

Université de Montréal

Régulation pharmacologique de l'apoptose dans les organes-cibles de l'hypertension

Par

Bun-Seng Tea

Département de Pharmacologie

Faculté de Médecine

Thèse présentée à la Faculté des études supérieures
en vue de l'obtention du grade de
Philosophiae Doctor (Ph.D.)
en pharmacologie

Décembre 2000

© Bun-Seng Tea, 2000



W
4
U58
2001
v. 010

LISTE DES CO-AUTEURS

DES ARTICLES INCLUS DANS LA THÈSE DE DOCTORAT INTITULÉE :

« Régulation pharmacologique de l'apoptose dans les organes-cibles de l'hypertension »

par

Bun-Seng Tea

Département de Pharmacologie
Faculté de Médecine
Université de Montréal

CO-AUTEURS :

1. Denis deBlois
2. Pavel Hamet
3. Pierre Moreau
4. Johanne Tremblay
5. Than Vinh Dam
6. Shant der Sarkissian
7. Rhian M. Touyz

Université de Montréal
Faculté des études supérieures

Cette thèse intitulée :

**Régulation pharmacologique de l'apoptose dans les organes-cibles de
l'hypertension**

Présentée par :

Bun-Seng Tea

a été évaluée par un jury composé des personnes suivantes :

Dr. Martin G. Sirois	:	présidente du jury
Dr. Denis deBlois	:	directeur de recherche
Dr. Pavel Hamet	:	co-directeur de recherche
Dre. Chantal Lambert	:	membre du jury
Dr. Pedro D'Orléans-Juste	:	examineur externe
Dr. Réjean Couture	:	représentant du doyen
Thèse acceptée le	:	19 décembre 2000

SOMMAIRE

Les maladies cardiovasculaires représentent les principales causes de mortalité au Canada, avec 38% des causes de décès. De nombreuses données épidémiologiques ont démontré que l'hypertension systolique et / ou diastolique, arbitrairement définie comme supérieure à 140 / 90 mmHg, constitue un facteur de risque important des pathologies vasculaires, cardiaques, cérébrales, rénales et périphériques. L'hypertrophie cardiovasculaire est une caractéristique importante de l'hypertension. Il est possible que l'hypertrophie des organes qui est associée à une augmentation de la réplication d'ADN (hyperplasie cellulaire) soit beaucoup moins facilement réversible que l'hypertrophie due uniquement à une augmentation de la synthèse protéique sans synthèse d'ADN *de novo*. Ainsi, dans l'aorte, le cœur et les reins, le contenu en ADN (dû à l'hyperplasie ou la polyploïdie) peut être considéré comme une mémoire des épisodes antérieures de la croissance cardiovasculaire, contribuant à la persistance de l'hypertension. La régression de l'hypertrophie cardiovasculaire est maintenant considérée comme une cible thérapeutique pour réduire la morbidité et la mortalité associées à l'hypertension. Par contre, les mécanismes de la régression de l'hypertrophie cardiovasculaire par les différentes classes d'agents antihypertenseurs sont encore mal connus.

L'apoptose, qui est une forme ubiquitaire et hautement régulée de la mort cellulaire, est impliquée dans la morphogenèse et l'homéostasie tissulaire en agissant comme la contrepartie essentielle de la réplication cellulaire. La signification de l'apoptose a été reconnue dans divers domaines de physiopathologie, incluant le cancer et les maladies dégénératives. Cependant, dans le domaine de la biologie cardiovasculaire, l'apoptose est un phénomène nouvellement reconnu avec des implications potentielles dans la structure cardiovasculaire, pouvant résulter en une hypertrophie de l'organe, une atrophie ou un remodelage tissulaire comme conséquence de l'augmentation du renouvellement cellulaire.

L'objectif de mon projet de recherche de doctorat se concentre sur la caractérisation des paramètres de la croissance et de la mort cellulaire par apoptose au cours de la régression de l'hypertrophie cardiovasculaire en réponse à des agents antihypertenseurs.

Dans l'hypertension génétique, plusieurs équipes incluant la nôtre, ont décrit la capacité élevée de la prolifération des cellules musculaires lisses *in vitro* et une hyperplasie cardiaque chez les rats néonataux. Ces caractéristiques résultent en un développement de l'hypertrophie cardiovasculaire au stade adulte. Or, les études initiales dans notre laboratoire ont permis de démontrer que l'augmentation de la croissance dans les organes cardiovasculaires (aorte, cœur et rein) hypertendus adultes se produisait en parallèle à une augmentation de l'apoptose, suggérant un équilibre compensatoire entre la réplication et l'élimination cellulaire dans le maintien de l'homéostasie tissulaire.

Les résultats de mon projet de recherche ont démontré pour la première fois que dans le modèle de rats spontanément hypertendus (SHR), l'apoptose des cellules musculaires lisses (CML) contribuait aussi à la régression de l'hypertrophie vasculaire en réponse à des agents antihypertenseurs spécifiques (l'antagoniste des canaux calciques nifédipine ou les bloqueurs de la voie de l'angiotensine, comme le losartan ou l'énalapril, mais pas le vasodilatateur non-spécifique hydralazine, le diurétique hydrochlorothiazide ou l'antagoniste β -adrénergique propranolol). Les agents qui produisaient une régression vasculaire, induisaient aussi une mort cellulaire significative des CML par apoptose avant de réduire la synthèse d'ADN, et indépendamment de la réduction de la pression artérielle. De façon intéressante, l'augmentation de l'apoptose en réponse à la pharmacothérapie se produisait de façon transitoire et précoce dans la séquence des changements menant à la régression vasculaire.

Nous avons fait des observations similaires dans le rein et le cœur au cours de la régression de l'hypertrophie chez le SHR. Dans ce dernier cas, indépendamment de la classe d'agents antihypertenseurs, la stimulation de l'apoptose cardiaque s'est concentrée de façon spécifique dans la région sub-épicaudique du cœur. De plus, à la lumière de nos résultats, l'apoptose cardiovasculaire semble être régulée de façon spécifique aux organes

par des agents antihypertenseurs *in vivo*. Ainsi, il est remarquable que l'apoptose ait été stimulée dans le cœur des rats SHR traités au propranolol bien que ce β -bloqueur n'ait pas affecté l'apoptose aortique chez les mêmes animaux. De plus, l'utilisation d'un diurétique (hydrochlorothiazide) a stimulé l'apoptose dans le rein sans affecter le cœur ou l'aorte.

Par ailleurs, parce qu'un blocage des récepteurs AT₁ de l'angiotensine II (Ang II) *in vivo* augmente l'Ang II plasmatique, nous nous sommes également intéressés à examiner la contribution relative des récepteurs de type AT₁ et AT₂ dans la modulation de la croissance et de l'apoptose des cellules musculaires lisses aortiques des rats SHR *in vivo*. Grâce à notre modèle, nous avons démontré pour la première fois que la stimulation des récepteurs AT₂ médiait l'apoptose des cellules musculaires lisses *in vivo* durant la régression de l'hypertrophie vasculaire en réponse à un antagoniste des récepteurs AT₁ de l'Ang II. Cet effet a été transitoire et a été dissocié de la réduction de la réplication d'ADN des cellules musculaires lisses et des effets sur la pression artérielle. Nous avons fait des observations similaires dans l'hypertrophie cardiaque en régression en réponse à un blocage des récepteurs AT₁.

De plus, nous avons aussi examiné l'efficacité à court et à long terme d'un bloqueur calcique dans la régulation de la croissance cellulaire et l'apoptose durant le remodelage cardiovasculaire chez les rats génétiquement hypertendus SHR et normotendus WKY (Wistar-Kyoto). La stimulation de l'apoptose aortique et cardiaque par l'antagoniste des canaux calciques nifédipine chez le SHR a été transitoire après une semaine de traitement. Celle-ci a été accompagnée d'une réduction significative de la synthèse et du contenu en ADN jusqu'aux niveaux observés chez les WKY. Ces événements ont précédé la réduction soutenue et significative de la masse cardiovasculaire. De façon intéressante, un traitement intermittent des rats SHR avec le même antagoniste calcique a augmenté l'accumulation des fragments d'ADN apoptotiques sans toutefois diminuer davantage le contenu en ADN. Contrairement aux SHR, les rats WKY n'ont démontré aucun changement dans la masse cardiovasculaire, la croissance ou l'apoptose en réponse à la nifédipine. Les résultats de cette étude suggèrent que l'apoptose est contrôlée

différemment dans l'aorte et le cœur du WKY comparativement au SHR. De plus, un traitement intermittent pourrait résulter en une accumulation successive de fragments d'ADN apoptotiques, contrairement à un traitement continu.

En conclusion, les approches pharmacologiques utilisées dans ce projet de doctorat ont clairement démontré pour la première fois que 1) l'apoptose représente un nouveau mécanisme de la régression de la masse cardiovasculaire dans l'hypertension en réponse à différents agents antihypertenseurs, 2) les récepteurs AT₂ de l'Ang II médient l'apoptose des CML *in vivo* et 3) l'effet sur l'apoptose et la croissance est atténuée et s'adapte lors d'un traitement intermittent avec un antagoniste calcique. La compréhension du rôle de l'apoptose dans le remodelage cardiovasculaire pourrait nous permettre d'identifier de nouvelles approches thérapeutiques en vue de réduire la morbidité et la mortalité associées à l'hypertension artérielle et ses complications.

TABLE DES MATIÈRES

Sommaire.....	iii
Table des matières.....	vi
Liste des tableaux.....	xii
Liste des figures.....	xiii
Liste des abréviations.....	xiv
Dédicace.....	xviii
Remerciements.....	xix
CHAPITRE I : INTRODUCTION	1
1.0 L'hypertension artérielle.....	2
1.1. Définition.....	2
1.2. Étiologie de l'hypertension.....	2
1.3. Mécanismes de contrôle de la pression sanguine.....	3
1.3.1. Hémodynamie de l'hypertension artérielle.....	2
1.3.2. Système nerveux central et autonome.....	3
1.3.2.1. Régulation de la pression à court terme.....	4
1.3.2.2. Régulation de la pression à long terme.....	4
1.3.3. Système rénine-angiotensine-aldostérone (RAS).....	5
1.3.3.1. Biologie moléculaire du système RAS.....	8
1.3.3.1.1. Angiotensinogène.....	8
1.3.3.1.2. Rénine.....	8
1.3.3.1.3. L'enzyme de conversion de l'angiotensine.....	9
1.3.3.1.4. Les systèmes autres que le RAS.....	9
1.3.3.1.5. Mécanismes cellulaires de l'action de l'Ang II.....	9
1.3.3.1.5.1. Les récepteurs de l'Ang II.....	10
1.3.3.1.5.2. Distribution tissulaire.....	12
1.3.3.1.5.3. Les récepteurs AT ₁	13

1.3.3.1.5.4. Les récepteurs AT ₂	13
1.4. Modèles génétiques d'hypertension.....	16
1.4.1. Développement des souches de rats hypertendus.....	16
1.4.2. Le SHR.....	16
1.5. Dommages aux organes-cibles dans l'hypertension.....	17
1.5.1. Le système vasculaire.....	17
1.5.1.1. Structure artérielle et fonctions.....	18
1.5.1.1.1. L'adventis.....	20
1.5.1.1.2. La média.....	20
1.5.1.1.3. Contraction et relaxation.....	20
1.5.1.1.4. La média.....	22
1.5.1.1.5. L'endothélium.....	22
1.5.1.2. Anomalies structurales dans l'hypertension.....	23
1.5.1.2.1. Remodelage vasculaire.....	23
1.5.1.2.1.1. Les grosses artères.....	26
1.5.1.2.1.2. Les petites artères.....	27
1.5.1.2.2. Mécanismes d'hypertrophie et d'hyperplasie.....	28
1.5.1.2.2.1. Les facteurs mécaniques.....	28
1.5.1.2.2.2. Le système nerveux sympathique.....	29
1.5.1.2.2.3. Le système rénine-angiotensine.....	30
1.5.1.2.2.4. Autres.....	31
1.5.1.2.3. Pharmacologie du remodelage vasculaire.....	31
1.5.2. Le coeur.....	37
1.5.2.1. Masse ventriculaire et développement de l'hypertrophie...	37
1.5.2.2. Fonction cardiaque.....	37
1.5.2.2.1. Hémodynamie ventriculaire et degré d'hypertrophie..	37
1.5.2.3. Anomalies structurales dans l'hypertension.....	38
1.5.2.3.1. La structure et les anomalies cardiaques.....	38
1.5.2.3.2. Croissance des types cellulaires.....	43
1.5.2.3.3. L'hypertrophie pathologique.....	46

1.5.2.3.4. Les facteurs trophiques.....	48
1.5.2.3.5. Pharmacologie du remodelage cardiaque.....	49
1.5.3. Le rein.....	57
1.5.3.1. Fonction rénale.....	57
1.5.3.2. Structure et anomalie rénale dans l'hypertension.....	58
1.5.3.3. Pharmacologie du remodelage rénal.....	61
1.6. Traitement pharmacologique de l'hypertension.....	64
1.6.1. Antihypertenseurs à action centrale.....	64
1.6.1.1. Mécanisme d'action.....	64
1.6.2. Diurétiques.....	66
1.6.2.1. Thiazides.....	66
1.6.2.2. Diurétiques de l'anse	67
1.6.2.3. Diurétiques épargneurs de potassium.....	67
1.6.2.4. Mécanismes antihypertenseurs des diurétiques.....	68
1.6.3. Antagonistes β -adrénergiques.....	68
1.6.4. Antagonistes α -adrénergiques.....	71
1.6.5. Vasodilatateurs.....	72
1.6.6. Antagonistes calciques.....	73
1.6.6.1. Classification.....	73
1.6.6.2. Les canaux calciques.....	74
1.6.6.3. Utilisation dans l'hypertension.....	76
1.6.7. Inhibiteurs de l'enzyme de conversion de l'Ang I.....	76
1.6.8. Antagonistes des récepteurs AT ₁ de l'Ang II.....	79
2.0. La prolifération et l'apoptose.....	83
2.1. Le cycle cellulaire.....	83
2.1.1. Mesure de la prolifération.....	83
2.2. L'apoptose.....	85
2.2.1. Caractéristiques de l'apoptose.....	85
2.2.2. Mécanismes moléculaires.....	87
2.2.2.1. Les caspases.....	87

2.2.2.2. La famille Bcl-2.....	90
2.2.2.3. p53.....	91
2.2.3. Méthodes utilisées pour évaluer l'apoptose.....	92
Objectifs du projet de recherche.....	93
CHAPITRE II : RÉSULTATS.....	98
<i>Article 1 : Smooth muscle apoptosis during vascular régression in spontaneously hypertensive rats.....</i>	99
<i>Article 2 : Apoptosis during regression of cardiac hypertrophy in spontaneously hypertensive rats : temporal regulation and spatial heterogeneity.....</i>	110
<i>Article 3 : Apoptosis during regression of renal mass in spontaneously hypertensive rats.....</i>	118
<i>Article 4 : Proapoptotic and growth-inhibitory role of angiotensine II receptor type 2 in vascular smooth muscle cells of spontaneously hypertensive rats in vivo.....</i>	138
<i>Article 5 : Nifedipine regulation of cardiovascular growth and apoptosis in SHR and WKY rats.....</i>	144
CHAPITRE III : CONCLUSION GÉNÉRALE ET IMPLICATION CLINIQUE.....	169
1.0. Fenêtre apoptotique : mécanisme.....	170
1.1. Induction de la fenêtre d'apoptose.....	171
1.2. Fermeture de la fenêtre d'apoptose.....	174
2.0. Mécanisme de l'apoptose durant la régression de l'hypertrophie cardiovasculaire.....	176
2.1. Régulation cellules-spécifiques de l'apoptose.....	177
2.1.1. Hypertrophie cardiaque.....	177
2.1.2. Hypertrophie vasculaire.....	180
2.2. Apoptose différentielle des organes.....	182

2.2.1. Spécificité anatomique de l'apoptose.....	182
3.0. Rôle des récepteurs AT ₂ de l'aorte <i>in vivo</i>	184
3.1. Mécanismes indépendant des récepteurs AT ₂	188
3.2. Mécanismes dépendant des récepteurs AT ₂	189
3.3. Rôle des récepteurs AT ₂ dans le cœur.....	191
4.0. Implication clinique.....	192
4.1. L'importance de la régression de l'hypertrophie cardiovasculaire.....	192
4.2. Les voies apoptotiques comme cibles thérapeutiques potentielles dans les maladies cardiovasculaires.....	194
4.3. Rôle apoptotique des récepteurs AT ₂ : implications cliniques.....	196
5.0. Conclusion générale.....	199
BIBLIOGRAPHIE.....	200
ANNEXE.....	235

LISTE DES TABLEAUX

	<u>Page</u>
<u>Tableau I</u> : <i>Critères de classification des sous-types de récepteurs de l'angiotensine II</i>	11
<u>Tableau II</u> : <i>Segments du système artériel et effets de l'hypertension sur la croissance</i>	25
<u>Tableau III</u> : <i>Nécrose et apoptose : caractéristiques</i>	86

LISTE DES FIGURES

	<u>Page</u>
<u>Figure 1.</u> <i>Représentation schématique du système rénine-angiotensine-aldostérone.....</i>	7
<u>Figure 2.</u> <i>Représentation schématique de l'arbre vasculaire et les caractéristique anatomiques et fonctionnelles de ces segments.....</i>	19
<u>Figure 3.</u> <i>Représentation schématique de la structure d'un artère musculaire normale (A) et d'une artère élastique normale (B).....</i>	21
<u>Figure 4.</u> <i>Représentation des formes possibles d'hypertrophie cardiaque (irrégulière, concentrique et eccentric) dans l'hypertension.....</i>	45
<u>Figure 5.</u> <i>Sites d'action des classes majeures d'agents antihypertenseurs.....</i>	65
<u>Figure 6.</u> <i>Le cycle cellulaire et mesures de la prolifération.....</i>	84
<u>Figure 7.</u> <i>Hypothèse du mécanisme de l'apoptose durant la régression de l'hypertrophie cardiaque : Mesure des types cellulaires apoptotiques en fonction du temps durant la régression</i>	178
<u>Figure 8.</u> <i>Rôle des récepteurs AT₁ et AT₂ dans les cellules cardiaques et les cellules musculaires lisses.....</i>	190

LISTE DES ABRÉVIATIONS

ACTH	(hormone adrénocorticothyroïdienne)
ADN	(acide déoxyribonucléique)
AMPc	(adénosine monophosphate cyclique)
Ang II	(angiotensine II (octapeptide, 1-8))
Ang III	(angiotensine III (fragment 1-7))
Ang IV	(angiotensine IV (fragment 3-7))
ANOVA	(analyse de variance)
Apaf	<i>apoptosis protease ced-activating factor</i>
ARN	(acide ribonucléique)
AT ₁	(sous-type AT ₁ des récepteurs de l'Ang II)
AT ₂	(sous-type AT ₂ des récepteurs de l'Ang II)
ATP	(adenosine triphosphate)
AVP	(vasopressine)
bp	<i>base pairs</i>
BrDu	(bromodéoxyuridine)
BN	<i>Brown-Norway rat</i>
BPM	(battements par minute)
cAMP	<i>cyclic adenylate monophosphate</i>
CAM	(calmoduline)
CAM kinase	(protéine kinase Ca ²⁺ dépendante de la calmoduline)
Ca ²⁺	(calcium)
caspase	(protéase à cystéine clivant après l'acide aspartique)
CCB	<i>calcium channel blocker</i>
C. elegans	<i>Caenorhabditis elegans</i>
cGMP	<i>cyclic guanylate monophosphate</i>
CML	(cellules musculaires lisses)
CoCl ₂	(dichlorure de cobalt)

CO ₂	(dioxyde de carbone)
cpm	(coups par minute)
CSA	(aire de section transverse)
CVO	<i>circumventricular organ</i>
DAG	(1,2-diacylglycérol)
DBP	(pression diastolique)
DISC	<i>death-inducing signaling complex</i>
dCTP	<i>deoxy-cytosine triphosphate</i>
DTT	(dithiothéitol)
DOCA	<i>deoxycorticosterone acetate</i>
ECA	(enzyme de conversion de l'angiotensine I)
EDRF	<i>endothelium derived relaxing factor</i>
EDTA	<i>ethylenediamine tetracetic acid</i>
EGF	<i>epidermal growth factor</i>
FADD	<i>Fas-associated « death domain » protein</i>
bFGF	<i>basic fibroblast growth factor</i>
FLICE	<i>FADD-like ICE</i>
GMPc	(guanosine monophosphate cyclique)
HTA	(hypertension artérielle)
HTCZ	(hydrochlorothiazide)
IGF-1	<i>insulin growth factor 1</i>
ICE	<i>interleukin-1β-converting enzyme</i>
iECA	(inhibiteur de l'ECA)
InsP ₃	(inositol 1.4.5-triphosphate)
kDa	(kilodaltons)
KO	<i>knock-out</i>
LHRH	<i>luteinizing hormone releasing hormone</i>
MAP	<i>mitogen-activated protein</i>
MAPK	<i>mitogen-activated protein kinase</i>
mCi	(milliCurrie)

mg	(milligramme)
min.	(minutes)
MOC	<i>myogenic-operated calcium channels</i>
NO	(oxyde nitrique)
NTS	<i>nucléus tractus solitarius</i>
O ₂	(oxygène)
O.D.	(densité optique)
³² P	(phosphore 32)
PBS	<i>phosphate buffer solution</i>
PD123319	(composé de Parke-Davis)
PDGF	<i>platelet-derived growth factor</i>
PIP ₂	<i>phosphatidylinositol 4,5-biphosphate</i>
PIP ₃	<i>phosphatidylinositol 3,4,5-biphosphate</i>
PLC	(phospholipase C)
PLD	(phospholipase D)
PLA ₂	(phospholipase A ₂)
RAS	<i>renin-angiotensin system</i>
ROC	<i>receptor-operated calcium channels</i>
RT-PCR	<i>reverse-transcriptase polymerase chain reaction</i>
SBP	(pression systolique)
SHR	<i>spontaneously hypertensive rat</i>
SHR-SP	<i>stroke-prone spontaneously hypertensive rat</i>
SDS	<i>sodium dodecyl sulfate</i>
SEM	<i>standard error of the mean</i>
SMOC	<i>second messenger-operated calcium channels</i>
SNC	(système nerveux central)
SNS	(système nerveux sympathique)
tdt	<i>terminal deoxynucleotidyl transferase</i>
TNF	<i>tumor necrosis factor</i>
TRADD	<i>TNF receptor-1 associated «death domain » protein</i>

TUNEL	<i>Tdt-mediated dUTP Nick-End Labeling</i>
ug	(microgramme)
uL	(microlitre)
uM	(micromolaire)
V	(volt)
VOC	<i>voltage-operated calcium channels</i>
WKY	<i>Wistar-Kyoto rat</i>

À mes parent et ma famille...

REMERCIEMENTS

Cette thèse n'aurait jamais été complétée sans le support inestimable de mes deux directeurs de recherche : Dr. Denis deBlois et Dr. Pavel Hamet. Merci Denis pour ton amitié et ton soutien du début jusqu'à la fin ! Merci Pavel pour les conseils de maître ! Ce fut une expérience enrichissante et inoubliable. Mes fleurs sont aussi lancées à Dr. Than Vinh Dam pour sa précieuse collaboration dans tout mes projets, à Dr. Pierre Moreau pour sa camaraderie et son enthousiasme scientifique, à Dr. Yulin Sun pour son expertise en génétique, à Dr. Sergei Orlov pour ses nombreux conseils techniques et à Dr. Johanne Tremblay pour sa collaboration scientifique. Je désire aussi souligner la contribution nécessaire à la réalisation de mes projets de l'équipe technique constituée de Régis Tremblay, Julie Bérubé, Monique Poirier, Nathalie Rousseau, Suzanne Carioto, Carole Long et Gilles Corbeil. Merci également au rayonnement de mes collaborateurs et ami(e)s durant mes quatre années passées au Centre de Recherche de l'Hôtel-Dieu : France Gagnon, Nathalie Thorin-Trescases, Jacinthe Lemay, Pierre Dumas, Sylvie Richard, Dzenka Pausauva, Marc Servant, Constantin Makris, Yatsuhiko Ono, Shant der Sarkissian, Tian Tian Wang, Hou Ying et Darwin Kong. Et finalement, non le moindre, merci à mes parents, frères, sœurs et Ban Ban...pour leur amour et support !

