquelle le stress oxydant domine. Cette situation favorise l'établissement de la dysfonction endothéliale et la prolifération des CMLV.

Les ROS sont produits dans les cellules endothéliales, les CMLV et les cellules de la média, principalement par l'enzyme nicotinamide adénine dinucléotide phosphate (NADPH) oxydase qui transforme l'oxygène en anion superoxyde (O_2^-)³², qui fait partie de la famille des radicaux libres puisqu'il possède des électrons libres. L'anion superoxyde, en plus d'être vasoconstricteur, est un *scavenger* du NO et le produit de leur réaction, la peroxynitrite ($ONOO^-$), est dommageable pour le tissu vasculaire. L'activité de la NADPH oxydase est augmentée en réponse à une stimulation à l'Ang II dans les cellules endothéliales et les CMLV, ce qui pourrait expliquer l'augmentation du stress oxydant dans l'hypertension accompagnée d'une suractivité du SRAA³³. Elle est aussi augmentée en réponse au stress exercé sur les parois vasculaires³⁴. Il a également été démontré que l'activité de la NADPH oxydase était augmentée de trois fois dans les aortes de SHR, et que cette situation était accompagnée de l'hypertrophie aortique et d'une réduction de la relaxation médiée par l'endothélium³⁵. La superoxyde dismutase (SOD) réduit l'anion superoxyde en peroxyde d'hydrogène (H_2O_2), qui, en présence d'ions métalliques réducteurs, produira le radical libre $\cdot OH$, très réactif. Ce radical libre a une demi-vie aussi très courte, et de ce fait, ses effets

sont confinés à l'endroit où il libéré. Autrement, des antioxydants comme la catalase et le glutathione poursuivront la réduction du H_2O_2 en eau. Le H_2O_2 n'est pas un radical libre puisqu'il ne possède pas d'électrons libres, mais cela lui permet de passer à travers les bicouches lipidiques, ce qui, en plus de sa longue demi-vie, lui permet d'agir dans un rayon plus grand.

L'anion superoxyde peut être formé lorsque eNOS est découplée. eNOS est l'enzyme qui, dans l'endothélium, est responsable de la production de NO. Son substrat est l'acide aminé L-arginine. Lorsque combinée au cofacteur tétrahydrobiopterine (BH_4), eNOS s'homodimérise, et il y a formation de NO et de L-citruline. Le découplage peut survenir lorsque BH_4 est oxydé par la NADPH oxydase et qu'il ne peut plus contribuer au bon fonctionnement de eNOS³⁶. Il y a alors formation d'anion superoxyde qui, encore une fois, va agir comme *scavenger* du NO, réduisant sa biodisponibilité. Une situation similaire survient lorsque eNOS est dépourvue de son substrat, la L-arginine. Il en résulte une situation où le stress oxydant domine.

Une autre source de stress oxydant provient de l'activité de l'enzyme xanthine oxydase, présente entre autres au niveau de l'endothélium, et qui catalyse la réaction d'oxydation de l'hypoxanthine en xanthine puis en acide urique. La xanthine oxydase est en fait la forme oxydée de la xanthine oxydoréductase qui, en donnant des électrons à l'oxygène moléculaire, produit du H_2O_2 et O_2^- , contribuant à l'augmentation du stress oxydant dans la vasculature. L'augmentation de l'expression de la xanthine oxydase a d'ailleurs été liée à divers modèles d'hypertension. Par exemple, chez le SHR, l'augmentation de son expression dans la microcirculation mésentérique est associée à l'élévation du tonus vasculaire³⁷. Ce genre de résultat est aussi observé dans des modèles animaux d'hypercholestérolémie, où l'utilisation d'un inhibiteur de la xanthine oxydase comme l'allopurinol améliore la fonction endothéliale^{38, 39}. Toutefois, alors que certains résultats obtenus chez des patients appuient cette hypothèse^{40, 41}, d'autres n'ont pas été en mesure

d'établir une relation entre l'inhibition de la xanthine oxydase et l'amélioration de la fonction endothéliale⁴². D'autre part, l'inhibition de la xanthine oxydase a aussi mené à la correction de l'hypertrophie ventriculaire gauche (HVG) et rénale chez le SHR, sans pour autant que la pression artérielle ne soit affectée⁴³.

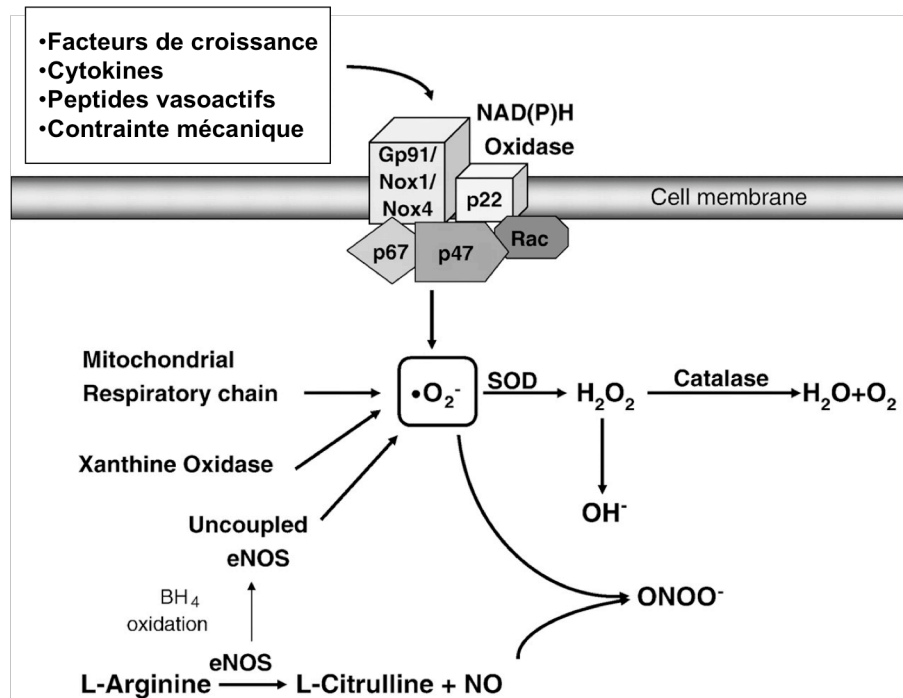


Figure 1: Sources de stress oxydant dans les cellules vasculaires. L'anion superoxyde et $\cdot\text{OH}^-$ sont différentes espèces radicalaires formées lors de l'activation des enzymes NADPH oxydase et xanthine oxydase, ainsi que lors du découplage de eNOS. La chaîne mitochondriale contribue aussi à la génération de stress oxydant. L'activité de la NADPH oxydase dépend de plusieurs agents vasoactifs, comme l'Ang II. Adapté de R Touyz, 2006.

Inflammation

L'inflammation est une réponse physiologique de l'organisme à une attaque par un pathogène, un stress mécanique ou tout autre stimuli qui menace l'intégrité du tissu. La réponse inflammatoire induit la libération de cytokines par le système immunitaire. Ces cytokines sont produites dans divers types cellulaires, y compris les cellules endothéliales. En se liant à des récepteurs membranaires, elle activent différentes voies de signalisation dont l'objectif est de contenir et de réparer le dommage. Elles vont aussi augmenter l'expression des molécules d'adhésion. Toutefois, la réponse inflammatoire est parfois exacerbée et les mécanismes de défense ne sont pas suffisants pour la contenir. Un état d'inflammation chronique est alors présent.

L'hypertension serait étroitement liée à un faible niveau d'inflammation chronique. En effet, les patients souffrant d'hypertension essentielle présentent des niveaux plasmatiques élevés de certaines cytokines utilisées comme marqueurs inflammatoires, principalement la *C-reactive protein* (CRP), l'interleukine-6 (IL-6) et le *Tumor Necrosis Factor α* (TNF- α), ainsi que de certaines molécules d'adhésion comme la P-sélectine et ce, sans présence de d'autres maladies cardiovasculaires concomitantes^{44, 45}. À savoir si l'inflammation est un facteur prédisposant à l'hypertension ou si elle est plutôt une conséquence de l'augmentation de la pression artérielle, divers indices pointent dans les deux directions. Une étude menée auprès de plus de 20 000 femmes a permis d'établir que les niveaux de CRP au moment de l'enrôlement corrélaient avec le développement de l'hypertension survenant près de huit années plus tard⁴⁶. Ce résultat est valable même pour les participants dont les valeurs de pressions artérielles étaient faibles au début de l'étude. Aussi, il a été suggéré que l'inflammation pouvait contribuer à la rigidité artérielle, puisque l'augmentation de la pression pulsée, indice de cette rigidité, corrèle également avec des niveaux élevés de marqueurs inflammatoires. À son tour, la rigidité artérielle pourrait ainsi

promouvoir le développement de l'hypertension⁴⁷, ce qui mène à penser que l'inflammation, en contribuant à des changements structuraux des artères, favorise l'état hypertensif⁴⁸. Finalement, chez le SHR, un modèle d'hypertension primaire, l'infiltration de macrophages et de lymphocytes dans la vasculature rénale et l'activation de NF- κ B semblent survenir avant les symptômes d'hypertension⁴⁹. Ce modèle présente aussi une augmentation de l'expression des molécules d'adhésion intracellulaire de type 1 (ICAM-1) et de l'adhésion des leucocytes aux cellules endothéliales, favorisant ainsi l'accumulation de monocytes et de macrophages dans l'espace sous-endothélial et le dommage vasculaire^{50,51}

D'autre part, l'hypertension induit une réponse inflammatoire au niveau des parois vasculaires, probablement en réaction au stress mécanique, aux forces de cisaillement et aux effets pro-inflammatoires de facteurs humoraux tel l'Ang II⁴⁸. L'Ang II augmente la production de cytokines inflammatoires, ce qui mène entre autres à l'activation de NF- κ B, modulateur de l'expression de plusieurs gènes, et ultimement, à la déposition de matrice extracellulaire dans la paroi vasculaire, à l'hypertrophie et l'hyperplasie des CMLV⁵². D'ailleurs, il a été démontré que IL-6 était indispensable aux effets délétères de l'Ang II chez la souris⁵³. Parallèlement, des souris dépourvues du gène codant pour IL-6 et ayant été infusées à l'Ang II ne développent pas d'hypertension⁵⁴. L'Ang II active également la NADPH oxydase, favorisant ainsi la dysfonction endothéliale. D'ailleurs, le traitement de patients avec un bloqueur du récepteur AT1 de l'angiotensine II atténue les niveaux de marqueurs inflammatoires tels CRP, IL-6 et TNF- α ⁵⁵.

Malgré l'incertitude quant au rôle exact joué par l'inflammation dans la pathogenèse de l'hypertension, cette avenue de recherche est prometteuse.

Lien entre l'hypertension et l'hyperlipidémie

L'hypertension et l'hyperlipidémie sont deux facteurs de risque cardiovasculaire qui se présentent souvent de façon concomitante. Jusqu'à récemment, l'approche thérapeutique consistait à traiter chacun de ces facteurs de risque de manière individuelle. La mise en lumière de liens mécanistiques entre les deux pathologies laisse croire qu'une approche plus globale pourrait s'avérer bénéfique.

Au niveau de la pathogenèse, le point de convergence entre l'hypertension et l'hyperlipidémie et sans contredit la dysfonction endothéliale, associée à une biodisponibilité réduite du NO. Dans le cas de l'hyperlipidémie, cette biodisponibilité réduite est la conséquence de plusieurs mécanismes. Tout d'abord, l'oxydation des lipoprotéines de faible densité (LDL) diminue l'expression de eNOS⁵⁶, et favorise la génération de stress oxydant⁵⁷ en contribuant entre autres au découplage de eNOS. Le LDL oxydé (LDLox) réduit également la disponibilité du substrat de eNOS, la L-arginine, et augmente les niveaux de diméthylarginine asymétrique (ADMA), un antagoniste compétiteur de eNOS⁵⁸.

Des liens importants sont également à faire entre l'hyperlipidémie et le SRAA. Tout d'abord, l'hyperlipidémie active le SRAA, ce qui se traduit par une augmentation de l'expression de ECA⁵⁹ et des récepteurs AT1⁶⁰. Chez l'humain, cette situation a été observée dans les endroits propices à la rupture de plaques athéromateuses. *In vitro*, l'incubation de CMLV avec du LDL a également conduit à l'augmentation de l'expression des récepteurs AT1⁶¹. De plus, une augmentation de LDL conduit à l'augmentation de l'expression des récepteurs ET_B de l'endothéline, un puissant vasoconstricteur⁶². La composante inflammatoire de l'hypercholestérolémie semble aussi impliquer le SRAA puisqu'un

traitement avec un médicament ciblant le SRAA diminue l'inflammation chez des humains et des modèles animaux d'athérosclérose⁶³.

Quelques expérimentations cliniques ont permis de mettre en évidence l'interaction entre l'hypertension et l'hypercholestérolémie. Une première a démontré que l'infusion d'Ang II augmentait de façon significative la pression artérielle chez des hommes hypercholestérolémiques comparativement à ceux normotendus ayant également subi l'infusion d'Ang II⁶⁴. Cette observation a aussi été faite simplement suite à un effort mental demandé aux patients⁶⁵. L'interaction s'observe aussi au niveau des traitements, où l'association d'un iECA et d'un médicament inhibant la synthèse du cholestérol, dans ce cas-ci une statine, permet une plus grande réduction de la pression artérielle que chacun des médicaments utilisé seul⁶⁶. De surcroît, il a été démontré à maintes reprises qu'un traitement avec une statine, chez des patients hypertendus, diminuait la pression artérielle^{62, 67, 68}. Il en est de même chez les modèles génétiques de rats hypertendus, chez lesquels un traitement prolongé avec une statine diminue la pression artérielle moyenne de l'ordre de trente mmHg⁶⁹⁻⁷¹.

Médicaments ciblant le système cardiovasculaire

Antihypertenseurs

Le contrôle de la pression artérielle et son maintien dans une fenêtre de valeurs cibles est primordiale. Les avantages d'un traitement antihypertensif se définissent principalement sous deux aspects différents. Tout d'abord, au niveau clinique, il est maintenant évident que la réduction de la pression artérielle est associée à une réduction de la morbidité et de la mortalité. Les données découlant d'une récente méta-analyse suggèrent que les pourcentages de réduction des événements cardiovasculaires sont de l'ordre de 30% pour un

accident vasculaire cérébral et de 23% pour un infarctus du myocarde, associé à une réduction de pression systolique de 10 mmHg et de pression diastolique de 4 mmHg⁷². D'autre part, traiter l'hypertension permet au système de santé d'éviter des coûts futurs pour le traitement des conséquences de l'hypertension comme des désordres rénaux ou un infarctus du myocarde⁷³. Cette situation est d'autant plus vraie pour les personnes à haut risque cardiovasculaire⁷⁴.

Une fois l'hypertension diagnostiquée, une stratégie de traitement doit être mise en place, que ce soit au niveau des modifications des habitudes de vie et/ou de l'initiation d'un traitement pharmacologique. Le choix du traitement se fait selon le stade d'hypertension, la présence de dommage aux organes cibles ou de d'autres facteurs de risque cardiovasculaire.

Les médicaments antihypertenseurs agissent aux différents sites anatomiques du contrôle de la pression artérielle, soit au niveau du système nerveux central, de la résistance artérielle, du cœur et des reins¹¹. Il est utile d'utiliser une classification basée sur ces différents sites d'action pour distinguer les médicaments antihypertenseurs. Cette classification comprend les agents sympatholytiques, les vasodilatateurs, les inhibiteurs du SRAA et les diurétiques.

Agents sympatholytiques

Tel que mentionné plus haut, une élévation de l'activité du système nerveux sympathique est présente dans à peu près toutes les formes d'hypertension. L'objectif d'un traitement avec un agent sympatholytique est de réduire le tonus sympathique en influençant la liaison des catécholamines aux récepteurs adrénergiques. Les deux sous-types de récepteurs, α -adrénergiques (incluant α_1 et α_2) et β -adrénergiques (incluant β_1 et β_2), peuvent constituer une cible pharmacologique, mais l'utilisation d'antagonistes β -adrénergiques est beaucoup

plus fréquente. La distribution des différents récepteurs varie selon les organes, ce qui dicte grandement les effets secondaires du médicament.

Les β -bloqueurs sont des antagonistes réversibles des récepteurs à sept passages transmembranaires couplés aux protéines G (RCPG). Ils sont classés selon leur sélectivité relative pour les récepteurs β_1 et β_2 . La liaison d'un agoniste au récepteur β_1 a pour effet de stimuler l'activité cardiaque. Ainsi, l'objectif des β -bloqueurs est de bloquer la liaison au récepteur β_1 , tout en minimisant l'action sur le récepteur β_2 dont la liaison d'un antagoniste non-sélectif est responsable des effets secondaires comme l'asthme. L'impact sur la pression artérielle se fait par une réduction d'environ 15 à 20% du débit cardiaque, une réduction de la résistance périphérique et une diminution de la relâche de rénine en bloquant les récepteurs des cellules juxtaglomérulaires des reins.

Pour ce qui est des médicaments ciblant les récepteurs α -adrénergiques, il existe des antagonistes α_1 -adrénergiques, agissant comme inhibiteurs compétitifs, et des agonistes α_2 -adrénergiques. Les récepteurs α_1 -adrénergiques sont situés principalement sur le muscle lisse, plus spécifiquement sur l'adventice des vaisseaux, et sont présents en plus grand nombre que les récepteurs α_2 . Par conséquent, l'action des antagonistes α_1 -adrénergiques permet de diminuer la résistance périphérique en augmentant la vasodilatation des artérioles et des veinules, et ce, en ayant peu d'impact sur le coeur. Toutefois, ce type de médicament, incluant la doxazosine, a été retiré du marché lorsque les résultats d'une étude clinique ont démontré leur infériorité à protéger contre les complications de l'hypertension, notamment les maladies cardiaques⁷⁵.

D'autre part, les récepteurs α_2 -adrénergiques sont prédominants dans le système nerveux central comparativement aux récepteurs α_1 -adrénergiques. L'action des agonistes α_2 -adrénergiques permet de diminuer la relâche de noradrénaline au niveau pré-synaptique de façon à ce que les récepteurs α_1 -adrénergique n'en reçoivent plus, ce qui diminue l'influx

sympathique. C'est ce qui explique que ce type d'agonistes est inclus dans la classe des sympatholytiques.

Inhibiteurs du système rénine-angiotensine

La participation du SRAA dans l'établissement de l'état hypertensif a été décrit précédemment. Quatre éléments de la cascade sont présentement visés par un traitement pharmacologique.

Il existe tout d'abord les antagonistes de l'aldostérone. Ce type de médicament a en fait une action diurétique. Ils sont d'ailleurs appelés diurétiques protecteurs du potassium, puisqu'ils inhibent l'excrétion de K^+ et la réabsorption de Na^+ dans le tubule collecteur des reins. L'utilité des diurétiques dans le traitement antihypertensif sera abordée dans la section suivante.

En deuxième lieu, les iECA sont une classe de médicaments antihypertenseurs qui a été mise sur le marché au début des années 1980. En inhibant la conversion de l'Ang I à l'Ang II, les iECA réduisent les niveaux circulants d'Ang II et d'aldostérone, tout en augmentant ceux de la bradykinine. Il en résulte une résistance périphérique vasculaire réduite, moins de rétention de sodium et d'eau et une vasodilatation accentuée grâce à l'effet vasodilatateur de la bradykinine. Leur usage est fréquent pour le traitement des patients souffrant de problèmes rénaux parce qu'ils diminuent la protéinurie et stabilise la fonction rénale¹¹. Ils sont aussi utilisés en prévention secondaire pour les patients ayant souffert d'un infarctus du myocarde parce qu'ils diminuent l'hypertrophie ventriculaire gauche.

Une troisième cible pharmacologique se situe au niveau des récepteurs AT1 de l'Ang II. Les antagonistes des récepteurs AT1 (ARA) ont été développés en partie pour éviter les

effets secondaires des iECA comme la toux et l'angio-oedème amenés par la dégradation de la bradykinine. Aussi, l'Ang II peut être produite par d'autres voies enzymatiques et donc les niveaux d'Ang II obtenus avec les iECA ne sont pas toujours aussi faibles que souhaités^{76, 77}. Les récepteurs AT1 s'avèrent donc être une cible de choix pour inhiber les effets de l'Ang II car ils constituent l'étape ultime de la cascade. Les premiers antagonistes des récepteurs AT1 ont donc suivi au milieu des années 1990. Le récepteur AT1 est responsable de la majeure partie des effets délétères de l'Ang II, soit la contraction des CMLV, la relâche d'aldostérone et de catécholamines et la prolifération cellulaire. Les conséquences de la liaison de l'Ang II au récepteur AT2 sont beaucoup moins définies.

Malgré l'efficacité reconnue des iECA et des antagonistes des récepteurs AT1, certains effets secondaires liés à leur utilisation a stimulé la recherche et l'a orienté vers une autre cible de la cascade du SRAA. En effet, l'utilisation de ces deux classes de médicaments provoque une augmentation rebond de la synthèse et de la sécrétion de rénine, menant à l'augmentation des concentrations de rénine plasmatique⁷⁸. L'augmentation des niveaux de rénine plasmatique a été corrélée avec une augmentation de la défaillance cardiaque et rénale⁷⁹. Cette situation a mené à la découverte des inhibiteurs de la rénine, dont le premier mis sur le marché a été l'aliskiren. Cette molécule se lie aux sites actifs de la rénine et inhibe son action. L'étude de ces inhibiteurs nécessite l'utilisation de modèles d'hypertension double-transgéniques pour exprimer les gènes de l'angiotensinogène et de la rénine spécifiques à l'humain. L'efficacité de l'aliskiren à réduire la pression artérielle est similaire à celle des iECA et des antagonistes des récepteurs AT1. Toutefois, l'avantage de ces nouveaux médicaments pourrait résider dans leur combinaison à d'autres médicaments antihypertenseurs. Il en est de même lors de leur combinaison avec d'autres inhibiteurs du SRAA, où les diminutions de pressions dans un tel cas sont plus grandes qu'avec chacun des médicaments utilisé seul⁸⁰. Aussi, le potentiel pour la protection des organes cibles semble bien présent.

Diurétiques

Les diurétiques sont une classe de médicaments antihypertenseurs dont l'usage est très répandu, seul ou combiné à d'autres antihypertenseurs. Il existe différentes classes de diurétiques: les thiazides, qui sont les plus utilisés, les diurétiques de l'anse, les inhibiteurs de l'anhydrase carbonique et les diurétiques protecteurs du potassium, mentionnés plus-haut. L'objectif de ce type de médicament est de réduire la rétention d'eau en augmentant le volume d'urine et l'excrétion de sodium et de potassium. Pour ce faire, la réabsorption du Na^+ à différents endroits du néphron est réduite, et pour conserver l'osmolarité du filtrat, davantage d'eau est excrétée. Il en résulte une diminution du volume sanguin et par conséquent, une diminution du débit cardiaque et de la pression artérielle. En utilisation chronique, une réduction de la résistance périphérique survient. Ce phénomène pourrait être dû à une modification dans le contenu ionique des CMLV, à une altération dans les gradients ioniques de part et d'autre de la membrane cellulaire des CMLV ou à une modification de l'activité de la pompe ATPase⁸¹.

Vasodilatateurs directs

L'usage de vasodilatateurs directs dans le traitement de l'hypertension se fait majoritairement en situation d'urgence ou en ajout à une thérapie multi-drogues⁸²⁻⁸⁴. Leur mécanisme d'action consiste à réduire la résistance périphérique par l'induction de la relaxation des CMLV des artérioles. Les quatre médicaments principaux qui composent cette classe y parviennent par des mécanismes distincts. L'hydralazine et le minoxidil provoquent l'ouverture des canaux potassiques, le sodium nitroprusside (SNP) est un donneur de NO qui augmente le GMP cyclique (GMPC) et diminue l'influx de calcium dans

la cellule et finalement, le fenoldopam est un agoniste des récepteurs dopaminergiques D1, et sa liaison au récepteur résulte en une dilatation des artérioles¹¹. En tant que composant d'une thérapie multi-drogues, les vasodilatateurs directs doivent être utilisés en combinaison avec, en premier lieu, un β -bloqueur pour contrôler l'augmentation de l'influx sympathique résultant de la réduction de la résistance périphérique par le vasodilatateur, et en deuxième lieu, un diurétique, afin de compenser la diminution de l'excrétion de Na^+ , la deuxième conséquence de la réduction de la résistance périphérique par le vasodilatateur.

Bloqueurs de canaux calciques

Les bloqueurs de canaux calciques inhibent l'influx de Ca^{2+} dans le cytoplasme des cellules contractiles de l'arbre vasculaire et du cœur en bloquant le pore principal des canaux voltage-dépendant de type L, la sous unité α_1 . Ce type de canal est exprimé sur les cellules de muscle lisse et sur les cardiomyocytes. Malgré la distribution ubiquitaire des canaux voltage-dépendants, l'action des bloqueurs de canaux calciques est spécifique au système cardiovasculaire. Il existe un potentiel électrochimique de part et d'autre de la membrane résultant de la différence de concentration de l'ion Ca^{2+} : cette concentration est beaucoup plus élevée dans le milieu extracellulaire. L'inhibition de l'entrée de calcium se fait par un changement de l'état conformationnel du canal, favorisant l'état fermé de celui-ci et réduisant sa fréquence d'ouverture en réponse à la dépolarisation. La concentration intracellulaire de Ca^{2+} est ainsi réduite, réduisant l'activation des diverses cascades signalétiques médiées par le calcium. Il s'en suit une relaxation du muscle lisse artériel, diminuant la résistance périphérique vasculaire, et une diminution de la contractilité du cœur. Les bloqueurs de canaux calciques ont peu d'influence sur le tonus veineux et par conséquent, l'hypotension orthostatique n'est pas un effet secondaire de l'utilisation de ce type de médicament.

Il existe diverses classes de bloqueurs de canaux calciques, caractérisées selon la structure moléculaire de ces derniers. Les différences dans leurs structures chimiques leur confèrent des propriétés distinctes au point de vue pharmacocinétique mais surtout en termes de leur mode d'action, car leur site de liaison et leur affinité pour le canal transmembranaire ne sera pas les mêmes. Les deux principales classes sont les dihydropyridines (DHP) et les non-dihydropyridines, laquelle se divise également en diphénylalkylamines et benzothiazepines. Les DHP ont une affinité marquée pour le canal dans son état inactivé; ainsi, leur impact est plus grand au niveau des CMLV parce que les canaux de celles-ci ont une fréquence de dépolarisation plus faible que les canaux des cardiomyocytes par exemple. C'est ce qui fait que les DHP sont de puissants vasodilatateurs, et ont moins d'effet sur la contractilité cardiaque. Par contre, les non-dihydropyridines ont une affinité accrue pour le canal dans son état activé en plus d'avoir un degré d'inhibition proportionnel à la fréquence de stimulation. Ils sont donc davantage spécifiques pour le muscle cardiaque, qui présente une fréquence de dépolarisation plus élevée. Leur effet principal est donc chronotrope et inotropique négatif avec un impact modéré sur la vasodilatation artérielle.

D'autres mécanismes de réduction de la pression artérielle sont aussi mis en branle avec l'utilisation des bloqueurs de canaux calciques. En provoquant l'augmentation de la concentration plasmatique de peptide natriurétique, le taux de filtration glomérulaire augmente, et il s'en suit une excrétion de sodium et d'eau augmentée, réduisant ainsi la pression artérielle. Ils réduisent la synthèse d'aldostérone et contribuent à inhiber la vasoconstriction induite par l'ECA⁸⁵ et par les récepteurs α -adrénergiques⁸⁶.

Cas de l'amlodipine

L'amlodipine est un bloqueur de canaux calciques de type dihydropyridine de la troisième génération, disponible sur le marché depuis 1992. La distinction entre les générations se fait

principalement par leurs propriétés pharmacocinétiques, la première comprenant les médicaments avec un début d'action rapide mais non-soutenue, c'est-à-dire avec une demi-vie très courte. La deuxième inclut ces mêmes médicaments mais sous forme de libération prolongée en plus de nouvelles entités chimiques, et finalement, la troisième génération comporte elle aussi de nouvelles entités chimiques avec des demi-vies beaucoup plus longues, une plus grande lipophilicité et une sélectivité vasculaire améliorée.

L'amlodipine possède des propriétés physico-chimiques particulières, résultant en une interaction privilégiée avec la membrane plasmique. Ceci lui confère un profil pharmacologique unique comparé aux autres dihydropyridines, par exemple sa demi-vie de 35 heures. À pH physiologique, l'amlodipine est chargé positivement, ce qui favorise les interactions électrostatiques avec la membrane phospholipidique⁸⁷. Une des conséquences de ces interactions est l'accumulation de l'amlodipine dans la bi-couche lipidique de la membrane, procurant un réservoir de molécules actives pour sa liaison au récepteur à long terme à l'intérieur même de la bi-couche des CMLV⁸⁸. Ce serait une des théories qui permettrait d'expliquer la longue durée d'action de l'amlodipine. L'association à son récepteur est toutefois plus lente que les DHP sans charge ionique, ce qui expliquerait en outre son début d'action plus lent.

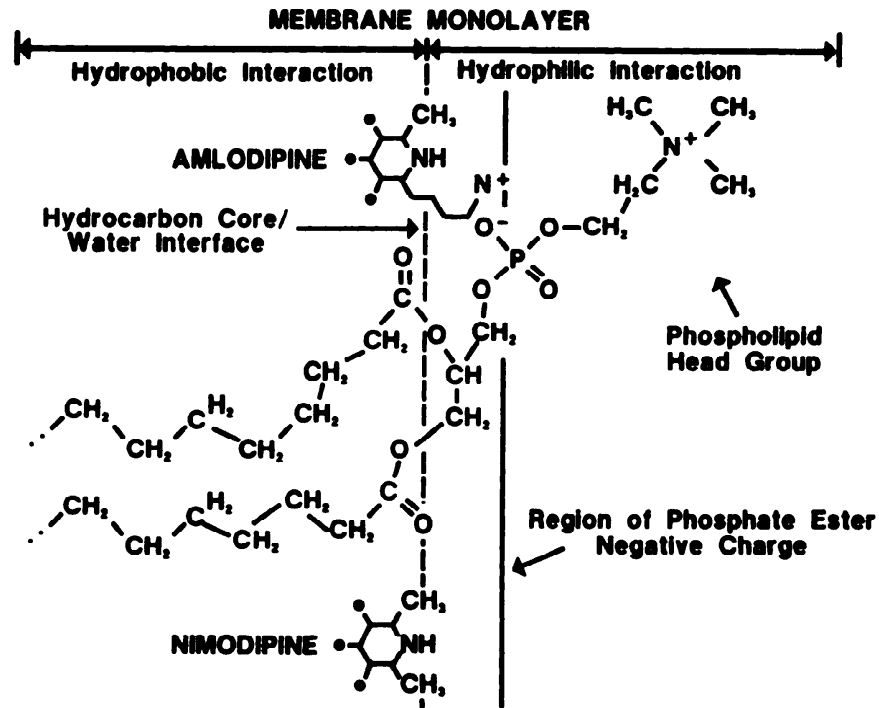


Figure 2: Localisation de l'amlodipine à la membrane plasmique. L'amlodipine, de par ses propriétés physico-chimiques particulières, démontre une interaction privilégiée avec la membrane plasmique. Cette interaction peut être de nature hydrophobique ou, de par sa charge ionique, hydrophilique. Tirée de Mason RP, 1989.

Combinaisons fixes

L'atteinte des objectifs de réduction de la pression artérielle chez un patient hypertendu se fait rarement avec un seul médicament. L'ajout d'un, de deux et même de trois antihypertenseurs est parfois nécessaire pour contrôler la pression artérielle efficacement. D'autre part, l'administration d'une combinaison fixe de faibles doses peut aussi être faite comme traitement de première ligne⁸⁹. L'association de divers antihypertenseurs est

souhaitable pour éviter d'utiliser une dose maximale d'un même médicament en risquant de voir survenir des effets secondaires et pour rechercher un effet additif sur la diminution de la pression artérielle, ce qui ne surviendrait pas nécessairement en augmentant la dose d'un même médicament. Un des critères pour l'association de deux antihypertenseurs est qu'ils possèdent des profils d'effets secondaires distincts, et que les effets secondaires de l'un contre-balaient les effets secondaires de l'autre. Pour le traitement antihypertensif, les associations se font entre deux groupes de médicaments, le premier groupe incluant les médicaments ciblant le SRAA et les β -bloquants, et le deuxième groupe, les diurétiques et les bloqueurs de canaux calciques. Les associations les plus courantes sont soit un iECA, un ARA ou un β -bloquant combiné à un diurétique.

Hypolipémiants

Le terme dyslipidémie se réfère à un désordre du métabolisme des lipides, se traduisant par un ensemble de manifestations comme des niveaux élevés de cholestérol, de triglycérides, de LDL, et une diminution des niveaux de lipoprotéines de haute densité (HDL). Le LDL et le HDL sont des complexes de lipoprotéines qui permettent de transporter le cholestérol dans le sang. Un niveau élevé de cholestérol plasmatique, dû à un désordre génétique ou en conséquence d'une alimentation riche en gras saturés et en cholestérol, est sans contredit un facteur de risque majeur dans la progression de l'athérosclérose⁹⁰ et autres maladies cardiovasculaires. Il est d'ailleurs maintenant clairement établi que le risque cardiovasculaire est directement proportionnel aux niveaux de cholestérol⁹¹. L'objectif de la thérapie hypolipémiante est de réduire les niveaux totaux de cholestérol et les niveaux de LDL et, de plus en plus, d'augmenter ceux de HDL. Les différents médicaments utilisés pour atteindre cet objectif sont les statines, les fibrates, la niacine, un inhibiteur de l'absorption intestinale du cholestérol, et les résines séquestrant le cholestérol.

Statines

Les statines représentent le groupe de médicaments hypolipidémiants le plus efficace et le mieux toléré parmi ceux offerts sur le marché. Elles sont donc utilisées en première ligne pour les patients souffrant d'hypercholestérolémie, et même administrées après un événement coronarien, peu importe les niveaux de cholestérol¹¹. La première statine a été disponible commercialement en 1987, et depuis, cinq autres se sont ajoutées à la liste. Alors que les trois premières statines étaient de structure chimique similaire, dérivées toutes trois d'une moisissure, l'*Aspergillus terreus*, les trois autres qui ont suivi sont des composés synthétiques présentant des structures chimiques plus variées.

Les statines sont des inhibiteurs compétitifs de l'HMG-CoA réductase, une enzyme qui catalyse la synthèse du cholestérol dans le foie à partir du substrat HMG-CoA. Les statines ont une structure similaire à l'intermédiaire entre l'HMG-CoA et le mévalonate, mais avec une affinité supérieure d'au moins quatre ordres de grandeur comparé au substrat endogène, ce qui leur permet de jouer leur rôle d'inhibiteur compétitif. En inhibant cette étape limitante de la réaction, les statines inhibent la cholestérogénèse hépatique, ce qui amène l'augmentation bénéfique de l'expression des récepteurs LDL^{92, 93}, l'expression de ces récepteurs étant régulée par une boucle de régulation négative. Il s'en suit une diminution de la concentration de cholestérol plasmatique⁹⁴. Les récepteurs LDL sont présents à la surface de toutes les cellules et contrôlent l'absorption du LDL plasmatique, fournissant ainsi à la cellule le cholestérol nécessaire à la synthèse de sa membrane lipidique⁹⁵. La réduction du cholestérol LDL est de l'ordre de 20% à 55% selon la dose utilisée⁹⁶. Les statines réduisent aussi les niveaux de triglycérides, mais de façon beaucoup plus modeste, de 10% à 30%, et finalement, une faible augmentation du HDL est observée.

Cas de l'atorvastatine

L'atorvastatine fait partie du groupe des statines synthétiques, et elle est disponible commercialement depuis 1996. Son efficacité à réduire le cholestérol LDL est supérieure à celle des autres statines, avec des niveaux de réduction atteignant 60%⁹⁷.

Une des particularités de l'atorvastatine, comparé aux statines non synthétiques, est qu'elle est hautement lipophile, ce qui lui permet d'interagir avec les composants de la membrane cellulaire du réticulum endoplasmique, dans lequel l'enzyme HMG-CoA réductase se situe⁹⁸⁻¹⁰⁰. Cette lipophilicité fait en sorte qu'elle ne nécessite pas de transport actif pour pénétrer à l'intérieur de la cellule. Cette propriété serait attribuable à sa structure chimique particulière, composée d'un pyrrole lié à de multiples cycles aromatiques¹⁰¹. De ce fait, la localisation de l'atorvastatine dans la membrane cellulaire, telle que déterminée par une approche biophysique, est associée à la chaîne hydrophobe des phospholipides¹⁰¹, alors qu'une statine hydrophile comme la pravastatine ne peut traverser la bicouche lipidique sans transport actif¹⁰². De plus, alors que les statines naturelles requiert une biotransformation pour la libération de leur principe actif, l'atorvastatine est déjà sous forme active en plus de posséder des métabolites actifs aussi efficaces que la molécule parent. Ces métabolites sont libérés dans la circulation et contribuent à la longue demi-vie de 20 à 30 heures de l'atorvastatine. Leur présence dans la circulation fait qu'ils sont disponibles pour une activité systémique, au niveau de la paroi vasculaire par exemple¹⁰¹.

Les différences dans la structure moléculaire des différentes statines semblent donc jouer un rôle de premier plan puisqu'elles corrént avec les différences dans les effets pharmacologiques observés, au niveau principalement de leur efficacité et de leurs effets pléiotropiques.

Rôle de l'apoptose dans la correction du remodelage vasculaire pathologique

L'apoptose thérapeutique est un concept selon lequel l'induction de l'apoptose des CMLV serait impliquée dans la normalisation de l'hypertrophie vasculaire induite par certaines classes d'agents antihypertenseurs, en réduisant l'hyperplasie vasculaire¹⁰³. De même, l'apoptose des fibroblastes dans le cœur contribuerait à la réduction de l'HVG^{104, 105}. L'apoptose thérapeutique permet de normaliser la structure vasculaire au même niveau que celle des animaux normotendus. Le modèle utilisé dans notre laboratoire pour étudier plus en détails le phénomène de remodelage cardiovasculaire est le SHR. Cette lignée de rats est un modèle d'hypertension essentielle, et elle présente des caractéristiques importantes du remodelage cardiovasculaire pathologique, soit une hypertrophie et une hyperplasie des CMLV au niveau de l'aorte¹⁰⁶ et une hypertrophie du ventricule gauche¹⁰⁷. Notre laboratoire a été en mesure de démontrer que chez le SHR, l'induction de l'apoptose dans l'aorte se faisait en une vague transitoire d'une durée moyenne de huit jours, selon le médicament antihypertensif utilisé. Cette vague, appelée fenêtre apoptotique, est associée à une diminution de l'hypertrophie et de l'hyperplasie vasculaire. Cet effet n'est pas observé avec le vasodilatateur hydralazine, ce qui suggère que le phénomène est indépendant de la diminution de la pression artérielle¹⁰³. Un marqueur potentiel proposé pour caractériser la susceptibilité des CMLV d'entrer en apoptose est la polyplôidie¹⁰⁸: une cellule polyplôide contient plusieurs fois son lot de chromosomes. C'est donc une conséquence d'une défectuosité du cycle cellulaire où il y a réplication de l'ADN sans division cellulaire. Finalement, l'apoptose jouerait également un rôle important dans la régression de la formation de l'intima chez le SHR et le rat Wistar-Kyoto (WKY), sans que ce phénomène ne soit accompagné d'une baisse de la pression artérielle¹⁰⁹.

Effets pléiotropiques de l'amlodipine

La justification première de l'utilisation des bloqueurs de canaux calciques pour le traitement de l'hypertension réside sur son pouvoir vasodilatateur. Or, des propriétés supplémentaires non reliées à cet effet primaire ont peu à peu été mises en évidence. Les effets pléiotropiques de l'amlodipine seraient des effets indépendants de la diminution de la pression artérielle, et contribueraient à son action bénéfique tel que démontré par les résultats de nombreuses études cliniques. Par exemple, l'étude CAMELOT¹¹⁰ a démontré que les patients normotendus mais souffrant d'une maladie coronarienne à qui est administrée l'amlodipine ont bénéficié d'une meilleure protection cardiovasculaire que ceux traités avec l'enalapril. Aussi, des résultats similaires ont été démontrés dans les études ALLHAT¹¹¹ et ASCOT-BPLA¹¹². Il est toutefois parfois difficile, dans de telles études, de dissocier les effets indépendants de la réduction de la pression artérielle et de la médication concomitante de ceux qui sont effectivement reliés à la réduction de la pression artérielle.

Les différents effets pléiotropiques associés à l'amlodipine sont décrits ci-dessous.

Induction de l'apoptose *in vivo* et réduction de l'hyperplasie et de l'hypertrophie aortique

L'amlodipine administrée à des SHR réduit de façon significative l'hypertrophie de l'aorte, tel que démontré par la diminution de l'aire de section aortique (CSA)^{113, 114}, et réduit également l'hyperplasie aortique¹¹³. Cette correction du remodelage vasculaire pathologique suit l'induction de la vague d'apoptose massive qui survient aux jours 2, 3 et 4 du traitement, au cours de laquelle près de 25% des CMLV de l'aorte sont éliminées par

apoptose. Associées à cette vague d'induction sont la réduction de la phosphorylation de Akt, une sérine-thréonine kinase pro-survie et l'augmentation de l'expression des caspases 8 dans un premier temps, et 3 et 9 dans un deuxième temps¹¹³. Aussi, suivant l'induction de l'apoptose, la synthèse d'ADN est réduite significativement lorsque le traitement est administré¹¹³.

Correction du remodelage vasculaire pathologique chez l'humain

La correction du remodelage vasculaire pathologique, tel qu'indiqué par la réduction du ratio paroi/lumière, est observée dans les petites artères de patients traités avec l'amlodipine¹¹⁵, résultat similaire à ceux obtenus avec un iECA¹¹⁶ ou un ARA¹¹⁷. Cet effet n'est toutefois pas observé avec un traitement avec un β -bloqueur, plus spécifiquement l'atenolol. Il semblerait qu'une des caractéristiques nécessaire au médicament antihypertensif pour avoir un effet sur le remodelage soit sa capacité à diminuer la résistance vasculaire périphérique¹¹⁸. L'impact de tels changements n'est pas encore tout à fait clair, mais il a été démontré qu'une réduction dans le ratio média/lumière était associée à la réduction d'événements cardiovasculaires^{119, 120}. Chez l'humain, le remodelage eutrophique interne s'observe effectivement au niveau des petites artères de résistance²³. Une amélioration de la structure des vaisseaux pourrait donc être responsable de la protection cardiovasculaire accordée par l'amlodipine.

Amélioration de la fonction endothéliale

L'amlodipine améliore la biodisponibilité du NO, probablement par un mécanisme dépendant des kinines au niveau des vaisseaux sanguins⁸⁸. L'amlodipine est aussi reconnue

pour stimuler eNOS, menant à une augmentation de la libération de NO^{121, 122}, mais le mécanisme exact de cette action n'est pas encore connu. Dans un modèle d'hypertension obtenu par l'infusion continue d'Ang II chez des rats Sprague-Dawley, l'administration d'un traitement à l'amlodipine a permis de normaliser la relaxation à l'acétylcholine dans des segments d'aortes, donc la relaxation dépendante de l'endothélium¹²³. Cette amélioration de la fonction endothéliale serait attribuable en partie à l'action antioxydante de l'amlodipine. Chez le SHR, une amélioration de la fonction endothéliale est aussi observée dans les artères mésentériques¹²⁴. Toutefois, cet effet n'a pas été observé dans les artères de résistance des SHR¹²⁵. Chez l'humain, l'utilisation de microvaisseaux provenant de biopsies de tissus sous-cutanés de la fesse, considérés comme étant un modèle de petites artères, a permis de mettre en évidence l'amélioration de la fonction endothéliale en mesurant la relaxation à l'acétylcholine également, alors que cette amélioration n'est pas observée avec un traitement à l'atenolol, un β -bloquant¹¹⁵. Toutefois, l'utilisation d'une méthode différente n'a pas corroboré ces résultats. Effectivement, un deuxième groupe de chercheurs a démontré que la mesure de la vasodilatation dépendante de l'endothélium dans l'artère brachiale chez des patients hypertendus traités à l'amlodipine n'a pas permis de normaliser la fonction endothéliale¹²⁶.

Diminution du stress oxydant

La diminution du stress oxydant permet entre autres d'améliorer la fonction endothéliale, ce qui est un avantage d'un traitement antihypertensif. L'amlodipine, de part sa lipophilicité élevée, possède une forte capacité anti-oxydante indépendante de la modulation des canaux calciques. Cette caractéristique serait également due à sa structure chimique particulière qui facilite l'interaction avec la membrane cellulaire et par conséquent le don d'électrons, mettant ainsi fin à la réaction de peroxydation lipidique¹²⁷. À cet égard, l'amlodipine est au moins dix fois plus efficace que le verapamil et le diltiazem. Cette propriété permet aussi à

l'amlodipine de freiner l'oxydation du LDL, qui autrement contribuerait à la formation de cellules spumeuses et au déclenchement de processus inflammatoires⁸⁸, contribuant ainsi à un effet pro-athérosclérotique.

Réduction de l'inflammation

Il a d'abord été démontré que l'amlodipine modulait l'expression de deux interleukines, IL-6 et IL-8, dans des CMLV humaines en culture¹²⁸. La conséquence exacte de cette propriété n'est pas établie, mais il a été hypothétisé que IL-6 et IL-8 pourraient être secrétées et agir comme un mécanisme de défense en réaction à la réponse inflammatoire impliquée dans la pathogenèse de l'athérosclérose. Une étude récente s'est penchée sur l'évaluation du rôle de l'inflammation dans l'effet protecteur de l'amlodipine contre l'athérosclérose. Utilisant un modèle de rat athérosclérotique obtenu en administrant un inhibiteur de la synthèse de NO, il a été démontré que l'amlodipine pouvait prévenir l'infiltration de monocytes, ainsi que l'augmentation de l'expression de TGF- β_1 et de MCP-1 dans le cœur de ces rats¹²⁹. Ceci laisse suggérer que l'amlodipine, par son pouvoir anti-inflammatoire, pourrait ralentir la progression de l'athérosclérose. De plus, cet effet de l'amlodipine sur les marqueurs inflammatoires ne semblent pas dépendre de la diminution de la pression artérielle, puisque la dose utilisée n'était pas suffisante pour induire un changement de cette dernière. L'amlodipine réduirait également l'expression de certaines molécules d'adhésion comme ICAM-1, VCAM-1 et la E-sélectine après l'incubation de cellules HUVEC avec du TNF- α ¹³⁰.

Effets pléiotropiques de l'atorvastatine

Un nombre élevé d'effets pléiotropiques ont été attribués à l'atorvastatine suite à la découverte de l'ampleur des effets bénéfiques procurés suite à son administration, effets qui ne semblent pas pouvoir être attribuables à la diminution du taux de cholestérol uniquement. Par exemple, les statines réduisent le risque d'accidents vasculaires cérébraux, alors qu'un taux de cholestérol élevé n'est pas un facteur de risque pour cette maladie cardiovasculaire¹³¹. De plus, l'amélioration de la fonction endothéliale chez l'humain suite à l'administration d'une statine survient avant même que la réduction des taux de cholestérol ne soit atteinte, démontrant l'indépendance de ces deux conséquences cliniques¹³². Un grand nombre de ces effets ont plutôt été attribués à l'inhibition de la biosynthèse des intermédiaires de la cascade signalétique du mévalonate, nommés isoprénoïdes, qui servent d'attachements lipidiques pour plusieurs molécules de signalisation intracellulaires comme les petites GTPases. L'isoprénylation permet en fait aux petites GTPases de passer de l'état inactif, dans le cytosol, à l'état actif, à la membrane plasmique.

Induction de l'apoptose *in vitro*

L'atorvastatine induit l'apoptose des CMLV *in vitro* tant chez le rat^{133, 134} que chez l'humain¹³⁴. La découverte de cette propriété s'est faite dans un contexte où, dans les modèles animaux de dommage vasculaire, il avait été démontré que les statines interfèrent avec la formation de la néointima en réduisant la prolifération et la migration des CMLV, et ce, même chez des animaux normocholestérolémiques^{135, 136}. Cette réduction de la migration des CMLV de la média à la néointima ainsi que l'inhibition de leur prolifération ont été suggérés comme mécanismes possibles de protection vasculaire offerte par les

statines. Par contre, la capacité des statines à induire l'apoptose *in vivo* dans ce même contexte de formation de la néointima n'est pas encore déterminé, quoique les statines accentue le taux de l'induction de l'apoptose des CMLV dérivées de telles lésions¹³⁷. La possibilité que les statines induisent l'apoptose des CMLV dans la média n'est pas encore déterminée. L'ampleur de l'induction de l'apoptose est directement reliée à l'ampleur de l'inhibition de la production de mévalonate, et l'ajout de farnesyl-pyrophosphate (FPP) ou de geranylgeranyl-pyrophosphate (GGPP) au milieu de culture prévient l'induction de l'apoptose. De façon opposée, l'ajout de squalène ou de cholestérol, composés formés en amont du mévalonate ou du FPP et du GGPP, ne modifie pas la capacité des statines lipophiliques à induire l'apoptose, suggérant une fois de plus l'implication des intermédiaires isoprénylés dans le mécanisme.

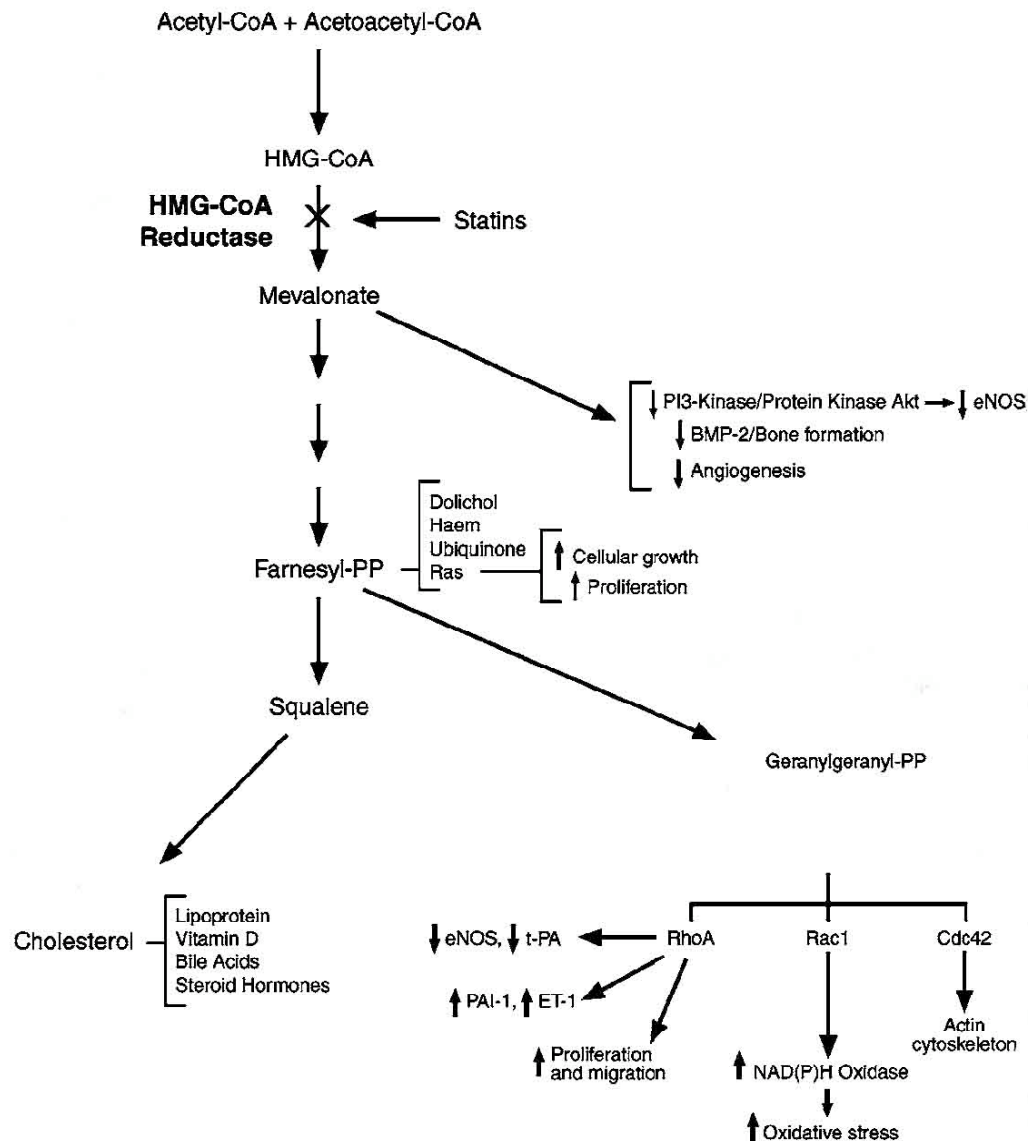


Figure 3: Cascade signalétique du mévalonate. L'inhibition compétitive de la HMG-CoA réductase par l'atorvastatine mène non seulement à l'inhibition de la synthèse du cholestérol, mais aussi à l'inhibition de la synthèse de composés isoprénylés indispensables à plusieurs modifications post-transcriptionnelles. Adapté de JK Liao *et al.*, 2004.