CHAPITRE 1
INTRODUCTION

1. L'hypertension artérielle

1.1 Définition de l'hypertension artérielle

Les maladies cardiovasculaires représentent la principale cause de mortalité au Canada, avec 38% des décès. De nombreuses données épidémiologiques ont montré que l'hypertension systolique et / ou diastolique, définie par consensus comme supérieure à 140 / 90 mmHg, constitue un facteur de risque important des pathologies vasculaires, cardiaques, cérébrales, rénales et périphériques. L'hypertension résulte de l'augmentation du tonus vasculaire périphérique qui conduit à une élévation de la résistance artériolaire et une réduction de la capacitance des veinules. Cette pathologie est d'autant plus dommageable lorsqu'elle est associée à d'autres facteurs de risque tels l'hypercholestérolémie, la résistance à l'insuline, l'obésité, le tabagisme et le sédentarisme. Selon le plus récent rapport du JNC VI « Sixth Report of the Joint National Committee on Detection, Evaluation and Treatment of High Blood Pressure criteria », approximativement 50 millions d'individus ou un adulte sur quatre, souffrent d'hypertension aux États-Unis (Sheps, 1999; Joffres et al., 1997).

1.2. Étiologie de l'hypertension

Même si l'hypertension peut être secondaire à d'autres maladies, plus de 90% des patients hypertendus souffrent d'hypertension essentielle, un désordre d'origine inconnue affectant les mécanismes régulateurs de la pression sanguine. L'âge et une histoire familiale d'hypertension augmentent la probabilité qu'un individu puisse développer la maladie.

Les facteurs environnementaux comme le stress, la consommation élevée de sodium, l'obésité et la cigarette représentent tous des facteurs prédisposant un individu à développer l'hypertension. Bien que l'on ne connaisse pas exactement la pathogénie de l'hypertension, plusieurs mécanismes ont été proposés dont la contrôle par le système nerveux central, le système nerveux autonome et la régulation hormonale.

1.3. Mécanismes de contrôle de la pression sanguine

1.3.1. Hémodynamie de l'hypertension essentielle

Lorsque la pression artérielle systémique est plus élevée que la normale, il y a une disproportion entre le volume sanguin pompé dans les artères (débit cardiaque) et le diamètre total des artères et artérioles (qui déterminent la résistance totale périphérique). La viscosité du sang peut aussi influencer la pression sanguine étant donné qu'une augmentation de la viscosité pourrait réduire la vitesse du flot contribuant ainsi à augmenter les pressions artérielle et artériolaire. Cependant, les déterminants majeurs de la pression sanguine sont le débit cardiaque et la résistance totale périphérique.

Les premières études sur l'hémodynamie dans l'hypertension humaine ont été effectuées durant les années 40 et 50 chez des patients avec une hypertension sévère (voir revue (Freis, 1960)). Ces patients étaient étudiés au repos et les résultats ont montré un débit cardiaque sous la normale et une augmentation de la résistance totale périphérique. Chez les patients avec une hypertension sévère et une défaillance cardiaque, une haute pression de remplissage du ventricule gauche associée à une élévation de la pression artérielle pulmonaire ont aussi été observées. Ainsi, l'augmentation de la résistance totale périphérique ou la réduction du diamètre artériolaire pourrait être responsable de l'augmentation de la pression artérielle. La réduction de la fonction cardiaque a été considérée comme un phénomène secondaire, due à une élévation chronique de la charge de pression du ventricule gauche (Taylor et al., 1957; Varnauskas, 1955; Werkö and Lagerlöf, 1949).

1.3.2. Les systèmes nerveux central et autonome

Le système nerveux central (SNC) joue un rôle important dans la régulation de la pression artérielle. En contrôlant l'activité du système nerveux autonome périphérique et le relâchement d'hormones, le SNC modifie la pression artérielle de façon aiguë, facilitant ainsi l'homéostasie cardiovasculaire et une réponse appropriée à l'environnement. D'une part, les mécanismes neuronaux, qui sont médiés par les systèmes nerveux sympathique (SNS) et parasympathique, répondent rapidement aux changements métaboliques, mais les réponses sont de courtes durées. D'autre part, les mécanismes humoraux sont médiés par les hormones circulantes et des substances vasoactives produites localement (comme l'angiotensine II et la vasopressine). Les réponses aux facteurs humoraux

peuvent survenir en quelques minutes et durer plusieurs jours. Plusieurs voies neuro-humorales peuvent être impliquées dans le contrôle de la pression artérielle au niveau du SNC dont l'activation du système des barorécepteurs, du système nerveux sympathique et de plusieurs neuromédiateurs comme l'angiotensine II (Ang II) et la vasopressine (AVP).

1.3.2.1. Régulation de la pression artérielle à court terme : Les barorécepteurs

La modulation baroréflexe du système cardiovasculaire a pour fonction de maintenir la pression artérielle dans des limites normales (voir revue (Chalmers and Pilowski, 1991)). Ainsi, une élévation soudaine de la pression artérielle activera les barorécepteurs vasculaires et cardiaques; cette information sera alors transmise par les fibres afférentes aux centres intégrateurs du système nerveux central localisés dans le tronc cérébral. L'intégration de cette information déterminera une réponse inhibitrice sur l'activité des fibres efférentes sympathiques, ce qui permettra de rétablir la pression artérielle à un niveau normal. À l'inverse, une chute de pression produira l'effet opposé, résultant en une activation des fibres sympathiques périphériques et une élévation de la pression artérielle. Dans des conditions normales, l'homéostasie de la pression artérielle est assurée par le fonctionnement harmonieux de cette voie réflexe. Lors d'une hypertension artérielle soutenue, le seuil d'activation de cette voie réflexe se recalibre à un niveau de pression artérielle plus élevé, ce qui a pour conséquence de maintenir la pression artérielle à des niveaux hypertendus.

1.3.2.2. Régulation de la pression artérielle à long terme: Système nerveux autonome

Le système nerveux autonome est très étroitement relié au système cardiovasculaire par un réseau de fibres sympathiques et parasympathiques qui innervent le coeur, les artères et les veines (voir revue (Folkow, 1982)). L'activité des fibres nerveuses et des glandes surrénaliennes est sous le contrôle des centres cardiovasculaires du système nerveux central qui sont modulés par les afférences des barorécepteurs artériels et des récepteurs cardiopulmonaires. Par ailleurs, le système sympathique peut moduler le système cardiovasculaire en stimulant la sécrétion de catécholamines (par la médullosurrénale), qui à leurs tours peuvent atteindre les récepteurs adrénergiques distribués dans les tissus cardiovasculaires. Des observations expérimentales ont montré que le système des baroréflexes s'adapte et qu'il ne peut médier les changements de l'activité sympathique à long terme. Ainsi une dénervation chirurgicale des barorécepteurs artériels augmenterait le niveau basal de l'activité sympathique et donc de la pression artérielle. Or, chez le rat, le lapin, le singe, le babouin

ou le chien chroniquement dénervé en barorécepteurs, il n'y a aucun changement de la pression artérielle ou de l'activité sympathique au bout de 24 heures et à plus long terme (voir revue (Folkow, 1982)). Ces observations suggèrent que les barorécepteurs artériels ne sont pas importants dans la régulation à long terme de la pression artérielle. La distribution ubiquitaire des fibres nerveuses sympathiques centrales et périphériques dans les centres régulateurs cérébraux et hypothalamiques, les sites périphériques des barorécepteurs et à travers le système cardiovasculaire suggère fortement que le système sympathique possède un effet direct sur la régulation de la pression artérielle à court terme ainsi qu'à long terme.

Plusieurs observations ont montré que l'augmentation chronique de l'activité sympathique produit l'hypertension (de Champlain and van Ameringen, 1972). En effet, l'activité sympathique est élevée dans presque toutes les formes d'hypertensions humaine et expérimentale, et la réduction de l'activité sympathique par différents agents pharmacologiques agissant sur le SNC (clonidine, inhibiteur de l'enzyme de conversion, antagoniste β -adrénergique) est associée à une réduction de la pression. De plus, plusieurs études ont montré la contribution importante des catécholamines dans la régulation de la pression artérielle. À cet égard, une augmentation du niveau de norépinéphrine plasmatique a été observée lors du développement de la pression artérielle dans plusieurs modèles expérimentaux d'hypertension artérielle génétique (SHR), d'hypertension induite par le sel (Dahl-sensitive rats) et d'hypertension rénovasculaire (Golblatt) (de Champlain and van Ameringen, 1972). Au niveau du SNC, la destruction des neurones noradrénergiques avec le 6-hydroxydopamine intracérébroventriculaire prévient le développement subséquent de l'hypertension chez le SHR (Oparil et al., 1995). La question est de savoir quels sont les signaux qui assurent l'induction et le maintien de ces changements chroniques de l'activité sympathique. Un des signaux qui pourrait être impliqué dans le SNC est le système rénine-angiotensine, plus particulièrement l'angiotensine II.

1.3.3. Le système rénine-angiotensine

Il y a maintenant plus de cent ans, Tigerstedt et Bergman démontraient que des extraits rénaux de lapin contenaient une substance vasoactive qu'ils ont nommé rénine (Tigerstedt and Bergman, 1898). Plusieurs années plus tard, deux autres groupes indépendants ont suggéré que l'action de la rénine consiste à libérer une substance possédant des propriétés vasoactives (Braun-Menendez et al., 1940; Page and Helmer, 1940). Aujourd'hui cette substance est reconnue comme étant l'angiotensine II

(Ang II). Les effecteurs et partenaires qui se retrouvent entre la rénine et l'Ang II sont maintenant bien caractérisés et l'ensemble porte le nom de système rénine-angiotensine (ou « RAS » pour « renin angiotensin system ») (Timmermans et al., 1993b).

Le RAS joue un rôle important dans la régulation de la pression sanguine de même que dans l'équilibre entre les électrolytes et les fluides. Dans sa définition classique, le RAS stabilise la pression sanguine via le peptide effecteur Ang II généré dans la circulation sanguine par une cascade enzymatique initiée par la rénine sécrétée par les cellules juxtaglomérulaires rénales (Figure 1). Au début de cette cascade, la rénine, une aspartyle protéase clive dans la circulation l'angiotensinogène, une α_2 -globuline produite par le foie. Cette réaction produit un décapeptide, l'Ang I. Ce dernier, pharmacologiquement inactif, est ensuite clivé par l'enzyme de conversion de l'angiotensine I (ECA) ou « angiotensin-converting enzyme », une protéase principalement d'origine endothéliale se retrouvant en très grande quantité dans les poumons. Cette réaction donne lieu à la production de l'Ang II. L'Ang II circulant à un temps de demie-vie très court (10 à 20 secondes) et cela grâce à la présence de protéases (angiotensinases) produisant des fragments inactifs et actifs tels que l'Ang III, l'Ang IV et le fragment 1-7 (Morton, 1993). La présence de ces angiotensinases est essentielle car celles-ci font partie des mécanismes impliqués dans l'arrêt d'un signal physiologique. L'Ang II produit différents effets inducteurs de l'augmentation de la pression artérielle, comme la vasoconstriction, la stimulation de la sécrétion d'aldostérone par les glandes surrénaliennes, la rétention de sodium par le rein et l'intestin, et la régulation à la hausse du tonus sympathique. L'importance du RAS va au-delà de la régulation de la pression sanguine et inclut l'homéostasie cardiovasculaire. Ceci a été prouvé par la valeur thérapeutique des agents interférant avec ce système, notamment les inhibiteurs de l'ECA et les antagonistes des récepteurs de l'Ang II (Timmermans et al., 1993b). De plus, les études génétiques chez l'humain ont démontré que des allèles particuliers des gènes de l'angiotensinogène et de l'ECA sont liés à l'hypertension (Jeunemaitre et al., 1992) et à l'infarctus du myocarde (Cambien et al., 1992).

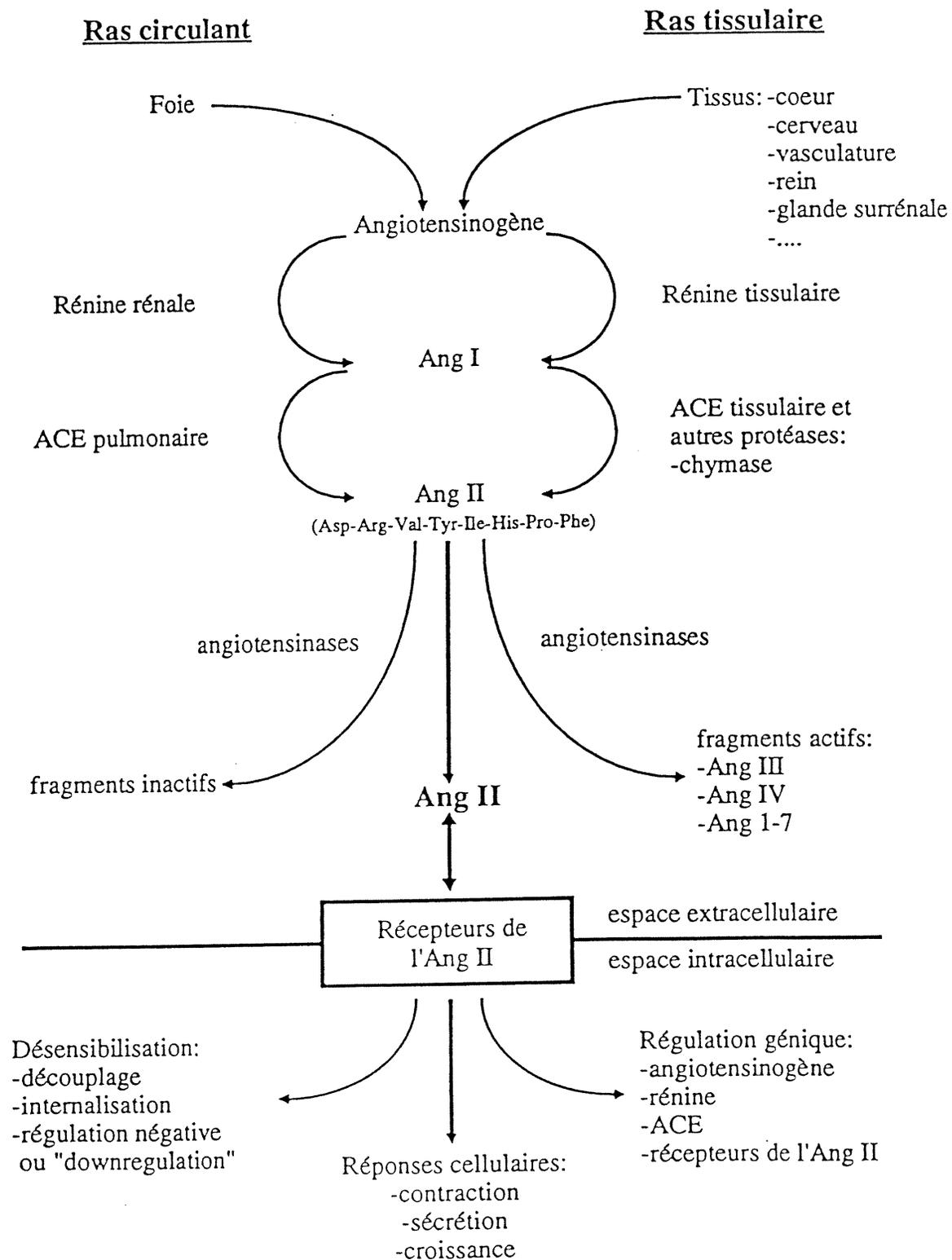


Figure 1: Le système rénine-angiotensine (RAS).
Schéma tiré de Timmermans et al., 1993. Voir le
texte pour les abréviations.

1.3.3.1. Biologie moléculaire et biochimie du système rénine-angiotensine.

1.3.3.1.1. Angiotensinogène

Le sang représente le réservoir principal de cette protéine et les quantités retrouvées sont déterminantes quant à l'activité du RAS. L'angiotensinogène, seul substrat de l'angiotensinogène connu de la rénine, est synthétisée surtout au niveau du foie. Des quantités appréciables d'ARNm ont été notées dans le cerveau, la moelle épinière, le muscle lisse, l'adventis de l'aorte et le mésentère tandis que de plus faibles quantités sont retrouvés dans le rein, la surrénale, l'oreillette, le poumon, le gros intestin, l'estomac et la rate (Campbell and Habener, 1986; Ohkubo et al., 1986).

1.3.3.1.2. La rénine

La rénine est une enzyme qui est synthétisée par des cellules musculaires lisses modifiées de l'artériole afférente rénale (Burt et al., 1985). La rénine est synthétisée à partir d'un précurseur, la prépro-rénine, qui est emmagasinée dans des granules à l'intérieur des cellules de l'artériole afférente. *In vivo*, il est possible que la kallikréine active la conversion de la pro-rénine en rénine. La rénine, sous sa forme mature, est sécrétée principalement par la vasculature rénale, plus précisément par les cellules juxtaglomérulaires. Ces cellules sont particulières puisqu'elles agissent comme des barorécepteurs intra-rénaux qui sont capables de détecter des changements minimes dans la perfusion rénale. Il existe d'autres sites de synthèse où l'on a pu identifier l'ARNm pour la rénine; la surrénale (zona glomerulosa), l'aorte, le foie, les gonades et le cerveau (Burt et al., 1985). La rénine représente l'étape limitante dans la production d'Ang II.

Plusieurs facteurs influencent la sécrétion de la rénine (Hackenthal et al., 1990). Par exemple, une réduction de la perfusion rénal, au niveau des cellules juxtaglomérulaires, est un stimulant puissant de la sécrétion de la rénine. Par contre, l'étirement de l'artériole afférente inhibe la sécrétion de la rénine. De même, une augmentation du sodium dans les tubules rénaux augmente le transport de ce dernier et inhibe la sécrétion de rénine. De plus, les récepteurs β -adrénergiques peuvent stimuler la sécrétion de rénine des cellules juxtaglomérulaires. La vasopressine inhibe cette dernière en augmentant l'influx et la libération de calcium des réserves intracellulaires. L'Ang II via les récepteurs AT_1 contrôle négativement la sécrétion de la rénine sans affecter la pression artérielle

(Timmermans et al., 1993a). Les substances humorales et les électrolytes influencent grandement la sécrétion de la rénine.

1.3.3.1.3. L'enzyme de conversion de l'angiotensine

L'enzyme de conversion de l'angiotensine (ECA) est une protéase contenant du zinc et qui coupe le côté carboxy-terminal de certains petits peptides tels l'Ang I et la bradykinine (voir revue (Timmermans et al., 1993a). Cette protéase a été détectée dans les poumons, les reins, le petit intestin, les ovaires, les testicules, le coeur, les surrénales et le foie. Dans les cellules endothéliales, on la retrouve du côté luminal des membranes plasmiques. On peut aussi détecter sa présence au niveau des cellules épithéliales de la bordure en brosse des cellules du tubule contourné proximal, de l'épithélium du petit intestin et du plexus choroïdien. L'activité de l'enzyme peut être augmentée par l'AMPC, les glucocorticoïdes et la thyroxine et le bFGF (Timmermans et al., 1993a).

1.3.3.1.4. Les systèmes enzymatiques autres que le RAS

La rénine et l'ECA représentent les enzymes classiques du RAS. Cependant, *in vitro*, des voies alternatives peuvent produire de l'Ang II directement à partir de l'angiotensinogène. Ce sont, par exemple, la chymase, la cathepsine G, l'élastase et l'activateur du plasminogène tissulaire. Ces substances pourraient potentiellement contribuer à la génération locale de l'Ang II et servir à l'amplification de la réponse aux sites d'inflammation, contribuant ainsi au contrôle du flux sanguin local, du tonus vasculaire et de la perméabilité vasculaire. Par contre, il n'est pas clair que ces enzymes se comportent de la même manière *in vivo* qu'*in vitro* (Timmermans et al., 1993a).

1.3.3.1.5. Mécanismes cellulaires de l'action de l'Ang II

La pression sanguine, découlant directement de la force qu'exerce le sang sur les parois des vaisseaux sanguins, est contrôlée principalement par le coeur, ainsi que par le diamètre et l'élasticité des vaisseaux sanguins, source principale de résistance lors de la contraction cardiaque. Bien que plusieurs hormones et catécholamines puissent directement réguler les paramètres cardiaques (force de contraction et battements), plusieurs hormones ou peptides vasoactifs dont l'Ang II via l'activation de ses récepteurs spécifiques (comme AT₁ et AT₂) contrôlent la pression artérielle en

influençant la fonction de plusieurs organes et tissus tels que le coeur, le rein et le tissu musculaire lisse qui compose majoritairement le système artériel.

1.3.3.1.5.1. Les récepteurs de l'Ang II

L'Ang II interagit avec les récepteurs spécifiques sur la surface cellulaire pour produire une myriade d'événements physiologiques : la contraction et/ou la croissance des CML vasculaires; le relâchement d'aldostérone, de prostacycline et de catécholamines; la sécrétion de prolactine et d'ACTH; et la glycogénolyse. Le développement récent d'agents pharmacologiques sélectifs pour les sous-types de récepteur de l'Ang II a permis de confirmer les données physiologiques précédentes, suggérant une hétérogénéité dans la population des récepteurs. Deux sous-types majeurs différents des récepteurs de l'Ang II ont été décrit sur la base de leurs propriétés pharmacologiques et biochimiques et désignés comme récepteurs de type 1 (AT₁) et de type 2 (AT₂), (Timmermans et al., 1993a).

Tableau I : Critères de classification des sous-types de récepteurs de l'angiotensine II.

	AT ₁	AT ₂
Ordre de puissance	Saralazine > AII > AIII	AIII ≥ AII ≥ Saralazine
Antagonistes sélectifs	Losartan (DuP 753) Valsartan	PD123319 PD123177
Effets des agents réducteurs	Inactivation	Augmentation
Voies de signalisation	↓ Adénylyl cyclase ↑ PLC ↑ PLA ₂ ↑ PLD ↑ Phosphorylation en tyrosine	↓ cGMP ↑ PLA ₂ ↑↓ Tyrosine phosphatase

AII : angiotensine II; AIII : angiotensine III.

Adaptation de Chassagne C. et al. *Récepteurs de l'angiotensine II : rôles dans le contrôle de la croissance cellulaire et mécanismes de transmission du signal*. Med Sci 12; 1351-60. (1996)

Les sous-types de récepteurs sont aussi classés selon des bases biochimiques comprenant principalement la sensibilité aux agents réducteurs et leur couplage aux systèmes de seconds messagers. Les critères de classification sont résumés dans le Tableau I. Les récepteurs AT₁ sont bloqués sélectivement par les antagonistes compétitifs du type biphénylimidazoles comme le Losartan alors que les sites de liaisons AT₂ sont bloqués par de tétrahydroimidazopyridines comme PD123319. Les récepteurs AT₁ possèdent une affinité plus forte pour l'Ang II que pour l'Ang III, un métabolite actif de l'Ang II, et sont couplés à plusieurs voies de signalisation précoces, dont l'activation des phospholipases C (PLC), D (PLD) et A2 (PLA2), l'activation des canaux calciques voltage-dépendant, et l'inhibition de l'adénylyl cyclase. Les effecteurs des sites de liaison aux récepteurs AT₂ pourraient impliquer la modulation du contenu intracellulaire en GMP_c des cellules neuronales en culture (Summers et al., 1991). Les agents réducteurs comme le dithiothreitol (DTT) n'ont peu ou pas d'effet sur l'affinité de ces derniers, alors que l'Ang III se lie dans un même ordre de puissance que l'Ang II. Physiologiquement, il a été montré que les récepteurs AT₁ médient la contraction, la sécrétion d'aldostérone, les réponses pressives et tachycardiques, la soif et l'hypertension. Les effets physiologiques de l'activation des récepteurs AT₂ demeurent mal connus (Matsubara, 1998). Malgré ceci, l'abondance de ces récepteurs dans les tissus foétaux et néonataux de rat suggèrent qu'ils jouent un rôle dans le développement.

1.3.3.1.5.2. Distribution tissulaire des sous-types de récepteurs AT₁ et AT₂

Chez l'homme, la distribution des sous-types de récepteurs de l'Ang II varie selon les tissus ou organes. Ainsi, les récepteurs AT₁ sont retrouvés surtout dans les tissus vasculaires incluant l'aorte, les artères pulmonaires et rénales et la microvascularisation. On les retrouve aussi au niveau du coeur, des cortex rénal et surrénal, du foie, de l'utérus, des poumons et du cerveau.

Les sites de liaison du récepteur AT₂ sont plus abondants dans les tissus embryonnaires que chez l'adulte. Ces sites sont exprimés de façon transitoire au niveau du mésenchyme du fœtus, dans certaines régions du cerveau fœtal et dans l'aorte néonatale. Les sites de liaison des récepteurs AT₂ sont aussi exprimés chez les animaux adulte, mais les niveaux sont apparemment faibles et dépendants de l'espèce et du tissu. Ils ont été détectés dans l'artère cérébrale, l'aorte et le cerveau de rat; dans le coeur de lapin; et dans l'aorte, le cortex rénal et le coeur de singes adultes. Cette distribution différentielle des sous-types de récepteurs pourrait être un déterminant important dans les effets tissulaires spécifiques de l'Ang II.