Rho, une petite GTPase appartenant à la superfamille Ras, est un exemple d'un composé pour lequel la prénylation est essentielle à son activation et qui pourrait être impliquée dans le phénomène de l'induction de l'apoptose associé aux statines. Un des rôles majeurs de Rho est de réguler la prolifération cellulaire. Elle possède une variété d'isoformes, dont RhoA et RhoB. La prénylation de Rho facilite son ancrage à la membrane plasmique et est requise pour l'activation des différentes protéines effectrices¹³⁸ dont p21^{Waf1/Cip1}, une protéine membre de la famille KIP/CIP. p21^{Waf1/Cip1} agit comme inhibiteur de kinase dépendante des cyclines (CDK), ces dernières régulant le cycle cellulaire. L'activation de Rho conduit à l'inhibition de p21^{Waf1/Cip1}, et par conséquent, à l'induction de la synthèse d'ADN¹³⁹. D'ailleurs, la surexpression de p21^{Waf1/Cip1} inhibe la prolifération et induit l'apoptose des CMLV¹⁴⁰. Aussi, dans un modèle de souris athérosclérotiques, la surexpression de p21^{Waf1/Cip1} par adénovirus a réduit significativement la resténose après angioplastie¹⁴¹. Dès les premières études démontrant la capacité des statines lipophiliques à induire l'apoptose des CMLV *in vitro* de façon dépendante de la dose, un rôle potentiel pour Rho a été suggéré, puisqu'il a alors été démontré que l'atorvastatine inhibait la prénylation de RhoB¹³³ et par la suite, de RhoA¹⁴². De plus, l'inhibition de la voie RhoA/ p21^{Waf1/Cip1} par une statine a été directement impliquée dans la prévention de la prolifération des cellules mésangiales induite par une concentration élevée de glucose dans le milieu de culture¹⁴³, ainsi que dans l'induction de l'apoptose des CMLV humaines *in vitro* par la lovastatine¹⁴⁴. Une autre étude suggère plutôt qu'une autre CDK, à savoir p27^{Kip1}, serait responsable de l'atténuation de la prolifération des CMLV par l'atorvastatine¹⁴⁵.

Les résultats de d'autres travaux pointent dans la direction de la voie mitochondriale. Le traitement de CMLV avec une statine *in vitro* mène à l'inhibition de l'expression de Bcl-2, une protéine anti-apoptotique, et ce, sans changement de Bax, une protéine pro-apoptotique¹⁴². Les caspases 9 et 3 semblent aussi être activées, sans pour autant que de changements soient observés pour la caspase 8¹⁴⁶.

Enfin, un nouveau mécanisme par lequel l'atorvastatine induirait l'apoptose des CMLV a récemment été proposé. La survivine est une protéine anti-apoptotique faisant partie de la famille des *Inhibitors of Apoptosis Proteins* (IAP). Son rôle est d'inactiver les effecteurs de l'apoptose, notamment les caspases 3, 7 et 9. Son implication dans le remodelage vasculaire pathologique a été démontrée dans un modèle de dommage vasculaire par angioplastie chez le lapin, dans lequel sa surexpression est observée dans les CMLV de la néointima¹⁴⁷. Par ailleurs, l'expression de la survivine est réduite significativement, voire même complètement supprimée, après traitement de CMLV en culture avec l'atorvastatine¹⁴⁸. Cette voie pourrait expliquer les effets anti-athérosclérotiques et anti-resténose des statines¹⁴⁹.

Amélioration de la fonction endothéliale

Un nombre important d'études cliniques variées chez l'humain ont démontré l'effet positif de l'atorvastatine sur la fonction endothéliale^{132, 150-153}. Cette propriété a également été observée dans plusieurs modèles de rats hypertendus¹⁵⁴⁻¹⁵⁶. Quelques mécanismes ont été proposés pour expliquer cette amélioration. Tout d'abord, l'atorvastatine induit l'augmentation de l'expression de eNOS ainsi que son activité, provoquant une augmentation de la synthèse du NO. Rho est une petite GTPase membre de la superfamille Ras, qui influence le transport intracellulaire, la transcription génique et la stabilité de l'ARN messager. Il a été démontré que Rho régule négativement l'expression de eNOS¹⁵⁷. Étant donné que l'atorvastatine inhibe l'isoprénylation, plus spécifiquement la géranylgeranylation, de Rho, celle-ci reste inactive dans le cytosol. Ainsi, la demi-vie de l'ARN messager codant pour eNOS est prolongée et l'expression de eNOS est par conséquent augmentée¹⁵⁸. Dans un deuxième temps, l'atorvastatine promouvoit l'interaction entre la protéine kinase Akt (aussi appelée protéine kinase B) des cellules endothéliales et eNOS, ce qui conduit à la phosphorylation de eNOS sur des sites spécifiques (sérines 1177

et 1179) menant à son activation, augmentant la libération de NO¹⁵⁹. L'atorvastatine stimule également la production de NO par les cellules endothéliales en atténuant l'expression de la cavéoline-1, une protéine de structure située dans des invaginations de la membrane plasmique. Lorsqu'associée à la cavéoline, eNOS est moins active, donc la diminution de l'expression de la cavéoline-1 résulte en une augmentation de l'activation de eNOS¹⁶⁰. Ces divers effets de l'atorvastatine sont renversés par l'ajout de mévalonate, démontrant encore une fois l'implication cette voie. D'autre part, l'atorvastatine influence aussi la synthèse de NO par des mécanismes dépendants du cholestérol. Des niveaux élevés de LDL influencent négativement l'expression de eNOS, et il en est de même pour l'état d'oxydation du LDL¹⁶¹. En diminuant les niveaux de LDL sériques et en diminuant le degré d'oxydation du LDL, l'atorvastatine améliore l'activité de eNOS et ainsi, la synthèse de NO. Il a d'ailleurs été démontré, chez des patients hypercholestérolémiques, que la vasodilatation dépendante de l'endothélium évaluée après l'aphérèse du LDL et du LDLox améliorerait la fonction endothéliale¹⁶². Finalement, le pouvoir antioxydant de l'atorvastatine contribue aussi à l'amélioration de la fonction endothéliale. Ce sujet sera abordé plus en détails dans la section suivante.

Diminution du stress oxydant

Le stress oxydant joue un rôle de premier plan dans le développement de la dysfonction endothéliale et de l'athérosclérose. Tel que mentionné précédemment, la NADPH oxydase est une source majeure de ROS dans les parois vasculaires. Cette enzyme est composée de diverses sous-unités, variables selon le tissu, notamment p22phox, gp91phox, p47phox, p40phox et nox1 dans les CMLV. L'activation de la NADPH oxydase dépend de la translocation de la petite GTPase rac1 du noyau à la membrane plasmique. L'activation du récepteur AT1 suite à une stimulation par l'Ang II et l'activation subséquente de la NADPH oxydase mènent d'ailleurs à la translocation de rac1 à la membrane, impliquant rac1 dans

l'un des plus importants mécanismes de génération de ROS. L'atorvastatine, en inhibant la géranylgeranylation de rac1 et donc en empêchant son activation, empêche également l'activation de la NADPH oxydase^{156, 163, 164}. De plus, l'atorvastatine diminue l'expression du récepteur AT1 de près de 50% dans l'aorte du SHR, contribuant certainement à son pouvoir antioxydant. Cette diminution de l'expression du récepteur AT1 au niveau vasculaire pourrait expliquer en partie la baisse de pression artérielle observée chez ce modèle¹⁵⁶. Toujours au niveau de la NADPH oxydase, des études *in vivo* chez le SHR ont démontré que l'atorvastatine modifie également à la baisse l'expression de ses sous-unités p22phox et nox1, agissant ainsi à un site différent mais contribuant toujours au pouvoir antioxydant de cette statine¹⁶⁴. En dernier lieu, l'atorvastatine régule à la hausse l'expression de la catalase, une enzyme qui agit en contre-balancant le stress oxydant, en catalysant la conversion du H₂O₂ en eau et en oxygène¹⁶⁴.

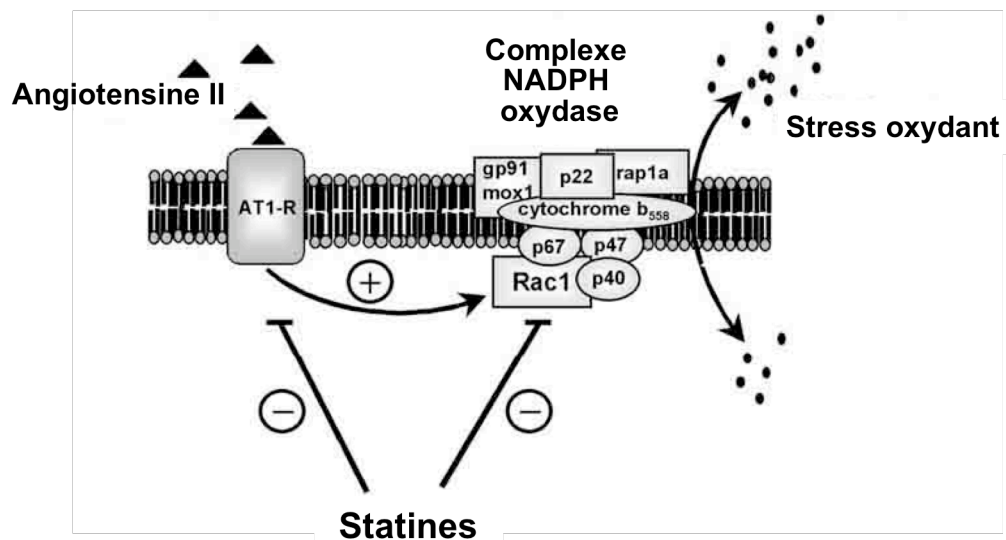


Figure 4: Mécanismes antioxydants des statines

L'Ang II provoque l'activation du récepteur AT1, ce qui amène la translocation de rac1 à la membrane et l'activation subséquente de la NADPH oxydase. Les statines inhibe ce mécanisme en diminuant l'expression du récepteur AT1, et en inhibant la géranylgeranylation de rac1. Adapté de JK Liao *et al.*, 2004.

Réduction de l'inflammation

Tel que mentionné précédemment, l'hypertension est associée à un état chronique d'inflammation au niveau des parois vasculaires. Les niveaux de différents marqueurs inflammatoires, notamment la CRP, les cytokines inflammatoires comme IL-6 et TNF- α et les molécules d'adhésion comme CD11, CD18, la P-sélectine, la E-sélectine, VCAM et ICAM, corréleront positivement avec l'augmentation de la pression artérielle⁴⁵. Fait intéressant, les statines ont aussi un pouvoir anti-inflammatoire, caractéristique qui pourrait contribuer à leur effet bénéfique global. Les résultats d'une étude récente semblent pouvoir permettre d'établir un lien entre la réduction de la concentration sérique de CRP et la réduction de la pression pulsée suite à un traitement avec une statine lipophile, la fluvastatine, chez des patients hypertendus avec un taux de cholestérol élevé¹⁶⁵. Dans le modèle de souris transgéniques athérosclérotiques ApoE*3-Leiden, l'atorvastatine réduit significativement l'inflammation vasculaire^{166, 167}, et ce, de façon indépendante de la diminution du taux de cholestérol pour ce qui est de VCAM-1¹⁶⁶. Une autre étude pointant dans la direction d'une action anti-inflammatoire de l'atorvastatine indépendante de la diminution des taux de cholestérol a été réalisée sur des souris transgéniques huCRP^{tg}, porteuses du gène codant pour la CRP humaine mais n'étant pas athérosclérotiques. Cette étude établit clairement que l'atorvastatine possède une activité anti-inflammatoire en absence d'athérosclérose, car l'expression génique de huCRP est quasiment supprimée tant pour l'état basal qu'après une stimulation à l'IL-1 β chez ces souris¹⁶⁸.

L'Ang II induit une réponse inflammatoire par la production de ROS, de molécules d'adhésion, de cytokines inflammatoires¹⁶⁹ et par sa liaison au récepteur AT1, en plus d'être impliquée dans toutes les étapes de cette réponse, soit l'augmentation de la perméabilité vasculaire, le recrutement leucocytaire et la mise en branle des processus de réparation¹⁷⁰. Il a été suggéré que l'inflammation serait intimement reliée au remodelage vasculaire induit

par l'exacerbation du SRAA dans l'hypertension, le remodelage étant médié principalement par le récepteur AT1. La majorité des effets délétères de l'Ang II sont d'ailleurs médiés par ce type de récepteur. Les antagonistes de récepteurs AT1 présentent une activité anti-inflammatoire et induisent une correction du remodelage cardiovasculaire pathologique chez le SHR¹⁶⁹. Il est tentant de spéculer que l'atorvastatine, par son action anti-inflammatoire, pourrait alors agir en corrigeant le remodelage pathologique induit par le récepteur AT1, combiné au fait que les statines sont reconnues pour diminuer l'expression de ce récepteur dans les CMLV¹⁷¹.

Logique de la combinaison amlodipine/atorvastatine

L'intérêt de la combinaison amlodipine/atorvastatine découle entre autres de certaines conclusions provenant de recherches fondamentales et cliniques faites suite à la mise en marché de la combinaison fixe de ces deux médicaments, vendue commercialement sous le nom de *Caduet*[®]. L'atteinte des objectifs de pressions artérielles et de taux de cholestérol se fait plus fréquemment et plus rapidement lors de l'administration de la combinaison, en plus de procurer un avantage supplémentaire au niveau de la réduction du risque cardiovasculaire¹⁷². Cette constatation suscite un questionnement sur les voies d'interaction possibles entre les deux médicaments. Une meilleure compréhension de cette interaction pourrait éventuellement mener à des indications thérapeutiques nouvelles pour cette combinaison. Voici un sommaire des conclusions de ces études.

Études mettant en évidence les effets bénéfiques de la combinaison

L'analyse des résultats de la portion LLA (*lipid-lowering arm*) de l'étude ASCOT a permis de faire ressortir une interaction possible entre les deux médicaments. Le design de cette partie de l'étude avait été pensé pour tenter de déterminer si l'ajout d'une statine pouvait procurer un avantage supplémentaire aux patients hypertendus et qui, selon les recommandations actuelles, ne souffraient pas de dyslipidémie. L'étude a permis de révéler que l'administration de la combinaison amlodipine/atorvastatine chez des patients ayant un taux de cholestérol normal ou légèrement élevé (cholestérol total < 6.5 mmol/L) est plus efficace à réduire le risque relatif de souffrir d'un infarctus du myocarde ou d'un accident coronarien que la combinaison atenolol/atorvastatine ou qu'un antihypertenseur seul¹⁷³. Même après une stratification séparant les patients dont le taux de cholestérol total était ≤ 5.6 mmol/L ou > 5.6 mmol/L, la conclusion était la même.

L'étude AVALON-AWC (*Avalon Arterial Wall Compliance*) a étudié l'effet de la combinaison sur la compliance et l'élasticité des artéριοles, capillaires et veinules composant la microcirculation. Ainsi, ils ont pu démontrer que la compliance de ces vaisseaux est améliorée significativement avec l'administration de la combinaison amlodipine/atorvastatine comparé à l'amlodipine seule chez des patients hypertendus et hypercholestérolémiques¹⁷⁴. La conclusion d'une autre étude pointe dans la même direction en élargissant cette découverte aux grosses artères également¹⁷⁵. Il semble donc que la combinaison ait un effet additif ou synergique sur cette variable indicatrice du dommage vasculaire.

L'effet de la combinaison sur la pression artérielle, les marqueurs inflammatoires IL-6 et TNF- α , ainsi que sur la résistance à l'insuline a été étudié chez des patients normocholestérolémiques, mais hypertendus et obèses¹⁷⁶. Cette étude confirme l'impact

positif de l'ajout de l'atorvastatine à l'amlodipine pour la diminution de la pression artérielle¹⁷⁷, laquelle est diminuée significativement par rapport à l'amlodipine administrée en monothérapie. De même, les niveaux plasmatiques des différents marqueurs inflammatoires ainsi que la résistance à l'insuline sont tous deux réduits significativement, encore une fois par rapport à l'amlodipine administrée en monothérapie.

Une étude *in vitro* s'est aussi penchée sur les propriétés que pouvait avoir la combinaison. À l'aide de cellules HUVEC, il a été démontré que la combinaison amlodipine/atorvastatine produisait un effet synergique sur la relâche de NO comparativement à chacun des médicaments seul, de telle sorte que l'activité endothéliale de l'amlodipine serait potentialisée par la présence de l'atorvastatine¹⁷⁸. Ce genre d'effet est aussi observé par rapport à la réduction du stress oxydant, où l'ajout d'amlodipine à l'atorvastatine accentue l'inhibition de la peroxydation lipidique¹⁰¹.

Amélioration de la fonction endothéliale pouvant mener à l'apoptose

Ces deux dernières propriétés en particulier, soit l'augmentation de la relâche de NO et la diminution du stress oxydant, représentent un potentiel intéressant pour le traitement antihypertensif parce qu'elles pourraient contribuer à améliorer la fonction endothéliale de façon additive, voire synergique. Ceci pourrait avoir une grande portée thérapeutique en soit, mais pourrait aussi avoir un impact majeur en ce qui a trait au remodelage vasculaire. Notre laboratoire a effectivement été en mesure d'établir que la restauration de la fonction endothéliale potentialisait la correction du remodelage pathologique induite par un iECA, l'enalapril¹⁷⁹. Chez le SHR, l'administration du substrat de la NO synthèse endothéliale, la L-arginine, et de son cofacteur BH₄, combinée au traitement à l'enalapril accélère et accentue de façon synergique l'induction de l'apoptose de CMLV aortiques. L'association de l'atorvastatine et de l'amlodipine pourrait, de la même façon, mener à une amélioration

synergique de la fonction endothéliale, accentuant ainsi la correction du remodelage pathologique déjà observée avec l'amlodipine.

Buts et hypothèses

Certaines classes d'agents antihypertenseurs, indépendamment de la baisse de la pression artérielle, permettent la correction du remodelage vasculaire pathologique. Cette propriété pourrait expliquer l'amélioration des taux de mortalité et de morbidité observée chez les patients suite à l'administration de ces médicaments en particulier. La normalisation du remodelage vasculaire est d'ailleurs devenue une cible thérapeutique de choix.

Notre laboratoire a démontré que l'amlodipine, un bloqueur de canaux calciques utilisé fréquemment dans le traitement de l'hypertension, induit l'apoptose des cellules de muscle lisse dans l'aorte du SHR de façon transitoire, ce qui résulte en une correction de l'hypertrophie aortique. Il a par ailleurs été démontré à plusieurs reprises que l'atorvastatine induit l'apoptose des CMLV *in vitro*, un effet qui reste à être démontré *in vivo*. Récemment, la combinaison fixe amlodipine/atorvastatine a fait son apparition sur le marché, afin d'améliorer la compliance des patients à qui sont déjà prescrits les deux médicaments.

L'objectif principal de ce mémoire était d'évaluer le potentiel pro-apoptotique de l'atorvastatine seule ou en combinaison avec l'amlodipine chez le SHR. Le SHR est un modèle bien défini d'induction de l'apoptose des CMLV dans les artères de conductance, menant à la correction du remodelage vasculaire pathologique. Finalement, l'administration de la combinaison amlodipine/atorvastatine devait nous permettre d'évaluer la possibilité d'une interaction entre les deux médicaments au niveau du remodelage vasculaire en particulier.

Méthodologie

Les méthodes présentées dans cette section complètent celles décrites dans la publication présentée à la section des résultats. Elles se rapportent à des résultats n'ayant pas été inclus dans cette publication mais dont l'ajout complète avec pertinence le corps de cet ouvrage. Une section plus détaillée sur la méthode utilisée pour déterminer l'index d'hyperplasie a aussi été ajoutée.

Bains à organes isolés

La vasoréactivité a été évaluée à l'aide d'anneaux d'une longueur de 3 mm provenant de l'aorte abdominale. Les anneaux fraîchement isolés et dont l'adventice a été retirée ont été placés dans des bains à organes isolés contenant une solution de Krebs oxygénée maintenue à 37°C et ont été placés sous une tension de repos de 2 g. Une heure a été accordée aux anneaux afin qu'ils se stabilisent avant que les stimulations débutent. L'actinomycine D (0.8 µM) a été ajoutée aux bains afin d'empêcher la synthèse protéique *de novo*. Le KCl (70 µM) a été utilisé afin de mesurer la contractilité intrinsèque du tissu, après quoi les anneaux se sont vus accorder une période d'une durée adéquate afin de leur permettre de retourner à leur état basal. Pour évaluer la fonction endothéliale, l'indométhacine (100 µM) a été ajoutée aux bains afin de bloquer l'action des peptides vasoactifs telles les prostaglandines. Les anneaux ont par la suite été pré-contractés par la phényléphrine (PE) (500 nM). Une courbe dose-réponse à l'acétylcholine (Ach) a été réalisée en employant des doses cumulées d'Ach allant de 1 nM à 1 µM. Les anneaux ont ensuite été restabilisés. Pour déterminer la réponse vasoactive des aortes en réponse à un donneur de NO, l'indométhacine (100 µM) a de nouveau été ajoutée, et les anneaux ont été pré-contractés par la phényléphrine (PE) (500 nM). Le SNP a par la suite été ajouté en employant des doses cumulées allant de 0.1 nM à 10 µM. Les résultats sont exprimés selon le pourcentage d'inhibition de la contraction induite par la PE.

Immunobuvardage de type *Western*

L'aorte thoracique ou la crosse aortique provenant de rats des différents groupes expérimentaux a été pulvérisée avec un mortier et pilon dans l'azote liquide. Afin d'en extraire les protéines, des aliquots d'environ 20 mg ont été lysés dans une solution d'extraction. Après la détermination de la concentration en protéines de chacun de ces aliquots par la méthode de Bradford, de nouveaux aliquots contenant 15 µg de protéines ont été réalisés. Les protéines ont par la suite migré par électrophorèse dans un gel d'acrylamide 10% ou 15% en conditions dénaturantes et ainsi séparées selon leur poids moléculaire (électrophorèse de gels de SDS-PAGE). Par la suite, les gels ont été transférés sur une membrane de nitrocellulose de type *Hybond-C*. L'immunobuvardage a été effectuée avec les anticorps appropriés, avant que les membranes soient incubées avec du *ECL (enhanced chemiluminescence substrate)*. Les films ont finalement été exposés et développés. Les densités optiques obtenues ont été analysées avec le logiciel *Image J*. Les résultats sont exprimés en termes de pourcentages de densité optique obtenues chez les animaux traités vs. celles obtenues chez les animaux du groupe contrôle.

Détermination de l'index d'hyperplasie aortique

La méthode du disecteur est un outil stéréologique qui permet de déterminer le nombre d'objets dans un volume donné, indépendamment de la forme, de l'orientation ou de la taille de ces objets¹⁸⁰. Adaptée à un tissu biologique¹⁸¹, la méthode consiste à compter le nombre de noyaux présents sur la première de trois photomicrographies prises à 400X d'une section de l'aorte, et de suivre ces mêmes noyaux jusque sur la troisième section parallèle à la

première. Le but est de connaître le nombre de noyaux encore présents sur cette troisième photomicrographie, donné par la différence entre le nombre de noyaux initial et le nombre de noyaux final. Ce nombre est par la suite divisé par le volume déterminé par l'épaisseur de la section d'aorte ($3 \mu\text{m}$) et l'aire de la surface analysée. Le nombre obtenu est la densité numérique exprimée en nombre de cellules/ mm^3 . En connaissant l'aire de section du tissu, la densité est multipliée par cette aire pour obtenir finalement une valeur représentant le nombre de cellules par unité de longueur. Les valeurs présentées sont une moyenne de trois calculs par aorte effectués pour un même animal.

Résultats

Publication No 1

Effect of atorvastatin and amlodipine, alone or in combination, on vascular remodeling in the spontaneously hypertensive rat.

**EFFECT OF ATORVASTATIN AND AMLODIPINE, ALONE OR IN
COMBINATION, ON VASCULAR REMODELING IN THE SPONTANEOUSLY
HYPERTENSIVE RAT**

M Doyon, TM Hale, JÉ Huot-Marchand, R Wu, J deChamplain, D deBlois¹

Short title: Atorvastatin/amlodipine in vascular remodeling

Département de pharmacologie, Université de Montréal

2900, Édouard-Montpetit

C.P. 6128 Succursale "Centre-Ville"

Montréal, Québec

H3T 1J4

¹ Author for correspondence

Tél.: (514) 343-6111 ext. 0915, Fax: (514) 343-2291

Email: denis.deblois@umontreal.ca

SUMMARY

Background and purpose

Antihypertensive drugs and cholesterol lowering agents exhibit pleiotropic effects. Amlodipine reduces aortic hypertrophy and hyperplasia in spontaneously hypertensive rat (SHR) by inducing a transient wave of apoptosis. Atorvastatin induces apoptosis of vascular smooth muscle cell (VSMC) *in vitro*, independently of cholesterol synthesis, an effect that remains to be shown *in vivo*. The present studies were designed to test the hypothesis that atorvastatin can induce vascular remodeling by VSMC apoptosis *in vivo* in SHR, and to test whether combined therapy with low dose amlodipine would provide synergistic effects on regression of aortic hypertrophy.