1.3.3.1.5.3. Les récepteurs AT₁

De nombreuses études ont démontré que l'activation des récepteurs AT₁ par l'Ang II exerce un effet trophique à long terme sur plusieurs tissus ou types cellulaires, notamment sur le coeur et le muscle lisse vasculaire. Parmi les principaux résultats obtenus *in vivo*, citons : 1) l'inhibition de l'hypertrophie cardiovasculaire chez les rats génétiquement hypertendus (SHR) traités par des inhibiteurs de l'enzyme de conversion ou des antagonistes du récepteur AT₁; 2) le ralentissement de la croissance rapide du coeur chez le porc nouveau-né ou l'inhibition de l'hypertrophie du myocarde chez des rats avec surcharge volumique traités avec ces mêmes agents; et 3) le développement d'une hypertrophie vasculaire ou cardiaque chez les rats traités par l'Ang II (Metsärinne et al., 1994). En outre, la synthèse des récepteurs AT₁ cardiaques est augmentée au cours de l'hypertrophie cardiaque d'origine expérimentale ou génétique chez l'animal, suggérant un rôle du récepteur dans la genèse ou le maintien de la croissance exagérée de ce tissu (Timmermans et al., 1993b).

In vitro, l'Ang II stimule la croissance de plusieurs types cellulaires, conduisant à une réponse hypertrophique (CML, myocytes cardiaques, cellules tubulaires proximales) ou hyperplasique (fibroblastes cardiaques) selon la cellule (Pratt and Dzau, 1993; Schelling et al., 1991). Dans les CML vasculaires isolées de rats normaux, l'Ang II stimule la synthèse de protéines et induit une hypertrophie cellulaire, sans modifier la synthèse d'ADN (Geisterfer et al., 1988). En revanche, l'Ang II exerce un effet mitogène faible sur des CML vasculaires isolées d'aortes de rat SHR (Paquet et al., 1989). Récemment, il a été démontré que l'Ang II inhibe l'apoptose des CML (Pollman et al., 1996) mais qu'elle induit l'apoptose des cardiomyocytes. Toutes ces réponses sont bloquées par le losartan et sont donc relayées par les récepteurs AT₁ (Kajstura et al., 1997a).

1.3.3.1.5.4. Les récepteurs AT₂

Jusqu'à ce jour, plusieurs observations pharmacologiques ont démontré que les effets les plus connus de l'Ang II sur les tissus cardiovasculaires sont attribuables au récepteur AT₁, alors que le rôle des récepteurs AT₂ est moins bien compris. Présentement, plusieurs observations suggèrent que ce récepteur agit comme un antagoniste physiologique du récepteur AT₁, i.e., le récepteur AT₂ exercerait des effets anti-croissance, anti-hypertrophique et proapoptotique dans le système cardiovasculaire.

Les récepteurs AT₂ et la pression artérielle

Ichiki et al. (Ichiki et al., 1995) ont récemment rapporté que les souris dépourvues du gène codant pour le récepteur AT₂ possèdent une pression artérielle plus élevée que les témoins, alors que Munzenmaier et Greene (Munzenmaier and Greene, 1996) ont rapporté que le blocage du récepteur AT₂ augmente l'effet presseur de l'Ang II chez le rat. Supportant ces résultats, Dzau et al. ont observé que les souris AT₂ KO (« knock-out ») ont une pression sanguine augmentée de façon aiguë en réponse à une infusion d'Ang II en faibles doses (Hein et al., 1995). Globalement, ces études suggèrent que le récepteur AT₂ médie la vasodilatation. Cependant, sa cible et son mécanisme ne sont pas bien compris. Étant donné que les récepteurs AT₂ étaient exprimés de façon minimale dans la vasculature lorsque la pression sanguine et les études de perfusion d'Ang II ont été réalisées (souris de 3 à 5 mois d'âge), ces données suggèrent aussi que l'expression transitoire et la régulation développementale d'AT₂ puisse exercer un effet à long terme sur la pression sanguine, par son influence sur la structure vasculaire.

L'étude d'Arima et al. (Arima et al., 1997) a examiné directement l'effet médié par le récepteur AT₂ de l'Ang II sur les artérioles rénales. Ils ont isolé et microperfusé l'artériole glomérulaire afférente du lapin, qui est un segment vasculaire crucial pour le contrôle de l'hémodynamie glomérulaire, et examiné si le récepteur AT₂ est impliqué dans la vasodilatation et, si tel est le cas, par quel mécanisme. Ils ont pu démontrer que le récepteur AT₂ médie la vasodilatation et que la dilatation est abolie par une rupture de l'endothélium ou une inhibition de la voie du cytochrome P-450. Ceci suggère que l'activation du récepteur AT₂ de l'artériole afférente puisse produire une vasodilatation endothélium-dépendante via la voie du cytochrome P-450, possiblement par les acides epoxyeicosatriénoïques. En revanche, il a été rapporté que la stimulation des récepteurs AT₂ rénaux chez des rats anesthésiés n'a pas d'effet sur le flot sanguin rénal total mais elle abolit la natriurèse. Siragy et Carey ont récemment démontré que l'activation du système rénine-angiotensine durant la restriction de sodium augmente la production d'oxide nitrique rénal via la stimulation par l'Ang II du récepteur AT₂ et la production rénale de GMP_c. De plus, le blocage du récepteur AT₂ potentialise la production de la prostaglandine E₂ induite par AT₁ (Siragy and Carey, 1996; Siragy and Carey, 1997). La libération de NO par la stimulation du récepteur AT₂ a aussi été rapportée dans les grosses artères et les microvaisseaux coronariens de chien (Seyedi et al., 1995). En accord avec ces résultats, Gohlke et ses collègues ont démontré que la production de GMP_c par le

récepteur AT₂ dans l'aorte de rat hypertendu est médiée par la bradykinine et le NO (Gohlke et al., 1998).

De plus, les récepteurs AT₂ pourraient être impliqués dans la conservation de sels par le rein. Madrid et al. ont examiné l'effet d'un antagoniste AT₁ ou AT₂ de l'Ang II sur le dysfonctionnement de la réponse diurétique et natriurétique produit par le blocage de la synthèse de NO par la N-nitro-L-arginine méthyl ester (L-NAME) (Madrid et al., 1997). Ils ont observé que, chez les rats recevant le L-NAME, le valsartan augmente les valeurs excrétoires de base à toutes les pressions de perfusion, mais qu'il n'a pas d'effet sur la sensibilité de la réponse diurétique et natriurétique. Cependant, l'administration de PD123319 à des rats pré-traités avec L-NAME déplaçait les courbes de pression-diurèse et natriurèse vers les valeurs témoins, indiquant que le dysfonctionnement produit par le blocage de la synthèse de NO sur la pression de diurèse est dépendant de l'activation des récepteurs AT₂ de l'Ang II. Ozono et al. ont démontré que l'Ang II relaye l'absorption du sodium et de l'eau par une action du récepteur AT₂, impliquant la production de GMP_c (Sosa-Canache et al., 2000; Gohlke et al., 1998; Ozono et al., 1997). Inversement, l'Ang II inhibe l'absorption du sodium et d'eau par le récepteur AT₁ (Jin et al., 1998). Ils ont aussi démontré qu'une diète diminuée en sodium augmentait l'expression du récepteur AT₂ dans les reins de rat adulte.

1.4. Modèles génétiques d'hypertension

1.4.1. Développement des souches hypertendues

Les modèles expérimentaux de rats consanguins hypertendus sont fréquemment utilisés pour étudier les mécanismes de contrôle de la pression artérielle, pour tester ou développer des agents antihypertenseurs et pour comprendre la pathogénèse de l'hypertension. Les modèles génétiques d'hypertension les plus couramment utilisés sont le rat spontanément hypertendu (SHR), le rat sensible au sel (Dahl), le rat hypertendu de Milan, de Lyon et de New Zealand. Avec ces nombreux modèles, des progrès substantiels ont été accomplis dans l'identification des facteurs physiologiques, biochimiques et environnementaux de l'hypertension artérielle. L'approche la plus utilisée pour développer des modèles d'hypertension génétique a été de mesurer la pression artérielle d'un très grand nombre d'animaux consanguins et d'accoupler sélectivement ceux qui ont les valeurs de pression les plus élevées. Chaque nouvelle génération avec les valeurs de pression artérielle les plus élevées est constituée d'un accouplement consanguin entre frères et sœurs. Après 20 générations d'accouplements entre frères et sœurs, les rats obtenus devraient être homozygotes pour > 99% des loci, et ainsi, les animaux devraient être génétiquement identiques (Okamoto and Aoki, 1963).

1.4.2. Le SHR

Le rat spontanément hypertendu (SHR), développé par Okamoto et Aoki en 1963, est dérivé d'un accouplement sélectif de rats Wistar (Okamoto and Aoki, 1963) ayant les plus hautes valeurs de pression artérielle. La mesure de la pression artérielle en conditions basales indique que la pression est légèrement plus élevée chez les jeunes SHR comparativement aux rats Wistar-Kyoto (WKY). Les différences de pression entre le SHR et le WKY peuvent être montrées dès la première journée de vie (Bruno et al., 1979; Gray, 1984). À partir de 3 semaines d'âge, les artères des SHR montrent des changements trophiques dans la forme d'une augmentation du ratio paroi : lumière, qui sont impliqués dans le développement et le maintien de l'hypertension. La pression artérielle et les propriétés prolifératives et de croissance des cellules vasculaires peuvent participer à ces changements structuraux au niveau vasculaire (Folkow et al., 1975; Yamori, 1976; Yamori, 1983; Yamori et al., 1981; Yamori et al., 1979). Chez le SHR, Yamori et al. ont montré une association entre l'hypertrophie ventriculaire gauche et l'hypertrophie vasculaire (Yamori et al., 1979) sans nécessairement qu'il y ait de corrélation avec la pression artérielle, indiquant que d'autres facteurs

jouent un rôle important (Frohlich, 1983; Frohlich, 1986). Trois complications cardiovasculaires majeures de l'hypertension sont l'hypertrophie ventriculaire gauche, la néphrosclérose et les accidents cérébrovasculaires. Or, ces pathologies sont des caractéristiques du SHR, particulièrement la sous lignée SHR-SP (*SHR stroke prone*).

1.5. Dommage dans les organes-cibles

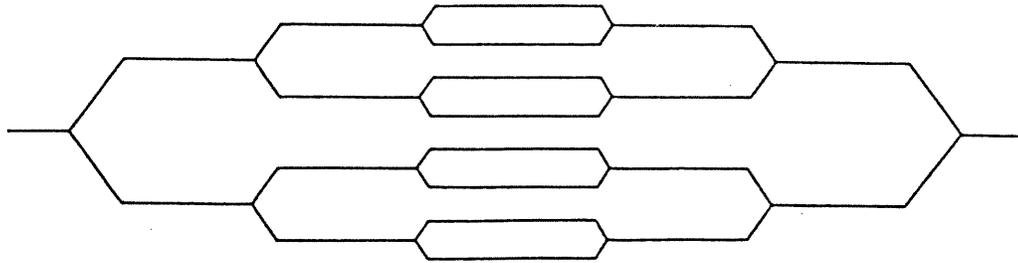
L'hypertension artérielle implique des changements délétères de la structure du coeur et des vaisseaux sanguins. Conséquemment, les altérations structurales du système cardiovasculaire et les effets des agents thérapeutiques ont été largement étudiés expérimentalement et en clinique. Le coeur et les vaisseaux sanguins forment un système continu. Les paramètres structuraux de base du système sont (a) le nombre de vaisseaux dans le système de branchement et (b) la masse de la paroi vasculaire. Ces paramètres fondamentaux sont génétiquement déterminés et peuvent être modulés par des facteurs physiques et chimiques. Ensemble, ils déterminent le volume global de la lumière du système vasculaire et ainsi, la plupart des paramètres cardiovasculaires (débit cardiaque, compliance des grosses artères, résistance périphérique locale ou totale, capacitance veineuse). La paroi musculaire lisse gouverne ces paramètres de façon aiguë via des changements de la contractilité des myocytes qui composent le tissu. Cette régulation dynamique agit sur les propriétés mécaniques et statiques de la paroi. La masse et la composition du tissu détermine ses propriétés élastiques ainsi que sa dimension à une pression transmurale déterminée. Parmi les composantes de la paroi cardiovasculaire, les cardiomyocytes et les CML ont reçu une attention particulière en raison de leur activité contractile aiguë et de leur contribution à la masse cardiovasculaire.

1.5.1. Le système vasculaire

En 1893, Thoma publiait une monographie sur la croissance du système vasculaire (Thoma, 1893). Il a postulé trois bases théoriques du développement des vaisseaux : (1) le nombre de vaisseaux qui se développent dans un tissu est déterminé par des influences génétiques et les besoins métaboliques du tissu, (2) le diamètre du vaisseau dépend du flot sanguin à travers la lumière, et (3) l'épaisseur de la paroi artérielle est déterminée par la tension transmurale. Après un siècle, ces postulats dérivés d'observations simples et élégantes demeurent un excellent cadre conceptuel pour la biologie du développement vasculaire.

1.5.1.1. Structure de l'artère et description des fonctions des CML

Le système artériel joue deux rôles distincts et interreliés : (1) il est responsable de la distribution du sang oxygéné vers les tissus de l'organisme et (2) il amortit les pulsations résultant de l'éjection du sang par le coeur (pression systolique) (Folkow, 1995; Mulvany, 1995; Mulvany, 1993). Les artères ne sont pas de simples conduits passifs que l'on pourrait assimiler à des tuyaux rigides. Il s'agit d'une structure dotée d'une élasticité et d'une motricité lui permettant de s'adapter aux conditions hémodynamiques locales et de répondre aux besoins métaboliques des organes et des tissus. La paroi des grosses artères est très élastique et elle s'étire sous la pression de remplissage systolique. Ces artères élastiques se ramifient en un réseau très étendu d'artères de plus petits calibres qui possèdent beaucoup moins de tissus élastiques mais plus de fibres musculaires lisses. Brièvement, l'arbre vasculaire et ses caractéristiques anatomiques et fonctionnelles sont illustrés à la Figure 2.



	Artères élastiques	Artères musculaires	Artérioles	Capillaires	Veinules collectrices	Veinules musculaires	Veines
Diamètre	> 2 mm	150 μm – 2 mm	8 – 150 μm	< 8 μm	8 – 50 μm	50 – 100 μm	> 100 μm
Endothélium	+	++	+++	++++	+++	++	+
Média	++	++	+	0	+	+	+
Fonction	conduction compliance	compliance résistance	résistance	échange	échange capacitance	capacitance	capacitance précharge cardiaque

Figure 2. Représentation schématique de l'arbre vasculaire et caractéristiques anatomiques et fonctionnelles des segments.
(tiré de Owens, GK : Growth responses of aortic smooth muscle cells in hypertension. In : Lee R, ed. *Blood vessel changes in hypertension : structure and function*. Boca Raton, Florida : CRC Press, 1990 : 45-63.)

La paroi d'une artère normale est constituée de trois couches (Figure 3) concentriques qui sont, de l'extérieur de l'artère à la lumière artérielle, l'adventice, la média et l'intima (Schwartz et al., 1996).

1.5.1.1.1. L'adventice

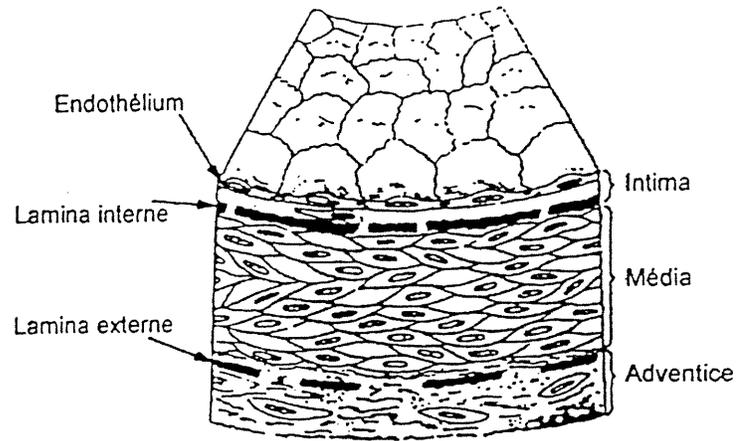
L'adventice comprend certains des éléments fonctionnels de l'artère : les terminaisons nerveuses à l'origine de la vasomotricité et les petits vaisseaux sanguins qui irriguent la paroi. Il est principalement constitué de fibroblastes disposés entre des fibrilles de collagène, et entourés de protéoglycans, de cellules souches et de cellules de Schwann associées à des axones. Ce tissu conjonctif fibreux, qui est habituellement séparé de la média par la lamina élastique externe, joue un rôle mécanique de soutien de la paroi dans le cas d'une média endommagée ou absente.

1.5.1.1.2. La média

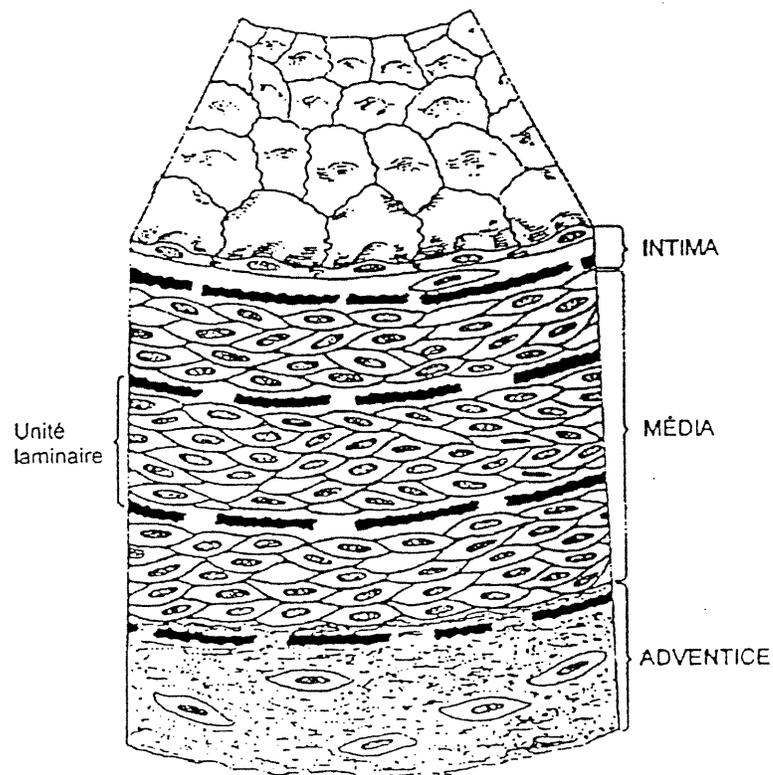
La média est la couche principale de l'artère, constituée principalement de cellules musculaires lisses qui déterminent le tonus vasculaire et qui contrôlent la dimension de la lumière artérielle. Ces fibres musculaires lisses sont entourées d'une matrice extracellulaire constituée de fibrilles de collagène de type I et III, de fibronectines, de petites fibres élastiques et de protéoglycans.

1.5.1.1.3. Contraction et relaxation musculaire lisse

La production d'un tonus par la cellule musculaire lisse vasculaire est dépendante de l'interaction de deux protéines contractiles majeures, l'actine et la myosine (Hai and Murphy, 1989; Ito and Hartshorne, 1990; Strull et al., 1991). La caractéristique principale de la contraction musculaire lisse en réponse à un agent pharmacologique ou à une diminution électrique, est une augmentation initiale rapide de la concentration de calcium intracellulaire libre et une phosphorylation de la chaîne légère de myosine. La tension, d'autre part, augmente plus lentement et se maintient même lorsque la phosphorylation active de la chaîne légère de myosine et que la concentration intracellulaire de calcium libre sont diminuées. Ce mécanisme est énergiquement rentable car la tension est maintenue malgré une diminution de consommation d'ATP. L'importance du calcium dans la contraction du muscle lisse vasculaire a été bien établie. Cette mobilisation peut s'effectuer par plusieurs voies. Différentes hormones agissant par des récepteurs couplés aux protéines G activent la phospholipase C liée à la membrane, laquelle convertit le L- α -phosphatidyl inositol biphosphate (PIP₂) membranaire en



A



B

Figure 3. Représentation schématique de (A) la structure d'une artère musculaire normale et (B) la structure d'une artère élastique normale: les mêmes couches se retrouvent dans les deux types d'artères avec la différence qu'en (B) la média comprend plusieurs lamelles de cellules musculaires lisses. (Adapté de Fozzard et al., 1991).

diacylglycérol (DAG) et en inositol-1,4,5 triphosphate (InsP3) solubles. Ce dernier stimule la libération de calcium par le réticulum endoplasmique via un récepteur aux InsP3, décrit comme un type de canal calcique. Ainsi, le calcium entre dans le cytoplasme et se lie à la calmoduline et par le fait même, l'active par changement conformationnel. Ceci favorise l'association de ce complexe et l'activation de cette dernière. Cette enzyme catalyse ensuite le transfert d'un groupement phosphate d'une molécule d'ATP à la chaîne légère régulatrice de la myosine. Cette simple phosphorylation permet l'activation de l'ATPase de la myosine par l'actine et déclenche ainsi la contraction en stimulant le mouvement des têtes de la myosine le long des filaments d'actine (Dillon et al., 1981). La phosphorylation des têtes de la myosine cesse et la déphosphorylation de la myosine par une phosphatase des chaînes légères de la myosine produit la relaxation.

1.5.1.1.4. L'intima

L'intima est essentiellement formée d'une monocouche de cellules endothéliales tapissant l'intérieur du vaisseau et sise sur la lame basale élastique interne (Schwartz et al., 1996). Cette lamelle particulièrement résistante est constituée de collagène de type IV, de lamines et de protéoglycans. Le collagène de type IV et la lamine jouent d'ailleurs un rôle important dans l'attachement des cellules endothéliales à la lame élastique interne. Chez le rat, l'intima comprend très rarement des CML à moins de dommages vasculaires. Par contre, chez l'homme, l'intima peut comprendre des CML.

1.5.1.1.5 L'endothélium

L'endothélium occupe une position stratégique entre la paroi vasculaire et le sang, ce qui lui permet de jouer un rôle fondamental dans le système circulatoire. En fait, l'endothélium a des fonctions multiples et primordiales. D'une part, en présentant une surface uniforme non-thrombogène, l'endothélium assure un parfait écoulement du sang dans les vaisseaux et empêche le développement des réactions d'hémostase entre le sang et les composantes pariétales sous-jacentes. D'autre part, contrairement à ce que l'on croyait jusqu'au début des années 80, l'endothélium est le siège d'une activité métabolique intense qui se traduit par la synthèse et la libération de nombreux médiateurs solubles ayant des fonctions modulatrices du tonus vasculaire et de la réaction inflammatoire.

1.5.1.2. Anomalies structurales des vaisseaux dans l'hypertension

Les deux anomalies fonctionnelles du système vasculaire dans l'hypertension sont : (1) la réduction de la compliance des systèmes artériels et veineux, et (2) l'augmentation de la résistance au flot sanguin. La réduction de la compliance de l'arbre vasculaire dans l'hypertension est due aux changements structuraux des grosses artères et veines, alors que l'augmentation de la résistance est localisée dans les petites artères et dans la microcirculation. Les principaux changements structuraux mieux connus sous le terme « remodelage vasculaire » peuvent se traduire par une hypertrophie, hyperplasie ou polyploïdie cellulaire.

1.5.1.2.1. Remodelage vasculaire dans l'hypertension

L'hypertrophie et/ou l'hyperplasie des CML participent à l'augmentation de la masse vasculaire, ainsi qu'à l'augmentation de la synthèse des composantes de la matrice extracellulaire tels le collagène, l'élastine, les protéoglycans et la fibronectine. Notre laboratoire a été parmi les premiers à montrer que les CML vasculaires de rat spontanément hypertendu (SHR) en culture prolifèrent plus rapidement que les CML vasculaires de rat Wistar-Kyoto (WKY) normotendu (Hamet et al., 1988; Hadrava et al., 1992). Il est important de souligner que la prolifération exagérée des CML vasculaires de rat SHR persiste en culture (indépendamment de la pression sanguine), suggérant l'existence d'une défectuosité génétique intrinsèque dans le contrôle de la prolifération cellulaire.

L'augmentation du ratio média : lumière a souvent été interprétée comme synonyme de croissance. Or, ce n'est pas nécessairement le cas. L'augmentation du ratio média : lumière peut être due à l'addition de matériel sur le côté abluminal ou luminal du vaisseau. Clairement, ces situations impliqueront la croissance. Cependant, l'augmentation du ratio média : lumière peut aussi survenir en réarrangeant le matériel existant autour d'une plus petite lumière, sans besoin d'invoquer une réponse croissante ou un changement dans l'aire de section. Ce processus a été défini comme étant le « remodelage ». En accord avec son usage accepté, il est à noter que le terme « remodelage » n'implique pas la croissance, mais bien un remaniement ou re-alignement des éléments préexistants de la paroi vasculaire. Le remodelage vasculaire implique des altérations structurales des vaisseaux sanguins qui se produisent généralement comme un processus d'adaptation en réponse aux changements à long terme des conditions hémodynamiques. Mais, il peut subséquemment contribuer à la pathophysiologie de la maladie vasculaire et les désordres circulatoires. Dans son

sens élargi, le processus de remodelage implique des changements dans un ou plusieurs des événements suivants : la croissance cellulaire, la mort cellulaire, la migration cellulaire et la production ou dégradation de la matrice extracellulaire – et est dépendant de l'interaction dynamique entre les facteurs de croissance générés localement, les substances vasoactives et les stimuli hémodynamiques. Comme le coeur, le système vasculaire ne peut pas être considéré comme un tissu quiescent avec une structure fixe. Les vaisseaux sanguins sont capables de remodeler leur architecture de façon chronique en réponse à des conditions spécifiques. En général, le remodelage vasculaire comprend : (a) la croissance de nouveaux vaisseaux (angiogénèse) et la disparition de ceux existants (raréfaction), (b) le changement dans le nombre ou la taille des CML et (c) la composition altérée en matrice extracellulaire de la paroi vasculaire.

L'interprétation globale du remodelage vasculaire est de plus compliquée par l'hétérogénéité marquée du système vasculaire. Cette hétérogénéité existe pour l'organisation parallèle (plusieurs régions du lit vasculaire) ou en série (plusieurs segments artériels, capillaires, ou veineux) du lit vasculaire. L'augmentation de la pression sanguine affecte la structure de tous les segments de l'arbre vasculaire, incluant les gros et les petits vaisseaux (voir Tableau II).

Tableau II : Segments du système artériel et effets de l'hypertension sur la croissance.

Segment du système artériel	Réponse de croissance vasculaire dans l'hypertension	Conséquences fonctionnelles
Grosses artères (e.g. l'aorte)	- Hypertrophie des CML - ↑ dépôt de matrice extracellulaire	↓ Distensibilité
Petites artères (e.g. artères mésentériques)	- Hypertrophie/hyperplasie des CML - ↑ dépôt de matrice extracellulaire	↓ Distensibilité ↑ Résistance
Artéριοles	- Hyperplasie des CML - Raréfaction	↑ Résistance
Capillaires	- Raréfaction	↑ Résistance
Veinules	- Inconnue	Inconnues
Veines	- Hypertrophie des CML	↓ Distensibilité

CML : cellules musculaires lisses

Adaptation de Lee RMKW. *Structural and functional consequence of antihypertensive treatments on blood vessels*. In : Lee R, ed. *Blood vessel changes in hypertension : structure and function*. Boca Raton, Florida : CRC Press, 163-190. (1989)

1.5.1.2.1.1. Les grosses artères

Plusieurs facteurs peuvent causer une réduction de la compliance : (1) l'augmentation du tonus vasculaire, (2) l'augmentation de l'épaisseur de la paroi vasculaire, (3) les altérations dans la composition en matrice extracellulaire de la paroi vasculaire et (4) l'augmentation du nombre de cellules. L'hypertrophie cellulaire représente une augmentation de la taille cellulaire et du contenu total en protéines avec ou sans augmentation du contenu en ADN dû à la polyploïdie mais sans modification du nombre cellulaire. Par contre, l'hyperplasie cellulaire est définie comme étant une augmentation du nombre cellulaire et du contenu total en ADN avec peu ou pas de changement de la taille cellulaire ou du contenu total en protéines. L'augmentation de la masse d'un organe peut être due à l'hypertrophie cellulaire, à l'hyperplasie cellulaire ou aux deux. L'anomalie structurelle majeure des gros vaisseaux dans l'hypertension est l'hypertrophie des CML avec subséquemment une augmentation de l'épaisseur de la paroi vasculaire (Lee, 1987; Lee, 1989; Owens, 1989b; Owens, 1990; Smeda et al., 1988) (Tableau II). L'hypertrophie des CML dans l'aorte et plusieurs grosses artères est généralement vue comme un changement adaptatif, se produisant seulement une fois l'hypertension développée (Lee, 1989; Smeda et al., 1988). Elle peut être accompagnée de polyploïdie (augmentation du contenu en ADN sans division cellulaire) des CML, un processus qui semble être absent dans les petites artères de SHR et d'autres modèles d'hypertension. L'augmentation de l'épaississement de la paroi des vaisseaux, en réponse à une élévation de la pression artérielle tend à être de nature protectrice, permettant aux vaisseaux de mieux supporter l'étirement de la paroi imposé par une élévation de la pression intravasculaire. Par contre, chez le rat spontanément hypertendu (SHR), les artères carotides et les principales artères rénales apparaissent comme des exceptions, l'hypertrophie des CML y précédant le développement de l'hypertension. De façon intéressante, l'augmentation de la résistance vasculaire rénale est une caractéristique précoce du SHR, précédant les anomalies de tout autre lit vasculaire (Evenwel et al., 1983). Dans les tissus vasculaires en culture, les artères rénales du SHR montrent une plus grande sensibilité à la croissance que tout autre artère (De Mey et al., 1991).

Un autre aspect du remodelage vasculaire dans l'hypertension est l'augmentation de la synthèse des composantes de la matrice extracellulaire. La matrice extracellulaire de la paroi artérielle est un système intégré composé de fibrilles collagéniques, de lamelles élastiques, de protéoglycans et de glycoprotéines structurales qui, avec les cellules, déterminent les propriétés majeures de la paroi du

vaisseau. Dans l'hypertension d'étiologie variée, la synthèse de fibres de collagène et d'élastine est augmentée (Itoh, 1989). Ces changements contribuent de façon importante à la diminution de la distensibilité des artères dans l'hypertension. Il est maintenant généralement reconnu que l'hypertension est associée à une augmentation de collagène et de fibres élastiques. Comme l'hypertrophie des CML des grosses artères, ces changements semblent être secondaires à l'hypertension. Malheureusement, on en connaît peu sur la nature du changement dans les gros vaisseaux chez les patients hypertendus. Il semble que chez les humains avec une hypertension essentielle, l'épaississement de la paroi apparaît dans les grosses artères (Furuyama, 1962; Lee, 1989). Cependant, il n'est pas encore connu si cet épaississement est dû à l'hypertrophie des CML. Mais une chose est sûre, l'hypertrophie aortique (avec la réduction de la compliance) contribue à l'hypertension et représente un facteur de risque indépendant pour le développement de l'hypertrophie ventriculaire gauche (Safar, 1993).

1.5.1.2.1.2. Les petites artères

La nature des changements structurels des petites artères dans l'hypertension a été revue par plusieurs auteurs (Heagerty et al., 1993a; Mulvany, 1990). Les études histologiques ont montré que le ratio média : lumière des petites artères est augmenté à différents stades du développement de l'hypertension, clinique et expérimentale. L'augmentation du nombre de CML de différents petits vaisseaux est due à l'élévation de la synthèse d'ADN des CML et à l'hyperplasie subséquente plutôt qu'à l'hypertrophie avec polyploïdie comme dans les grosses artères (Mulvany, 1990; Owens, 1989b). Dans les modèles primaires d'hypertension, l'hyperplasie des CML des petites artères représente un événement précoce dans le développement de l'hypertension. Il y a un débat considérable à savoir si l'hyperplasie des CML dans les petites artères précède ou suit l'hypertension (Lee, 1989; Owens, 1989b). Dans les formes d'hypertension primaire, l'hyperplasie des CML, contrairement à l'hypertrophie des grosses artères, peut précéder le développement de l'hypertension (Mulvany, 1990; Owens, 1989a). Dans les artères mésentériques du jeune SHR, la taille des CML et le contenu protéique, de même que la prévalence des cellules polyploïdes ne sont pas différents des artères du WKY (Mulvany, 1990; Owens, 1989a). Les artères des SHR âgés de 6 semaines montrent l'augmentation la plus remarquable en terme de synthèse d'ADN dans les petites artères (De Mey and Daemen, 1991). Par ailleurs, dans des modèles d'hypertension secondaire, par exemple l'hypertension de type Goldblatt ou suite à la coarctation de l'aorte, l'augmentation de l'épaisseur de la média des petites artères est causée par l'hypertrophie plutôt que par l'hyperplasie des CML

(Korsgaard and Mulvany, 1988; Owens, 1989c). Ceci suggère que ces modèles de changements structurels dans les petites artères représentent un phénomène d'adaptation secondaire à l'augmentation de la pression artérielle. Dans certaines petites artères, comme le lit cérébral, l'augmentation du ratio média : lumière est due au remodelage sans changement du nombre de cellules, soit de façon longitudinale ou circonférentielle. Un type similaire de remodelage a été rapporté par Short et al. pour les petites artères intestinales et par Aalkjaer et al. dans les petites artères sous-cutanées des humains hypertendus. Dans les modèles non-primaires d'hypertension, par exemple chez les rats recevant un traitement au DOCA-sel ou l'hypertension de type Goldblatt par sténose rénale, l'augmentation de l'épaisseur des petites artères est causée par une hypertrophie plutôt que par une hyperplasie des CML.

1.5.1.2.2. Mécanismes de l'hypertrophie et de l'hyperplasie du muscle lisse vasculaire

Les mécanismes contrôlant l'hypertrophie et l'hyperplasie des CML ont été largement revus (Lee, 1989; Mulvany, 1990; Owens, 1989b; Owens, 1990). Il semble qu'il n'y ait pas qu'un seul mécanisme qui contrôle la croissance des CML. Au cours des dernières années, le concept de « modulation phénotypique » a été développé pour expliquer la diversité des réponses de croissance des CML (Schwartz et al., 1990; Thyberg et al., 1990). Durant la vie foetale et postnatale, une proportion des CML possède le phénotype d'une cellule de type synthétique avec un grand potentiel de prolifération et de sécrétion des composantes de la matrice extracellulaire. Après la naissance, le phénotype des CML change graduellement en cellule de type contractile. Le phénotype des CML peut être modulé d'un type contractile en un type synthétique (ou vice versa) par un nombre de facteurs mécaniques et chimiques dans l'hypertension.

1.5.1.2.2.1. Les facteurs mécaniques

Il est reconnu que la structure des vaisseaux sanguins peut être remodelée par des changements mécaniques reliés au flot sanguin. En fait, il y a maintenant un siècle, Thoma (Thoma, 1893) avait observé que dans l'embryon du poulet, les vaisseaux qui supportent le plus grand flot sanguin donnent naissance aux gros vaisseaux de conductance. Langille a démontré que le remodelage artériel survient suivant des changements persistants du flot sanguin (Langille, 1993). Le processus s'applique dans les grosses et les petites artères, même si la production des facteurs relaxants ou contractiles dérivés de l'endothélium peut différer entre ces différents niveaux artériels. La réponse

à long terme de la paroi artérielle à un changement du flot sanguin implique autant les éléments structurels que fonctionnels. La nature des changements structurels dépend de la direction du changement du flot sanguin. Ainsi, chez les adultes, les composantes structurales majeures de la paroi artérielle changent peu durant une diminution chronique du flot sanguin, alors que des adaptations importantes ont été observées durant l'augmentation chronique du flot (Langille, 1993; Zarins et al., 1987). Zarins et al. ont rapporté une augmentation de 84% dans l'aire de section médiale des artères iliaques de singe en réponse à une augmentation de 10 fois du flot sanguin pendant 6 mois (Zarins et al., 1987). Durant les périodes embryonnaire et périnatale, il y a une puissante composante structurelle dans la réponse artérielle aux changements de flot sanguin impliquant notamment la prolifération des CML et la synthèse des élastines.

1.5.1.2.2.2. Le système nerveux sympathique

L'innervation sympathique a une influence sur la croissance des grosses et petites artères (Lee and Gzik, 1991). Les premières évidences proviennent des travaux de Bevan, qui a démontré que la dénervation sympathique diminue l'index mitotique des artères de l'oreille de lapin (Bevan, 1976). De façon intéressante, cet effet était accompagné d'une réduction du diamètre des vaisseaux. Des études ultérieures de dénervation sympathique ont confirmé l'influence trophique du système nerveux sympathique sur les CML d'artères de différentes espèces (Bevan and Tsuru, 1981; Lee and Gzik, 1991; Todd and Gowen, 1991). Des études morphologiques détaillées de l'artère saphène des nouveaux-nés WKY sujets à la dénervation montrent une média plus mince à l'âge de 3 semaines (avec dénervation 11 jours auparavant) (Todd and Gowen, 1991). Les effets de la dénervation chimique sympathique sur la croissance vasculaire peuvent être étudiés par l'utilisation de différents outils incluant la guanethidine, la réserpine ou la 6-hydroxydopamine, qui agissent comme des bloqueurs du système nerveux sympathique (Lee and Gzik, 1991). La plupart des études utilisant ces outils ont été effectuées chez des animaux hypertendus. Il a été difficile de dissocier les effets directs du système nerveux sympathique sur la paroi vasculaire des effets antihypertenseurs de la sympathectomie (Fronck et al., 1978; Lee and Gzik, 1991). Malgré ce problème méthodologique, les études sur la dénervation chimique ont confirmé le rôle trophique du système nerveux sympathique. La croissance accélérée des CML des espèces hypertendues, due à l'hypertrophie ou à l'hyperplasie, est réduite par la sympathectomie chimique (Lee and Gzik, 1991; Mangiarua and Lee, 1992). Les études de dénervation ne sont pas les seules évidences supportant le rôle du système nerveux sympathique dans les réponses de la croissance vasculaire dans l'hypertension. Majeski et al. ont

démontré que la stimulation des récepteurs α_1 -adrénergiques avec la phényléphrine augmente l'expression des gènes de la croissance dans les CML d'aorte tels c-myc, l'ornithinedécarboxylase et la PDGF-A (Majewski et al., 1990). Les antagonistes α_1 -adrénergiques comme le prazosin, la doxazosin ou l'urapidil, peuvent bloquer la croissance vasculaire dans les artères d'animaux hypertendus ou dans les artères de l'intima endommagés mécaniquement. Finalement, il y a des évidences abondantes de l'effet prolifératif de la noradrénaline via les récepteurs α_1 -adrénergiques des CML en culture (Schwartz et al., 1990; Thyberg et al., 1990) et aussi *in vivo* (deBlois et al., 1996a).

1.5.1.2.2.3. Le système rénine-angiotensine : L'Angiotensine II

Le rôle de l'Ang II comme facteur de croissance des CML est basé sur deux observations: (i) les effets sur la croissance de l'Ang II dans les CML en culture et chez les animaux, et (ii) les effets inhibiteurs de la croissance des inhibiteurs de l'enzyme de conversion de l'angiotensine et des antagonistes AT₁. L'Ang II induit l'hypertrophie et la polyploïdie des CML en quiescence et déprivées en serum (Campbell et al., 1991; O'Malley et al., 1989). De plus, elle induit l'expression de proto-oncogènes comme c-fos, c-myc et c-jun, de même que PDGF-A dans les CML en culture (Girard, 1989; Itoh et al., 1991; Naftilan et al., 1989). D'autre part, l'Ang II peut aussi stimuler l'expression de TGF- β (Hamet et al., 1991), qui inhibe la synthèse d'ADN (Itoh et al., 1990) dans les CML en culture (Gibbons et al., 1992).

Ainsi, les effets de l'Ang II sur la croissance des CML pourraient être la somme des effets stimulateurs et inhibiteurs des différents facteurs. Au niveau cellulaire, ces influences pourraient promouvoir l'hypertrophie mais prévenir la prolifération cellulaire. Cette hypothèse est supportée par des études ultrastructurales (Anderson et al., 1993; Geisterfer et al., 1988; Wolf and Neilson, 1990). Ces études ont démontré que dans les CML, les cellules mésangiales ou les cellules du tubule rénale, l'Ang II cause l'hypertrophie mais non l'hyperplasie. Dans les cellules en culture des différentes petites artères de rat, l'Ang II n'agit pas comme un facteur primaire de mitogénéicité. Par contre, les observations *in vivo* chez les rats avec lésion au ballonnet dans l'aorte ou la carotide suggèrent que l'Ang II augmente la synthèse d'ADN dans la média et la néo-intima (deBlois et al., 1996b).

Une des différences entre les expériences *in vitro* et les expériences *in vivo*, pourrait être la présence simultanée dans le modèle *in vivo* de d'autres facteurs causant la division cellulaire. Si l'Ang II est un facteur compétent, il peut avoir besoin de d'autres facteurs circulants ou produits localement pour

induire la prolifération. De telles substances peuvent ne pas être présentes dans les milieux en culture.

En résumé, la majorité des évidences publiées supportent un rôle pour l'Ang II dans le processus de l'hypertrophie de CML dans les grosses et petits artères (discuté dans la section précédente). D'un autre côté, la réduction de l'hypertrophie des grosses artères, en parallèle avec la baisse de la pression artérielle, semble être un aspect bénéfique dans le mode d'action des médicaments bloquant l'Ang II.

1.5.1.2.2.4. Les autres facteurs de croissance

Plusieurs facteurs stimulant ou inhibant la croissance des CML ont été identifiés au cours de la dernière décennie (Jackson and Schwartz, 1992). Il est extrêmement difficile de définir précisément le rôle de ces facteurs dans les changements des CML dans l'hypertension, pour plusieurs raisons : (i) plusieurs études utilisent une fenêtre de concentration limitée pour définir le rôle d'un facteur de croissance potentiel, (ii) les antagonistes pharmacologiques pour définir la spécificité des récepteurs ne sont pas disponibles, et (iii) les systèmes de culture cellulaire des CML diffèrent sous plusieurs aspects de la situation *in vivo*, où le degré de réplication des CML est extrêmement faible dû à l'équilibre intrinsèque des facteurs promoteurs et inhibiteurs de la croissance. En effet, nous devons attendre les études *in vivo* dans des modèles bien contrôlés d'hypertension utilisant des facteurs de croissance potentiels et leurs antagonistes dans des fenêtres de concentrations différentes pour être en mesure de conclure sur le rôle d'un facteur de croissance particulier dans la pathogénèse de l'hypertension.

1.5.1.2.3. Pharmacologie du remodelage vasculaire dans l'hypertension

La réduction à long terme de la pression sanguine produit par les agents antihypertenseurs pourrait impliquer un effet sur la structure vasculaire à travers une altération hémodynamique, indépendamment du mode d'action du médicament. Sur la base de séries d'études approfondies utilisant les diverses classes d'agents antihypertenseurs, Mulvany et al. ont démontré que la régression de l'hypertrophie artérielle dans l'hypertension expérimentale est influencée de façon primaire par une baisse de la pression artérielle à long terme (Mulvany, 1992). Par contre, il y a des exceptions à cette règle générale. D'un côté, il y a des antihypertenseurs, comme le minoxidil ou

l'hydralazine, qui produisent une faible régression ou même une augmentation de l'hypertrophie vasculaire. La régression de l'hypertrophie causée par ces agents lorsque combinée avec un agent sympatholytique suggère que les vasodilatateurs artériels augmentent l'activité vasculaire sympathique. D'un autre côté, il y a des médicaments antihypertenseurs, comme les antagonistes calciques ou les agents interférant avec le système rénine-angiotensine, qui influencent la structure vasculaire par des mécanismes indépendants de la baisse de la pression artérielle.

Les antagonistes calciques

Une variété de facteurs de croissance, incluant PDGF et l'Ang II, stimulent l'influx calcique, du moins en partie à travers les canaux de type L dans les CML quiescentes (Ko et al., 1993; Zhu et al., 1994). L'augmentation conséquente du calcium intracellulaire semble jouer un rôle important dans la migration et la prolifération des CML [Muno, 1994 #2163]. Les antagonistes des canaux calciques de type L sont des inhibiteurs puissants de l'infiltration de monocytes dans l'intima vasculaire (Gray et al., 1993) ainsi que de la migration et la prolifération des CML produites par les facteurs de croissance polypeptidiques (Jackson and Schwartz, 1992). L'effet semble être dissocié de la classe chimique, i.e. les dihydropyridines telle la nifédipine de même que le vérapamil et le diltiazem inhibent tous la prolifération et la migration des CML (Jackson and Schwartz, 1992; Ko et al., 1993; Zhu et al., 1994).

Dans une étude élégante, Yang et al. ont démontré que la prolifération des CML produite par l'étirement pulsatif n'est pas inhibée par les antagonistes calciques (Yang et al., 1993). La divergence entre facteur de croissance et la croissance des CML induite par l'étirement pulsatile peut expliquer les effets différents des antagonistes calciques dans les modèles animaux ou chez les patients. D'un autre côté, les antagonistes calciques pourraient être des bloqueurs efficaces à long terme de l'hyperplasie myointimale dans des modèles de resténose (Munro et al., 1994). Tel que discuté auparavant, l'hyperplasie myointimale dans cette situation est dépendante de la migration et la prolifération des CML induites par les facteurs de croissance. Sur la base de leur effet sur la baisse de la pression sanguine, les antagonistes calciques ont des effets anti-athérogéniques modestes (Lichtlen et al., 1990; Schachter, 1991) et ne produisent pas une réduction nette de l'hypertrophie de la média des artères de résistance au delà du niveau attendu (Mulvany, 1990; Nyborg and Mulvany, 1985). Comme hypothèse alternative, Jackson et Schwartz ont proposé que l'influx de calcium via les canaux calciques de type L soit nécessaire pour permettre aux CML de réaliser une transition de la

quiescence à la croissance active (Jackson and Schwartz, 1992). Une fois que les CML prolifèrent, il y a perte de canaux calciques de type L (Kuga et al., 1996). Cette hypothèse de la modulation « phénotypique » des CML pourrait être testée davantage avec les outils pharmacologiques moléculaires modernes pour quantifier les canaux calciques.

En résumé, les observations actuelles suggèrent que les antagonistes calciques exercent des effets anti-prolifératifs sur les CML dans la paroi vasculaire. Les autres effets sur le remodelage vasculaire sont moins évidents ou n'ont pas été étudiés de façon approfondie. Ceci est particulièrement le cas pour les effets des antagonistes calciques sur la matrice extracellulaire et sur l'angiogénèse (Kim et al., 1995; Roth et al., 1996).

Les médicaments agissant sur le système rénine-angiotensine

Parmi les médiateurs chimiques du remodelage vasculaire, l'Ang II s'avère un facteur pléiotropique des plus importants. En plus de son rôle comme substance pressive aiguë et substance intrarénale active, l'Ang II est impliquée dans l'angiogénèse et la raréfaction vasculaire, la croissance des CML, et la synthèse de la matrice extracellulaire vasculaire. Elle peut jouer ce rôle en faisant partie des mécanismes de contrôle endocrines et paracrines activés dans l'hypertension.

Les premières observations indirectes du rôle de l'Ang II comme facteur de croissance des CML sont venues des études avec les inhibiteurs de l'ECA. Freslon et Giudicelli ont été les premiers à rapporter une diminution de l'hypertrophie des grosses artères durant un traitement chronique des rats SHR au captopril (Freslon and Giudicelli, 1983). Des études ultérieures ont confirmé cette observation avec différents inhibiteurs de l'ECA dans différents modèles d'hypertension (Schachter, 1991). Les inhibiteurs de l'ECA peuvent atténuer l'hypertrophie des grosses et des petites artères durant le développement spontané de l'hypertension ou dans les formes rénales d'hypertension chez le rat et ils peuvent aussi induire la régression de l'hypertrophie dans des formes établies d'hypertension expérimentale. Le traitement chronique des SHR avec des inhibiteurs de l'ECA réduit l'aire de section des artères de différents lits vasculaires incluant l'aorte, les artères mésentériques, les artères cérébrales et les artères coronariennes (Cadilhac and Giudicelli, 1986; Christensen et al., 1989; Clozel et al., 1989; Clozel et al., 1992; Freslon and Giudicelli, 1983; Lee et al., 1991). Dans les différents lits vasculaires, il peut y avoir une hétérogénéité de la réponse aux inhibiteurs de l'ECA. Par exemple, l'effet du cilazapril a été plus marqué dans les grosses artères

coronariennes que dans les petits vaisseaux (Clozel et al., 1992). De plus, le captopril a prévenu l'hypertrophie des grosses artères mésentériques supérieures chez le SHR et y a réduit le nombre de cellules musculaires lisses (Lee et al., 1991). En revanche, la réduction de l'aire de section n'a pas été associée à la réduction du nombre de cellules musculaires lisses dans les petites artères (Lee et al., 1991). Dans les CML en culture (Black et al., 1989) et dans les cultures cellulaires de petites artères (Schiffers et al., 1991), les inhibiteurs de l'ECA n'ont pas d'effet sur la prolifération induite par différents stimuli.