Experimental approach

11-week old SHR were given atorvastatin and amlodipine, alone or in combination, for three or six weeks. Primary end-points were vascular remodeling and blood pressure. Secondary end-points included DNA fragmentation and content in the aorta, oxidative stress, cholesterol and serum total nitrite and nitrate (NO_x) concentrations.

Key results

Treatment with atorvastatin did not modify vascular structure, although it significantly reduced oxidative stress after three weeks and blood pressure after six weeks. Amlodipine dose-dependently reduced blood pressure and aortic hypertrophy. Significant reduction of cellular hyperplasia was reached after 6 weeks with a low dose of amlodipine alone or after 3 weeks when atorvastatin was combined with low dose amlodipine.

Conclusions and implications

Our results do not support the notion that atorvastatin induces VSMC apoptosis *in vivo*, although the data suggest a possible interaction with amlodipine in reducing VSMC hyperplasia in the hypertensive aorta.

Keywords: Hypertension, spontaneously hypertensive rat, apoptosis, vascular remodeling, combination therapy, amlodipine, atorvastatin.

Abbreviations: SHR, spontaneously hypertensive rat; VSMC, vascular smooth muscle cell; CSA, cross-sectional area.

INTRODUCTION

Despite recent advances in drug research and development, cardiovascular disease remains a major cause of mortality in North America (Thom *et al.*, 2006). Vascular remodeling is an important feature of cardiovascular disease, including hypertension and atherosclerosis. Moreover, regression of vascular hypertrophy is now considered an important therapeutic target for the control of high blood pressure and its complications (Deblois *et al.*, 2005; Mulvany, 2008). While HMG-CoA reductase inhibitors, commonly known as statins, and calcium channel blockers (CCB) were designed to reduce cholesterol and blood pressure respectively, recent evidence has demonstrated that these agents may have additional benefits beyond their primary goals (Auer *et al.*, 2002; Laufs *et al.*, 2000; Mason, 2001; Mason *et al.*, 2005; Reddy *et al.*, 2005; Trion *et al.*, 2006; Wolfrum *et al.*, 2003; Zhou *et al.*, 2004).

Vascular remodeling is defined as a reorganisation of smooth muscle cells (SMC) around a smaller lumen (Mulvany, 1999), and can be caused by cellular hyperplasia and/or hypertrophy. Alterations in the equilibrium between apoptosis, a form of regulated cell death, and cell proliferation is thought to be responsible at least in part for this vascular remodeling. Previous work from both animal and experimental studies has demonstrated that certain antihypertensive agents, including CCB and inhibitors of the renin angiotensin system (RAS), are capable of normalizing cardiovascular structure in left ventricle and peripheral vessels by inducing a transient wave of apoptosis in the spontaneously hypertensive rat (SHR), a model of primary hypertension (Deblois *et al.*, 2005; deBlois *et*

al., 1997; Hamet *et al.*, 1996). In fact, vascular smooth muscle cell (VSMC) apoptosis by these agents is obligatory to aortic mass regression (Marchand *et al.*, 2003). Furthermore, we previously reported that *in vivo* treatment with the CCB amlodipine induces VSMC apoptosis in the aorta of SHR, leading to reduced hyperplasia and consequently, to a restructuring of the vessel in such a way that it resembles that of a normotensive animal (Duguay *et al.*, 2007).

The *in vivo* effect of statins on cell proliferation has been shown in animal models of vascular injury, in which statins limited SMC proliferation, even in normocholesterolemic animals (Gellman *et al.*, 1991; Soma *et al.*, 1993), and independently of their ability to lower cholesterol. Interestingly, recent evidence suggests that long-term treatment with statins can also modify both blood pressure and vascular structure in animal models of hypertension (Delbosc *et al.*, 2002; Jiang *et al.*, 1997). On the other hand, there is mounting evidence suggesting that some lipophilic statins induce VSMC apoptosis, although the current findings are limited to cell culture (Blanco-Colio *et al.*, 2002; Erl, 2007; Guijarro *et al.*, 1998; Xu *et al.*, 2007).

In the present study, we used the SHR as a well-defined model of VSMC apoptosis induction during antihypertensive drug-mediated vascular remodeling in order to test the hypothesis that atorvastatin can induce VSMC apoptosis *in vivo*. The apoptotic potential of atorvastatin was tested alone or in combination with amlodipine, a therapeutic regimen now

widely available to treat patients suffering from both hypertension and hypercholesterolemia

METHODS

In initial studies, both drugs were administered alone to determine their respective minimal effective dose for reducing cellular hyperplasia. Blood pressure, indices of vascular remodeling and oxidative stress were the primary end-points. To study the possible interaction between the two drugs, each of them was administered alone or in combination for three or six weeks, and the same primary end-points were analyzed.

Animal procedures

A total of 128 male SHR were purchased from Charles River Laboratories (St-Constant, Québec) and were housed for at least one week before the study began. A total of three studies were conducted. In all cases, treatment was initiated in 11-week old SHR. For *Study 1*, 24 SHR were divided into four groups ($n=6$ per group) receiving either water (vehicle) or amlodipine for three weeks in their drinking water at a dose of 2, 7 or 20 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{day}^{-1}$ per day. Another set of 30 SHR were divided into five groups ($n=6$ per group) receiving vehicle or atorvastatin (suspended in 0.5% methycellulose) for three weeks by daily oral gavage at a dose of 2, 7, 20 or 50 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{day}^{-1}$. The highest dose of atorvastatin was chosen according to previous studies by other authors revealing an effect on blood pressure, oxidative stress (Wassmann *et al.*, 2001; Wassmann *et al.*, 2002) and left ventricular hypertrophy (Chen *et al.*, 2007). *Study 2* consisted of four groups of SHR ($n=8$ per group), receiving amlodipine (7 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{day}^{-1}$), atorvastatin (50 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{day}^{-1}$) or a combination of both drugs for three weeks. The control group received regular drinking water and the vehicle. In *Study 3* ($n=12$ per group), a six-week treatment duration was employed using the same drugs and doses outlined in *Study 2*. For each study, rats were weighed every two

days and doses were adjusted accordingly. At the time of sacrifice, rats were anaesthetised with an *i.p.* injection of sodium pentobarbital ($60 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$). Blood pressure was assessed via direct cannulation of the carotid artery. Blood was collected via the carotid, and centrifuged at 2000 RPM for 20 minutes at 4°C to obtain serum for cholesterol characterisation. The abdominal aorta was excised and used to measure oxidative stress using the lucigenin-enhanced chemiluminescence assay. The thoracic aorta was isolated, measured in length and weighed. A 3 mm ring was taken between the third and the fourth intercostal arteries, formalin-fixed for 12 hours, processed according to standard histological procedures and paraffin-embedded for further histomorphometric analyses. The remaining thoracic aorta was gently swabbed to remove the endothelium and immediately snap frozen in liquid nitrogen, and stored at -80°C for future measurement of DNA fragmentation and content. The heart was isolated, the left ventricle (LV) plus septum was separated from the right ventricle, and weighed. The conduct of this protocol was performed according to the institutional guidelines.

Lipid measurements

Serum total cholesterol concentrations were determined using a fluorometric enzymatic method. The Cholesterol Assay Kit from Cayman Chemical (Ann Arbor, Michigan, United States) was used according to the manufacturer recommendations. The fluorescence was read with a SAFIRE microplate spectrophotometer using an excitation wavelength of 570 nm and an emission wavelength of 585 nm. Results are expressed in $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$.

Serum NOx concentration

The total nitrite and nitrate serum concentration was determined using the Nitric Oxide Quantitation Kit as per the manufacturer's instructions. To determine the total amount of nitrite and nitrate in the sample, total nitrate is first converted to nitrite by a nitrate reductase and then total nitrite is quantified following the addition of Griess Reagent, which transforms nitrite into a pink-coloured azo compound. The concentration of nitrite is then determined by a spectrophotometer at a wavelength of 540 nm with a reference wavelength of 620 nm. Results are given in $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$.

Determination of aortic hypertrophy and hyperplasia

Aortic cross-sectional area (CSA), an indicator of aortic hypertrophy, was determined using 3 μm -thick aortic sections stained with hematoxylin, photographed at a 40X magnification and analyzed quantitatively with the National Institutes of Health *ImageJ* software. The three-dimensional disector method was then used, as described previously (deBlois *et al.*, 1997), to measure the smooth muscle cell number per unit of length in the aorta, as an index of VSMC hyperplasia. Briefly, three consecutive 3 μm -thick aortic sections were stained with hematoxylin, and photographs were taken at a magnification of 400X.

Aortic DNA content

DNA was extracted using the phenol/chloroform method (Teiger *et al.*, 1996). A portion of powdered tissue was weighed and homogenized in a digestion solution containing pronase,

sodium dodecyl sulfate (SDS) and TNE buffer (Tris 10 mM, NaCl 150 mM and EDTA 2 mM, pH 8) and incubated overnight at 37°C. DNA was extracted with repetitive washes with phenol and chloroform and samples were incubated with RNase A and rewashed with phenol and chloroform. DNA was precipitated with ethanol and sodium chloride and resuspended in TE buffer (Tris 10 mM and EDTA 1 mM, pH 7.5). DNA concentration was evaluated with spectrophotometry at an optical density of 260 nm and DNA content was expressed as total DNA in µg per aorta.

DNA fragmentation

To evaluate DNA fragmentation in aorta homogenates, the presence of mono- and oligonucleosomes in the cytoplasmic fraction was assessed using a photometric enzyme-immunoassay with antibodies directed against DNA and histones, provided by the Cell Death Detection ELISA PLUS kit. The change in color was measured with a microplate spectrophotometer at a wavelength of 405 nm with a reference wavelength of 490 nm and then normalized to the total DNA content of each sample. Results are expressed as OD₄₀₅ normalized to DNA content of the sample.

Measurements of oxidative stress

The lucigenin-enhanced chemiluminescence assay was used to measure superoxide anion production (O₂⁻) in the abdominal aorta, as described previously (Munzel *et al.*, 1995;

Ohara *et al.*, 1993). A 2 mm ring segment was incubated in oxygenated Krebs-HEPES buffer at room temperature for 10 minutes to allow equilibration. The aortic ring was then transferred to a scintillation vial containing 250 $\mu\text{mol/L}$ of lucigenin to determine the basal superoxide level. The chemiluminescence was recorded by a liquid scintillation counter (Wallac 1409, Turku, Finland). At the end of the measurement, the fresh aortic ring was weighed. To evaluate the NAD(P)H oxidase contribution to superoxide production, aortic rings were incubated for 10 minutes at room temperature with diphenylene iodonium (DPI, 100 $\mu\text{mol/L}$), an NAD(P)H oxidase inhibitor. Basal O_2^- production was then determined using 5 $\mu\text{mol/L}$ of lucigenin. The DPI-inhibitable O_2^- production, which represents the intrinsic NAD(P)H oxidase activity, was expressed as the difference of aortic basal O_2^- production in the presence and in the absence of DPI. Superoxide production was expressed as counts $\times 10^3$ per minute $\cdot\text{mg}^{-1}$ of aortic tissue.

Drugs and reagents

Amlodipine and atorvastatin were gifts from Pfizer Canada. Pentobarbital was purchased from Bimeda-MTC, Cambridge (ON, Canada). The Cell Death Detection ELISA PLUS kit was purchased from Roche Diagnostics, (Quebec, Canada). The Nitric Oxide Quantitation Kit was from Active Motif (Carlsbad, California). All other chemicals were from Sigma-Aldrich, Oakville (ON, Canada).

Statistical analysis

Data is expressed as mean \pm S.E.M. Treatment groups were analyzed *versus* control groups with one-way analysis of variance (ANOVA) with Dunnett's multiple comparison *post*-test (GraphPad Prism, CA, United States). A *p*-value < 0.05 was considered to be a significant difference.

RESULTS

Body weight, mean arterial pressure, lipid measurement and serum NOx concentration

There was no difference in body weight between groups throughout the study period. After 3 weeks, mean arterial pressure was reduced dose-dependently with amlodipine (Figure 1 a.), but not with atorvastatin. However, atorvastatin significantly reduced blood pressure after six weeks (9% reduction *vs.* vehicle, $p<0.05$, Figure 2 b.). The effect of the combination on blood pressure was not different than the effect of amlodipine alone. The different treatments did not affect serum cholesterol concentrations or serum NOx concentrations in any group compared to control, regardless of treatment duration (Table 1).

Determination of aortic hypertrophy and hyperplasia

The aim of *Study 1* was to determine the minimal effective doses for the correction of pathological cardiovascular remodeling for each of the drugs administered alone. Amlodipine, at a dose of $7 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{day}^{-1}$ but not at $2 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{day}^{-1}$, showed a significant decrease in left ventricular hypertrophy (data not shown), aortic CSA (10% reduction *vs.* vehicle, $p<0.01$, Figure 1 b.) and a clear tendency towards decreased aortic hyperplasia (10% reduction *vs.* vehicle, Figure 1 c.). Atorvastatin did not alter any parameter of cardiovascular remodeling, even at the highest dose of $50 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{day}^{-1}$. Those results were reproduced in *Study 2* with minor differences (Table 1 and Figure 2 c. and e.). In this latter study, atorvastatin alone continued to have no effect on any parameter of cardiovascular

structure. On the other hand, the combination therapy had a significant impact on vascular hyperplasia (17% reduction *vs.* vehicle, Figure 2 e.). In *Study 3*, the continuation of amlodipine treatment for another 3 weeks permitted the correction of pathological aortic remodeling. CSA as well as VSMC number per unit of length were significantly reduced in the amlodipine group, and this effect was similar for the combination therapy (Figure 2 d. and f.). However, even after a 6-week treatment, atorvastatin did not affect any of the parameters used to evaluate cardiovascular structure.

DNA fragmentation and aortic DNA content

After 6 weeks of treatment, DNA content was reduced in the thoracic aorta of SHR of the amlodipine and combination groups (8% and 7% decrease respectively *vs.* vehicle), although statistical difference was not achieved (Figure 4 a.). Accordingly, DNA fragmentation in the aorta was higher in the amlodipine and combination groups (36% and 21% increase respectively *vs.* vehicle) but again, there was no statistical difference detected (Figure 4 b.). In the atorvastatin group, there was no difference in DNA content and DNA fragmentation when compared to control.

Oxidative stress

Superoxide production was significantly lowered in the abdominal aorta of SHR treated for three weeks with either atorvastatin (15% reduction *vs.* vehicle) or the combination (18% reduction *vs.* vehicle), but this effect was not observed in the amlodipine group (Figure 3

a.). The same results were obtained after six weeks of treatment (16% and 21% reduction vs. vehicle for atorvastatin and combination group, respectively, Figure 3 b.). DPI-inhibitable superoxide production was similar in each group after three and six weeks of treatment (Figure 3 c. and d. respectively).

DISCUSSION

The present findings do not support the hypothesis that statins can induce VSMC apoptosis *in vivo*. The SHR is a well defined model of primary hypertension in which the reversal of VSMC hyperplasia by apoptosis plays an important role in the early phase of regression of aortic hypertrophy (deBlois *et al.*, 1997; Duguay *et al.*, 2007; Marchand *et al.*, 2003). Although the administration of a high dose of atorvastatin was effective in reducing vascular oxidative stress by three weeks and high blood pressure by six weeks, it did not alter VSMC number, DNA fragmentation or DNA content in the aorta.

In contrast, amlodipine induced a dose-dependent reduction of high blood pressure and aortic hypertrophy in SHR after a three-week treatment. The minimal effective dose of amlodipine required for inducing a regression of vascular hypertrophy at three weeks was determined to be $7 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{day}^{-1}$, and was thus used in combination with the high dose of atorvastatin. Interestingly, even though atorvastatin alone did not have an impact on cellular hyperplasia, the data suggest a possible interaction when combined with low dose amlodipine in reducing VSMC hyperplasia in the hypertensive aorta. The second important finding is that a lower dose of amlodipine can, over time, result in the same extent of correction of vascular remodeling as the dose of $20 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{BW}^{-1}$ previously used to demonstrate the deletion of 25% of SMC in the aorta of SHR (Duguay *et al.*, 2007). Indeed, there is a further 7% reduction in VSMC hyperplasia when the treatment is prolonged for another three weeks, resulting in a total reduction of 22%. CSA reduction occurred after the SMC number per unit length was reduced, which is in accordance with what we have previously reported (Duguay *et al.*, 2007).

Previous reports, both from basic and clinical studies, have shown an interaction between amlodipine and atorvastatin, in terms of enhanced NO liberation (Mason *et al.*, 2005), reduced oxidative stress (Mason, 2005a), improvement of arterial wall compliance (Cohn *et al.*, 2005; Leibovitz *et al.*, 2003), better control of blood pressure (Mason, 2008) and reduced coronary heart disease (Sever *et al.*, 2006). It was suggested that this interaction could be responsible at least in part for the enhanced cardiovascular protection offered by this combination therapy (Mason, 2008). In spite of these evidence, the results of the present investigation do not support the hypothesis of an interaction between amlodipine and atorvastatin regarding regression of vascular hypertrophy, oxidative stress or serum NOx concentrations.

While the present data suggest that atorvastatin treatment does not induce apoptosis *in vivo*, there is evidence that this agent is effective *in vitro*. Lipophilic statins induce apoptosis in rat and human VSMC (Blanco-Colio *et al.*, 2002; Guijarro *et al.*, 1999; Guijarro *et al.*, 1998), as well as in neointima-derived VSMC (Erl *et al.*, 2003). It was suggested that this effect is mediated by protein prenylation inhibition. Induction of apoptosis by statins is reversed by the addition of exogenous mevalonate, showing that it is independent of the inhibition of cholesterol synthesis. More recently, the downregulation of survivin expression has emerged as a new possible mechanism for apoptosis induction by atorvastatin (Xu *et al.*, 2007). The discrepancy between the *in vitro* and *in vivo* observations may be due to the change from a contractile to a synthetic phenotype known to occur when

VSMC adapt to cell culture conditions. As previously discussed, the stimulation of cell growth may increase VSMC susceptibility to undergo apoptosis (Deblois *et al.*, 2005).

Our results are consistent with other reports describing pleiotropic effects of atorvastatin, including the reduction of oxidative stress and blood pressure. Proposed mechanisms for oxidative stress reduction include decreased expression of vascular angiotensin II type 1 (AT1) receptor (Ichiki *et al.*, 2001; Wassmann *et al.*, 2001), decreased translocation to the cell membrane and activation of the small GTPase rac1, a key component of NAD(P)H oxidase complex (Wassmann *et al.*, 2002) and reduced expression of NAD(P)H oxidase subunits (Mason *et al.*, 2005). Furthermore, it was reported that atorvastatin enhances catalase expression (Wassmann *et al.*, 2002) and potentiates tetrahydrobiopterin (BH₄) synthesis in rat VSMC *in vitro* (Hattori *et al.*, 2002), contributing to its anti-oxidative properties. In accordance with these reports, we showed atorvastatin treatment reduced oxidative stress in the abdominal aorta after three weeks. No additional effect was seen when amlodipine was added to the regimen, despite previous reports attributing anti-oxidative properties to this calcium channel blocker (Mason, 2005b). Interestingly, the contribution of the NAD(P)H oxidase to the O₂⁻ production was not different between experimental groups, as demonstrated by the DPI-inhibitable O₂⁻ production. Alternative mechanisms that may account for the significant differences in O₂⁻ production between experimental groups include uncoupled eNOS, xanthine oxidase and the mitochondrial respiratory chain. Indeed, xanthine oxidase is upregulated in SHR microvasculature (Suzuki

et al., 1998). The significant blood pressure reduction after six weeks in the atorvastatin group could have resulted from prolonged reduction in oxidative stress, combined with the promotion of endothelial NO synthesis, both of which could improve endothelial function and consequently, reduce peripheral vascular resistance. This blood-pressure lowering effect of statins is also observed clinically in hypertensive patients with or without concomitant hyperlipidemia (Abetel *et al.*, 1998; Borghi *et al.*, 2002; Ferrier *et al.*, 2002; Glorioso *et al.*, 1999).

The impact of atorvastatin on the reduction of superoxide production and blood pressure appear to be independent of cholesterol synthesis, since no modification in serum cholesterol concentration was detected between treated and control SHR. This lack of effect on cholesterol levels may reflect the fact that SHR have low cholesterol levels (Kitts *et al.*, 1998; Yuan *et al.*, 1996). Importantly, the significant reduction in superoxide production confirms drug delivery and activity.

We have shown previously that improvement of endothelial function by supplementation of L-Arginine and BH₄ in SHR facilitates the induction of VSMC apoptosis and regression of vascular hypertrophy (Der Sarkissian *et al.*, 2004). Although physiologically small, the added benefit provided by atorvastatin in amlodipine-treated rats was statistically significant in terms of VSMC hyperplasia reduction. This response to combined therapy may reflect a more rapid reduction of oxidative stress and improved correction of

endothelial dysfunction in the first three weeks of treatment. Consistent with this interpretation, the added benefit of combined therapy was no longer apparent after 6 weeks, at a time when full regression of vascular hyperplasia and hypertrophy is observed in animals treated with amlodipine alone.

Up to this point, *in vivo* studies with statins have focused on changes in left ventricular rather than aortic hypertrophy. In these studies, 8 weeks of atorvastatin normalized the LVH in nine and eight-week old SHR (Kang *et al.*, 2007; Lee *et al.*, 2005), a result associated with a decreased expression of connexin43 (Chen *et al.*, 2007). The impact of this treatment on cellular hyperplasia however was not tested directly.

In this study, we show that atorvastatin was not able to induce VSMC apoptosis and subsequent regression of vascular hypertrophy in the adult SHR. The data suggest a possible interaction with amlodipine in reducing VSMC hyperplasia in the hypertensive aorta. The role of apoptosis in the ability of statins to limit neointima thickening has yet to be investigated. Also, it is not known whether this agent would be effective in inducing a regression of an established intimal lesion in the injured vascular wall. Further studies are required to determine the nature and mechanisms of any additional benefits afforded by combined atorvastatin/amlodipine therapy on target organs in hypertension.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by a grant from the Canadian Cardiovascular Research Award by Pfizer Canada. TM Hale was supported by a post-doctoral fellowship from the Heart & Stroke Foundation of Canada, and J-É Huot-Marchand was supported by a Canadian Institutes of Health Research doctoral research award.

STATEMENT OF CONFLICTS OF INTEREST

None

REFERENCES

Abetel, G, Poget, PN, Bonnabry, JP (1998). [Hypotensive effect of an inhibitor of cholesterol synthesis (fluvastatin). A pilot study]. *Schweiz Med Wochenschr* **128**: 272-7.

Auer, J, Berent, R, Weber, T, Eber, B (2002). Clinical significance of pleiotropic effects of statins: lipid reduction and beyond. *Curr Med Chem* **9**: 1831-50.

Blanco-Colio, LM, Villa, A, Ortego, M, Hernandez-Presa, MA, Pascual, A, Plaza, JJ, Egido, J (2002). 3-Hydroxy-3-methyl-glutaryl coenzyme A reductase inhibitors, atorvastatin and simvastatin, induce apoptosis of vascular smooth muscle cells by downregulation of Bcl-2 expression and Rho A prenylation. *Atherosclerosis* **161**: 17-26.

Borghi, C, Dormi, A, Veronesi, M, Immordino, V, Ambrosioni, E (2002). Use of lipid-lowering drugs and blood pressure control in patients with arterial hypertension. *J Clin Hypertens (Greenwich)* **4**: 277-85.

Chen, HJ, Yao, L, Chen, TG, Yu, M, Wang, LH, Chen, JZ (2007). Atorvastatin prevents connexin43 remodeling in hypertrophied left ventricular myocardium of spontaneously hypertensive rats. *Chin Med J (Engl)* **120**: 1902-7.

Cohn, J, Neutel, J, Houston, H (2005). Early improvements in vascular compliance following coadministration of amlodipine and atorvastatin in patients with concomitant hypertension and dyslipidemia: the Avalon Arterial Wall Compliance (AWC) trial. 2005, ASoHtSMM- (ed): San Francisco.

Deblois, D, Tea, BS, Beaudry, D, Hamet, P (2005). Regulation of therapeutic apoptosis: a potential target in controlling hypertensive organ damage. *Can J Physiol Pharmacol* **83**: 29-41.

deBlois, D, Tea, BS, Than, VD, Tremblay, J, Hamet, P (1997). Smooth muscle apoptosis during vascular regression in spontaneously hypertensive rats. *Hypertension* **29**: 340-9.

Delbosc, S, Cristol, JP, Descomps, B, Mimran, A, Jover, B (2002). Simvastatin prevents angiotensin II-induced cardiac alteration and oxidative stress. *Hypertension* **40**: 142-7.

Der Sarkissian, S, Marchand, EL, Duguay, D, deBlois, D (2004). Synergistic interaction between enalapril, L-arginine and tetrahydrobiopterin in smooth muscle cell apoptosis and aortic remodeling induction in SHR. *Br J Pharmacol* **142**: 912-8.

Duguay, D, deBlois, D (2007). Differential regulation of Akt, caspases and MAP kinases underlies smooth muscle cell apoptosis during aortic remodelling in SHR treated with amlodipine. *Br J Pharmacol* **151**: 1315-23.