Dans l'aorte, le récepteur AT₁ est exprimé à des niveaux relativement constants au cours de la période néonatale, le développement et le stade adulte (Nakajima et al., 1995a; Yamada et al., 1996a). À l'inverse, il a été démontré que l'ARNm du récepteur AT₂ des vaisseaux de rat et de souris est exprimé à des niveaux élevés durant le développement embryonnaire et à des niveaux très élevés tout juste avant la naissance (Viswanathan et al., 1991). Après la naissance, les niveaux du récepteur AT₂ déclinent rapidement. Shanmugam et al. ont confirmé cette observation en utilisant l'hybridation *in situ* (Shanmugam et al., 1996; Viswanathan et al., 1991). Le niveau élevé de l'expression de l'ARNm du récepteur AT₂ dans la région en dehors de la média et de l'adventice persiste après la naissance, mais elle est absente dans la média et est diminuée dans l'adventia 10 jours après la naissance.

Les récepteurs AT₂ et la croissance cellulaire

Plusieurs groupes ont rapporté un rôle antiprolifératif du récepteur AT₂ *in vitro*. En effet, Stoll et al. ont observé une influence antiproliférative du récepteur AT₂ sur les cellules endothéliales coronariennes (Stoll et al., 1995). De plus, Goto et al. ont rapporté que les cellules mésangiales en culture obtenues de SHR-SP montrent un plus bas niveau d'expression d'AT₂ et une activité proliférative plus élevée que celles de rats normotendus WKY, suggérant que le récepteur AT₂ exerce un effet antiprolifératif (Goto et al., 1997). Les effets antiprolifératifs du récepteur AT₂ ont été démontrés dans des fibroblastes de souris (cellules R3T3) et des cellules PC12W (Tsuzuki et al., 1996a; Tsuzuki et al., 1996b).

In vivo, le rôle physiologique du récepteur AT₂ dans le développement foétal de l'aorte a été examiné par la perfusion de PD123319 (un antagoniste du récepteur AT₂) *in utero* du jour 15 à 21 du stade embryonnaire. Au jour 15, lorsque le récepteur AT₂ n'est pas exprimé et que le niveau de

la synthèse d'ADN est maximale, le PD123319 n'a pas d'effet sur la synthèse d'ADN. Cependant, lorsque les niveaux de la croissance dans l'aorte foétale sont diminués et que le récepteur AT₂ est exprimé (Jour 16 à 21 de l'embryon), le PD123319 atténue la réduction de la synthèse d'ADN. Ces résultats suggèrent fortement que le récepteur AT₂ médie des effets anti-croissance dans l'aorte *in vivo* (Nakajima et al., 1995b). Les effets opposés des sous-types de récepteurs AT₁ et AT₂ suggèrent une interaction antagonistique entre leurs effets sur la structure vasculaire. Le groupe de Dzau et al. a aussi examiné les effets de l'expression du récepteur AT₂ transfectés dans des CML d'adulte *in vivo* en utilisant le modèle de lésion carotidienne du rat (Nakajima et al., 1995b). Le vecteur du récepteur AT₂ ou le vecteur témoin a été transfecté dans l'artère carotidienne qui a été préalablement lésée au ballonnet par la méthode d'infection par le virus Japan-liposome. L'aire de la néointima (exprimée en ratio de l'aire de la média) des vaisseaux transfectés avec le transgène AT₂ était significativement plus petite (diminution de 70%) que celles des vaisseaux non-transfectés ou témoins. Cet effet inhibiteur du développement de la lésion neointimale peut être bloqué avec l'antagoniste du récepteur AT₂, PD123319. Sur la base de ces données *in vivo*, il a été postulé que le récepteur AT₂ régule la croissance du vaisseau sanguin, peut-être en contrôlant les effets stimulateurs de la croissance comme les facteurs de croissance ou par d'autres mécanismes comme la mort cellulaire par apoptose.

En revanche, Otsuka et al. ont observé récemment que l'expression de l'ARNm du récepteur AT₁ et AT₂ est augmenté dans l'aorte de SHR et ils ont démontré que le traitement au PD123319 réduisait l'aire de section de la média de l'aorte, alors que le losartan réduisait la pression sanguine systolique et la concentration en collagène (Otsuka et al., 1998). Ils ont suggéré que le récepteur AT₁ joue un rôle crucial dans le remodelage de la matrice tissulaire alors que le récepteur AT₂ joue un rôle dans le développement de l'hypertrophie du muscle lisse dans l'aorte du SHR. De plus, le groupe de Levy et al. ont rapporté qu'un blocage chronique du récepteur AT₁ avec losartan chez les rats WKY recevant de l'Ang II résulte en une pression artérielle normale mais il induit significativement l'hypertrophie aortique et la fibrose : à l'inverse, le blocage chronique du récepteur AT₂ avec le PD123319 dans des rats perfusés à l'Ang II n'a pas d'effet sur la pression artérielle mais il empêche l'effet de l'Ang II sur l'hypertrophie artérielle et la fibrose. Ceci suggère qu'*in vivo*, les effets vasotrophiques de l'AngII sont, du moins partiellement, médiés par les récepteurs du sous-type AT₂ (Levy et al., 1996). Cette différence apparente des fonctions du récepteur AT₂ est potentiellement due à la différence entre les espèces et/ou les modèles expérimentaux, et ces questions pourraient être adressées dans un futur rapproché. Ces résultats sont toujours controversés car ils sont

incompatibles, du moins en apparence, avec l'ensemble des données publiées sur les effets biologiques des récepteurs AT₁ et AT₂ (Matsubara, 1998).

Les récepteurs AT₁, AT₂ et l'apoptose

Étant donné que le phénomène de mort cellulaire par apoptose est critique pour le remodelage cardiovasculaire, Pollman et al. ont examiné l'effet de l'Ang II sur l'apoptose des CML *in vitro* (Pollman et al., 1996). Après déprivation de facteurs de croissance dans le sérum, les CML en culture montrent des changements morphologiques typiques de l'apoptose et la fragmentation internucléosomale d'ADN, et l'Ang II inhibe l'induction d'apoptose par le récepteur AT₁. En revanche, en utilisant les CML transfectées avec AT₂, il a été démontré qu'une stimulation sélective des récepteurs AT₂ augmente l'apoptose après déprivation de sérum (Nakajima et al., 1995b). De plus, ils ont démontré que le récepteur AT₂ exerce un effet pro-apoptotique dans les cardiomyocytes néonataux, les cellules PC12W (Lehtonen et al., 1999) et les fibroblastes de souris R3T3 en culture (Yamada et al., 1996b). Récemment, Dimmeler et al. ont rapporté que l'Ang II induisait l'apoptose des cellules endothéliales des veines ombélicales humaines par l'activation d'une cascade de caspases et que le blocage simultané des récepteurs AT₁ et AT₂ prévient l'apoptose induit par l'Ang II, alors qu'une stimulation sélective agonistique des récepteurs AT₂ seuls induit l'apoptose (Dimmeler et al., 1997). En résumé, l'ensemble des résultats obtenus par plusieurs groupes, suggère un rôle pro-apoptotique des récepteurs AT₂ *in vitro*, dans les cellules en culture (Lehtonen et al., 1999; Shenoy et al., 1999; Yamada et al., 1998). Notre groupe a été parmi les premiers à examiner le rôle des récepteurs AT₂ dans l'apoptose *in vivo*.

1.5.2. Le coeur

L'importance vitale et le rôle pathologique du coeur dans l'hypertension artérielle sont soulignés par les données épidémiologiques démontrant qu'environ quatre décès sur cinq chez les patients hypertendus non-traités sont dus à des causes cardiaques (43% dus à la défaillance de la pompe, et 36% dus à l'insuffisance coronarienne), alors que les causes cérébrovasculaires et rénales sont beaucoup moins fréquentes (14% et 7%, respectivement). L'hypertension artérielle est la cause la plus commune de la surcharge de pression du ventricule gauche (Levy et al., 1990). Au début, ceci résulte en une hypertrophie cardiaque compensatoire, laquelle conduit progressivement à la défaillance cardiaque (Kannel and Drawber, 1981). En plus d'affecter le myocarde directement, l'hypertension est aussi un des facteurs de risque pour la maladie coronarienne cardiaque. Ainsi, les conséquences cardiaques de l'hypertension ont un impact sur la mortalité et la morbidité. Un diagnostic précoce et un traitement efficace de l'hypertension contribuent à réduire ce risque.

1.5.2.1. Masse ventriculaire et développement de l'hypertrophie

L'hypertrophie compensatoire due à une haute pression artérielle est caractérisée par un épaissement de la paroi ventriculaire du septum, un volume interne ventriculaire petit ou normal (ratio masse/volume élevé) et un trajet du débit ventriculaire gauche prolongé. D'un autre côté, dans le stade d'hypertrophie décompensée, les ventricules sont élargis avec un volume diastolique élevé; le ratio masse/volume est par conséquent réduit. Un nombre important de facteurs déterminent le développement de l'hypertrophie cardiaque. Ceci inclut l'étendue, le type et la durée de la charge de pression ventriculaire, les influences humorales, le rythme et la contractilité cardiaques, et les facteurs génétiques.

1.5.2.2. Fonction cardiaque

Une des premières études cliniques sur plus de 900 patients a démontré une relation inverse entre la taille cardiaque et la fonction cardiaque dans la majorité des cas de maladies cardiaques congénitales et acquises (James, 1977). La fonction cardiaque diminue lorsque la taille cardiaque augmente, sauf au début de l'hypertrophie compensatoire. Ceci s'applique particulièrement dans le coeur hypertendu. Si le volume diastolique est considéré comme une mesure de la taille du coeur et la

fraction d'éjection du ventricule gauche comme une mesure de la fonction cardiaque. la fraction d'éjection du ventricule gauche peut rester normale, même en présence d'hypertension sévère avec hypertrophie ventriculaire gauche, tant et aussi longtemps qu'il n'y a pas d'augmentation du volume diastolique (résultat de l'hypertrophie compensatoire avec ou sans ischémie coronarienne). D'un autre côté, même au début de la dilatation ventriculaire, il y a une réduction marquée de la fraction d'éjection. L'hypertension essentielle peut être classifiée avec d'autres maladies cardiaques qui, lorsque la taille du ventricule gauche augmente, montrent une diminution de la fonction de la pompe et de la contractilité cardiaques. Ces altérations, mesurées cliniquement par des changements de la fraction d'éjection du ventricule gauche et par les index d'éjection reliés à la vitesse, sont plus marquées et sévères que celles retrouvées dans les cœurs avec une surcharge volumique (maladies mitrales et valvulaires aortiques, des déficiences ventriculaires septales, etc.) (Weber and Brilla, 1991).

1.5.2.3. Anomalies structurales dans l'hypertension

1.5.2.3.1. La structure et les anomalies cardiaques

Dans le coeur, les fibroblastes interstitiels sont maintenant considérés comme un type cellulaire réactif contribuant, du moins dans les conditions pathologiques, à l'organisation globale de la paroi par des changements dans le nombre et par la synthèse de matériaux matriciels. Sur cette base, Weber et al. ont développé un modèle cellulaire à deux compartiments pour définir les divers aspects des changements structuraux cardiaques dans des conditions pathologiques (Weber and Brilla, 1991). Dans ce modèle, le coeur consiste en un compartiment contractile myocytaire et un compartiment non-myocytaire. Le compartiment non-myocytaire comprend : 1) les cellules endothéliales, qui forment la lignée ubiquitaire de la vasculature coronarienne et lymphatique, et l'endocarde qui influence la réactivité vasomotrice des vaisseaux sanguins; 2) les cellules musculaires lisses, qui sont retrouvées dans l'épicarde, les artères et artérioles coronariennes intramyocardiques, 3) les fibroblastes cardiaques, qui ont la responsabilité de produire et de dégrader la structure protéique des collagènes et des élastines dans l'interstitium; et 4) les macrophages et les cellules mastocytaires, qui sont les défenseurs de l'invasion des protéines étrangères.

Les fibroblastes mais non les myocytes cardiaques, expriment des ARN_m pour le collagène de type I et III, les collagènes fibrillaires majeurs du myocarde qui constituent le réseau normal de la structure

matricielle. Ces collagènes sont aussi impliqués dans la fibrose interstitielle et périvasculaire du myocarde, et la formation de la cicatrice qui suit la mort cellulaire des cardiomyocytes. Comme les cellules endothéliales et musculaires lisses, les fibroblastes sont capables d'entrer dans le cycle cellulaire et peuvent ainsi entrer en croissance hyperplasique. D'un autre côté, les cardiomyocytes (myocytes cardiaques) adultes sont des cellules différenciées de façon terminale et donc, ils ne prolifèrent pas. Cette vision, basée sur les études biochimiques réalisées à travers une courte période de la croissance du myocarde, a été récemment remise en question par Anversa et al. (Anversa et al., 1990b), dont les études morphométriques de l'hypertension à long terme ont indiqué que l'hyperplasie de myocytes pouvait aussi survenir. Les myocytes cardiaques sont les cellules les plus grosses du coeur, occupant 70-75% de l'espace structural. Cependant, en terme de nombre de cellules, le compartiment des myocytes ne représente qu'environ 30% (Zak, 1973) de l'espace structural. Le développement normal du coeur, de même que l'hypertrophie en réponse à un exercice physique intense, est basé sur l'équilibre entre la croissance de ces deux compartiments, myocytaires et non-myocytaires. Cependant, la réponse de la croissance à une surcharge de pression ou de volume et l'ischémie est caractérisée par un déséquilibre entre ces deux compartiments (Weber and Brilla, 1991).

Le remodelage structural dans l'hypertension artérielle

En clinique, il a été démontré depuis longtemps que la cause la plus fréquente de la surcharge mécanique du coeur est l'hypertension (Zak, 1973). L'hypertrophie ventriculaire gauche augmente les complications cliniques chez les patients hypertendus. Ainsi, la surcharge du coeur conduit à une augmentation du stress systolique de la paroi ventriculaire et à l'hypertrophie ventriculaire gauche. Au cours de ce processus, on observe l'addition de sarcomères en parallèle aux sarcomères préexistants sur la longueur des myofibrilles (hypertrophie concentrique). Ceci provoque un épaissement du ventricule. Toutefois le volume de la chambre reste inchangé ou même se réduit, ce qui résulte en une normalisation du stress systolique de la paroi ventriculaire. La fonction diastolique, cependant, diminue habituellement chez les patients avec hypertension et hypertrophie ventriculaire gauche. Ceci est dû à la fibrose ventriculaire qui cause une réduction de la distensibilité.

Les études utilisant des modèles expérimentaux d'animaux hypertendus ont révélé l'importance du remodelage cardiaque dans l'hypertension (Weber et al., 1987). En effet, il a été reconnu que les

myocytes entrent en hypertrophie cellulaire, conduisant à une augmentation significative de l'aire transversale des myocytes cardiaques. La réponse hypertrophique survient en parallèle avec une expression transitoire de proto-oncogènes, de même que des changements dans l'expression des isoformes majeurs des protéines contractiles (myosine et actine). De plus, les myocytes expriment des quantités appréciables de facteurs de croissance, comme l'IGF-1 (Weber et al., 1987). Dans le compartiment non-myocytaire, deux importants changements sont l'augmentation de la synthèse de collagène I et la perte de micro-vaisseaux coronariens. Ainsi, alors que les changements dans le compartiment des myocytes peuvent très bien représenter une adaptation fonctionnelle du coeur à l'augmentation de la pression, le dérèglement de la performance cardiaque est causé de façon prédominante par les événements se produisant dans le compartiment non-myocytaire : diminution de l'élasticité et de la réserve en oxygène du coeur (Weber et al., 1987).

Hypertrophie des myocytes

Lorsque la tension systolique est élevée au-dessus de la limite normale, de façon intermittente ou continue, le coeur s'adapte rapidement à l'augmentation de la charge par une augmentation de la masse ventriculaire (Anversa et al., 1979; Anversa et al., 1986). L'hypertrophie des myocytes est fonction de la tension qu'ils génèrent et maintiennent durant la systole (Weber et al., 1987). Le principal mécanisme qui relie le travail mécanique à la synthèse protéique est inconnu. Toutefois, on sait que, durant la phase initiale de l'hypertrophie des myocytes, de nouveaux isoformes d'actine et de myosine apparaissent progressivement (Katz, 1990; Swynghedauw, 1989) et que de nouveaux sarcomères s'alignent en parallèle. Ces changements causent un épaissement des myocytes et, conséquemment, de la paroi ventriculaire (Anversa et al., 1986). Ce processus d'épaississement de la paroi ventriculaire réduit le stress physique exercé par la pression systolique dans le ventricule gauche (Ford, 1985; Grossmann et al., 1975). Ainsi, l'hypertrophie ventriculaire des myocytes est une adaptation, répondant de façon appropriée à l'augmentation de la pression ventriculaire gauche du point de vue de la régulation du stress de la paroi.

Le nombre de myocytes ne semble pas changer, du moins jusqu'à ce qu'une masse critique soit atteinte. Linzbach a rapporté une hyperplasie des myocytes dans le coeur humain dépassant une masse totale de 500 g. Cette augmentation de la masse est considérée comme pathologique (Linzbach, 1960). Cependant, le mécanisme responsable de la transition du coeur hypertrophié à la dilatation et à la défaillance cardiaque demeure incertain. Même si la masse critique de coeur n'est

pas dépassée, les études ultrastructurales ont révélé des changements dégénératifs des myocytes avec une diminution de myofibrilles, une augmentation de mitochondries, de myélines et de lipides (Frenzel et al., 1987). Les changements moléculaires des protéines, synthétisées dans les myocytes, peuvent jouer un rôle important dans la progression de l'hypertrophie adaptative à la défaillance cardiaque. De plus, l'augmentation de la taille des myocytes pourrait diminuer la diffusion d'oxygène et l'apport de substrat, réduisant ainsi la génération intracellulaire d'énergie. Une perte de cardiomyocytes et l'apparence de fibrose ont été rapportées dans le stade terminal de l'hypertrophie ventriculaire due à une hypertension expérimentale (Capasso et al., 1990). La perte et le remodelage des myocytes dans la paroi ventriculaire s'ensuivent, conduisant à la dilatation ventriculaire avec un amincissement de la paroi (Anversa et al., 1991; Anversa et al., 1997; Anversa et al., 1990a). Cependant, des observations chez l'humain et chez les animaux ont démontré une mitose des cardiomyocytes sous diverses conditions pathologiques caractérisées par un stress prolongé sur le myocarde (Anversa et al., 1991; Anversa et al., 1997; Anversa et al., 1990a). Par contre, cette mitose ne résulte pas en une augmentation du nombre de cellules. Anversa et al. expliquent ceci par une augmentation de la mort cellulaire par apoptose des cellules cardiaques (Anversa et al., 1997).

Fibrose myocardique

L'interstitium du myocarde contient des tissus conjonctifs fibrillaires riches en collagène de type I et III. Le collagène de type IV, retrouvé dans les membranes basales et le collagène de type V, un constituant de l'espace péri-cellulaire, sont présents dans des proportions modestes. Les composantes variées de ce réseau forme un échafaudage qui maintient l'alignement des myocytes et de la vasculature coronarienne, et fournit la transmission de la force, générée par la contraction des myocytes, vers la chambre ventriculaire. Afin de préserver l'alignement des myocytes, le réseau de collagène est aussi responsable de l'architecture (e.g.. épaisseur de la paroi) du myocarde. Les fibres de collagène conservent l'énergie durant la systole, ce qui permet le rallongement des myocytes durant la relaxation et le remplissage cardiaque. Durant la période néonatale, comme le réseau de collagène a été établi, le collagène de type II représente près du tiers du collagène total. Le collagène de type I représente plus de 75% du collagène total dans le myocarde adulte. Le collagène de type I est aussi une composante majeure de la fibrose observée dans l'hypertension rénovasculaire et génétique. Dans l'hypertension humaine et non-humaine avec hypertrophie ventriculaire gauche, l'augmentation de la fraction volumique du collagène peut prendre la forme de fibrose interstitielle, périvasculaire ou de remplacement. Le réseau fibrillaire de collagène est un élément essentiel pour

le maintien de l'intégrité structurale et de l'architecture du myocarde durant la systole et la diastole. Ce réseau dirige le stress développé par les sarcomères vers la cavité ventriculaire et distribue le stress de remplissage diastolique à travers le ventricule afin que les myocytes adjacents soient à des niveaux équivalents à d'étirement. Une augmentation anormale de collagène, e.g. fibrose, de même que les propriétés des matériaux élastiques, sont responsables de l'augmentation de la rigidité myocardique. Dans les coeurs humains en surcharge de pression comme l'hypertension ou la sténose aortique, il y a une augmentation de collagène, conduisant à une fibrose avoisinant les myocytes ventriculaires (Anderson et al., 1979; Cheitlin et al., 1980; Huysman et al., 1989) (Schwartzkopff et al., 1992). Caulfield a démontré que la fibrose péri-myocardique est causée par une augmentation de l'épaisseur des fibres de collagène péri-myocardiques et endocardiaques qui entourent des groupes de myocytes, des paquets de muscle et des myocytes individuels (Caulfield, 1983).

Il semble que des changements de l'interstitium périvasculaire, indépendamment de l'hypertrophie des myocytes peuvent altérer la capacité vasodilatatrice coronarienne et induire une détérioration de la microcirculation coronarienne dans l'hypertension. Après une période prolongée d'hypertension, des dommages cellulaires parenchymaux et la perte de myocytes surviennent, ce qui conduit à la fibrose et la cicatrisation.

Le mécanisme impliqué dans l'accumulation de collagène conduisant à la fibrose n'est pas complètement compris. La prolifération des fibroblastes responsable de la génération de collagène, une augmentation de l'activité locale des fibroblastes, ou les deux, ou une collagénolyse locale réduite, peut accompagner l'augmentation du stress myocardique et de la paroi vasculaire (Eghbali et al., 1989). L'ischémie a été suggérée comme stimulus additionnel pour la fibrose réparatrice et réactive (Bing, 1972; Fujita et al., 1988; Weber et al., 1993). Des études récentes indiquent que la fibrose myocardique peut aussi être produite par une élévation chronique d'hormones de croissance, ou des minéralocorticoïdes (Pitt et al., 1999). Ainsi, l'implication combinée des myocytes, de la vasculature intramyocardique et des tissus conjonctifs caractérisent les changements structuraux de la maladie cardiaque hypertensive.

Fibrose du myocarde et stratégies thérapeutiques

La réponse fibreuse tissulaire de l'interstitium cardiaque est responsable de la rigidité anormale du myocarde et du dysfonctionnement ventriculaire de la phase diastolique ou systolique du cycle cardiaque ou les deux. Chez les patients ayant une hypertrophie ventriculaire gauche et une fibrose myocardique avec dysfonctionnement ventriculaire, la régression de la structure du myocarde et la restauration de la distensibilité représentent des potentiels thérapeutiques.

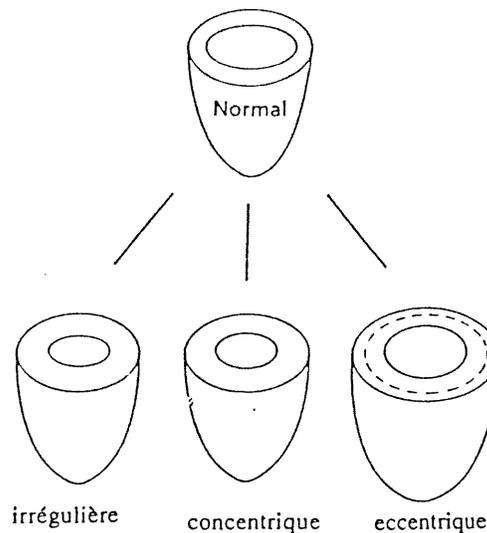
La prévention de l'hypertension artérielle et l'élévation du niveau d'Ang II circulant et d'aldostérone sont des cibles logiques pour la prévention de la fibrose myocardique. Des études initiales avec la spironolactone ou un pré-traitement au captopril chez le rat avec une ischémie rénale unilatérale ou une hyperaldostéronémie dans laquelle il a été possible d'atténuer la réponse de la fibrose tissulaire suggèrent que ces agents ont des propriétés cardioprotectives. Étant donné l'importance potentielle du calcium comme signal intracellulaire dans la synthèse de fibroblastes collagèneux cardiaques médiée par l'angiotensine II, les bloqueurs de canaux calciques pourraient avoir des propriétés cardioprotectrices. Ceci doit être examiné de façon plus approfondie. Une autre possibilité est basée sur le prémisses que la réponse médiée par l'Ang II est reliée à l'interaction entre les neurones adrénergiques et les voies médiées par l'AMPc. Ainsi, les agents sympatholytiques pourraient aussi potentiellement prévenir la fibrose.