- Erl, W (2007). Atorvastatin-induced downregulation of survivin and vascular smooth muscle cell apoptosis: a causal relationship in restenosis? *Cardiovasc Drugs Ther* **21**: 141-4.
- Erl, W, Hristov, M, Neureuter, M, Yan, ZQ, Hansson, GK, Weber, PC (2003). HMG-CoA reductase inhibitors induce apoptosis in neointima-derived vascular smooth muscle cells. *Atherosclerosis* **169**: 251-8.
- Ferrier, KE, Muhlmann, MH, Baguet, JP, Cameron, JD, Jennings, GL, Dart, AM, Kingwell, BA (2002). Intensive cholesterol reduction lowers blood pressure and large artery stiffness in isolated systolic hypertension. *J Am Coll Cardiol* **39**: 1020-5.
- Gellman, J, Ezekowitz, MD, Sarembock, IJ, Azrin, MA, Nochomowitz, LE, Lerner, E, Haudenschild, CC (1991). Effect of lovastatin on intimal hyperplasia after balloon angioplasty: a study in an atherosclerotic hypercholesterolemic rabbit. *J Am Coll Cardiol* **17**: 251-9.
- Glorioso, N, Troffa, C, Filigheddu, F, Dettori, F, Soro, A, Parpaglia, PP, Collatina, S, Pahor, M (1999). Effect of the HMG-CoA reductase inhibitors on blood pressure in patients with essential hypertension and primary hypercholesterolemia. *Hypertension* **34**: 1281-6.
- Guijarro, C, Blanco-Colio, LM, Massy, ZA, O'Donnell, MP, Kasiske, BL, Keane, WF, Egido, J (1999). Lipophilic statins induce apoptosis of human vascular smooth muscle cells. *Kidney Int Suppl* **71**: S88-91.
- Guijarro, C, Blanco-Colio, LM, Ortego, M, Alonso, C, Ortiz, A, Plaza, JJ, Diaz, C, Hernandez, G, Egido, J (1998). 3-Hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme a reductase and isoprenylation inhibitors induce apoptosis of vascular smooth muscle cells in culture. *Circ Res* **83**: 490-500.
- Hamet, P, deBlois, D, Dam, TV, Richard, L, Teiger, E, Tea, BS, Orlov, SN, Tremblay, J (1996). Apoptosis and vascular wall remodeling in hypertension. *Can J Physiol Pharmacol* **74**: 850-61.
- Hattori, Y, Nakanishi, N, Kasai, K (2002). Statin enhances cytokine-mediated induction of nitric oxide synthesis in vascular smooth muscle cells. *Cardiovasc Res* **54**: 649-58.
- Ichiki, T, Takeda, K, Tokunou, T, Iino, N, Egashira, K, Shimokawa, H, Hirano, K, Kanaide, H, Takeshita, A (2001). Downregulation of angiotensin II type 1 receptor by hydrophobic 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase inhibitors in vascular smooth muscle cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **21**: 1896-901.

- Jiang, J, Roman, RJ (1997). Lovastatin prevents development of hypertension in spontaneously hypertensive rats. *Hypertension* **30**: 968-74.
- Kang, L, Ge, CJ, Hu, SJ (2007). Beneficial effect of atorvastatin on left ventricular remodeling in spontaneously hypertensive rats. *Pharmacology* **80**: 120-6.
- Kitts, DD, Yuan, YV, Godin, DV (1998). Plasma and lipoprotein lipid composition and hepatic antioxidant status in spontaneously hypertensive (SHR) and normotensive (WKY) rats. *Can J Physiol Pharmacol* **76**: 202-9.
- Laufs, U, Liao, JK (2000). Direct vascular effects of HMG-CoA reductase inhibitors. *Trends Cardiovasc Med* **10**: 143-8.
- Lee, TM, Lin, MS, Chou, TF, Tsai, CH, Chang, NC (2005). Effect of pravastatin on development of left ventricular hypertrophy in spontaneously hypertensive rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **289**: H220-7.
- Leibovitz, E, Beniashvili, M, Zimlichman, R, Freiman, A, Shargorodsky, M, Gavish, D (2003). Treatment with amlodipine and atorvastatin have additive effect in improvement of arterial compliance in hypertensive hyperlipidemic patients. *Am J Hypertens* **16**: 715-8.
- Marchand, EL, Der Sarkissian, S, Hamet, P, deBlois, D (2003). Caspase-dependent cell death mediates the early phase of aortic hypertrophy regression in losartan-treated spontaneously hypertensive rats. *Circ Res* **92**: 777-84.
- Mason, RP (2005a). A rationale for combination therapy in risk factor management: a mechanistic perspective. *Am J Med* **118 Suppl 12A**: 54-61.
- Mason, RP (2005b). A rationale for combined therapy with a calcium channel blocker and a statin: evaluation of basic and clinical evidence. *Curr Drug Targets Cardiovasc Haematol Disord* **5**: 489-501.
- Mason, RP (2001). Mechanisms of atherosclerotic plaque stabilization for a lipophilic calcium antagonist amlodipine. *Am J Cardiol* **88**: 2M-6M.
- Mason, RP (2008). Scientific rationale for combination of a calcium channel antagonist and an HMG-CoA reductase inhibitor: a new approach to risk factor management. *Drugs* **68**: 885-900.
- Mason, RP, Walter, MF, Day, CA, Jacob, RF (2005). Intermolecular differences of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme a reductase inhibitors contribute to distinct pharmacologic and pleiotropic actions. *Am J Cardiol* **96**: 11F-23F.

Mulvany, MJ (2008). Small artery remodelling in hypertension: causes, consequences and therapeutic implications. *Med Biol Eng Comput*.

Mulvany, MJ (1999). Vascular remodelling of resistance vessels: can we define this? *Cardiovasc Res* **41**: 9-13.

Munzel, T, Sayegh, H, Freeman, BA, Tarpey, MM, Harrison, DG (1995). Evidence for enhanced vascular superoxide anion production in nitrate tolerance. A novel mechanism underlying tolerance and cross-tolerance. *J Clin Invest* **95**: 187-94.

Ohara, Y, Peterson, TE, Harrison, DG (1993). Hypercholesterolemia increases endothelial superoxide anion production. *J Clin Invest* **91**: 2546-51.

Reddy, R, Chahoud, G, Mehta, JL (2005). Modulation of cardiovascular remodeling with statins: fact or fiction? *Curr Vasc Pharmacol* **3**: 69-79.

Sever, P, Dahlof, B, Poulter, N, Wedel, H, Beevers, G, Caulfield, M, Collins, R, Kjeldsen, S, Kristinsson, A, McInnes, G, Mehlsen, J, Nieminen, M, O'Brien, E, Ostergren, J (2006). Potential synergy between lipid-lowering and blood-pressure-lowering in the Anglo-Scandinavian Cardiac Outcomes Trial. *Eur Heart J* **27**: 2982-8.

Soma, MR, Donetti, E, Parolini, C, Mazzini, G, Ferrari, C, Fumagalli, R, Paoletti, R (1993). HMG CoA reductase inhibitors. In vivo effects on carotid intimal thickening in normocholesterolemic rabbits. *Arterioscler Thromb* **13**: 571-8.

Suzuki, H, DeLano, FA, Parks, DA, Jamshidi, N, Granger, DN, Ishii, H, Suematsu, M, Zweifach, BW, Schmid-Schonbein, GW (1998). Xanthine oxidase activity associated with arterial blood pressure in spontaneously hypertensive rats. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**: 4754-9.

Teiger, E, Than, VD, Richard, L, Wisnewsky, C, Tea, BS, Gaboury, L, Tremblay, J, Schwartz, K, Hamet, P (1996). Apoptosis in pressure overload-induced heart hypertrophy in the rat. *J Clin Invest* **97**: 2891-7.

Thom, T, Haase, N, Rosamond, W, Howard, VJ, Rumsfeld, J, Manolio, T, Zheng, ZJ, Flegal, K, O'Donnell, C, Kittner, S, Lloyd-Jones, D, Goff, DC, Jr., Hong, Y, Adams, R, Friday, G, Furie, K, Gorelick, P, Kissela, B, Marler, J, Meigs, J, Roger, V, Sidney, S, Sorlie, P, Steinberger, J, Wasserthiel-Smoller, S, Wilson, M, Wolf, P (2006). Heart disease and stroke statistics--2006 update: a report from the American Heart Association Statistics Committee and Stroke Statistics Subcommittee. *Circulation* **113**: e85-151.

Trion, A, de Maat, M, Jukema, W, Maas, A, Offerman, E, Havekes, L, Szalai, A, van der Laarse, A, Princen, H, Emeis, J (2006). Anti-atherosclerotic effect of amlodipine, alone and in combination with atorvastatin, in APOE*3-Leiden/hCRP transgenic mice. *J Cardiovasc Pharmacol* **47**: 89-95.

Wassmann, S, Laufs, U, Baumer, AT, Muller, K, Ahlbory, K, Linz, W, Itter, G, Rosen, R, Bohm, M, Nickenig, G (2001). HMG-CoA reductase inhibitors improve endothelial dysfunction in normocholesterolemic hypertension via reduced production of reactive oxygen species. *Hypertension* **37**: 1450-7.

Wassmann, S, Laufs, U, Muller, K, Konkol, C, Ahlbory, K, Baumer, AT, Linz, W, Bohm, M, Nickenig, G (2002). Cellular antioxidant effects of atorvastatin in vitro and in vivo. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **22**: 300-5.

Wolfrum, S, Jensen, KS, Liao, JK (2003). Endothelium-dependent effects of statins. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **23**: 729-36.

Xu, YG, Zhou, SH, Li, YG, Zheng, CH, Li, XP, Liu, QM, Xu, DM, Chen, S (2007). The mechanism underlying vascular smooth muscle cell apoptosis induced by atorvastatin may be mainly associated with down-regulation of survivin expression. *Cardiovasc Drugs Ther* **21**: 145-53.

Yuan, YV, Kitts, DD, Godin, DV (1996). Heart and red blood cell antioxidant status and plasma lipid levels in the spontaneously hypertensive and normotensive Wistar-Kyoto rat. *Can J Physiol Pharmacol* **74**: 290-7.

Zhou, MS, Jaimes, EA, Raij, L (2004). Atorvastatin prevents end-organ injury in salt-sensitive hypertension: role of eNOS and oxidant stress. *Hypertension* **44**: 186-90.

Table 1. Lipid profile and serum NOx concentrations following treatment with atorvastatin and amlodipine, alone or in combination, for 3 or 6 weeks

Groups	NOx concentration ($\mu\text{mol.L}^{-1}$)	Total cholesterol (mmol.L^{-1})
3-week treatment		
Vehicle	5.09 \pm 0.16	
Amlodipine 7	6.47 \pm 0.64	
Combination	5.76 \pm 0.63	
Atorvastatin 50	5.88 \pm 0.43	
6-week treatment		
Vehicle	3.24 \pm 0.29	2.51 \pm 0.09
Amlodipine 7	3.33 \pm 0.32	2.93 \pm 0.15
Combination	3.07 \pm 0.19	2.44 \pm 0.13
Atorvastatin 50	3.33 \pm 0.26	2.60 \pm 0.16

Values are mean \pm SEM

Table 2. Cardiac hypertrophy indices following treatment with atorvastatin and amlodipine, alone or in combination, for 3 or 6 weeks

Groups	Left ventricular hypertrophy index (mg.g ⁻¹)	Right ventricular hypertrophy index (mg.g ⁻¹)
3-week treatment		
Vehicle	2.71 ± 0.02	0.620 ± 0.024
Amlodipine 7	2.55 ± 0.02 **	0.643 ± 0.021
Combination	2.55 ± 0.03 **	0.638 ± 0.014
Atorvastatin 50	2.69 ± 0.04	0.632 ± 0.011
6-week treatment		
Vehicle	2.76 ± 0.03	0.632 ± 0.013
Amlodipine 7	2.64 ± 0.02 *	0.641 ± 0.011
Combination	2.61 ± 0.04 **	0.662 ± 0.012
Atorvastatin 50	2.76 ± 0.03	0.641 ± 0.017

Values are mean ± SEM

* Significantly different from vehicle group (P<0.05), ** (P<0.01)

Figure 1

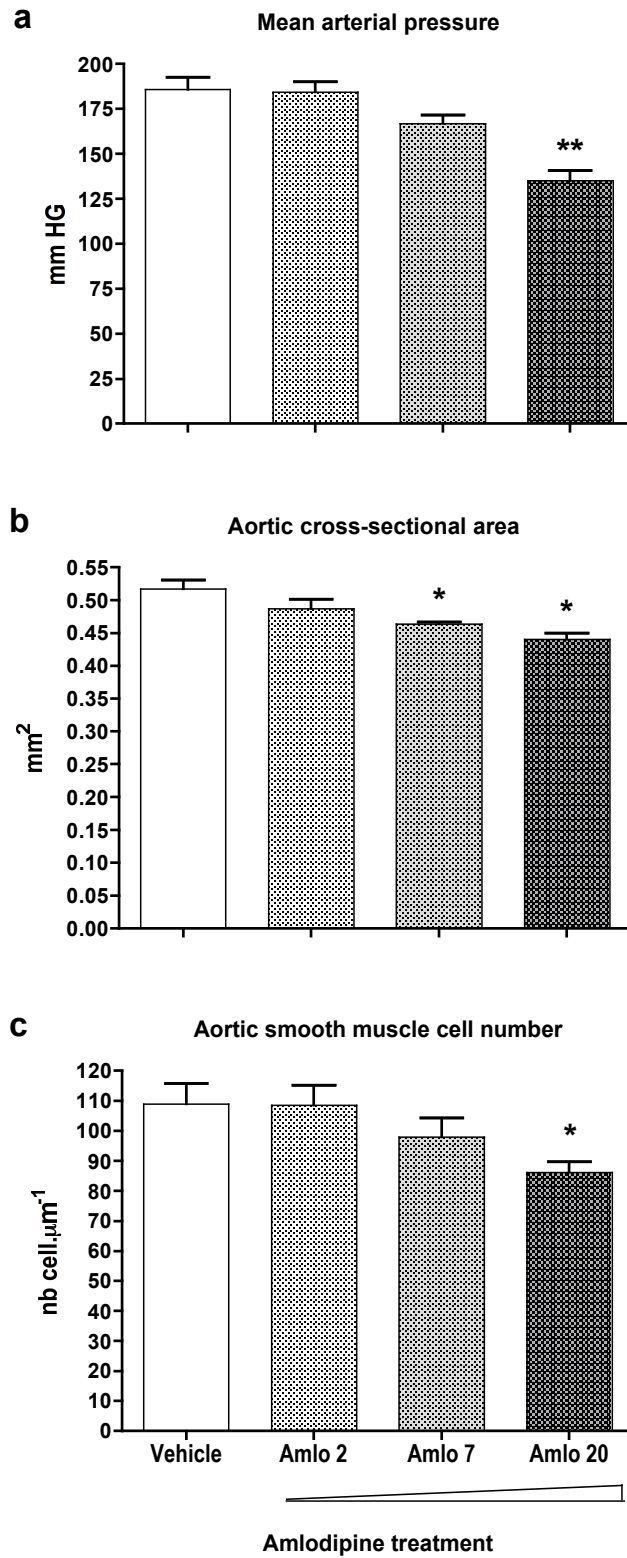


Figure 2

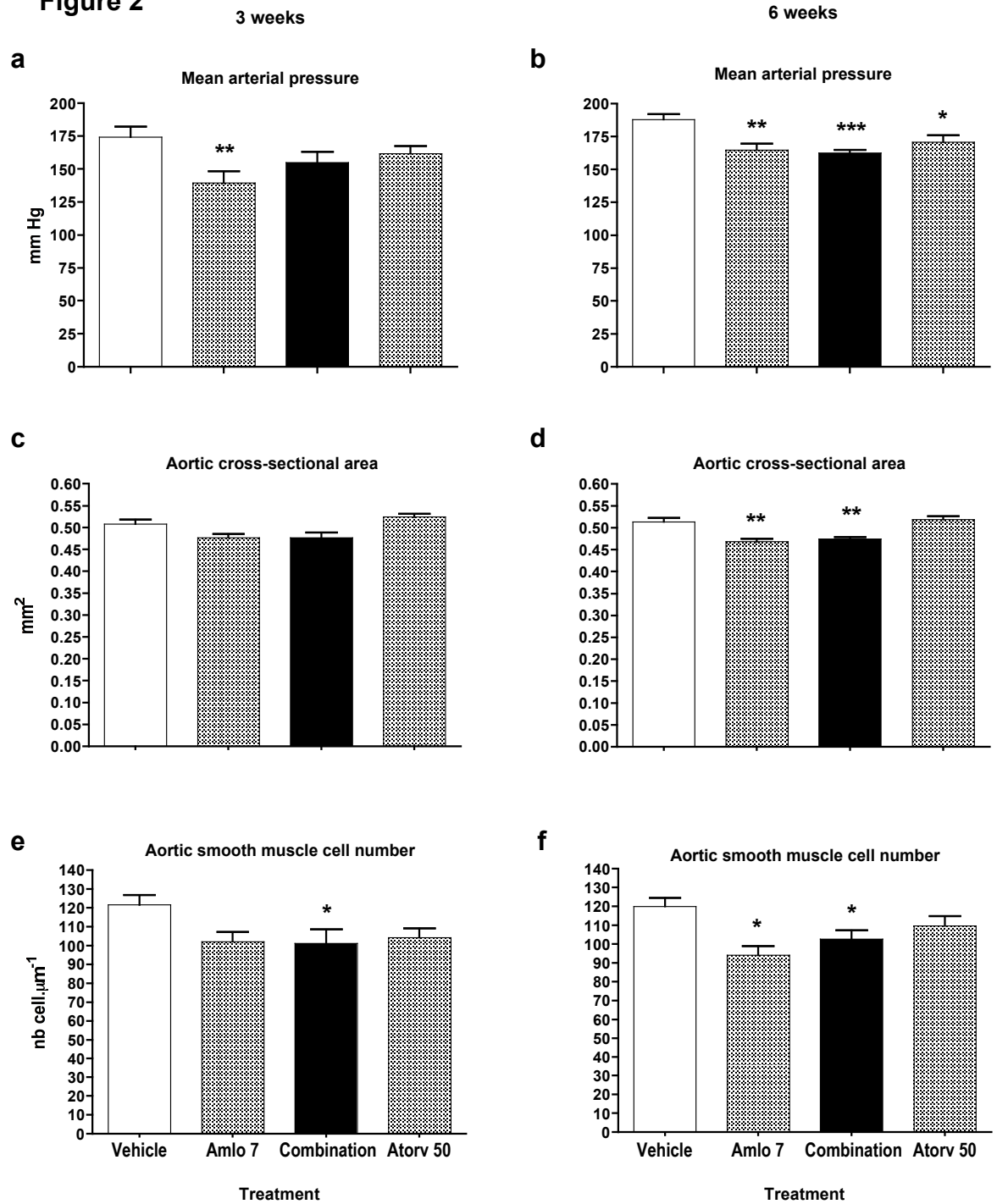


Figure 3

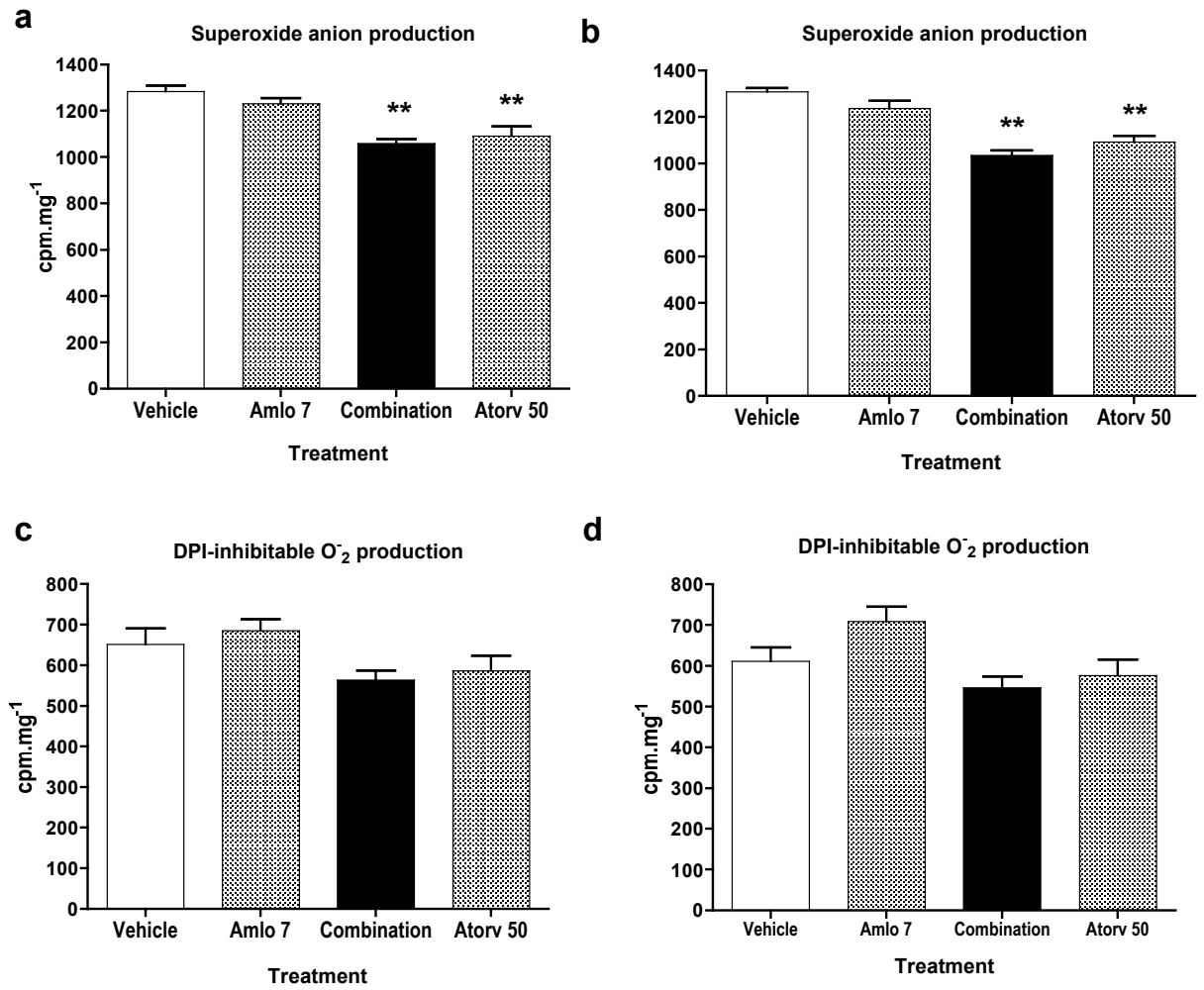


Figure 4

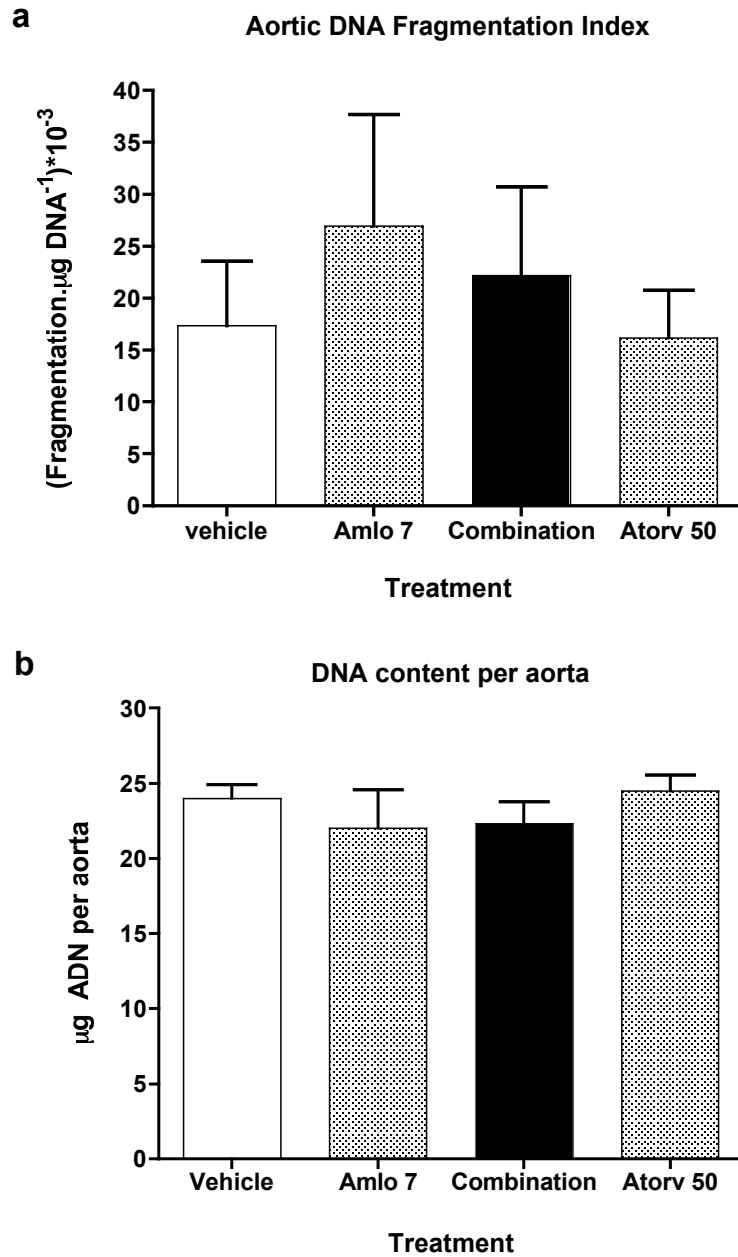


Figure 1: Determination of the minimal effective dose of amlodipine for inducing blood pressure lowering and regression of vascular hypertrophy in SHR treated for three weeks. This dose was determined as $7 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{jour}^{-1}$. **a.** Mean arterial pressure **b.** aortic cross-sectional area, indicative of aortic hypertrophy **c.** aortic smooth muscle cell number, an index of aortic hyperplasia. Each of these parameters was reduced dose-dependently. Data are expressed as mean \pm SEM. * Significantly different ($p < 0.05$) from vehicle group, ** $p < 0.01$. $n= 6$ per group.

Figure 2: Effect of amlodipine and atorvastatin, alone or in combination, on mean arterial pressure (**a.** and **b.**), aortic cross-sectional area (**c.** and **d.**) and aortic smooth muscle cell number (**e.** and **f.**) in SHR treated for three weeks (**a.** **c.** and **e.**) or six weeks (**b.** **d.** and **f.**). Data are expressed as mean \pm SEM. * Significantly different ($p < 0.05$) from vehicle group, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$. $n= 6-12$ per group.