1.5.2.3.2. La croissance cellulaire des myocytes et des non-myocytes

La croissance des cardiocytes est exprimée par une augmentation de l'étendue et/ou de la largeur cellulaire, une mesure morphométrique de l'hypertrophie cellulaire. La croissance des cardiocytes crée une augmentation de la masse et de l'épaisseur du myocarde, critères utilisés pour identifier l'hypertrophie des organes. Ainsi, l'hypertrophie ventriculaire gauche est basée sur la croissance des cardiocytes. La croissance des cardiocytes est un dénominateur commun de l'hypertrophie ventriculaire gauche (Anversa et al., 1979). D'un autre côté, il ne doit pas être assumé que l'hypertrophie ventriculaire gauche est accompagnée de la croissance cellulaire des non-myocytes, sans tenir compte de sa base étiologique. La croissance cellulaire des non-myocytes est exprimée par un remodelage structural de l'interstitium. Dans le cas des cellules musculaires lisses et endothéliales, l'épaississement de l'intima et de la média de la microvasculature coronarienne est une caractéristique importante dans l'hypertension. Ces événements pourraient réduire l'aire

luminale de ces vaisseaux et compromettre leur réactivité vasomotrice. L'accumulation de collagènes fibrillaires et l'augmentation de la synthèse de collagènes myocardiques sont des indices de la croissance des fibroblastes. La croissance des myocytes et des non-myocytes est indépendante l'un de l'autre. Des études *in vivo* ont confirmé cette hypothèse (Weber, 1989). Donc, dans l'hypertension n'importe quelle des réponses suivant la maladie cardiovasculaire pourraient se produire : 1) la croissance des non-myocytes sans l'hypertrophie des myocytes, 2) l'hypertrophie des myocytes sans croissance des non-myocytes, et 3) la croissance concomitante égale ou disproportionnée des deux types de cellules.

Normal
 |
 Hypertension
 |
 Hypertrophie



	irrégulière	concentrique	eccentrique
• Pression sanguine	↑	↑	↑
• Épaisseur de la paroi	↑↑	↑	→ (↑↓)
• Masse ventriculaire	↑	↑	↑
• Rayon ventriculaire	↓	→	↑
• Volume diastolique	→ ↓	→ ↓	↑
• Ratio masse : volume	↑↑	↑	→ ↓
• Stress systolique de la paroi	↓↓	→	↑
• Index cardiaque	→ ↓	→	↓
• Fraction d'éjection	→ ↓	→	↓
• Consommation d'oxygène myocardique	→ ↓	→	↑
• Résistance coronarienne	↑	↑	↑
• Réserve coronarienne	↓	↓	↓↓

→ : normal; ↓ : diminué; ↑ : augmenté.

Adaptation de Strauer BE, *The heart in hypertension*. Berlin : Springer, 1981.

Figure 4. Représentation des formes possibles d'hypertrophie cardiaque chez le coeur hypertendu (irrégulière, concentrique et eccentrique).

1.5.2.3.3. L'hypertrophie pathologique

Dans l'hypertension, il y a en théorie trois différentes formes d'hypertrophie influençant la dynamique, la fonction et le diagnostic ventriculaire (Figure 3).

Hypertrophie concentrique

L'augmentation de la charge artérielle induit une hypertrophie myocardique concentrique avec une augmentation de l'épaisseur de la paroi et de la masse musculaire du ventricule gauche et une élévation du ratio masse/volume du ventricule de telle sorte que la post-charge demeure constante. L'index cardiaque et la fraction d'éjection sont normaux, et il n'y a pas de changement significatif dans la consommation myocardique d'oxygène. Cependant, il y a une augmentation de la résistance coronarienne et la réserve coronarienne est clairement limitée même chez les jeunes sujets hypertendus avec une hypertrophie cardiaque.

Hypertrophie irrégulière

Chez 14% des patients hypertendus, une hypertrophie irrégulière se développe avec des régions asymétriques d'hypertrophie localisée dans la paroi antérieure, l'apex, la base et le septum. Il y a un épaissement local substantiel de la paroi, le ratio masse/volume est considérablement augmenté, et la post-charge est diminuée. Les indices de la fonction ventriculaire demeurent dans les limites normales, et la consommation d'oxygène myocardique par unité de poids est normale ou réduite. Comme dans l'hypertrophie concentrique, la résistance coronarienne est augmentée et la réserve coronarienne diminuée. Une caractéristique commune de ces deux formes (concentrique et irrégulière) est une post-charge constante (concentrique) ou même diminuée (hypertrophie irrégulière).

Hypertrophie eccentricique

Si la charge de la pression est élevée de façon persistante et accompagnée par une hypertrophie myocardique progressive et une prolifération interstitielle des tissus conjonctifs, il peut y avoir des dommages myocardiques conduisant à une augmentation du rayon ventriculaire, du volume

diastolique et de la post-charge. La dilatation des ventricules est par définition eccentricque. Les index de la pompe ventriculaire (index cardiaque, fraction d'éjection) diminuent et la consommation d'oxygène myocardique par unité de poids augmente. Comme dans d'autres formes d'hypertrophie, une élévation de la résistance coronarienne résulte de l'augmentation des composantes vasculaires. Dans l'hypertrophie eccentricque, la réserve coronarienne devient cependant considérablement limitée à cause de l'augmentation additionnelle des composantes myocardiques de la résistance coronarienne.

Du point de vue morphologique, le remodelage hypertrophique du myocarde est un processus homogène ou hétérogène, selon qu'il y a une croissance proportionnée ou disproportionnée des cellules non-myocytaires. Lorsque l'homogénéité tissulaire est préservée, la proportionnalité des compartiments musculaire, vasculaire ou interstitiel est maintenue et l'hypertrophie est adaptative. Ceci est le type d'hypertrophie qui se produit en réponse à l'entraînement isotonique ou isométrique et à l'anémie chronique. La nature adaptative de l'hypertrophie, avec la structure du myocarde préservée, est supportée par des évidences démontrant la régression de l'hypertrophie et la restauration de la taille de la chambre ventriculaire qui se produit lorsque la surcharge est terminée ou est corrigée (Weber and Brilla, 1991). En revanche, l'hétérogénéité de la structure du myocarde, basée sur la disproportionnalité de la croissance des non-myocytes et la perte de la proportionnalité inter-compartementale produira l'hypertrophie pathologique.

Dans le cas de l'hypertrophie adaptative, la concentration de collagène du myocarde demeure inchangée même si le contenu en collagène (concentration multipliée par le poids ventriculaire) est augmentée. Une réponse disproportionnée du collagène conduirait à l'hypertrophie pathologique. Ceci pourrait prendre la forme d'une augmentation inadéquate de collagène en présence de la croissance des myocytes cardiaques. L'augmentation disproportionnée de la concentration de collagène (et le contenu) dans l'hypertrophie conduit à la fibrose du myocarde et au durcissement structural du myocarde hypertrophié.

L'hypertrophie adaptative ou pathologique, qui est basée sur la croissance relative des compartiments myocytaires, vasculaires, et collagèneux, n'est pas nécessairement dépendante du temps. Par exemple, le remodelage structural initial du myocarde peut être pathologique. Alternativement, l'hypertrophie adaptative compensée peut devenir pathologique lorsque la croissance disproportionnée des cellules se produit à n'importe quel temps, créant une hétérogénéité

de la structure tissulaire. Cette dernière phase représente le mécanisme de transition de la phase de l'hypertrophie compensée à l'hypertrophie décompensée (Weber et al., 1987; Weber and Brilla, 1991).

Ainsi, les facteurs trophiques qui favorisent la disproportionnalité de la croissance cellulaire des non-myocytes représentent des déterminants de la défaillance myocardique résultant de l'hypertrophie pathologique. Le processus hypertrophique est probablement plus que la simple croissance des cardiocytes; la population cellulaire entière du myocarde de même que les protéines variées ainsi que des enzymes, et l'expression de gènes correspondants doivent être considérés dans ce processus de croissance. Par exemple, Schwartz et al. ont démontré un déplacement dans l'expression des gènes « myosin heavy chain » des cardiomyocytes, c'est-à-dire une ré-expression des isoformes fœtales (α) versus adultes (β) lors du processus d'hypertrophie cardiaque (Schwartz et al., 1993).

1.5.2.3.4. Les facteurs trophiques

Différents facteurs peuvent être impliqués dans le développement de l'hypertrophie cardiaque : 1) l'angiotensine II, la noradrénaline, endothéline; 2) les facteurs de croissance et 3) l'étirement.

Dans l'hypertrophie cardiaque, il y a une augmentation de l'expression génique de l'angiotensinogène et de l'ECA, suggérant un rôle de l'Ang II dans le cœur, en plus de son rôle classique dans la régulation de la pression (Dzau, 1993a). Il a été démontré que l'Ang II cause une hypertrophie des myocytes cardiaques (Baker et al., 1992) et augmente la production de la matrice extracellulaire par les fibroblastes cardiaques (Crawford et al., 1994; Villarreal et al., 1993). Les études de Sadoshima et al. effectuées *in vitro* sur les myocytes ont montré que l'Ang II via les récepteurs AT_1 induit une hypertrophie des myocytes calcium-dépendants, et stimule la PKC, la MAP kinase ainsi que l'activation des gènes c-fos, c-myc, c-jun et erg-1 (Sadoshima et al., 1995). D'autre part, le rôle des catécholamines, noradrénaline et adrénaline, dans le développement de l'hypertrophie des cellules myocardiques a fait l'objet de nombreuses recherches. Ainsi, Zierhut et Zimmer (Zierhut and Zimmer, 1989) et King et al. (King et al., 1987) ont rapporté qu'une perfusion de noradrénaline produit une augmentation de la masse cardiaque indépendamment des changements de pression artérielle, de pression intracardiaque ou de surcharge cardiaque. De plus, les études effectuées par Simpson et al. (Simpson et al., 1985) sur des myocytes néonataux en culture, ont démontré que les agonistes α_1 -adrénergiques induisent l'hypertrophie des myocytes, en augmentant la synthèse protéique et le volume cellulaire. Les récepteurs α_1 -adrénergiques sont principalement localisés au niveau post-

synaptique des terminaisons sympathiques. Dans le coeur, ils sont moins présents que les récepteurs β -adrénergiques, mais ils contribuent aussi à augmenter la force de contraction. Tel qu'expliqué plus tard, la stimulation des récepteurs β -adrénergiques est associée à une augmentation d'AMP cyclique qui active la PKA (Shabb et al., 1991). Par ailleurs, il a été démontré que plusieurs facteurs de croissance peuvent être impliqués dans le processus de développement de l'hypertrophie cardiaque dont l'IGF-1 (Fuller et al., 1992; Reiss et al., 1993) et le TGF- β (Sadoshima and Izumo, 1994; Villarreal et al., 1993).

Finalement, des observations obtenues dans les cardiocytes en culture suggèrent que les conditions mécaniques (e.g., l'étirement) contribuent à la croissance de ces cellules par le relâchement d'Ang II (Glennon et al., 1995). Il est incertain si l'étirement favorise aussi la croissance des fibroblastes cardiaques ou augmente la synthèse de collagènes d'une manière analogue à la déposition de collagène dans les os médiée par le stress. Tel que noté, la concentration de collagène demeure normale dans le myocarde hypertrophié avec la fistulae artérioveineuse, l'anémie chronique, ou l'administration des hormones de croissance. Ceci est aussi vrai pour les déficiences septales de l'atrium et dans l'hypertension artérielle produite par bandage de l'aorte abdominale sous les artères rénales. De plus, l'expression de gène du collagène de type I et III et la synthèse de collagène sont temporairement dissociées du début de la croissance des myocytes. Ainsi, les facteurs trophiques qui médient la croissance cellulaire des myocytes et des non-myocytes (i.e. les fibroblastes cardiaques) dans le myocarde peuvent être indépendants les uns des autres (Weber, 1989; Weber et al., 1987).

En résumé, le remodelage cardiaque dans l'hypertension comprend les processus suivants : (a) l'hypertrophie des myocytes et l'hyperplasie des fibroblastes, (b) la dilatation ventriculaire gauche, (c) la synthèse augmentée des composantes de la matrice extracellulaire, spécialement les sous-types de collagènes et (d) une croissance altérée des cellules endothéliales et des petits vaisseaux sanguins coronariens.

1.5.2.3.5. Pharmacologie du remodelage cardiaque

Étant donné que l'hypertrophie ventriculaire gauche et la réduction de la circulation coronarienne sont les principales manifestations cardiaques dans l'hypertension artérielle et que ces changements sont des facteurs de risque de mortalité et de morbidité, le traitement médical devrait cibler la régression ou la prévention de l'hypertrophie ventriculaire et améliorer la réserve sanguine.

Régression de la masse ventriculaire gauche

Des études cliniques ont démontré que certaines thérapies antihypertensives peuvent conduire à la régression de l'hypertrophie myocardique. Durant une thérapie avec des inhibiteurs de l'ECA (Nakashima et al., 1984) ainsi qu'avec des bloqueurs calciques (Strauer et al., 1985; Strauer et al., 1984), la réduction de la pression artérielle se produit en parallèle avec la régression de l'hypertrophie cardiaque. Après un traitement avec des antagonistes β -adrénergiques, des résultats hétérogènes ont été obtenus. Plusieurs antagonistes β -adrénergiques possèdent une activité sympathomimétique. Cette activité sympathomimétique des antagonistes β -adrénergiques semble jouer un rôle modulateur durant la régression de l'hypertrophie cardiaque. Par exemple, après un traitement avec acebutolol, un antagoniste β -adrénergique avec une activité sympathomimétique intrinsèque, il n'y a aucune régression de l'hypertrophie cardiaque. Par contre, lorsque les mêmes patients ont reçu l'aténolol, un bloqueur β -adrénergique sans activité sympathomimétique, il y a eu une régression de l'hypertrophie cardiaque alors que la pression demeurait inchangée (Sau et al., 1986). À présent, il n'est pas clair pourquoi certains antagonistes β -adrénergiques contrôlent l'hypertrophie ventriculaire gauche chez certains patients et non pas chez d'autres (Schulman et al., 1990). Cette hétérogénéité de la réponse antihypertrophique semble s'étendre aussi à d'autres classes. Ainsi, après un traitement chronique avec les diurétiques, aucune régression de l'hypertrophie cardiaque n'a été démontrée même si la pression artérielle a été réduite jusqu'à un niveau normotendu (McLenachan et al., 1987; Weber and Brilla, 1991).

Il y a des évidences que les catécholamines et l'Ang II agissent comme de facteurs de croissance pour l'hypertrophie ventriculaire gauche, renforçant la réponse de croissance du ventricule à une augmentation de la pression systolique (Kromer and Riegger, 1988; Laks, 1976; Östman-Smith, 1981; Schunkert et al., 1990). Bien que les diurétiques et les vasodilatateurs activent ces facteurs, leur impact sur l'hypertrophie ventriculaire gauche demeure non établie. Les inhibiteurs de l'enzyme de conversion ont un potentiel spécifique pour réduire l'hypertrophie ventriculaire gauche parce qu'ils déchargent le ventricule gauche et inhibent l'Ang II. Il semble probable qu'il y ait un spectre large d'efficacité de différents agents antihypertenseurs sur l'hypertrophie ventriculaire gauche.

Le système rénine-angiotensine

Les médiateurs chimiques les mieux compris au cours du remodelage cardiaque appartiennent au système rénine-angiotensine. Deux facteurs ont contribué à nos connaissances actuelles sur le rôle du système rénine-angiotensine : (a) la disponibilité de plusieurs agents pharmacologiques pour influencer ce système, et (b) les effets remarquables de ces médicaments sur le remodelage cardiaque dans les modèles expérimentaux et dans les pathologies humaines. Il semble maintenant que le système rénine-angiotensine joue un rôle important dans le processus du remodelage cardiaque.

Les études sur les cardiomyocytes en culture montrent que l'Ang II à des concentrations comparables aux niveaux retrouvés *in vivo*, peut induire l'hypertrophie cellulaire associée à une induction précoce de proto-oncogènes (Neyses et al., 1993; Sadoshima and Izumo, 1993). Le rôle potentiel de l'Ang II dans l'hypertrophie cardiaque est renforcé par plusieurs observations chez l'humain et dans les modèles animaux où les inhibiteurs de l'ECA renversent l'hypertrophie cardiaque, même en absence d'effets mesurables sur la baisse de la pression sanguine (Henderson et al., 1994; Konstam et al., 1992; Kromer and Riegger, 1988; Pfeffer et al., 1992; Pouleur et al., 1993; Schoemaker et al., 1991). Le type de récepteur de l'Ang II qui relaye l'induction de l'hypertrophie des myocytes a suscité beaucoup d'intérêt. *In vitro*, la production de l'hypertrophie par l'Ang II est bloquée par un antagoniste des récepteurs AT₁, le losartan, alors que l'antagoniste des récepteurs AT₂, le PD123319, n'a pas d'effet (Sadoshima and Izumo, 1993). *In vivo*, la perfusion d'Ang II chez le rat provoque une hypertrophie cardiaque, qui peut être prévenue par le losartan (Dostal and Baker, 1992). L'hypertrophie cardiaque dans l'hypertension expérimentale et suivant l'infarctus du myocarde chez les rats peut être prévenue par des antagonistes AT₁ (Kojima et al., 1994; Schieffer et al., 1994; Smits et al., 1992).

La fonction du récepteur AT₂ dans le myocarde a récemment été élucidée tout du moins en partie *in vitro*. En effet, la stimulation du récepteur AT₂ dans les cardiomyocytes néonataux et les fibroblastes en culture de rats inhibe la croissance dépendante du récepteur AT₁ (Booz and Baker, 1996; van Kesteren et al., 1997). En accord avec cette observation, des expériences de Hayashida et al. ont démontré que le récepteur AT₁ bloque l'apoptose et que le récepteur AT₂ augmente l'apoptose dans les cardiomyocytes néonataux en culture de rat, suggérant que l'Ang II exerce des effets simultanément opposés sur la croissance cellulaire via ces 2 sous-types de récepteurs ((Hayashida et

al., 1996). En revanche, Kajstura et ses collègues ont rapporté que l'Ang II induit l'apoptose dans les myocytes ventriculaires néonataux en culture de rats à partir d'un mécanisme relayé par le récepteur AT_1 et la protéine kinase C, un effet qui est bloqué par losartan (Kajstura et al., 1997b). De plus, ayant trouvé que p53 augmente l'angiotensinogène et l'expression du récepteur AT_1 dans les myocytes ventriculaires de rat adulte. Ces auteurs ont postulé que p53 induisait l'apoptose des myocytes par l'activation du RAS. En effet, le relâchement de l'Ang II secondaire à l'étirement dans les myocytes adultes est couplé à l'apoptose, et l'activation de p53 pourrait être responsable de la prolongation de la régulation à la hausse du RAS local et de l'augmentation de la susceptibilité à l'apoptose des myocytes (Lery et al., 1998; Pierzchalski et al., 1997). La base de cette divergence des observations sur l'effet de l'apoptose des myocytes du récepteur AT_1 versus AT_2 est inconnue. Elle peut être partiellement dépendante des caractéristiques cellulaires et des conditions expérimentales de culture cellulaire. Des études plus avancées pour clarifier cette question et son implication physiologique restent à faire.

Le récepteur AT_2 dans les maladies cardiaques

Si les récepteurs AT_1 et AT_2 exercent des effets antagonistes sur la biologie myocardique, spécifiquement sur la croissance, alors l'expression relative de ces récepteurs et leur ratio sous différentes conditions pathologiques pourraient être importants dans la détermination de la fonction et de la structure du myocarde. L'expression cardiaque des sous-types de récepteurs AT_1 et AT_2 est dépendante des espèces mais aussi de l'âge et des pathologies, et les changements dans leur proportion relative pourraient influencer l'hypertrophie et la fibrose myocardiques. Dans l'infarctus du myocarde expérimental, la densité du récepteur AT_2 dans le myocarde était augmentée 1 jour après infarctus de la portion infarctée, et l'expression du récepteur AT_2 était régulée à la hausse 7 jours après l'infarctus dans les portions infarctées et non-infarctées (Nio et al., 1997). Dans l'hypertrophie cardiaque chez le rat, le ratio de la densité du récepteur AT_2 sur AT_1 est augmenté (Lopez et al., 1994). Dans les cœurs de hamsters cardiomyopathiques, l'expression du récepteur AT_2 augmentée dans les fibroblastes cardiaques des régions fibreuses, exerce un effet inhibiteur sur la progression de la fibrose interstitielle produit par les récepteurs AT_1 durant le remodelage cardiaque (Ohkubo et al., 1997). En revanche, l'expression du récepteur AT_2 est augmentée dans le stade de l'hypertrophie et ensuite diminuée au niveau témoin durant la défaillance cardiaque. De plus, des changements dans l'expression du récepteur AT_2 dans les maladies cardiaques humaines ont été rapportés (Dzau and Horiuchi, 1996). En effet, dans le cœur humain défaillant, le ratio relatif de

l'expression d'AT₂ sur le récepteur AT₁ est plus élevée que dans le cœur normal (Haywood et al., 1997). Wharton et al. ont examiné l'expression et la localisation du récepteur AT₂ dans le cœur. Ils ont rapporté une plus grande densité de sites de liaison à haute affinité aux récepteurs AT₂ dans les régions de l'endocarde, l'interstitium, le péricarde et les régions infarctées comparativement au côté adjacent du myocarde non-infarcté chez les patients avec maladie cardiaque ischémique ou cardiomyopathie dilatée (Wharton et al., 1998). Les régions montrant une augmentation des sites de liaison de l'AT₂ correspondaient aux régions de prolifération des fibroblastes et de déposition de collagène. La zone non-infarctée contient de nombreux microvaisseaux exhibant des récepteurs AT₂ périvasculaires. En revanche, les sites de liaison des récepteurs AT₁ ont été localisés dans les nerfs et à des densités relativement faibles dans les artères coronaires vasculaires (Wharton et al., 1998). Ces sites de liaison des récepteurs AT₁ représentent seulement de 23 à 29% des sites de liaison de l'Ang II du myocarde. Ensemble, ces résultats suggèrent que le récepteur AT₂ joue un rôle important dans le remodelage cardiovasculaire chez les humains.

Les récepteurs AT₂ et la fonction cardiaque

Avec ces données, si nous postulons que le récepteur AT₂ interfère avec la croissance cellulaire, alors le traitement avec des antagonistes sélectifs aux récepteurs AT₁ pourrait avoir des effets bénéfiques sur le remodelage cardiaque. En effet, utilisant le modèle de la défaillance cardiaque induit par l'infarctus du myocarde chez le rat, Liu et ses collègues ont démontré qu'une augmentation significative du volume diastolique et systolique ventriculaire gauche et une diminution de la fraction d'éjection. De plus, la déposition de collagène interstitiel et la taille des cardiomyocytes étaient réduites par les antagonistes AT₁ et ces effets ont été partiellement bloqués par l'antagoniste AT₂ (Liu et al., 1997). Ils ont spéculé que dans la défaillance cardiaque, le blocage des récepteurs AT₁ augmente la rénine et l'angiotensine II; cette angiotensine II stimulerait le récepteur AT₂, qui ainsi contribue à l'effet thérapeutique de l'antagoniste AT₁.

En plus de l'hypertrophie des myocytes, la dilatation ventriculaire est un aspect important du remodelage cardiaque, spécialement après l'infarctus du myocarde. En fait, la dilatation ventriculaire gauche est un facteur de risque majeur de la mortalité et morbidité post-infarctus (Pfeffer et al., 1992; Sutton et al., 1994). Les inhibiteurs de l'ECA atténuent significativement la dilatation ventriculaire gauche chez l'humain (Konstam et al., 1992; Pouleur et al., 1993; Sutton et al., 1994; Yusuf et al., 1993) et les rats (Zierhut et al., 1993) post-infarctus. Les effets structuraux de

l'inhibition de l'ECA sur la dimension ventriculaire gauche sont associés à l'amélioration de la fonction ventriculaire (1992b; Pfeffer et al., 1992; Schoemaker et al., 1991; Sutton et al., 1994; Yusuf et al., 1993).

Les effets directs sur la structure cardiaque et les effets indirects sur les changements hémodynamiques contribuent aux actions des inhibiteurs de l'ECA sur la dimension ventriculaire gauche. Les changements hémodynamiques sont basés de façon primaire sur la réduction de la post-charge cardiaque. Sharpe et ses collaborateurs ont démontré que le captopril, mais non le furosémide, abolit la dilatation cardiaque progressive chez les patients en post-infarctus (Sharpe et al., 1988). Ainsi, un médicament qui influence de façon primaire la pré-charge n'altère pas le cours de la dilatation ventriculaire gauche. Les effets structuraux favorables des inhibiteurs de l'ECA sur la dilatation ventriculaire gauche impliquent des effets sur le métabolisme du collagène dans l'interstitium cardiaque et la régression de l'hypertrophie des myocytes (Eng et al., 1993; Pouleur et al., 1993).