Figure 3: Effect of atorvastatin and amlodipine, alone or in combination, on superoxide anion production, evaluated by the lucigenin-enhanced chemiluminescence assay (**a.** and **b.**) and DPI-inhibitable NAD(P)H oxidase contribution to superoxide anion production (**c.** and **d.**) in SHR treated for three weeks (**a.** and **c.**) or six weeks (**b.** and **d.**). ** Significantly different ($p < 0.01$) from vehicle group. $n= 12$ per group.

Figure 4: Effect of amlodipine and atorvastatin, alone or in combination, on **a.** aortic DNA fragmentation index and on **b.** aortic DNA content per aorta, in SHR treated for six weeks. $n= 10$ per group.

Résultats additionnels

Pression pulsée

Chez les SHR traités avec la combinaison amlodipine/atorvastatine pendant six semaines, une réduction significative de la pression pulsée a été observée. Les valeurs de pressions pulsées sont obtenues lors de la canulation directe de la carotide, en faisant la différence entre la pression systolique et la pression diastolique. Alors que l'amlodipine a réduit de 21.4% la pression pulsée, ce pourcentage s'élève à 32.7% de réduction avec la combinaison (Figure 5). Aucune modification n'a été détectée pour l'atorvastatine seule. Chez les SHR traités pendant seulement trois semaines, aucune tendance ne s'était révélée, les résultats pour chacun des groupes étant similaires au groupe témoin.

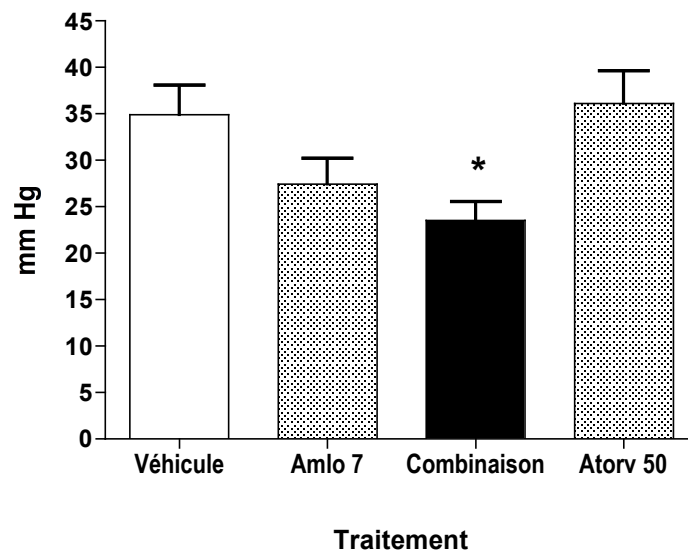


Figure 5: Pression pulsée chez les SHR traités avec l'amlodipine et l'atorvastatine, seule ou en combinaison, pendant six semaines. Valeurs exprimées selon moyenne \pm SEM. * $p < 0.05$ vs. témoins.

Vasorelaxation à un donneur de NO

La sensibilité du muscle lisse aortique a été évaluée dans des bains à organes isolés, avec un donneur de NO, le SNP. La vasorelaxation des aortes obtenue en réponse au SNP indique que les aortes de SHR traités avec la combinaison pendant trois semaines ont été en mesure de relaxer davantage que chacun des médicaments seul (Figure 6).

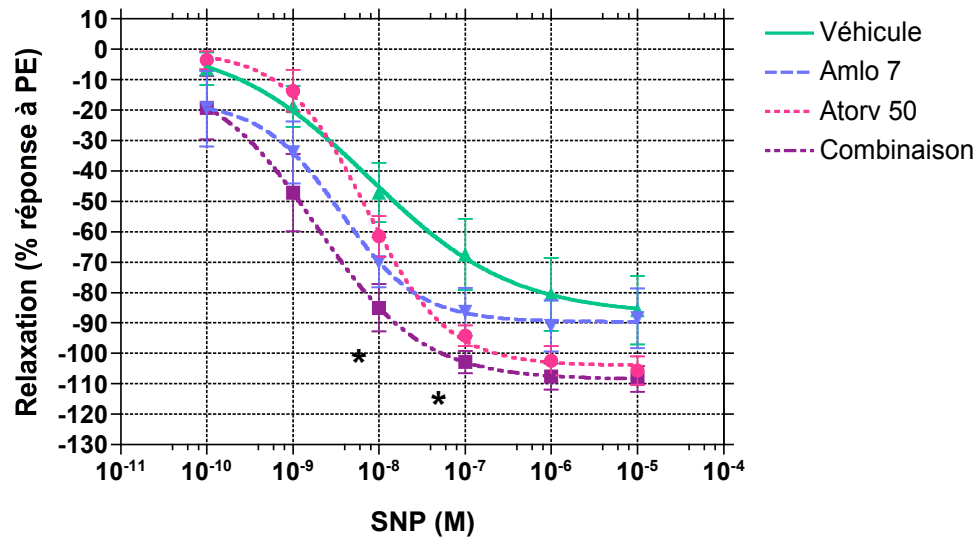


Figure 6: Vasorelaxation en présence d'un donneur de NO chez les SHR traités avec l'amlodipine et l'atorvastatine, seule ou en combinaison, pendant trois semaines. Valeurs exprimées selon moyenne \pm SEM. * $p < 0.05$ vs. témoins. $n=8$

Fonction endothéliale

Les résultats de la fonction endothéliale sont présentés ici pour le cas des SHR traités pendant six semaines. Aucune différence significative n'a pu être observée quant à la vasodilatation induite par l'acétylcholine chez aucun des groupes traités comparativement au groupe témoin (Figure 7).

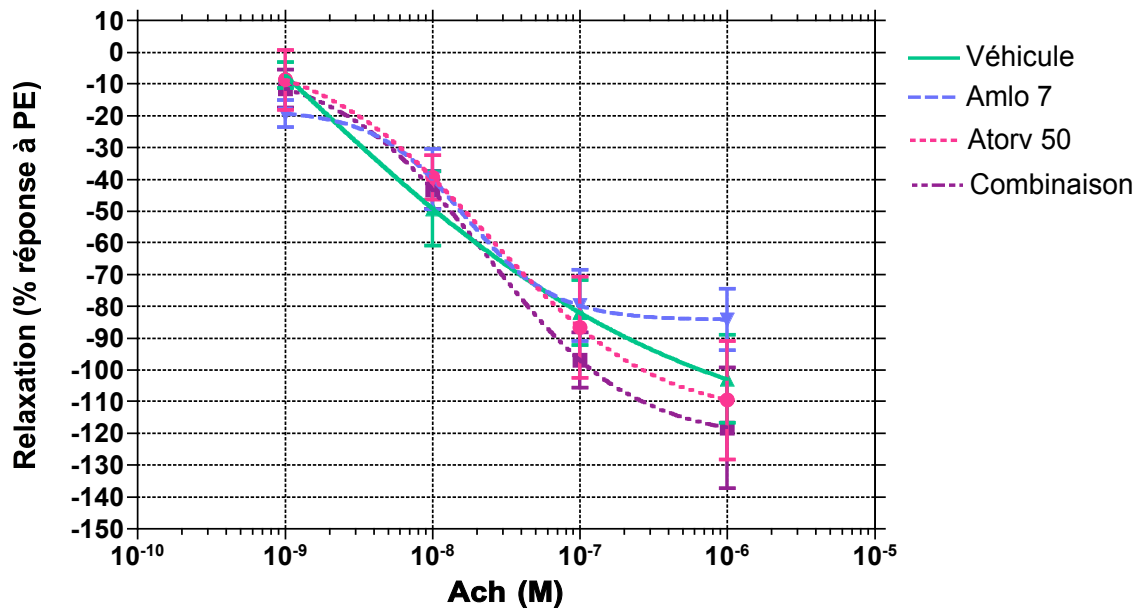


Figure 7: Fonction endothéliale chez les SHR traités avec l'amlopidine et l'atorvastatine, seule ou en combinaison, pendant six semaines. Valeurs exprimées selon moyenne \pm SEM. * $p < 0.05$ vs. témoins. $n = 12$

Expression de p21^{Waf1/Cip1}

L'expression de la protéine p21^{Waf1/Cip1} a été évaluée par immunobuvardage de type *Western*. Aucune différence n'a pu être détectée chez les SHR traités avec l'atorvastatine 50 mg·kg⁻¹·jour⁻¹ pendant trois semaines comparativement au groupe témoin (Figure 8).

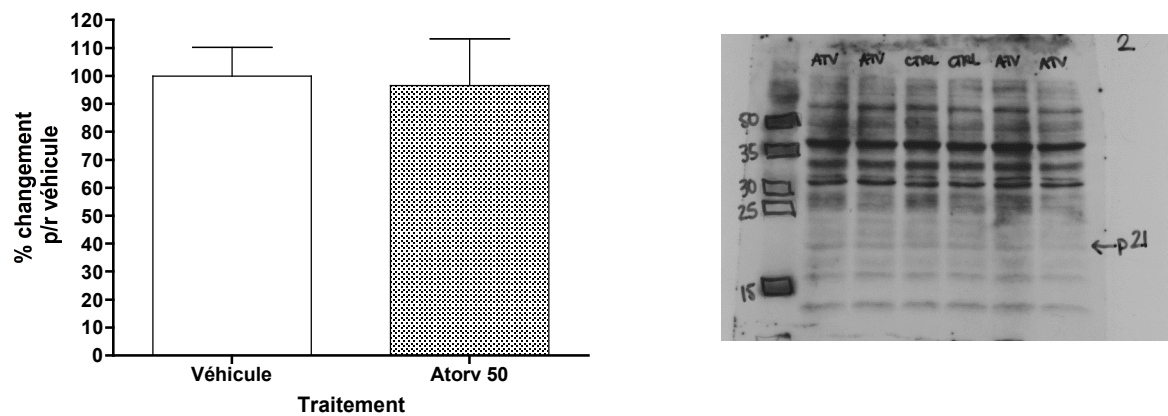


Figure 8: Niveau d'expression de p21^{Waf1/Cip1} dans les aortes de SHR traités avec l'atorvastatine pendant trois semaines. Valeurs exprimées selon moyenne \pm SEM. $n=5$

Expression de Akt

Le ratio de l'expression de Akt phosphorylé sur la forme totale de Akt a été évalué afin d'obtenir un indice de l'activité de Akt. En effet, l'augmentation de l'activité de Akt a été associée avec l'induction de l'apoptose des CMLV par l'amlodipine. Toutefois, dans le cas de l'atorvastatine, aucune différence n'a pu être détecté lorsque les SHR ont été traités pendant trois semaines, pas plus que pour l'amlodipine ou la combinaison (Figure 9).

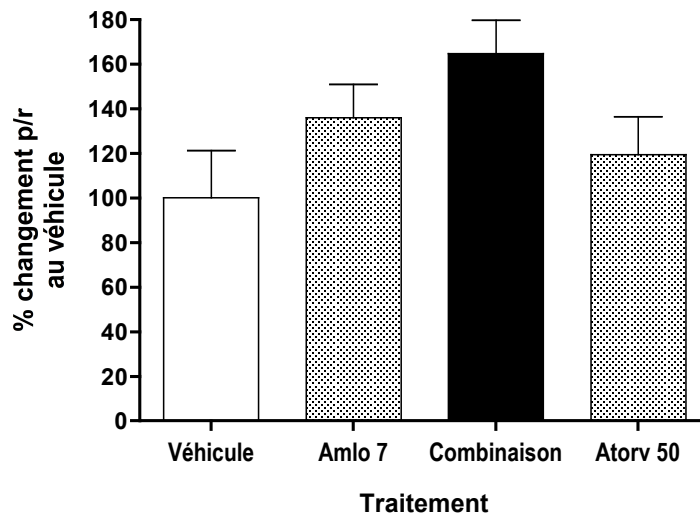


Figure 9: Ratio de l'expression de Akt phosphorylée sur la forme totale de Akt dans les aortes de SHR traités avec l'amlodipine ou l'atorvastatine, seule ou en combinaison, pendant trois semaines. Valeurs exprimées selon moyenne \pm SEM.

n=6

Expression de eNOS

Le ratio de l'expression de eNOS phosphorylée sur la forme totale de eNOS a été évalué afin d'obtenir un indice de l'activité de eNOS. Seulement la dose de 20 mg·kg⁻¹·jour⁻¹ d'atorvastatine a augmenté de façon significative l'activité de eNOS comparativement au groupe témoin (Figure 10).

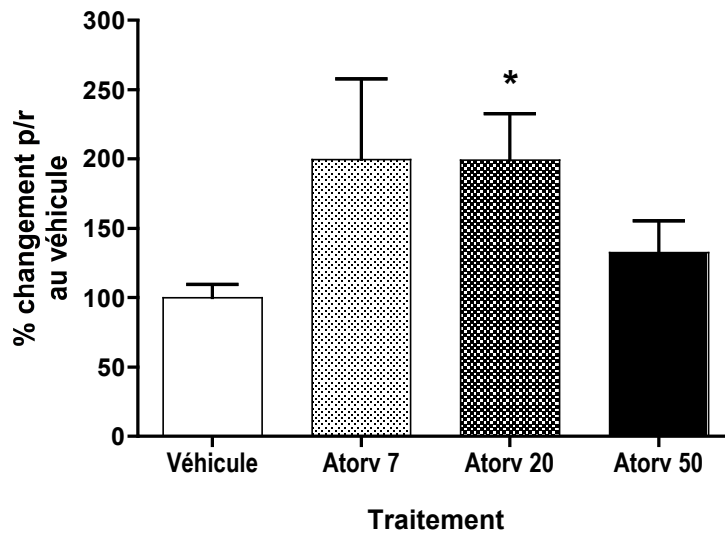


Figure 10: Ratio de l'expression de eNOS phosphorylée sur la forme totale de eNOS dans les crosses aortiques de SHR traités avec l'atorvastatine pendant trois semaines. Valeurs exprimées selon moyenne \pm SEM. * $p < 0.05$ vs. témoins. $n = 6-8$

Discussion

Cette section comporte une discussion générale portant principalement sur les résultats qui n'ont pas été discutés préalablement dans le cadre de la publication.

Hyperplasie aortique

Atorvastatine

Le premier objectif de cette étude était de vérifier la capacité de l'atorvastatine à induire l'apoptose des CMLV *in vivo*. Pour ce faire, le modèle du SHR a été choisi, puisque c'est un modèle d'hypertension primaire dont les caractéristiques reliées à l'induction de l'apoptose menant à la réduction de l'hyperplasie et l'hypertrophie aortiques sont très bien définies. Les résultats obtenus démontrent que dans ce modèle, l'atorvastatine n'a pas été en mesure d'induire l'apoptose des CMLV, et ce, malgré une durée de traitement prolongée et une dose élevée de médicament, soit $50 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{jour}^{-1}$ pendant 6 semaines. En effet, aucune régression significative de l'hyperplasie et de l'hypertrophie aortique n'a pu être observée (Figure 2, e et f), ni de diminution du contenu en ADN de l'aorte ou d'augmentation de l'index de fragmentation de l'ADN dans ces mêmes aortes lors de l'administration de l'atorvastatine (Figure 4). Les résultats ne supportent donc pas l'hypothèse de départ quant à l'induction de l'apoptose *in vivo* par l'atorvastatine.

Amlodipine

D'autre part, afin d'être en mesure d'étudier l'interaction possible entre l'amlodipine et l'atorvastatine, la détermination de la dose minimale efficace induisant une réduction de l'hyperplasie des CMLV aortiques par l'amlodipine après trois semaines de traitement était nécessaire. L'utilisation d'une dose trop élevée d'amlodipine combinée à l'atorvastatine risquait de camoufler cette interaction. La dose d'amlodipine utilisée dans les études précédentes effectuées dans notre laboratoire pour démontrer la régression de l'hyperplasie

aortique suite à l'induction d'une vague d'apoptose transitoire est de $20 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{jour}^{-1}$ ¹¹³. Nous avons donc utilisé les doses de 2 et de $7 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{jour}^{-1}$ tout en incluant celle de $20 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{jour}^{-1}$, afin d'être en présence d'un contrôle positif pour la réduction de l'hyperplasie. Les résultats démontrent que la diminution de la pression artérielle et la réduction de l'hyperthrophie et de l'hyperplasie aortique se font de façon dépendante de la dose avec l'amlodipine (Figure 1). La dose minimale efficace a donc été fixée à $7 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{jour}^{-1}$. À cette faible dose d'amlodipine administrée pendant 3 semaines, la réduction de l'hyperplasie aortique est de 15% comparativement à une délétion de ~25% de CMLV avec la dose de $20 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{jour}^{-1}$. D'autre part, la prolongation du traitement pour trois semaines supplémentaires, pour un total de six semaines, a permis d'intensifier cette diminution et de la porter à 22%, soit tout proche de la délétion maximale observée avec la dose de $20 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{jour}^{-1}$ (Figure 2f). La délétion est dite maximale puisque nos études antérieures, notamment avec la nifédipine, indiquent que lorsque la dose de $20 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{jour}^{-1}$ est utilisée, la prolongation du traitement n'amène pas de délétion additionnelle¹⁰⁸. Il est donc intéressant de constater que la durée de traitement, tout comme la dose, permettent de moduler la régression de l'hyperplasie aortique avec l'amlodipine.

Combinaison

Le choix des doses pour l'administration de la combinaison des deux médicaments a donc été de $7 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{jour}^{-1}$ pour l'amlodipine et de $50 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{jour}^{-1}$ pour l'atorvastatine. Lors de cette étude, l'administration de la combinaison amlodipine/atorvastatine durant trois semaines est le seul traitement qui a permis une diminution significative de l'hyperplasie aortique (Figure 2e). Selon les notions déjà connues par rapport à la cinétique d'induction de l'apoptose par l'amlodipine à une dose de $20 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{jour}^{-1}$ ¹¹³, l'interprétation des résultats obtenus après trois et six semaines de traitement permettent de suggérer la possibilité d'une cinétique telle que décrite par la Figure 11. Selon cette interprétation,

même si l'index d'hyperplasie à la fin du traitement de six semaines est semblable pour tous les traitements, il serait possible d'observer certaines distinctions au tout début de l'échelle de temps. L'atorvastatine pourrait ainsi potentialiser et accélérer l'effet de la faible dose d'amlodipine. Selon cette hypothèse, il est envisageable qu'après seulement une ou deux semaines de traitement, la différence entre la faible dose d'amlodipine et la combinaison, en ce qui a trait à l'hyperplasie, serait d'autant plus grande. Des études évaluant l'index d'hyperplasie des CMLV après quelques jours de traitement, voire une semaine ou deux, permettraient de confirmer cette affirmation.

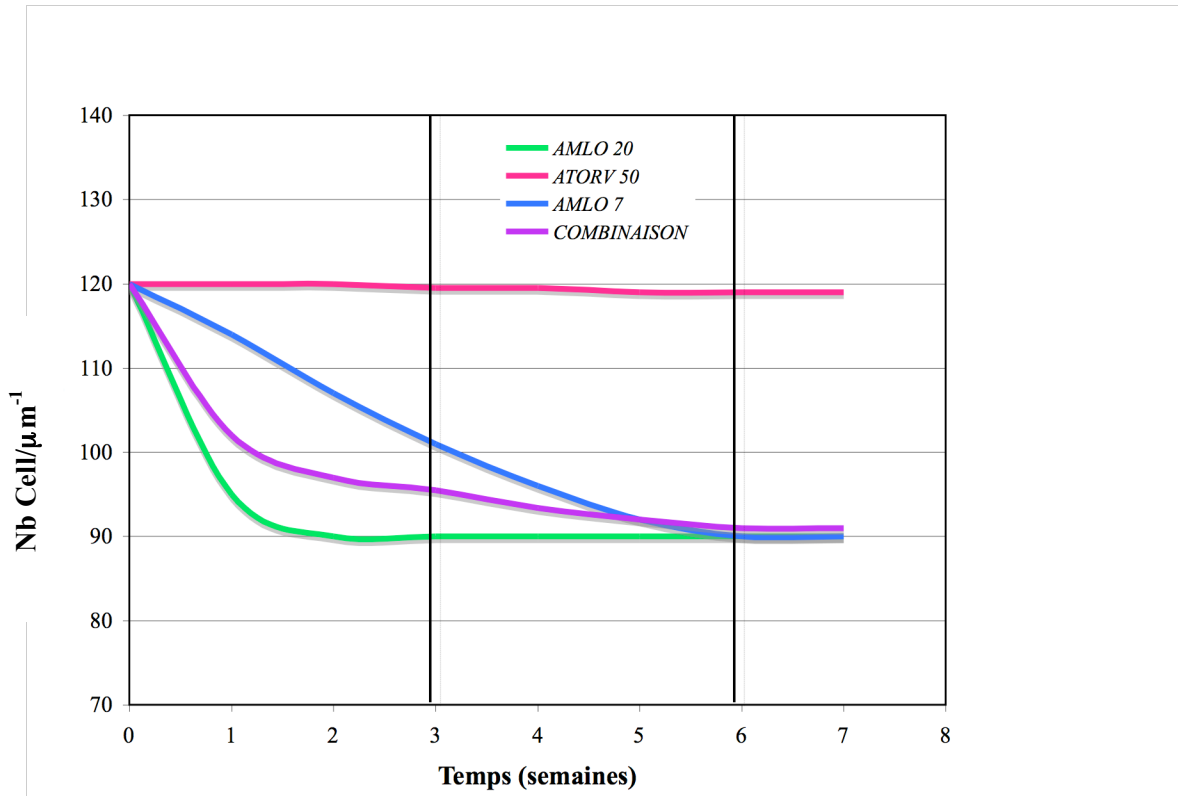


Figure 11: Cinétique proposée pour la réduction de l'hyperplasie aortique chez le SHR traité avec l'amlodipine et l'atorvastatine, seule ou en combinaison. Une faible dose d'amlodipine, pour une durée de traitement prolongée, atteint le même seuil de diminution qu'une dose plus élevée. L'ajout de l'atorvastatine semble accélérer cet effet.

Induction de l'apoptose

Les modifications moléculaires associées à l'induction de l'apoptose observées dans les aortes de SHR traités à l'amlodipine surviennent dès les premiers jours de traitement, avant de retourner aux valeurs initiales après environ une semaine. Ainsi, après trois semaines de traitement, ces changements ne sont plus détectables. En supposant que la cinétique d'induction de l'apoptose serait moins rapide lors de l'administration de l'atorvastatine seulement, l'expression de certaines protéines possiblement impliquées dans le phénomène ont été étudiées. Les différents mécanismes proposés à ce jour pour expliquer l'induction de l'apoptose des CMLV *in vitro* par les statines lipophiliques ont impliqué entre autres p21^{Waf1/Cip1}, une protéine agissant comme inhibiteur de CDK^{133, 144}. La surexpression de p21^{Waf1/Cip1} est d'ailleurs liée à l'induction de l'apoptose¹⁴⁰. Appuyant nos résultats obtenus quant à l'hyperplasie aortique, aucune modification de l'expression de p21^{Waf1/Cip1} n'a été toutefois détectée dans l'aorte des SHR traités à l'atorvastatine pendant trois semaines (Figure 8). D'autre part, la protéine pro-survie Akt semble être impliquée dans le mécanisme d'induction de l'apoptose des CMLV par l'amlodipine, étant la première à présenter une réduction de son activité¹¹³. Toutefois, aucune modification dans la phosphorylation de cette protéine n'a pu être détectée pour aucun des groupes à l'étude (Figure 9). Si des changements au niveau moléculaire avaient été détectés après trois semaines de traitement avec l'atorvastatine, cela aurait pu laisser présager une diminution de l'hyperplasie après six semaines de traitement, effet qui n'a pas été observé. Ces résultats semblent supporter nos observations à l'échelle morphologique, à savoir qu'il n'y aurait pas eu d'induction de l'apoptose des CMLV aortiques pour l'atorvastatine seule.

Est-ce que le choix d'un modèle différent aurait pu influencer les résultats liés à l'induction de l'apoptose des CMLV par l'atorvastatine? Il a été démontré que les statines limitent la

prolifération des CMLV et la taille de l'intima chez un modèle de souris susceptibles de développer des lésions athérosclérotiques^{182, 183}. Dans cette étude, la fluvastatine a prévenu la formation de l'intima chez ces souris, en plus d'inhiber la synthèse de l'ADN, sans qu'il ne survienne de changement dans la pression artérielle ou dans les taux de lipides sanguins. Cette situation est différente de celle dans laquelle la taille de l'intima, déjà formée, serait réduite suite à l'induction de l'apoptose. Tel que démontré antérieurement, l'induction de l'apoptose des CMLV par la nifédipine se fait préférentiellement dans l'intima par opposition à la média¹⁰⁹. De la même manière, des études préliminaires effectuées dans notre laboratoire semblent démontrer que la délétion de CMLV chez les SHR âgés subissant un traitement avec l'amlodipine se fait une fois de plus préférentiellement dans l'intima et non dans la média. Le phénotype des CMLV intimaux est différent de celui des CMLV médiales¹⁸⁴, et une de leur caractéristique est qu'elles sont aussi plus susceptibles à entrer en apoptose¹⁸⁵. Il serait intéressant de vérifier, dans un modèle présentant des caractéristiques athérosclérotiques ou un modèle de dénudation endothéliale, si la régression de la taille de l'intima peut être associée avec l'induction de l'apoptose des CMLV intimaux lors d'un traitement avec l'atorvastatine. Si tel était le cas, l'ajout de l'amlodipine à la thérapie permettrait d'étudier l'interaction entre les deux médicaments dans ce contexte particulier. La combinaison pourrait alors être indiquée pour les patients hypertendus exposés à plusieurs facteurs de risques cardiovasculaires supplémentaires. C'est d'ailleurs l'indication que possède cette combinaison en Europe, c'est-à-dire qu'elle est prescrite aux patients hypertendus, ayant trois facteurs de risque cardiovasculaire associés.

L'induction de l'apoptose des CMLV semble à première vue souhaitable, particulièrement dans le cas mentionné précédemment où il y a formation d'une néointima et que la réduction de la taille de la néointima est un effet recherché. Par contre, dans le cas d'un vaisseau endommagé sur lequel une plaque athérosclérotique s'est développée, il importe de considérer la contribution des CMLV à la stabilité de la plaque. En effet, les CMLV contribuent à stabiliser et à renforcer la chape fibreuse recouvrant la plaque en assurant la

formation du tissu fibreux composant la chape et entourant le centre athéromateux. Ce tissu fibreux est lui-même composé de collagène, d'élastine, de fibrine et de CMLV. Ainsi, s'il s'avérait que l'atorvastatine induit l'apoptose des CMLV dans ce contexte, il est probable que cela pourrait fragiliser la plaque fibreuse, menant à sa rupture, à la formation d'un thrombus et ainsi contribuer à l'augmentation du risque d'évènements coronariens. Un parallèle peut également se faire au sujet de l'inhibition de la prolifération et de la migration des CMLV par les statines, qui, à première vue, peut être considérée comme un effet bénéfique pour limiter le développement et la progression de la formation de plaque athéromateuse. Par contre, cela pourrait à nouveau contribuer à la fragilisation de la plaque athérosclérotique et conduire à des conséquences néfastes. Il importe toutefois de considérer la contribution des autres effets pléiotropiques des statines dans ce même contexte, à savoir par exemple son action anti-inflammatoire.

Pression artérielle

Après six semaines de traitement, l'administration de la combinaison a entraîné une réduction significative de la pression pulsée chez les animaux traités (Figure 5). La pression pulsée dépend du volume d'éjection systolique et de la compliance des vaisseaux. Son augmentation est une conséquence de la rigidité artérielle des artères de gros calibre, étant donné que cette rigidité provoque une altération du pouvoir amortissant des artères servant à contrer les variations de pression artérielle suite à l'éjection systolique du ventricule gauche. Plusieurs études ont démontré que la pression pulsée est un déterminant majeur des maladies cardiovasculaires chez les patients hypertendus¹⁸⁶. La rigidité artérielle est aussi associée à l'hypertrophie ventriculaire gauche chez ces mêmes patients¹⁸⁷. D'ailleurs, chez le SHR, l'index d'hypertrophie ventriculaire gauche corrèle négativement avec la rigidité artérielle, et non avec la pression artérielle¹⁸⁸. Chez le SHR, la rigidité artérielle des artères de conduction est supérieure à celle de la lignée contrôle normotendue, ce qui pourrait être

dû aux changements dans les propriétés intrinsèques de la paroi vasculaire. Ces changements surviennent avec le vieillissement et indépendamment de la pression artérielle moyenne¹⁸⁹. Ces modifications incluent la diminution de l'élasticité de l'aorte, liée entre autres à une augmentation du contenu en collagène, et les changements dans la proportion des CMLV par rapport à la matrice extracellulaire¹⁸⁹. Ainsi, la diminution significative de la pression pulsée observée uniquement chez les animaux traités avec la combinaison pourrait signifier que son administration a entraîné une diminution de la rigidité artérielle et donc une amélioration de la compliance des vaisseaux. Ce changement pourrait aussi être un indice que l'inflammation a été réduite dans ces vaisseaux, ce qui aurait contribué à une amélioration de la fonction endothéliale et ainsi à une diminution de la rigidité artérielle. Tel que décrit antérieurement, la diminution de la pression pulsée corrèle effectivement avec une diminution de certains marqueurs inflammatoires comme la CRP suite à l'administration d'une statine à des patients hypertendus ayant un taux de cholestérol élevé¹⁶⁵. Il serait surprenant que la calcification vasculaire ait pu jouer un rôle dans ce cas-ci, étant donné que les SHR à l'étude sont considérés comme étant "jeunes". Ce résultat se compare à ceux obtenus dans deux études précédentes effectuées chez les humains, dans lesquelles l'administration de la combinaison amlodipine/atorvastatine a amélioré au moins de façon additive la compliance des vaisseaux^{174, 175}.

Il a été démontré que chez les patients hypertendus jeunes (≤ 50 ans) provenant de la cohorte de Framingham, la pression diastolique est un meilleur prédicteur de maladies cardiovasculaires que la pression systolique, à l'inverse de ce qui est observé chez les patients âgés¹⁹⁰. De façon intéressante, chez les jeunes rats étudiés, l'atorvastatine administrée pendant six semaines à une dose de $50 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{jour}^{-1}$ a diminué significativement la pression diastolique, pratiquement au même niveau que la faible dose d'amlodipine de $7 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{jour}^{-1}$ (158.8 et 155.7 mmHg respectivement), sans affecter significativement la pression systolique. Ce résultat pourrait représenter un des facteurs possibles contribuant à la protection cardiovasculaire accordée par l'atorvastatine dans les

études cliniques. Il a d'ailleurs été démontré dans plusieurs études cliniques que l'atorvastatine diminuait la pression artérielle chez des patients hypertendus souffrant ou non d'hyperlipidémie^{67, 191, 192}.

Fontion endothéliale

La deuxième variable ayant été influencée significativement par l'administration de la combinaison pendant trois semaines est la sensibilité du muscle lisse à un donneur de NO, le SNP (Figure 6). Cet effet semble dépendant du temps, puisqu'il n'a pas été observé après six semaines de traitement. Le fait que la relaxation indépendante de l'endothélium ait été améliorée indique que pour une même quantité de NO disponible, le muscle lisse a relaxé davantage, ce qui est un effet bénéfique lorsqu'il est question de traitement antihypertensif. Par contre, cette information ne nous renseigne pas sur la fonction endothéliale, puisque le NO présent provient d'une source exogène et non de la NO synthèse des cellules endothéliales. En situation physiologique, la quantité de NO biodisponible varie selon l'activité de eNOS, la présence du substrat L-arginine et du cofacteur BH₄, et le stress oxydant. Afin de mesurer la fonction endothéliale directement, la relaxation à l'acétylcholine a été évaluée (Figure 7). Aucune différence n'a pu être observée chez aucun des groupes traités comparativement au groupe témoin, que ce soit après un traitement de trois ou de six semaines. Ce résultat va à l'encontre de ce qui est décrit dans la littérature par rapport aux deux agents^{123, 124, 156, 163}. D'autre part, l'expression de eNOS a été significativement augmentée par un traitement avec la dose intermédiaire d'atorvastatine de 20 mg·kg⁻¹·jour⁻¹, mais pas avec celle de 50 mg·kg⁻¹·jour⁻¹ (Figure 10). La méthode d'analyse par immunobuvardage n'est peut-être pas suffisamment sensible pour détecter les différences réelles dans l'expression de eNOS dans un tissu contenant plusieurs types cellulaires, il s'avère alors difficile de tirer des conclusions à ce sujet. L'impact de la combinaison sur l'amélioration de la fonction endothéliale aurait peut-être été plus marqué

dans un modèle aigu de dysfonction endothéliale et d'hypertension, par exemple le modèle SHR+L-NAME. Ce modèle est caractérisé par une augmentation accrue de la pression et de la rigidité artérielles, combinée à une dysfonction endothéliale et une HVG majeures¹⁹³⁻¹⁹⁵. Effectivement, le L-NAME est un inhibiteur des trois isoformes de la NO synthase, ce qui réduit la biodisponibilité du NO substantiellement. Il a été démontré que chez des rats Wistar à qui est administré du L-NAME pendant trois semaines, une faible dose de 4 mg·kg⁻¹·jour⁻¹ d'atorvastatine améliore de façon significative les concentrations plasmatiques de NO¹⁹⁶. Il serait intéressant de mesurer l'effet de la combinaison sur la fonction endothéliale dans cette situation extrême.

Stress oxydant

Il a été rapporté dans la littérature que la combinaison augmente la libération de NO et diminue le stress oxydant de façon synergique^{178, 197}. Par ailleurs, nos résultats ne vont pas dans ce sens. Les concentrations sériques de NOx n'ont pas été modifiées par aucun des traitements (Table 1) et la réduction de la production d'anion superoxyde dans l'aorte a été la même avec la combinaison qu'avec l'atorvastatine seule (Figure 3). Même si la contribution de la NADPH oxydase à la production d'anion superoxyde n'est pas modifiée significativement par les traitements, il est intéressant de constater qu'une tendance semble tout de même se dessiner. En effet, à deux reprises, soit après trois et six semaines de traitement, la contribution de la NADPH oxydase est clairement diminuée dans le cas de l'administration de la combinaison et de l'atorvastatine seule. Ceci semble confirmer l'action de l'atorvastatine sur l'inhibition de la voie NADPH oxydase.

Niveaux de cholestérol

Le fait que les traitements n'aient pas modifié les niveaux de cholestérol sériques des SHR peut indiquer que les changements observés suite à l'administration de l'atorvastatine, soit la diminution du stress oxydant et de la pression artérielle moyenne, sont indépendants de la synthèse du cholestérol. Toutefois, de par les niveaux de cholestérol *a priori* peu élevés chez le SHR, même inférieurs à la lignée témoin normotendue WKY, il est possible que l'effet de l'atorvastatine ne soit pas détectable en ce qui a trait aux niveaux de cholestérol. Il est donc difficile de conclure si effectivement les effets observés sont indépendants de la diminution des taux cholestérol. Le choix de la dose d'atorvastatine de $50 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{jour}^{-1}$ a été fait en fonction de diverses études démontrant un effet sur le stress oxydant, la pression artérielle et dans quelques cas, le profil lipidique. Il a été suggéré que, chez le rat, cette dose produit des concentrations plasmatiques du principe actif semblables à celles obtenues chez l'humain après l'administration de doses standards^{198, 199}. La mesure du degré d'inhibition de l'HMG-CoA réductase permettrait de documenter plus précisément l'action primaire du médicament.

Conclusion

La régression de l'hypertrophie aortique associée à l'état hypertendu est une cible thérapeutique potentielle. La correction du remodelage vasculaire pathologique suite à l'induction d'une vague transitoire d'apoptose des CMLV caractéristique de certaines classes de médicaments antihypertenseurs pourrait expliquer l'amélioration du pronostic conféré par ces médicaments, en ce qui a trait à la diminution de la morbidité et de la mortalité. L'étude plus approfondie des effets pléiotropiques de certains médicaments est tout à fait justifiée dans le cadre de la tentative constante de contrôler les facteurs de risque cardiovasculaire, dont l'hypertension. L'atorvastatine, le médicament le plus prescrit et le plus vendu au monde, s'est vu attribué des effets cardiovasculaires bénéfiques ne pouvant être expliqués uniquement par la diminution des taux de cholestérol. Nous avons donc voulu vérifier si ces effets pouvaient être attribuables en partie à la régression de l'hyperplasie aortique suite à l'induction de l'apoptose des CMLV. En contradiction avec les résultats *in vitro* décrits dans la littérature, nos résultats semblent démontrer que l'atorvastatine n'a pas induit l'apoptose des CMLV *in vivo*, et par le fait même, n'a pas corrigé l'hyperplasie aortique chez le SHR.

Toutefois, une interaction possible entre l'amlodipine et l'atorvastatine, une thérapie de combinaison disponible commercialement, a été détectée au niveau de l'hyperplasie aortique, de la pression pulsée et de la sensibilité du muscle lisse au NO. Ces résultats, supportant d'autres conclusions obtenues précédemment dans différents contextes, pourraient expliquer en partie les effets bénéfiques apportés par cette thérapie. Ils vont également dans la direction suggérée au départ dans ce mémoire, à savoir qu'il pourrait être souhaitable que cette thérapie combinée soit indiquée pour les patients souffrant d'hypertension seulement.

Bibliographie

1. 1999 World Health Organization-International Society of Hypertension Guidelines for the Management of Hypertension. Guidelines Subcommittee. *Journal of hypertension* 1999;17(2):151-83.
2. Vasan RS, Larson MG, Leip EP, et al. Impact of high-normal blood pressure on the risk of cardiovascular disease. *The New England journal of medicine* 2001;345(18):1291-7.
3. Joffres MR, Hamet P, MacLean DR, L'Italien G J, Fodor G. Distribution of blood pressure and hypertension in Canada and the United States. *Am J Hypertens* 2001;14(11 Pt 1):1099-105.
4. 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.
5. Beevers G, Lip GY, O'Brien E. ABC of hypertension: The pathophysiology of hypertension. *BMJ (Clinical research ed)* 2001;322(7291):912-6.
6. Oparil S, Zaman MA, Calhoun DA. Pathogenesis of hypertension. *Annals of internal medicine* 2003;139(9):761-76.
7. Cowley AW, Jr. Long-term control of arterial blood pressure. *Physiological reviews* 1992;72(1):231-300.
8. Julius S. Transition from high cardiac output to elevated vascular resistance in hypertension. *American heart journal* 1988;116(2 Pt 2):600-6.
9. Folkow B. Physiological aspects of primary hypertension. *Physiological reviews* 1982;62(2):347-504.
10. Guyenet PG. The sympathetic control of blood pressure. *Nature reviews* 2006;7(5):335-46.
11. Katzung BG. *Basic and Clinical Pharmacology*. Tenth Edition ed: McGraw-Hill Companies Inc.; 2007.
12. Schiffrin EL. Vascular endothelin in hypertension. *Vascular pharmacology* 2005;43(1):19-29.
13. Kassab S, Miller MT, Novak J, Reckelhoff J, Clower B, Granger JP. Endothelin-A receptor antagonism attenuates the hypertension and renal injury in Dahl salt-sensitive rats. *Hypertension* 1998;31(1 Pt 2):397-402.
14. Remuzzi G, Perico N, Benigni A. New therapeutics that antagonize endothelin: promises and frustrations. *Nat Rev Drug Discov* 2002;1(12):986-1001.
15. Krum H, Viskoper RJ, Lacourciere Y, Budde M, Charlon V. The effect of an endothelin-receptor antagonist, bosentan, on blood pressure in patients with essential hypertension. *Bosentan Hypertension Investigators. The New England journal of medicine* 1998;338(12):784-90.
16. Hall JE, Mizelle HL, Hildebrandt DA, Brands MW. Abnormal pressure natriuresis. A cause or a consequence of hypertension? *Hypertension* 1990;15(6 Pt 1):547-59.
17. Dahl LK, Heine M. Primary role of renal homografts in setting chronic blood pressure levels in rats. *Circulation research* 1975;36(6):692-6.
18. Smallegange C, Hale TM, Bushfield TL, Adams MA. Persistent lowering of pressure by transplanting kidneys from adult spontaneously hypertensive rats treated with brief antihypertensive therapy. *Hypertension* 2004;44(1):89-94.

19. Schiffrin EL. Effect of antihypertensive treatment on small artery remodeling in hypertension. *Canadian journal of physiology and pharmacology* 2003;81(2):168-76.
20. Mulvany MJ. Are vascular abnormalities a primary cause or secondary consequence of hypertension? *Hypertension* 1991;18(3 Suppl):152-7.
21. Lévy BI. Altérations de la microcirculation et hypertension artérielle: cause ou conséquence? *Sang Thrombose Vaisseaux* 2007;19(1):9-16.
22. Hamet P, deBlois D, Dam TV, et al. Apoptosis and vascular wall remodeling in hypertension. *Canadian journal of physiology and pharmacology* 1996;74(7):850-61.
23. Mulvany MJ. Small artery remodeling and significance in the development of hypertension. *News Physiol Sci* 2002;17:105-9.
24. Greene AS, Tonellato PJ, Lui J, Lombard JH, Cowley AW, Jr. Microvascular rarefaction and tissue vascular resistance in hypertension. *The American journal of physiology* 1989;256(1 Pt 2):H126-31.
25. Ogita H, Liao J. Endothelial function and oxidative stress. *Endothelium* 2004;11(2):123-32.
26. Garg UC, Hassid A. Nitric oxide-generating vasodilators and 8-bromo-cyclic guanosine monophosphate inhibit mitogenesis and proliferation of cultured rat vascular smooth muscle cells. *The Journal of clinical investigation* 1989;83(5):1774-7.
27. Feletou M, Vanhoutte PM. Endothelial dysfunction: a multifaceted disorder (The Wiggers Award Lecture). *American journal of physiology* 2006;291(3):H985-1002.
28. Munzel T, Sinning C, Post F, Warnholtz A, Schulz E. Pathophysiology, diagnosis and prognostic implications of endothelial dysfunction. *Annals of medicine* 2008;40(3):180-96.
29. John S, Schmieder RE. Impaired endothelial function in arterial hypertension and hypercholesterolemia: potential mechanisms and differences. *Journal of hypertension* 2000;18(4):363-74.
30. McIntyre M, Bohr DF, Dominiczak AF. Endothelial function in hypertension: the role of superoxide anion. *Hypertension* 1999;34(4 Pt 1):539-45.
31. Ceravolo R, Maio R, Pujia A, et al. Pulse pressure and endothelial dysfunction in never-treated hypertensive patients. *Journal of the American College of Cardiology* 2003;41(10):1753-8.
32. Touyz RM. Reactive oxygen species, vascular oxidative stress, and redox signaling in hypertension: what is the clinical significance? *Hypertension* 2004;44(3):248-52.
33. Griendling KK, Sorescu D, Ushio-Fukai M. NAD(P)H oxidase: role in cardiovascular biology and disease. *Circulation research* 2000;86(5):494-501.
34. Hishikawa K, Luscher TF. Pulsatile stretch stimulates superoxide production in human aortic endothelial cells. *Circulation* 1997;96(10):3610-6.
35. Zalba G, Beaumont FJ, San Jose G, et al. Vascular NADH/NADPH oxidase is involved in enhanced superoxide production in spontaneously hypertensive rats. *Hypertension* 2000;35(5):1055-61.
36. Landmesser U, Dikalov S, Price SR, et al. Oxidation of tetrahydrobiopterin leads to uncoupling of endothelial cell nitric oxide synthase in hypertension. *The Journal of clinical investigation* 2003;111(8):1201-9.

37. Suzuki H, DeLano FA, Parks DA, et al. Xanthine oxidase activity associated with arterial blood pressure in spontaneously hypertensive rats. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1998;95(8):4754-9.
38. Ohara Y, Peterson TE, Harrison DG. Hypercholesterolemia increases endothelial superoxide anion production. *The Journal of clinical investigation* 1993;91(6):2546-51.
39. Mervaala EM, Cheng ZJ, Tikkanen I, et al. Endothelial dysfunction and xanthine oxidoreductase activity in rats with human renin and angiotensinogen genes. *Hypertension* 2001;37(2 Part 2):414-8.
40. Butler R, Morris AD, Belch JJ, Hill A, Struthers AD. Allopurinol normalizes endothelial dysfunction in type 2 diabetics with mild hypertension. *Hypertension* 2000;35(3):746-51.
41. Cardillo C, Kilcoyne CM, Cannon RO, 3rd, Quyyumi AA, Panza JA. Xanthine oxidase inhibition with oxypurinol improves endothelial vasodilator function in hypercholesterolemic but not in hypertensive patients. *Hypertension* 1997;30(1 Pt 1):57-63.
42. O'Driscoll JG, Green DJ, Rankin JM, Taylor RR. Nitric oxide-dependent endothelial function is unaffected by allopurinol in hypercholesterolaemic subjects. *Clinical and experimental pharmacology & physiology* 1999;26(10):779-83.
43. Laakso JT, Teravainen TL, Martelin E, Vaskonen T, Lapatto R. Renal xanthine oxidoreductase activity during development of hypertension in spontaneously hypertensive rats. *Journal of hypertension* 2004;22(7):1333-40.
44. Chae CU, Lee RT, Rifai N, Ridker PM. Blood pressure and inflammation in apparently healthy men. *Hypertension* 2001;38(3):399-403.
45. Edwards KM, Ziegler MG, Mills PJ. The potential anti-inflammatory benefits of improving physical fitness in hypertension. *Journal of hypertension* 2007;25(8):1533-42.
46. Sesso HD, Buring JE, Rifai N, Blake GJ, Gaziano JM, Ridker PM. C-reactive protein and the risk of developing hypertension. *Jama* 2003;290(22):2945-51.
47. Dernellis J, Panaretou M. Aortic stiffness is an independent predictor of progression to hypertension in nonhypertensive subjects. *Hypertension* 2005;45(3):426-31.
48. Pauletto P, Rattazzi M. Inflammation and hypertension: the search for a link. *Nephrol Dial Transplant* 2006;21(4):850-3.
49. Rodriguez-Iturbe B, Quiroz Y, Ferrebuz A, Parra G, Vaziri ND. Evolution of renal interstitial inflammation and NF-kappaB activation in spontaneously hypertensive rats. *American journal of nephrology* 2004;24(6):587-94.
50. Ofosu-Appiah W, Sfeir G, Smith D, Richard T. Neutrophil-mediated damage to vascular endothelium in the spontaneously hypertensive rat. *Clinical immunology and immunopathology* 1997;83(3):293-301.
51. Liu Y, Liu T, McCarron RM, et al. Evidence for activation of endothelium and monocytes in hypertensive rats. *The American journal of physiology* 1996;270(6 Pt 2):H2125-31.
52. Touyz RM, Schiffrin EL. Signal transduction mechanisms mediating the physiological and pathophysiological actions of angiotensin II in vascular smooth muscle cells. *Pharmacological reviews* 2000;52(4):639-72.

53. Schrader LI, Kinzenbaw DA, Johnson AW, Faraci FM, Didion SP. IL-6 deficiency protects against angiotensin II induced endothelial dysfunction and hypertrophy. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 2007;27(12):2576-81.
54. Lee DL, Sturgis LC, Labazi H, et al. Angiotensin II hypertension is attenuated in interleukin-6 knockout mice. *American journal of physiology* 2006;290(3):H935-40.
55. Fliser D, Buchholz K, Haller H. Antiinflammatory effects of angiotensin II subtype 1 receptor blockade in hypertensive patients with microinflammation. *Circulation* 2004;110(9):1103-7.
56. Podrez EA, Schmitt D, Hoff HF, Hazen SL. Myeloperoxidase-generated reactive nitrogen species convert LDL into an atherogenic form in vitro. *The Journal of clinical investigation* 1999;103(11):1547-60.
57. Laufs U, La Fata V, Plutzky J, Liao JK. Upregulation of endothelial nitric oxide synthase by HMG CoA reductase inhibitors. *Circulation* 1998;97(12):1129-35.
58. Ito A, Tsao PS, Adimoolam S, Kimoto M, Ogawa T, Cooke JP. Novel mechanism for endothelial dysfunction: dysregulation of dimethylarginine dimethylaminohydrolase. *Circulation* 1999;99(24):3092-5.
59. Mitani H, Bandoh T, Kimura M, Totsuka T, Hayashi S. Increased activity of vascular ACE related to atherosclerotic lesions in hyperlipidemic rabbits. *The American journal of physiology* 1996;271(3 Pt 2):H1065-71.
60. Yang BC, Phillips MI, Mohuczy D, et al. Increased angiotensin II type 1 receptor expression in hypercholesterolemic atherosclerosis in rabbits. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 1998;18(9):1433-9.
61. Nickenig G, Sachinidis A, Seewald S, Bohm M, Vetter H. Influence of oxidized low-density lipoprotein on vascular angiotensin II receptor expression. *J Hypertens Suppl* 1997;15(6):S27-30.
62. Mangat S, Agarwal S, Rosendorff C. Do statins lower blood pressure? *Journal of cardiovascular pharmacology and therapeutics* 2007;12(2):112-23.
63. Tunon J, Martin-Ventura JL, Blanco-Colio LM, Tarin N, Egido J. Common pathways of hypercholesterolemia and hypertension leading to atherothrombosis: the need for a global approach in the management of cardiovascular risk factors. *Vascular health and risk management* 2007;3(4):521-6.
64. Nickenig G, Baumer AT, Temur Y, Kebben D, Jockenhovel F, Bohm M. Statin-sensitive dysregulated AT1 receptor function and density in hypercholesterolemic men. *Circulation* 1999;100(21):2131-4.
65. Sung BH, Izzo JL, Jr., Wilson MF. Effects of cholesterol reduction on BP response to mental stress in patients with high cholesterol. *Am J Hypertens* 1997;10(6):592-9.
66. Nazzaro P, Manzari M, Merlo M, et al. Distinct and combined vascular effects of ACE blockade and HMG-CoA reductase inhibition in hypertensive subjects. *Hypertension* 1999;33(2):719-25.
67. Ferrier KE, Muhlmann MH, Baguet JP, et al. Intensive cholesterol reduction lowers blood pressure and large artery stiffness in isolated systolic hypertension. *Journal of the American College of Cardiology* 2002;39(6):1020-5.
68. Sarkar K, Sinha AK, Mehta JL. The role of statins in endothelial dysfunction in hypertension. *Current opinion in cardiology* 2006;21(4):316-21.