Un autre effet structural cardiaque important du système rénine-angiotensine est l'augmentation de la matrice extracellulaire (collagène et glycoprotéines) induite par l'Ang II. Dans les modèles animaux d'hypertension ou de surcharge volumique avec activation simultanée du système rénine-angiotensine, le contenu en collagène cardiaque est augmenté à un niveau plus haut que prévu sur la base de l'ampleur de l'hypertrophie cardiaque (Brilla et al., 1990; Van Krimpen et al., 1991). Un traitement aux inhibiteurs de l'ECA atténue cette augmentation du contenu en collagène cardiaque (Brilla et al., 1991; Van Krimpen et al., 1991). Inversement, les modèles d'hypertension ou de surcharge volumique sans activation du système rénine-angiotensine ne produisent pas d'augmentation disproportionnée des niveaux de collagène (Brilla et al., 1990).

Des études récentes déterminant la liaison du ligand ou l'expression de ARNm ont montré la présence des récepteurs de l'Ang II dans les fibroblastes cardiaques en culture de rats (Burgess et al., 1994; Villarreal et al., 1993). Ainsi, dans ces fibroblastes en culture, l'Ang II (même à de faibles concentrations) augmente la synthèse de collagène (Weber, 1989). Sadoshima et Izumo ont démontré que des quantités nanomolaires d'Ang II pouvaient augmenter la synthèse protéique et le recaptage de la thymidine via la stimulation des récepteurs AT₁ de fibroblastes en culture (Sadoshima and Izumo, 1993). Cet effet a été associé à l'induction de nombreux gènes précoces. Aussi, dans ce modèle, la dissociation *in vivo* entre les effets du losartan sur la déposition de collagène, d'un côté,

et la synthèse d'ADN de cellules interstitielles en post-infarctus, d'un autre côté, suggère un rôle des récepteurs AT₁ dans la déposition de collagène (Smits et al., 1992). Les résultats préliminaires indiquent que la prolifération des cellules endothéliales dans le modèle de post-infarctus chez le rat est relayé par les récepteurs AT₂ plutôt que les récepteurs AT₁ (Daemen and Smits, 1993). En plus de ses effets sur le contenu en collagène, l'Ang II influence l'expression de fibonectine (Crawford et al., 1994; Villarreal et al., 1993) et d'intégrine β 1 (Burgess et al., 1994) dans les fibroblastes cardiaques. Ces protéines jouent un rôle important dans l'adhésion et la migration cellulaires. Les rôles fonctionnels de ces molécules ont été cités dans le développement embryonnaire et la cicatrisation.

La dernière cible du système rénine-angiotensine dans le remodelage cardiaque est la vasculature coronarienne. Les changements structuraux des vaisseaux artériolaires coronariens et capillaires contribuent aux anomalies cardiaques chez les patients avec hypertension artérielle ou ischémie du myocarde (Schwartzkopff et al., 1992). Dans les modèles animaux de ces pathologies, l'hypertrophie de la média des artérioles coronariennes et la raréfaction des capillaires cardiaques ont été observées et associées à une augmentation de la résistance coronarienne (Brilla et al., 1991; Tomanek et al., 1986). Les observations antérieures confirment l'importance de ces changements de la microvasculature chez les patients (Schwartzkopff et al., 1992). De plus, chez les patients avec un infarctus récent, l'intensité de la croissance de nouveaux microvaisseaux coronariens est un facteur pronostic important (Fujita et al., 1988). L'Ang II a été impliquée dans l'hypertrophie artériolaire ainsi que dans la croissance et la raréfaction des capillaires.

Autres médicaments induisant des changements cardiaques

Les médicaments antihypertenseurs de différentes classes, e.g. les bloqueurs β -adrénergiques, les sympatholytiques à action centrale, les diurétiques et les antagonistes calciques, réduisent l'hypertrophie cardiaque chez les patients hypertendus (Dahlhof et al., 1992). Les antagonistes calciques bloquent l'entrée du calcium par les canaux calciques des cellules du muscle lisse et cardiaque. Le résultat est une vasodilatation et un effet inotrope négatif. Ce dernier effet est plutôt modeste du à l'effet vasodilatateur périphérique. Le blocage β -adrénergique a des effets contraires sur le muscle lisse comparativement au muscle cardiaque. Alors qu'ils tendent à augmenter la contraction musculaire lisse des artères, les bloqueurs β -adrénergiques diminuent la contractilité myocardique. La différence fondamentale réside dans la régulation du mécanisme de contractilité par les ions calcium dans ces deux tissus. Dans le myocarde, les ions calcium interagissent avec la

troponine C pour permettre l'interaction actine-myosine. Une stimulation β -adrénergique augmente l'entrée des ions calcium dans le réticulum sarcoplasmique : ainsi, les niveaux d'ions calcium augmentent et diminuent rapidement. Donc, la contraction et la relaxation sont accélérées avec la formation d'AMP cyclique sous la stimulation β -adrénergique. De plus, une concentration d'ion calcium cytosolique élevée au moment de la systole signifie que la force maximale de contraction est augmentée. Un blocage β -adrénergique s'oppose à tout ces effets. Dans le muscle lisse, les ions calcium régulent le mécanisme de contractilité indépendamment de la troponine C. L'interaction du calcium avec la calmoduline forme le complexe calcium-calmoduline, qui stimule ensuite la kinase des chaînes légères de myosine (MLCK) pour phosphoryler les chaînes légères de myosine. Cette phosphorylation permet l'interaction actine-myosine et ainsi, la contraction. L'AMP cyclique inhibe la MLCK. Un blocage β -adrénergique, en diminuant la formation d'AMP cyclique, enlève cette inhibition. Ceci résulte en une contraction du muscle lisse.

La réduction de la pression sanguine avec la restriction de sodium réduit l'hypertrophie ventriculaire gauche (Jula and Karanko, 1994). Ceci suggère que la réduction de la pression sanguine *per se*, plutôt qu'un effet direct des médicaments, serait responsable de la régression de l'hypertrophie cardiaque par les agents antihypertenseurs. Deux exceptions sont les inhibiteurs de l'ECA, qui influencent le remodelage cardiaque par des mécanismes connexes en plus de la réduction de la pression artérielle, et les vasodilatateurs artériels directs, comme l'hydralazine ou le minoxidil, qui ne réduisent pas ou peuvent même promouvoir l'hypertrophie cardiaque (Jespersen et al., 1985; Tsoporis et al., 1993).

1.5.3. Le rein

Depuis plusieurs années, des cliniciens et des chercheurs ont reconnu le rôle crucial du rein dans le contrôle de la pression sanguine et dans la pathophysiologie des différentes formes d'hypertension (Cowley and Roman, 1996). Cependant, étant donné la proximité et souvent l'association réciproque entre le dysfonctionnement rénal et la perte de contrôle de la pression artérielle, le débat est ouvert quant à savoir si cet organe est engagé de façon primaire ou secondaire dans le développement de l'hypertension essentielle. En effet, le rein est une des cibles principales du processus hypertensif et plusieurs anomalies qui ont été observées chez les patients avec une hypertension essentielle, semblent être une conséquence plutôt qu'une cause de l'élévation de la pression (Cowley and Roman, 1996). Le rein peut affecter la pression sanguine systémique via des changements dans l'excrétion de sodium ou en modifiant le relâchement de substances vasoactives comme la rénine et l'Ang II (Gibbons, 1998). Un élément-clé dans ce processus peut être un dérèglement de l'hémodynamie rénale.

1.5.3.1. Fonction rénale

Une approche pour mieux apprécier le rôle du rein dans l'hypertension a été l'étude de l'hémodynamie rénale. Ceci n'est pas surprenant étant donné que dans l'hypertension rénovasculaire, une chute de la perfusion rénale apparaît comme étant un mécanisme du développement de l'hypertension (Cowley and Roman, 1996). Plus souvent qu'autrement, il a été démontré qu'une relation inverse existe entre le niveau de la pression sanguine et le flot sanguin rénal. De plus, il a été démontré que le flot sanguin rénal décroît avec l'âge et ceci est plus marqué chez les hypertendus que chez les normotendus (Navar, 1997). À partir de plusieurs études dans lesquelles le débit cardiaque a été déterminé en parallèle, il est devenu clair que la fraction rénale (i.e. la fraction du débit cardiaque qui est livrée aux reins) est généralement réduite dans l'hypertension. Navar et al. ont analysé le flot sanguin rénal en relation avec le débit cardiaque et l'âge chez des patients normotendus et hypertendus; ils ont trouvé des relations parallèles entre le flot sanguin rénal et l'index cardiaque dans ces deux populations, le point d'interception étant plus bas dans le groupe hypertendu (Navar, 1997). Ils ont conclu qu'une valeur « normale » du flot sanguin rénal peut se retrouver dans une large proportion de patients hypertendus, mais pour un débit cardiaque donné le flot sanguin rénal chez ces patients demeure plus bas que les sujets témoins

(Navar, 1997). L'implication potentielle des anomalies structurales de la vasculature rénale dans ce désordre a été suggérée. Ainsi, il peut être conclu qu'une augmentation de la résistance vasculaire rénale (marqueur d'hypertension) est non seulement précoce, mais aussi en progression. La nature et le site de l'augmentation de la résistance rénale vasculaire sont mal compris, mais impliquent probablement les vaisseaux pré-glomérulaires dans la zone externe corticale du rein.

1.5.3.2. Structure rénale dans l'hypertension

La base morphologique de la détérioration rénale dans tous les types d'hypertension a été examinée de façon étendue au cours des 125 dernières années. Dans l'hypertension essentielle non maligne, deux types de lésions vasculaires intrarénales ont été décrits, leur sévérité étant dépendante du degré d'hypertension et de l'âge. Dans les artères intra-lobulaires, le changement le plus courant est l'athérosclérose hyperplasique élastique, alors que dans les artérioles afférentes, on observe un mélange d'hyperplasie des CML vasculaires et des changements sclérotiques hyalins (Folkow et al., 1977; Norrelund et al., 1994). La distribution de ces lésions est inégale et non uniforme.

La pathogénèse des lésions glomérulaires dans l'hypertension essentielle peut être multifactorielle. Selon le concept classique, la dégradation glomérulaire est une conséquence directe de l'ischémie due au rétrécissement des artérioles afférentes (Navar, 1997). De plus, il est maintenant reconnu que les néphrons restants peuvent être exposés à l'augmentation de la pression systémique et ainsi devenir susceptibles à l'engorgement glomérulaire, l'hypertension et l'hyperfiltration..

Au cours de l'hypertension, le flot sanguin rénal et la filtration glomérulaire tendent à diminuer avec l'âge plus rapidement que chez les normotendus (Cowley, 1992; Cowley and Roman, 1996). Comme le flot sanguin chute plus abruptement que la filtration, une augmentation de la fraction filtrée est une des observations courantes dans l'hypertension.

L'équilibre entre la vasoconstriction des artérioles afférentes et efférentes peut survenir de façon biphasique, tel que déterminé par le niveau plasmatique de rénine. Au-delà de la résistance vasculaire, l'hyperplasie interlobulaire et la vasoconstriction artériolaire sont des déterminants majeurs de l'ischémie rénale. À ce stade, la filtration glomérulaire chute alors que la sécrétion de rénine est stimulée (Cowley, 1992; Cowley and Roman, 1996).

Remodelage rénal chez le SHR

Chez le SHR, de nombreuses déficiences rénales pourraient jouer un rôle dans le développement de l'hypertension. Ces altérations comprennent un déplacement ascendant de la relation pression-natriurèse (Liu et al., 1994; Roman, 1987), une augmentation de la résistance vasculaire rénale (Arendshorst, 1979; Berecek et al., 1980), une réduction de la filtration glomérulaire (Evan et al., 1981), une augmentation de la réponse rétroactive tubuloglomérulaire (Dilley and Arendshorst, 1984) et un remodelage structural de la vasculature rénale (Folkow et al., 1977; Norrelund et al., 1994). Plusieurs de ces changements se produisent après le développement de l'hypertension. Les résultats des études du laboratoire de Cowley et al. ont démontré que la réponse pressive-natriurétique est altérée avant le développement de l'hypertension chez le SHR et indiquent que la ré-initialisation de la fonction rénale peut être nécessaire pour le développement de l'hypertension dans ce modèle (Cowley and Roman, 1996). Cette ré-initialisation de la relation pression-natriurèse chez le SHR a été associée à une réduction du flot sanguin de la médulla rénale.

Même si le flot sanguin rénal cortical et global est similaire chez les rats SHR et WKY, la relation entre le flot sanguin papillaire et la pression de perfusion rénale est déplacée vers des pressions plus élevées chez tous les groupes d'âge des SHR. Le groupe de Roman et al. a démontré que l'administration d'un antagoniste calcique aux rats SHR augmente sélectivement le flot sanguin de la médulla dans le rein, et ceci était associé à une augmentation de la pression hydrostatique interstitielle rénale et à la normalisation de la relation pression-natriurèse chez le SHR (Roman, 1987). Ensemble, ces observations suggèrent qu'une augmentation de la résistance vasculaire de la médulla joue un rôle important dans la ré-initialisation de la relation pression-natriurèse chez le SHR.

Il existe des évidences pour une base rénale dans le développement de l'hypertension chez le SHR. L'évidence la plus convaincante provient certainement des études dans lesquelles les reins de SHR transplantés chez des récipiendaires normotendus, résultent en hypertension chez les receveurs (Bianchi et al., 1974; Bianchi et al., 1989; Rettig and Unger, 1991). Des résultats similaires ont été trouvés chez d'autres souches de rats hypertendus (Dahl and Heine, 1975; Rettig and Unger, 1991). De plus, le traitement des donneurs SHR avec des agents antihypertenseurs, même débutant au stade pré-natal, ne prévient pas le développement de l'hypertension chez les receveurs (hybrides F1) (Rettig et al., 1990). Même si des questions ont été soulevées sur l'interprétation des résultats de

chacune de ces études, les résultats suggèrent que l'hypertension chez le SHR soit due de façon primaire à un certain « facteur » rénal. Une possibilité est qu'il y a une hypertrophie des vaisseaux juxtaglomérulaires dans les reins des SHR. Cette hypertrophie artérielle est présente dans les lits non-rénaux (Folkow, 1982; Folkow et al., 1977; Heagerty et al., 1993b), et si elle présente dans le rein, pourrait augmenter la résistance rénale et produire une réponse exagérée aux substances vasoconstrictrices (Folkow, 1982; Korner and Angus, 1992). Goldblatt avait souligné que le rétrécissement des artères intrarénales serait fonctionnellement identique au rétrécissement des artères rénales principales, une cause connue de l'hypertension (Goldblatt, 1947). Maintenant, plusieurs études indiquent, qu'il y a effectivement une hypertrophie vasculaire rénale chez le SHR. Smeda et ses collègues (Smeda et al., 1988) ont rapporté une augmentation de l'aire de section de la média de tout l'arbre artériel rénal chez les rats pré-hypertendus (4 semaines) et hypertendus (21 semaines), et d'autres chercheurs, ont montré un rétrécissement de la lumière artériolaire afférente sans hypertrophie médiale (Gattone et al., 1983; Skov et al., 1990). Les préparations microvasculaires juxtamédullaires perfusées ont été utilisées pour déterminer le mécanisme responsable de l'élévation de la résistance vasculaire rénale chez le SHR. Le groupe de Roman a démontré que le diamètre des artérioles afférentes et de la vasculature pré-glomérulaire juxtamédullaire des SHR était 18% à 35% plus petit que celui observé chez les rats WKY (Gebremedhin et al., 1990; Imig et al., 1993). Le retrait du calcium dans le perfusat et dans le bain élimine les différences dans le diamètre vasculaire chez les rats SHR et WKY, indiquant que les différences pourraient être causées par une augmentation du tonus vasculaire (Gebremedhin et al., 1990). Ces différences ne sont pas secondaires au développement de l'hypertension puisque des augmentations similaires dans le tonus vasculaire pré-glomérulaire sont observées dans les reins de SHR âgés de 3 semaines, soit avant le développement de l'hypertension (Imig et al., 1993). Ensemble, ces données suggèrent que la médulla rénale joue un rôle important dans l'homéostasie sodique et hydraulique, de même que dans le contrôle à long terme de la pression artérielle.

Il y a plusieurs raisons de croire que l'Ang II soit responsable d'une telle hypertrophie de la paroi vasculaire (Gibbons, 1998; Kim and Iwao, 2000). Il est connu que l'Ang II stimule la prolifération cellulaire des CML en culture (Naftilan et al., 1990; Naftilan et al., 1989; Taubman et al., 1989), et que le traitement des SHR avec un inhibiteur de l'ECA prévienne les altérations structurales dans d'autres lits vasculaires périphériques (mésentère et membres inférieurs) (Adams et al., 1990; Lee et al., 1991). Les études chez le SHR suggèrent que les changements les plus précoces détectables au cours du traitement aux inhibiteurs de l'ECA dans la fonction rénale commencent par un changement subtil

de la résistance vasculaire rénale médullarienne en absence de changement dans le flot sanguin cortical, le flot sanguin rénal en entier ou la filtration glomérulaire. Avec l'établissement de l'hypertension de façon prolongée, plusieurs études ont démontré que la circulation rénale à travers le rein en entier devient éventuellement impliquée, avec la progression de la glomérulosclérose généralisée et un développement éventuel de la maladie rénale en phase terminale (Adams et al., 1990; Lee et al., 1991).

1.5.3.3. Pharmacologie du remodelage rénal dans le traitement de l'hypertension

Plusieurs médicaments sont présentement disponibles pour le traitement de l'hypertension. Alors que ces agents sont très bien caractérisés en terme d'action hypotensive, peu de données sont disponibles sur les actions rénales. Ceci est remarquable considérant les effets délétères que ces agents peuvent avoir sur le lit vasculaire rénal. Par exemple, les agents qui diminuent la pression artérielle mais augmentent la résistance vasculaire rénale peuvent, à long terme, être moins bénéfiques que les agents qui réduisent la résistance vasculaire rénale. Ces questions sont pertinentes puisqu'un des objectifs du traitement antihypertenseur est la néprotection.

Diurétiques

Les données sur les effets hémodynamiques rénaux des diurétiques sont peu abondantes. Alors que les études initiales ont indiqué que l'administration à court terme d'un thiazide pourrait conduire à une chute du flot sanguin rénal et du niveau de la filtration glomérulaire, Van Brummelen et ses collaborateurs ont montré que la réponse hémodynamique rénale aux diurétiques est biphasique lors d'un traitement à long terme (Cowley and Roman, 1996) (Brater, 2000b). Initialement, la vasoconstriction rénale et une diminution modeste du niveau de filtration glomérulaire ont été observées, mais avec un traitement continu, le flot sanguin rénal et la filtration glomérulaire peuvent augmenter substantiellement. Inversement, la résistance vasculaire rénale et la fraction filtrée chutent significativement au cours d'un traitement à long terme.

β -bloqueurs

Comparativement aux diurétiques, plus de données sont disponibles sur les effets sur la circulation rénale des bloqueurs β -adrénergiques. Parmi les premières études, Krauss et al. ont observé une

augmentation de la résistance vasculaire rénale durant un traitement au propranolol (Krauss et al., 1972). Des études ultérieures ont confirmé cette tendance des β -bloqueurs à induire une réduction modeste de flot sanguin rénal et du niveau de filtration glomérulaire (De Leeuw, 1982; De Leeuw and Birkenhäger, 1983; Schlueter and Batlle, 1989; Wilkinson, 1982). Mais, les réponses rénales systémiques et vasculaires sont controversées. Les différents types de β -bloqueurs utilisés peuvent possiblement être reliés à ces différences. Globalement, il semble que la plupart des β -bloqueurs tendent à préserver le flot sanguin rénal.

Antagonistes calciques

Les effets rénaux des antagonistes calciques ont été étudiés de façon étendue (Epstein, 1998). En dépit de la très grande variété des propriétés des bloqueurs des canaux calciques, ces agents réduisent invariablement la résistance vasculaire rénale, laissant la perfusion intacte. Le niveau de filtration glomérulaire peut augmenter ou demeurer inchangé. Il est à noter que les réponses hémodynamiques rénales peuvent varier avec le type d'antagoniste calcique (Epstein, 1997). Dans une revue, Reams et Bauer ont conclu que ce ne sont pas tous les dérivés des dihydropyridines qui augmentent le flot sanguin rénal de façon aiguë (Bauer et al., 1987). Néanmoins, durant un traitement avec cette classe de médicaments, il n'y a pas de dysfonction de la perfusion rénale, et la résistance vasculaire rénale est constamment réduite. Schlueter et Batte ont suggéré que les antagonistes calciques puissent réduire le tonus pré-glomérulaire et post-glomérulaire des artérioles ou les deux, selon le stimulus vasoconstricteur (Schlueter and Batlle, 1989). En d'autres termes, lorsque la constriction afférente domine, les antagonistes calciques peuvent augmenter le niveau de filtration en dilatant préférentiellement les artérioles afférente. De même, sous des conditions de pression de perfusion réduites (comme dans la sténose artérielle rénale), ces mêmes agents peuvent moduler la filtration par la dilatation de l'artériole afférente (Epstein, 1998).

Inhibiteurs de l'ECA

Plusieurs études ont indiqué qu'une administration d'inhibiteurs de l'ECA augmente le flot sanguin rénal et potentialise la relation pression-natriurèse. Des études ont examiné les effets à long terme de la relation pression-natriurèse chez les SHR traités avec un inhibiteur de l'ECA ou un antagoniste des récepteurs AT_1 (Cowley, 1992; Cowley and Roman, 1996). Ces agents peuvent efficacement réduire la pression artérielle chez les SHR sans produire une rétention de sodium. Les inhibiteurs de

l'ECA déplacent la courbe de la fonction rénale à long terme, i.e., la relation entre l'entrée de sodium et la pression artérielle, vers des pressions plus basses chez les SHR, de même que chez les normotendus (Cowley, 1992). Les antagonistes des récepteurs AT₁ de l'Ang II baissent aussi la pression artérielle, augmentent l'excrétion de sodium et potentialisent la relation pression-natriurèse chez les SHR. Les études de Kline et Liu ont suggéré que les effets antihypertenseurs à long terme d'un traitement des SHR au losartan peuvent résulter en un blocage des effets directs de l'Ang II généré localement pour produire la rétention sodique dans les tubules proximaux (Kline and Liu, 1994).

Les autres classes

En générale, la réponse vasculaire rénale à l'administration d'antagonistes α_1 -adrénergiques est caractérisée par une chute dans la résistance et le maintien du flot sanguin et de la filtration glomérulaire (Cowley and Roman, 1996). Un effet similaire a aussi été retrouvé avec les agents antihypertenseurs à action centrale (Schlueter and Batlle, 1989; van Zwieten, 1999). Étant donné l'équilibre entre la réduction du tonus afférent et efférent, la fraction filtrée n'est pas affectée (Schlueter and Batlle, 1989). La résistance vasculaire rénale diminue aussi après traitement avec des agents vasodilatateurs non-spécifiques comme l'hydralazine, mais dans ce cas, les changements dans la perfusion rénale et le niveau de filtration glomérulaire dépendent du degré de réduction de la pression artérielle (Cowley and Roman, 1996). La plupart des antagonistes α_1 -adrénergiques, les agents à action centrale et les vasodilatateurs directs tendent à réduire l'excrétion de sodium et peuvent causer un œdème significatif (Schlueter and Batlle, 1989). La chute de la pression de perfusion rénale, combinée avec l'activation du système rénine-angiotensine-aldostérone, est probablement responsable de ce phénomène.

1.6. Traitements pharmacologiques de l'hypertension

Tous les agents antihypertenseurs agissent à un ou plusieurs des quatre sites du contrôle anatomique (Figure 4) et produisent leurs effets en interférant avec les mécanismes normaux de régulation de la pression sanguine. Une classification utile de ces agents est de les regrouper selon leur principal site d'action: 1) les bloqueurs de la fonction sympathique (système nerveux central, système nerveux sympathique), 2) les diurétiques, 3) les vasodilatateurs (directs, bloqueurs de canaux calciques) et 4) les inhibiteurs du système rénine-angiotensine-aldostérone.

1.6.1. Antihypertenseurs à action centrale

Les antihypertenseurs à action centrale ont été parmi les premiers médicaments efficaces et « sécuritaires » à être introduit pour le contrôle de l'hypertension. Depuis les années 1950, ils ont formé un des principaux standards du traitement de l'hypertension. Aujourd'hui, ils ont été relégués comme médicaments de deuxième ou troisième choix sauf dans les communautés où le coût est un déterminant majeur dans le choix de la thérapie. Le méthyl dopa a été introduit au début des années 1960, suivi de l'imidazole et de la clonidine. On a cru initialement que ces derniers agissent également comme agonistes α_2 -adrénergiques. Plus récemment, l'intérêt s'est dirigé vers les imidazolines et les composés reliés comme une nouvelle classe potentielle d'agents pour baisser la pression artérielle par des récepteurs imidazoline spécifiques (van Zwieten, 1999).