69. Jiang J, Roman RJ. Lovastatin prevents development of hypertension in spontaneously hypertensive rats. *Hypertension* 1997;30(4):968-74.
70. Susic D, Varagic J, Ahn J, Slama M, Frohlich ED. Beneficial pleiotropic vascular effects of rosuvastatin in two hypertensive models. *Journal of the American College of Cardiology* 2003;42(6):1091-7.
71. Wilson TW, Alonso-Galicia M, Roman RJ. Effects of lipid-lowering agents in the Dahl salt-sensitive rat. *Hypertension* 1998;31(1 Pt 2):225-31.
72. Psaty BM, Lumley T, Furberg CD, et al. Health outcomes associated with various antihypertensive therapies used as first-line agents: a network meta-analysis. *Jama* 2003;289(19):2534-44.
73. Association AH. Heart and Stroke Facts: 2005 Statistical Supplement. Dallas, TX; 2005.
74. Johannesson M. The cost effectiveness of hypertension treatment in Sweden. *Pharmacoeconomics* 1995;7(3):242-50.
75. Bryson CL, Psaty BM. A Review of the Adverse Effects of Peripheral Alpha-1 Antagonists in Hypertension Therapy. *Curr Control Trials Cardiovasc Med* 2002;3(1).
76. Ennezat PV, Berlowitz M, Sonnenblick EH, Le Jemtel TH. Therapeutic implications of escape from angiotensin-converting enzyme inhibition in patients with chronic heart failure. *Current cardiology reports* 2000;2(3):258-62.
77. Mooser V, Nussberger J, Juillerat L, et al. Reactive hyperreninemia is a major determinant of plasma angiotensin II during ACE inhibition. *Journal of cardiovascular pharmacology* 1990;15(2):276-82.
78. Nussberger J, Wuerzner G, Jensen C, Brunner HR. Angiotensin II suppression in humans by the orally active renin inhibitor Aliskiren (SPP100): comparison with enalapril. *Hypertension* 2002;39(1):E1-8.
79. Alderman MH, Ooi WL, Cohen H, Madhavan S, Sealey JE, Laragh JH. Plasma renin activity: a risk factor for myocardial infarction in hypertensive patients. *Am J Hypertens* 1997;10(1):1-8.
80. Jensen C, Herold P, Brunner HR. Aliskiren: the first renin inhibitor for clinical treatment. *Nat Rev Drug Discov* 2008;7(5):399-410.
81. Battegay EJ, Lip GYH, Bakris GL. *Hypertension Principles and Practice*: Taylor & Francis Group; 2005.
82. Chobanian AV, Bakris GL, Black HR, 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.
83. Black AE, Hayes RN, Roth BD, Woo P, Woolf TF. Metabolism and excretion of atorvastatin in rats and dogs. *Drug metabolism and disposition: the biological fate of chemicals* 1999;27(8):916-23.
84. Black HR, Bakris GL, Elliot WJ. Hypertension: epidemiology, pathophysiology, diagnosis and treatment. In: McGraw-Hill, ed. *Hurst's: The Heart*. New York; 2001:1553-604.
85. Millar JA, McLean KA, Sumner DJ, Reid JL. The effect of the calcium antagonist nifedipine on pressor and aldosterone responses to angiotensin II in normal man. *European journal of clinical pharmacology* 1983;24(3):315-21.

86. Pedrinelli R, Taddei S, Salvetti A. Calcium entry blockade and alpha-adrenergic vascular reactivity in human beings: differences between nifedipine and verapamil. *Clinical pharmacology and therapeutics* 1989;45(3):285-90.
87. Mason RP, Campbell SF, Wang SD, Herbette LG. Comparison of location and binding for the positively charged 1,4-dihydropyridine calcium channel antagonist amlodipine with uncharged drugs of this class in cardiac membranes. *Molecular pharmacology* 1989;36(4):634-40.
88. Mason RP, Marche P, Hintze TH. Novel vascular biology of third-generation L-type calcium channel antagonists: ancillary actions of amlodipine. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 2003;23(12):2155-63.
89. Law MR, Wald NJ, Morris JK, Jordan RE. Value of low dose combination treatment with blood pressure lowering drugs: analysis of 354 randomised trials. *BMJ (Clinical research ed)* 2003;326(7404):1427.
90. Goldberg RJ, Burchfiel CM, Benfante R, Chiu D, Reed DM, Yano K. Lifestyle and biologic factors associated with atherosclerotic disease in middle-aged men. 20-year findings from the Honolulu Heart Program. *Archives of internal medicine* 1995;155(7):686-94.
91. Stamler J, Wentworth D, Neaton JD. Is relationship between serum cholesterol and risk of premature death from coronary heart disease continuous and graded? Findings in 356,222 primary screenees of the Multiple Risk Factor Intervention Trial (MRFIT). *Jama* 1986;256(20):2823-8.
92. Ma PT, Gil G, Sudhof TC, Bilheimer DW, Goldstein JL, Brown MS. Mevinolin, an inhibitor of cholesterol synthesis, induces mRNA for low density lipoprotein receptor in livers of hamsters and rabbits. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1986;83(21):8370-4.
93. Goldstein JL, Brown MS. Regulation of low-density lipoprotein receptors: implications for pathogenesis and therapy of hypercholesterolemia and atherosclerosis. *Circulation* 1987;76(3):504-7.
94. Brown MS, Kovanen PT, Goldstein JL. Regulation of plasma cholesterol by lipoprotein receptors. *Science (New York, NY)* 1981;212(4495):628-35.
95. Goldstein JL, Brown MS. Lipoprotein receptors and the control of plasma LDL cholesterol levels. *European heart journal* 1992;13 Suppl B:34-6.
96. Young IS, Laughrey BV. Lipid-Lowering Therapy. In: Elsevier M, ed. *Comprehensive Hypertension*; 2007:1087-100.
97. Nawrocki JW, Weiss SR, Davidson MH, et al. Reduction of LDL cholesterol by 25% to 60% in patients with primary hypercholesterolemia by atorvastatin, a new HMG-CoA reductase inhibitor. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 1995;15(5):678-82.
98. McGee TP, Cheng HH, Kumagai H, Omura S, Simoni RD. Degradation of 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase in endoplasmic reticulum membranes is accelerated as a result of increased susceptibility to proteolysis. *The Journal of biological chemistry* 1996;271(41):25630-8.

99. Olender EH, Simon RD. The intracellular targeting and membrane topology of 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase. *The Journal of biological chemistry* 1992;267(6):4223-35.
100. Brown DA, Simoni RD. Biogenesis of 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase, an integral glycoprotein of the endoplasmic reticulum. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1984;81(6):1674-8.
101. Mason RP, Walter MF, Day CA, Jacob RF. Intermolecular differences of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme a reductase inhibitors contribute to distinct pharmacologic and pleiotropic actions. *The American journal of cardiology* 2005;96(5A):11F-23F.
102. Bellosta S, Paoletti R, Corsini A. Safety of statins: focus on clinical pharmacokinetics and drug interactions. *Circulation* 2004;109(23 Suppl 1):III50-7.
103. 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.
104. 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.
105. 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.
106. Bucher B, Travo P, Stoclet JC. Smooth muscle cell hypertrophy and hyperplasia in the thoracic aorta of spontaneously hypertensive rats. *Cell biology international reports* 1984;8(7):567-77.
107. 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.
108. 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.
109. 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.
110. Nissen SE, Tuzcu EM, Libby P, et al. Effect of antihypertensive agents on cardiovascular events in patients with coronary disease and normal blood pressure: the CAMELOT study: a randomized controlled trial. *Jama* 2004;292(18):2217-25.
111. Group TAOaCftACR. Major outcomes in high-risk hypertensive patients randomized to angiotensin-converting enzyme inhibitor or calcium channel blocker vs diuretic: The Antihypertensive and Lipid-Lowering Treatment to Prevent Heart Attack Trial (ALLHAT). *Jama* 2002;288(23):2981-97.
112. Dahlof B, Sever PS, Poulter NR, et al. Prevention of cardiovascular events with an antihypertensive regimen of amlodipine adding perindopril as required versus atenolol adding bendroflumethiazide as required, in the Anglo-Scandinavian Cardiac Outcomes

- Trial-Blood Pressure Lowering Arm (ASCOT-BPLA): a multicentre randomised controlled trial. *Lancet* 2005;366(9489):895-906.
113. 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. *British journal of pharmacology* 2007;151(8):1315-23.
114. Sharifi AM, Schiffrin EL. Apoptosis in vasculature of spontaneously hypertensive rats: effect of an angiotensin converting enzyme inhibitor and a calcium channel antagonist. *Am J Hypertens* 1998;11(9):1108-16.
115. 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.
116. Thybo NK, Stephens N, Cooper A, Aalkjaer C, Heagerty AM, Mulvany MJ. Effect of antihypertensive treatment on small arteries of patients with previously untreated essential hypertension. *Hypertension* 1995;25(4 Pt 1):474-81.
117. 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.
118. Mulvany MJ. Small artery remodelling in hypertension: causes, consequences and therapeutic implications. *Medical & biological engineering & computing* 2008;46(5):461-7.
119. Rizzoni D, Porteri E, Boari GE, et al. Prognostic significance of small-artery structure in hypertension. *Circulation* 2003;108(18):2230-5.
120. Mathiassen ON, Buus NH, Sihm I, et al. Small artery structure is an independent predictor of cardiovascular events in essential hypertension. *Journal of hypertension* 2007;25(5):1021-6.
121. Loke KE, Messina EJ, Shesely EG, Kaley G, Hintze TH. Potential role of eNOS in the therapeutic control of myocardial oxygen consumption by ACE inhibitors and amlodipine. *Cardiovascular research* 2001;49(1):86-93.
122. Kobayashi N, Yanaka H, Tojo A, Kobayashi K, Matsuoka H. Effects of amlodipine on nitric oxide synthase mRNA expression and coronary microcirculation in prolonged nitric oxide blockade-induced hypertensive rats. *Journal of cardiovascular pharmacology* 1999;34(2):173-81.
123. Zhou MS, Jaimes EA, Raij L. Inhibition of oxidative stress and improvement of endothelial function by amlodipine in angiotensin II-infused rats. *Am J Hypertens* 2004;17(2):167-71.
124. Sharifi AM, Li JS, Endemann D, Schiffrin EL. Effects of enalapril and amlodipine on small-artery structure and composition, and on endothelial dysfunction in spontaneously hypertensive rats. *Journal of hypertension* 1998;16(4):457-66.
125. Bennett MA, Hillier C, Thurston H. Endothelium-dependent relaxation in resistance arteries from spontaneously hypertensive rats: effect of long-term treatment with perindopril, quinapril, hydralazine or amlodipine. *Journal of hypertension* 1996;14(3):389-97.
126. Ghiadoni L, Magagna A, Versari D, et al. Different effect of antihypertensive drugs on conduit artery endothelial function. *Hypertension* 2003;41(6):1281-6.

127. Mason RP. A rationale for combined therapy with a calcium channel blocker and a statin: evaluation of basic and clinical evidence. *Current drug targets* 2005;5(6):489-501.
128. Rodler S, Roth M, Nauck M, Tamm M, Block LH. Ca(2+)-channel blockers modulate the expression of interleukin-6 and interleukin-8 genes in human vascular smooth muscle cells. *Journal of molecular and cellular cardiology* 1995;27(10):2295-302.
129. Kataoka C, Egashira K, Ishibashi M, et al. Novel anti-inflammatory actions of amlodipine in a rat model of arteriosclerosis induced by long-term inhibition of nitric oxide synthesis. *American journal of physiology* 2004;286(2):H768-74.
130. Cominacini L, Pasini AF, Pastorino AM, et al. Comparative effects of different dihydropyridines on the expression of adhesion molecules induced by TNF-alpha on endothelial cells. *Journal of hypertension* 1999;17(12 Pt 2):1837-41.
131. Collins R, Armitage J, Parish S, Sleight P, Peto R. Effects of cholesterol-lowering with simvastatin on stroke and other major vascular events in 20536 people with cerebrovascular disease or other high-risk conditions. *Lancet* 2004;363(9411):757-67.
132. O'Driscoll G, Green D, Taylor RR. Simvastatin, an HMG-coenzyme A reductase inhibitor, improves endothelial function within 1 month. *Circulation* 1997;95(5):1126-31.
133. Guijarro C, Blanco-Colio LM, Ortego M, et al. 3-Hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme a reductase and isoprenylation inhibitors induce apoptosis of vascular smooth muscle cells in culture. *Circulation research* 1998;83(5):490-500.
134. Guijarro C, Blanco-Colio LM, Massy ZA, et al. Lipophilic statins induce apoptosis of human vascular smooth muscle cells. *Kidney international* 1999;71:S88-91.
135. Soma MR, Donetti E, Parolini C, et al. HMG CoA reductase inhibitors. In vivo effects on carotid intimal thickening in normocholesterolemic rabbits. *Arterioscler Thromb* 1993;13(4):571-8.
136. Gellman J, Ezekowitz MD, Sarembock IJ, et al. Effect of lovastatin on intimal hyperplasia after balloon angioplasty: a study in an atherosclerotic hypercholesterolemic rabbit. *Journal of the American College of Cardiology* 1991;17(1):251-9.
137. Erl W, Hristov M, Neureuter M, Yan ZQ, Hansson GK, Weber PC. HMG-CoA reductase inhibitors induce apoptosis in neointima-derived vascular smooth muscle cells. *Atherosclerosis* 2003;169(2):251-8.
138. Budzyn K, Marley PD, Sobey CG. Targeting Rho and Rho-kinase in the treatment of cardiovascular disease. *Trends in pharmacological sciences* 2006;27(2):97-104.
139. Olson MF, Paterson HF, Marshall CJ. Signals from Ras and Rho GTPases interact to regulate expression of p21Waf1/Cip1. *Nature* 1998;394(6690):295-9.
140. Matsushita H, Morishita R, Kida I, et al. Inhibition of growth of human vascular smooth muscle cells by overexpression of p21 gene through induction of apoptosis. *Hypertension* 1998;31(1 Pt 2):493-8.
141. Condorelli G, Ayccock JK, Frati G, Napoli C. Mutated p21/WAF/CIP transgene overexpression reduces smooth muscle cell proliferation, macrophage deposition, oxidation-sensitive mechanisms, and restenosis in hypercholesterolemic apolipoprotein E knockout mice. *Faseb J* 2001;15(12):2162-70.
142. Blanco-Colio LM, Villa A, Ortego M, et al. 3-Hydroxy-3-methyl-glutaryl coenzyme A reductase inhibitors, atorvastatin and simvastatin, induce apoptosis of vascular smooth

- muscle cells by downregulation of Bcl-2 expression and Rho A prenylation. *Atherosclerosis* 2002;161(1):17-26.
143. Danesh FR, Sadeghi MM, Amro N, et al. 3-Hydroxy-3-methylglutaryl CoA reductase inhibitors prevent high glucose-induced proliferation of mesangial cells via modulation of Rho GTPase/ p21 signaling pathway: Implications for diabetic nephropathy. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2002;99(12):8301-5.
144. Muller C, Kiehl MG, van de Loo J, Koch OM. Lovastatin induces p21WAF1/Cip1 in human vascular smooth muscle cells: influence on protein phosphorylation, cell cycle, induction of apoptosis, and growth inhibition. *International journal of molecular medicine* 1999;3(1):63-8.
145. Laufs U, Marra D, Node K, Liao JK. 3-Hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase inhibitors attenuate vascular smooth muscle proliferation by preventing rho GTPase-induced down-regulation of p27(Kip1). *The Journal of biological chemistry* 1999;274(31):21926-31.
146. Werner M, Sacher J, Hohenegger M. Mutual amplification of apoptosis by statin-induced mitochondrial stress and doxorubicin toxicity in human rhabdomyosarcoma cells. *British journal of pharmacology* 2004;143(6):715-24.
147. Blanc-Brude OP, Yu J, Simosa H, Conte MS, Sessa WC, Altieri DC. Inhibitor of apoptosis protein survivin regulates vascular injury. *Nature medicine* 2002;8(9):987-94.
148. Xu YG, Zhou SH, Li YG, et al. The mechanism underlying vascular smooth muscle cell apoptosis induced by atorvastatin may be mainly associated with down-regulation of survivin expression. *Cardiovascular drugs and therapy / sponsored by the International Society of Cardiovascular Pharmacotherapy* 2007;21(3):145-53.
149. Erl W. Atorvastatin-induced downregulation of survivin and vascular smooth muscle cell apoptosis: a causal relationship in restenosis? *Cardiovascular drugs and therapy / sponsored by the International Society of Cardiovascular Pharmacotherapy* 2007;21(3):141-4.
150. Marchesi S, Lupattelli G, Siepi D, et al. Short-term atorvastatin treatment improves endothelial function in hypercholesterolemic women. *Journal of cardiovascular pharmacology* 2000;36(5):617-21.
151. Laufs U, Wassmann S, Hilgers S, Ribaldo N, Bohm M, Nickenig G. Rapid effects on vascular function after initiation and withdrawal of atorvastatin in healthy, normocholesterolemic men. *The American journal of cardiology* 2001;88(11):1306-7.
152. Frick M, Alber HF, Hugel H, Schwarzacher SP, Pachinger O, Weidinger F. Short- and long-term changes of flow-mediated vasodilation in patients under statin therapy. *Clinical cardiology* 2002;25(6):291-4.
153. Alber HF, Frick M, Sussenbacher A, et al. Effect of atorvastatin on peripheral endothelial function and systemic inflammatory markers in patients with stable coronary artery disease. *Wiener medizinische Wochenschrift (1946)* 2007;157(3-4):73-8.
154. Zhou MS, Jaimes EA, Raj L. Atorvastatin prevents end-organ injury in salt-sensitive hypertension: role of eNOS and oxidant stress. *Hypertension* 2004;44(2):186-90.

155. Mondo CK, Yang WS, Zhang N, Huang TG. Anti-oxidant effects of atorvastatin in dexamethasone-induced hypertension in the rat. *Clinical and experimental pharmacology & physiology* 2006;33(11):1029-34.
156. Wassmann S, Laufs U, Baumer AT, et al. HMG-CoA reductase inhibitors improve endothelial dysfunction in normocholesterolemic hypertension via reduced production of reactive oxygen species. *Hypertension* 2001;37(6):1450-7.
157. Laufs U, Liao JK. Direct vascular effects of HMG-CoA reductase inhibitors. *Trends in cardiovascular medicine* 2000;10(4):143-8.
158. Laufs U, Liao JK. Post-transcriptional regulation of endothelial nitric oxide synthase mRNA stability by Rho GTPase. *The Journal of biological chemistry* 1998;273(37):24266-71.
159. Brouet A, Sonveaux P, Dessy C, Moniotte S, Balligand JL, Feron O. Hsp90 and caveolin are key targets for the proangiogenic nitric oxide-mediated effects of statins. *Circulation research* 2001;89(10):866-73.
160. Feron O, Dessy C, Desager JP, Balligand JL. Hydroxy-methylglutaryl-coenzyme A reductase inhibition promotes endothelial nitric oxide synthase activation through a decrease in caveolin abundance. *Circulation* 2001;103(1):113-8.
161. Liao JK, Shin WS, Lee WY, Clark SL. Oxidized low-density lipoprotein decreases the expression of endothelial nitric oxide synthase. *The Journal of biological chemistry* 1995;270(1):319-24.
162. Tamai O, Matsuoka H, Itabe H, Wada Y, Kohno K, Imaizumi T. Single LDL apheresis improves endothelium-dependent vasodilatation in hypercholesterolemic humans. *Circulation* 1997;95(1):76-82.
163. Wagner AH, Kohler T, Ruckschloss U, Just I, Hecker M. Improvement of nitric oxide-dependent vasodilatation by HMG-CoA reductase inhibitors through attenuation of endothelial superoxide anion formation. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 2000;20(1):61-9.
164. Wassmann S, Laufs U, Muller K, et al. Cellular antioxidant effects of atorvastatin in vitro and in vivo. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 2002;22(2):300-5.
165. Ichihara A, Hayashi M, Koura Y, Tada Y, Kaneshiro Y, Saruta T. Long-term effects of statins on arterial pressure and stiffness of hypertensives. *Journal of human hypertension* 2005;19(2):103-9.
166. Verschuren L, Kleemann R, Offerman EH, et al. Effect of low dose atorvastatin versus diet-induced cholesterol lowering on atherosclerotic lesion progression and inflammation in apolipoprotein E*3-Leiden transgenic mice. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 2005;25(1):161-7.
167. Delsing DJ, Jukema JW, van de Wiel MA, et al. Differential effects of amlodipine and atorvastatin treatment and their combination on atherosclerosis in ApoE*3-Leiden transgenic mice. *Journal of cardiovascular pharmacology* 2003;42(1):63-70.
168. Kleemann R, Verschuren L, de Rooij BJ, et al. Evidence for anti-inflammatory activity of statins and PPARalpha activators in human C-reactive protein transgenic mice in vivo and in cultured human hepatocytes in vitro. *Blood* 2004;103(11):4188-94.

169. Dai Q, Xu M, Yao M, Sun B. Angiotensin AT1 receptor antagonists exert anti-inflammatory effects in spontaneously hypertensive rats. *British journal of pharmacology* 2007;152(7):1042-8.
170. Marchesi C, Paradis P, Schiffrin EL. Role of the renin-angiotensin system in vascular inflammation. *Trends in pharmacological sciences* 2008;29(7):367-74.
171. Ichiki T, Takeda K, Tokunou T, et al. Downregulation of angiotensin II type 1 receptor by hydrophobic 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase inhibitors in vascular smooth muscle cells. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 2001;21(12):1896-901.
172. Mason RP. Scientific rationale for combination of a calcium channel antagonist and an HMG-CoA reductase inhibitor: a new approach to risk factor management. *Drugs* 2008;68(7):885-900.
173. Sever P, Dahlof B, Poulter N, et al. Potential synergy between lipid-lowering and blood-pressure-lowering in the Anglo-Scandinavian Cardiac Outcomes Trial. *European heart journal* 2006;27(24):2982-8.
174. Cohn J, Neutel J, Houston H. Early improvements in vascular compliance following coadministration of amlodipine and atorvastatin in patients with concomitant hypertension and dyslipidemia: the Avalon Arterial Wall Compliance (AWC) trial. In: 2005 ASoHtSMM-, ed. San Francisco; 2005.
175. Leibovitz E, Beniashvili M, Zimlichman R, Freiman A, Shargorodsky M, Gavish D. Treatment with amlodipine and atorvastatin have additive effect in improvement of arterial compliance in hypertensive hyperlipidemic patients. *Am J Hypertens* 2003;16(9 Pt 1):715-8.
176. Fogari R, Preti P, Zoppi A, et al. Effects of amlodipine-atorvastatin combination on inflammation markers and insulin sensitivity in normocholesterolemic obese hypertensive patients. *European journal of clinical pharmacology* 2006;62(10):817-22.
177. Borghi C, Dormi A, Veronesi M, Immordino V, Ambrosioni E. Use of lipid-lowering drugs and blood pressure control in patients with arterial hypertension. *Journal of clinical hypertension (Greenwich, Conn)* 2002;4(4):277-85.
178. Mason RP. A rationale for combination therapy in risk factor management: a mechanistic perspective. *The American journal of medicine* 2005;118 Suppl 12A:54-61.
179. 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. *British journal of pharmacology* 2004;142(5):912-8.
180. Sterio DC. The unbiased estimation of number and sizes of arbitrary particles using the disector. *Journal of microscopy* 1984;134(Pt 2):127-36.
181. Mulvany MJ, Baandrup U, Gundersen HJ. Evidence for hyperplasia in mesenteric resistance vessels of spontaneously hypertensive rats using a three-dimensional disector. *Circulation research* 1985;57(5):794-800.
182. Li Z, Iwai M, Wu L, et al. Fluvastatin enhances the inhibitory effects of a selective AT1 receptor blocker, valsartan, on atherosclerosis. *Hypertension* 2004;44(5):758-63.
183. Horiuchi M, Cui TX, Li Z, Li JM, Nakagami H, Iwai M. Fluvastatin enhances the inhibitory effects of a selective angiotensin II type 1 receptor blocker, valsartan, on vascular neointimal formation. *Circulation* 2003;107(1):106-12.

184. Schwartz SM, deBlois D, O'Brien ER. The intima. Soil for atherosclerosis and restenosis. *Circulation research* 1995;77(3):445-65.
185. Bennett MR, Evan GI, Schwartz SM. Apoptosis of human vascular smooth muscle cells derived from normal vessels and coronary atherosclerotic plaques. *The Journal of clinical investigation* 1995;95(5):2266-74.
186. Boutouyrie P, Bussy C, Lacolley P, Girerd X, Laloux B, Laurent S. Association between local pulse pressure, mean blood pressure, and large-artery remodeling. *Circulation* 1999;100(13):1387-93.
187. Laurent S, Tropeano AI, Boutouyrie P. Pulse pressure reduction and cardiovascular protection. *J Hypertens Suppl* 2006;24(3):S13-8.
188. Levy BI, Babalis D, Lacolley P, Poitevin P, Safar ME. Cardiac hypertrophy and characteristic impedance in spontaneously hypertensive rats. *J Hypertens Suppl* 1988;6(4):S110-1.
189. Safar ME, Laurent P. Pulse pressure and arterial stiffness in rats: comparison with humans. *American journal of physiology* 2003;285(4):H1363-9.
190. Franklin SS, Larson MG, Khan SA, et al. Does the relation of blood pressure to coronary heart disease risk change with aging? The Framingham Heart Study. *Circulation* 2001;103(9):1245-9.
191. Glorioso N, Troffa C, Filigheddu F, et al. Effect of the HMG-CoA reductase inhibitors on blood pressure in patients with essential hypertension and primary hypercholesterolemia. *Hypertension* 1999;34(6):1281-6.
192. Abetel G, Poget PN, Bonnabry JP. [Hypotensive effect of an inhibitor of cholesterol synthesis (fluvastatin). A pilot study]. *Schweizerische medizinische Wochenschrift* 1998;128(7):272-7.
193. Vaskonen T, Mervaala E, Krogerus L, et al. Cardiovascular effects of chronic inhibition of nitric oxide synthesis and dietary salt in spontaneously hypertensive rats. *Hypertens Res* 1997;20(3):183-92.
194. Varagic J, Jerkic M, Jovovic D, et al. Regional hemodynamics after chronic nitric oxide inhibition in spontaneously hypertensive rats. *The American journal of the medical sciences* 2000;320(3):171-6.
195. Sventek P, Li JS, Grove K, Deschepper CF, Schiffrin EL. Vascular structure and expression of endothelin-1 gene in L-NAME-treated spontaneously hypertensive rats. *Hypertension* 1996;27(1):49-55.
196. Kalayci R, Kaya M, Elmas I, et al. Effects of atorvastatin on blood-brain barrier permeability during L-NAME hypertension followed by angiotensin-II in rats. *Brain research* 2005;1042(2):184-93.
197. Mason RP, Kubant R, Heeba G, et al. Synergistic Effect of Amlodipine and Atorvastatin in Reversing LDL-Induced Endothelial Dysfunction. *Pharmaceutical research* 2008;25(8):1798-806.
198. Cilla DD, Jr., Whitfield LR, Gibson DM, Sedman AJ, Posvar EL. Multiple-dose pharmacokinetics, pharmacodynamics, and safety of atorvastatin, an inhibitor of HMG-CoA reductase, in healthy subjects. *Clinical pharmacology and therapeutics* 1996;60(6):687-95.

199. Dostal LA, Whitfield LR, Anderson JA. Fertility and general reproduction studies in rats with the HMG-CoA reductase inhibitor, atorvastatin. *Fundam Appl Toxicol* 1996;32(2):285-92.