1.6.1.1. Mécanisme d'action

Les médicaments de cette classe affectent le système nerveux central, responsable du maintien du débit sanguin, du tonus artériel et du volume des fluides corporels. Ils possèdent plusieurs propriétés comme la non-interférence avec le métabolisme du glucose, le profil lipidique ou les fonctions respiratoires et cardiaques, et ne semblent pas induire ou précipiter l'ischémie coronarienne ou l'hypotension sévère. Les effets négatifs de cette classe de médicaments sont la dépression avec la réserpine, la réduction de la performance mentale, les étourdissements et l'impuissance avec la méthyl dopa et la bouche sèche avec la clonidine. La recherche sur le contrôle central de la pression artérielle continue de donner de nouveaux agents qui peuvent être utilisés en thérapie. L'identification des récepteurs à imidazoline distincts des récepteurs α_2 -adrénergiques dans le cerveau est d'un intérêt particulier. Ils sont retrouvés à haute densité dans les régions

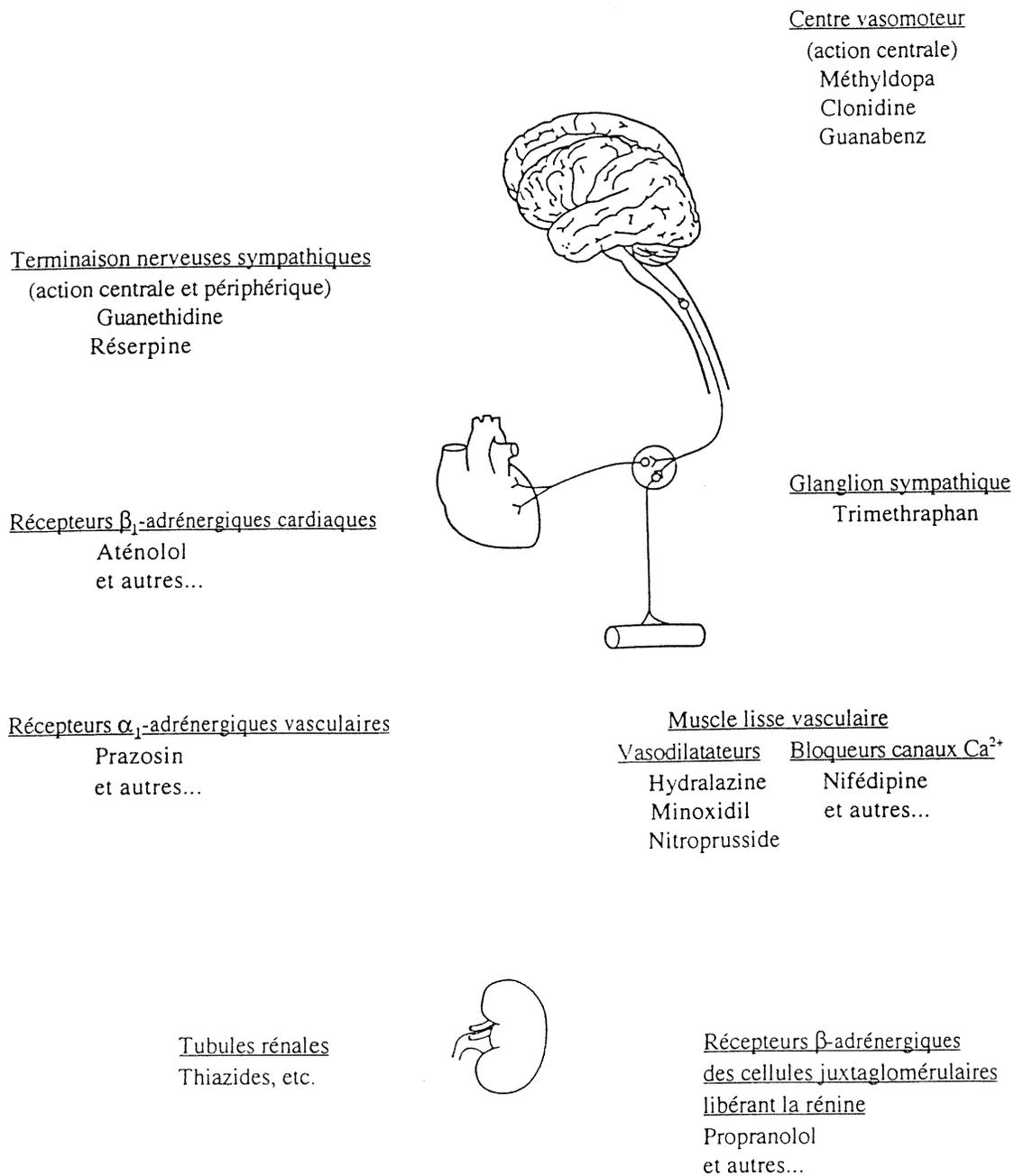


Figure 5 : Sites d'actions des classes majeures d'agents antihypertenseurs.

comme le nucleus tractus solitarius (NTS) et la région C1 (1992a; King et al., 1992). Plusieurs médicaments incluant la clonidine qui semblent agir par les récepteurs α_2 -adrénergiques sont reconnus pour interagir avec ces sites imidazolines. La reconnaissance de certains médicaments comme la rilmenidine, qui possèdent une plus grande sélectivité pour ces sites imidazolines, pourraient réduire les effets secondaires sur le système nerveux central. Ceci donne une lueur d'espoir pour des agents plus spécifiques pour ces récepteurs afin de contrôler la pression artérielle sans effets secondaires sur le système nerveux central.

1.6.2. Diurétiques

Les thiazides, les diurétiques de l'anse et les diurétiques épargneurs de potassium agissent sur les tubules rénaux pour augmenter l'excrétion de sodium et le volume urinaire, donc réduire le volume sanguin, d'où leurs effets antihypertenseurs. (Lang, 1987; Lant, 1985; Pecker, 1990; Wittner et al., 1991).

1.6.2.1. Les thiazides

Les thiazides et leurs dérivés (par exemple, hydrochlorothiazide) agissent sur la membrane luminale du segment cortical du tubule contourné distal en interférant avec le passage du chlorure de sodium de la lumière aux cellules. Ce segment du tubule rénal est responsable de l'absorption d'environ 10% du sodium filtré, et ainsi, les thiazides ont un effet natriurétique modeste quand on le compare avec celui des diurétiques de l'anse (Cowley, 1992; Cowley and Roman, 1996). L'augmentation du transport de sodium dans le tubule distal produit un échange de potassium pour du sodium, causant en partie l'augmentation soutenue de la clairance rénale du potassium responsable de la persistance de l'hypokaliémie caractéristique des thiazides à long terme. L'échange potassium-sodium est largement déterminé par le transport du sodium au niveau distal et par l'action de l'aldostérone. Mais les thiazides ont aussi une activité inhibitrice de l'anhydrase carbonique qui peut contribuer à augmenter la clairance du potassium rénal. La réduction répétée du volume extracellulaire stimule le système rénine-angiotensine-aldostérone, et l'augmentation de l'aldostérone accélère la clairance du potassium rénal. Les thiazides augmentent aussi la clairance rénale du magnésium et réduisent la clairance de l'acide urique et du calcium (Ramsay, 1999).

1.6.2.2. Les diurétiques de l'anse

Les diurétiques de l'anse (comme le furosémide ou la bumétanide) agissent principalement sur le tubule ascendant de l'anse de Henle, avec quelques actions aussi sur le tubule proximal et le segment cortical. Ils inhibent le mécanisme du co-transport de Na-K-2Cl pour l'entrée de sodium et de chlorure à la face luminale des cellules épithéliales tubulaires. Dans l'anse ascendante, environ 25% du sodium du filtrat glomérulaire est réabsorbé, et les diurétiques de l'anse ont donc une plus grande action natriurétique que les thiazides (Cowley, 1992; Cowley and Roman, 1996). Contrairement aux thiazides, ils conservent leur efficacité même dans la défaillance rénale avancée. Les diurétiques de l'anse augmentent aussi la clairance du potassium et du magnésium, et réduisent la clairance de l'urate. Ils augmentent l'excrétion de calcium, un effet opposé des thiazides. Ces diurétiques augmentent la sécrétion de rénine, même en absence de déplétion volumique; stimulent la production de prostaglandines; diminuent la résistance vasculaire rénale; et augmentent le flot sanguin rénal. Les diurétiques de l'anse peuvent être prescrits dans les conditions suivantes : l'hypertension, la défaillance cardiaque, l'oedème pulmonaire aiguë, la défaillance rénale chronique ou aiguë et l'intoxication chimique (pour augmenter le flux urinaire).

1.6.2.3. Les diurétiques épargneurs de potassium

Ces diurétiques agissent au niveau du tubule collecteur cortical où l'échange du sodium pour le potassium et l'hydrogène est sous l'influence de l'aldostérone. L'amiloride et le triamterène agissent sur la membrane luminale pour bloquer les canaux sodiques et inhibent l'effet de l'aldostérone de façon non spécifique, alors que la spirinolactone est un antagoniste compétitif réversible de l'aldostérone. Sous les conditions normales, très peu de sodium est réabsorbé à ce site, et ces agents ont une action natriurétique faible. Cependant, la réabsorption de sodium au tubule distal est augmentée lorsque le transport de sodium est augmenté par les agents agissant sur le tubule proximal comme les thiazides ou les diurétiques de l'anse. Les diurétiques épargneurs de potassium ont donc une plus grande action lorsqu'ils sont utilisés en combinaison avec les diurétiques conventionnels. Cependant, leur utilité clinique est basée plus sur leur habilité de réduire la clairance rénale du potassium que sur leur action natriurétique. Ils sont prescrits plus fréquemment pour prévenir ou traiter l'hypokaliémie causée par les thiazides ou les diurétiques de l'anse (Cowley, 1992; Cowley and Roman, 1996).

1.6.2.4. Mécanismes antihypertenseurs des diurétiques

Certaines observations suggèrent que les diurétiques diminuent la pression artérielle par une action vasodilatatrice directe sur les artérols. Plusieurs observations indiquent que l'effet vasodilatateur d'une thérapie chronique aux diurétiques est une conséquence indirecte de la réduction volumique et non une action directe sur les vaisseaux de résistance (Brater, 2000a). Les différentes classes de diurétiques baissent toutes la pression artérielle par une restriction du sodium et favorisent la réduction volumique. Lorsqu'un traitement chronique aux diurétiques, un nouvel état est atteint dans lequel la sécrétion de sodium s'équilibre avec la consommation de sodium par l'action de facteurs hémodynamiques, humoraux, ou neuronaux sur le rein. À ce nouvel état d'équilibre, la réduction plasmatique et volumique de fluides extracellulaires sont minimales, et près des limites de détection de plusieurs méthodes. Néanmoins, différentes études ont démontré que la réduction volumique peut persister (Pecker, 1990). Les changements hémodynamiques d'un traitement précoce aux diurétiques sont distincts de la réduction volumique, la réduction du débit cardiaque ou l'augmentation de la résistance périphérique. Durant un traitement chronique, il se produit une déplétion volumique, une réduction de la résistance totale périphérique et une diminution de la pression artérielle (Ramsay, 1999).

1.6.3. Les antagonistes β -adrénergiques

En 1948, Ahlquist a décrit deux types de récepteurs : le terme α a été appliqué pour les adrénorécepteurs sensibles à l'adrénaline et à la noradrénaline et moins sensibles à l'isoprotérénol, et β pour ceux qui montrent la sélectivité (i.e., plus sensible à l'isoprotérénol) (Ahlquist, 1948). Les adrénorécepteurs α médient principalement des fonctions excitatrices, et les adrénorécepteurs β médient des fonctions inhibitrices (à l'exception des cardiomyocytes où les β -adrénorécepteurs sont excitateurs). Lands et al. (Lands et al., 1967) ont démontré l'existence de deux types d'adrénorécepteurs β , β_1 et β_2 . Le premier agent β -bloqueur utilisé dans le traitement de la maladie coronarienne est le pronethalol (Black and Stephenson, 1962). Le pronethalol a été éliminé de la scène due à sa toxicité, et le propranolol l'a remplacé.

Distribution des adrénorécepteurs

À peu près tous les tissus ont une innervation noradrénergique et sont exposés à l'adrénaline ou la noradrénaline circulante. De façon classique, les récepteurs β -adrénergiques sont divisés en récepteurs β_1 retrouvés dans le muscle cardiaque et les récepteurs β_2 dans le muscle lisse vasculaire. Les récepteurs β_1 et β_2 co-existent souvent dans le même tissu. e.g. dans le coeur humain normal le ratio $\beta_1 : \beta_2$ est de 75 :25 (Golf et al., 1985), alors que dans le coeur défaillant, ce ratio change à 60 :40 dû à une régulation à la baisse des récepteurs β_1 (Bristow et al., 1986). Situés sur la membrane cellulaire, les récepteurs β -adrénergiques font partie du système adénylate cyclase. En présence de la forme stimulatrice de la protéine G (G_S) l'adénylate cyclase produit l'AMP cyclique à partir de l'ATP. L'AMP cyclique est le messenger intracellulaire de la stimulation β -adrénergique. Les actions de l'AMP cyclique consistent à « ouvrir » les canaux calciques via phosphorylation par une kinase, pour promouvoir un effet inotrope positif et augmenter le recaptage du calcium cytosolique dans le réticulum sarcoplasmique. Dans le nœud sinusal, le courant est augmenté (effet chronotrope positif), alors que le taux de conduction est accéléré (effet dromotrope positif).

Mécanismes d'action dans l'hypertension

En 1964, Prichard et Gillam ont noté pour la première fois que le propranolol baissait la pression artérielle (Prichard and Gillam, 1964). Depuis 1970, les β -bloqueurs, avec les diurétiques, sont devenus des traitements de choix pour l'hypertension. Les β -bloqueurs classiques non-sélectifs β_1/β_2 comme le propranolol, le timolol et le nadolol, et les bloqueurs β_1 -sélectifs comme l'aténolol, le métoprolol et le bisoprolol diminuent la pression artérielle par la baisse du débit cardiaque. La réduction du débit cardiaque résulte principalement de la diminution du rythme cardiaque due à une inhibition compétitive de l'activité sympathique sur le nœud sino-atrial. La résistance totale périphérique ne baisse pas, au contraire, elle tend à augmenter légèrement, particulièrement avec les bloqueurs non-sélectifs parce que les récepteurs β_2 vasculaires sont vasodilatateurs (Smits and Struyker-Boudier, 1982).

Système nerveux central

Plusieurs expériences animales ont démontré une chute de la pression artérielle lorsque le propranolol et d'autres β -bloqueurs sont injectés dans le ventricule latéral du cerveau ou via la carotide ou les artères vertébrales. Le propranolol (qui est lipophile et donc peut traverser la barrière hématoencéphalique et entrer dans le cerveau) donné par intraveineuse résulte en une baisse de la pression sanguine associée à une diminution de l'activité nerveuse splanchnique. À l'inverse, les bloquants hydrophiliques comme le practolol ou le sotalol ne réduisent pas l'activité nerveuse sympathique. Si l'activité du SNC est importante, on peut présumer que les agents hydrosolubles qui ne traversent pas la barrière hématoencéphalique, comme l'aténolol, n'auront qu'un effet antihypertenseur minime. Or, ce n'est pas le cas. Ce qui suggère que le site d'action de ces agents en général est surtout périphérique (Smits and Struyker-Boudier, 1982).

Inhibition de l'activité nerveuse sympathique périphérique

Les niveaux plasmatiques de noradrénaline corrént avec la pression diastolique (Richards et al., 1986). Il y a des preuves qui suggèrent que le degré de l'activité sympathique détermine le degré de la réduction de la pression sanguine par un β -bloqueur. Ainsi, les patients hypertendus ayant un haut niveau de noradrénaline plasmatique au repos répondent mieux aux β -bloqueurs (Myers and De Champlain, 1983). La libération de noradrénaline à partir des terminaisons nerveuses sympathiques est augmentée par la stimulation présynaptique des récepteurs β_2 (de Champlain, 1990). Un tel relâchement peut être inhibé par un β -bloqueur non sélectif comme le propranolol mais pas par un bloqueur β_1 sélectif comme l'aténolol (Vincent et al., 1982).

Le blocage de l'activité rénine

Les récepteurs β -adrénergiques juxtaglomérulaires stimulent la sécrétion de la rénine (de Champlain et al., 1999). Les β -bloqueurs comme le propranolol sont reconnus pour diminuer l'activité de la rénine plasmatique. Buhler et al. ont observé que le propranolol ne baisse que très peu la pression sanguine chez les hypertendus avec un bas niveau de l'activité rénine plasmatique. alors que la baisse est remarquable chez les hypertendus avec une haute activité plasmatique de rénine (Buhler et al., 1972). Cependant, plusieurs études ne peuvent corrélérer la baisse de l'activité rénine et la baisse de la pression artérielle induite par les β -bloqueurs. De plus, une faible dose de propranolol qui supprime l'activité rénine plasmatique n'a pas eu d'effet sur la pression artérielle. En effet, De Leeuw et Birkenhager ont montré que la rénine relâchée par le rein est plus réduite chez les non-répondants que chez les répondants à la baisse de la pression artérielle (De Leeuw and Birkenhager, 1982). De façon importante, les hypertendus qui sont résistants au captopril répondent avec une baisse significative de la pression artérielle lorsque le propranolol est ajouté à la thérapie (Staessen et al., 1980). Ainsi, l'activité plasmatique de la rénine ne peut être une contribution majeure au mécanisme antihypertenseur des β -bloqueurs, particulièrement si l'activité rénine reflète simplement l'activité nerveuse sympathique. Par contre dans le cas où la pression artérielle serait dépendante du système rénine-angiotensine, la suppression de l'activité rénine par un β -bloqueur contribuerait alors probablement à l'effet antihypertenseur.

1.6.4. Antagonistes α_1 -adrénergiques

Il a été postulé que le système nerveux sympathique joue un rôle dans l'initiation et le maintien de la haute pression artérielle dans l'hypertension essentielle (DeQuattro and Lee, 1991; DeQuattro and Miura, 1973). Ainsi il a été logique d'utiliser des médicaments qui baissent la pression artérielle en diminuant le tonus sympathique. Il a été postulé que le tonus artériolaire et veineux, et donc la pression artérielle, sont augmentés par le relâchement de la noradrénaline par les terminaisons nerveuses sympathiques et est relayé par les récepteurs α_1 -adrénergiques localisés au niveau pré- et post-synaptiques (Reid, 1986; Van Brummelen et al., 1986; van Zwieten et al., 1984). Les récepteurs α_1 -adrénergiques post-jonctionnels contribuent probablement au maintien du tonus artériolaire et ce dernier peut augmenter l'hypertension essentielle.

Mécanisme d'action

Le mécanisme d'action des antagonistes α_1 -adrénergiques, comme le prazosin, le terazosin et la doxazosin est une inhibition α -adrénergique post-jonctionnelle avec une haute sélectivité pour les récepteurs α_1 . L'affinité de ces médicaments pour les récepteurs α_2 est extrêmement faible. Les antagonistes α_1 -sélectifs diminuent la pression artérielle par la réduction de la résistance vasculaire périphérique. Les antagonistes α_1 -sélectifs produisent seulement un modeste réflexe tachycardique, ce qui implique que leur action antihypertensive est largement non-opposée par les baroréflexes. De plus, ni le débit cardiaque ni la tolérance à l'exercice ne sont réduits durant une thérapie aux bloqueurs α_1 -adrénergiques. Au niveau rénal, le flot sanguin et le taux de filtration glomérulaire sont bien maintenus durant un traitement à long terme avec le prazosin, contrairement à la diminution de ces paramètres associés à un bloqueur β sans activité sympathique intrinsèque. En clinique, les bloqueurs α -adrénergiques semblent préserver la fonction rénale.

1.6.5. Vasodilatateurs

La plupart des agents antihypertenseurs diminuent la pression sanguine par la dilatation de la résistance périphérique des vaisseaux. Dans certains cas, cet effet est indirect résultant d'actions sur le contrôle des systèmes neuronaux ou humoraux. D'autres agents ont une action relaxante directe sur les CML vasculaires. Ceux-ci incluent les bloqueurs des canaux calciques et les agents qui génèrent l'oxyde nitrique (endothelium-derived relaxing factor – EDRF).

Mécanismes d'action

Les agents de la classe des vasodilatateurs peuvent agir sur : (1) les vaisseaux de résistance; (2) les grosses artères; et (3) les vaisseaux de capacitance, les veines. Les actions diverses à ces sites jouent un rôle majeur dans leur profil hémodynamique (Collier et al., 1978; van Zwieten, 1984). Une action prédominante sur les vaisseaux de résistance pourrait causer une baisse immédiate de la pression artérielle, une activation réflexe des barorécepteurs et une augmentation du débit cardiaque (Ablad, 1963; Lin et al., 1983). À l'inverse, une relaxation des vaisseaux de capacitance cause une réduction du retour veineux au coeur et une chute du débit cardiaque associée à une baisse de la pression artérielle (Christensson et al., 1969). Il y a d'autres conséquences de la thérapie vasodilatatrice à part

l'activation sympathique. L'inhibition du système parasympathique contribue aussi à la réponse cardiaque (Man in't Veld et al., 1980), et les niveaux de rénine ou d'aldostérone augmentent partiellement à cause de l'augmentation de l'activité sympathique et de la diminution de la pression de perfusion rénale (Koch-Weser, 1974). La nature hétérogène de ce groupe d'agents est reflétée dans les différentes indications pour leurs usages. Le seul nitrate organique couramment utilisé pour l'hypertension, le sodium nitroprusside, est donné en intraveineuse pour produire une baisse rapide et réversible de la pression artérielle. L'usage du minoxidil est restreint au patient avec une hypertension sévère non contrôlée par d'autres agents. Ce médicament a été remplacé par la diazoxide, qui est aussi toxique. L'hydralazine est le seul membre de cette classe qui a été utilisé fréquemment dans le traitement de l'hypertension comme thérapie de second et troisième choix. Il est utilisé couramment en traitement parentéral lors de crise hypertensive et dans l'hypertension de la grossesse mais il n'est pas utilisé dans le traitement chronique de l'hypertension conventionnelle. Comme dans le cas du minoxidil et du diazoxide, les conséquences de l'activation sympathique favorisent l'utilisation des vasodilatateurs artériels en combinaison avec un bloqueur β -adrénergique, des inhibiteurs de l'ECA ou un antagoniste des récepteurs AT₁ (Weir, 1998).

1.6.6. Antagonistes calciques

La découverte des antagonistes calciques a débuté vers la fin des années 1970 avec les premiers travaux sur le vérapamil et la prénylamine (Fleckenstein, 1983). Fleckenstein et al. avaient alors démontré que les actions inotropes négatives de ces composés pouvaient être neutralisées par le calcium (Fleckenstein, 1983). Le développement de nouveaux composés avec des propriétés analogues a depuis lors progressé à un rythme accéléré.

1.6.6.1. Classification des antagonistes de calcium

Plusieurs schémas de classification ont été proposés pour les antagonistes calciques et sont basés essentiellement sur : a) leur structure chimique; b) leurs propriétés pharmaco-chimiques comme la lipophilicité et la spécificité du site récepteur; c) leur degré d'interférence avec les différents mécanismes de transport calcique et d) leur sélectivité tissulaire. Sur la base de la structure chimique, 4 groupes majeurs d'antagonistes calciques peuvent être distingués : la classe des phénylalkylamines (vérapamil, gallopamil, tiapamil, etc...), des benzothiazépines (diltiazem, clentiazem, fostedil, etc...), des dihydropyridines (nifédipine, nitrendipine, félodipine, etc...) et des

pipérazines (cinnarizine, lidoflazine, flunarizine, etc...). Actuellement, c'est la classification en fonction de la structure chimique qui est la plus utilisée par la communauté scientifique (Triggle, 1996). Les prototypes des antagonistes calciques (« première génération ») sont le vérapamil, le diltiazem et la nifédipine. Depuis leur apparition, des développements majeurs ont été réalisés, résultant en une émergence de nombreux autres composés que l'on nomme les bloqueurs calciques de « seconde génération ». Ces derniers sont différents de leurs prototypes non seulement du point de vue de la structure chimique, mais également leur sélectivité tissulaire, leur biodisponibilité et leur durée d'action. Ces antagonistes de la « seconde génération » permettent aussi de mieux cibler les sites stratégiques d'intervention et d'atténuer les effets secondaires reliés à l'utilisation des antagonistes du calcium de la « première génération » (Epstein, 1996; Epstein, 1997).

1.6.6.2. Les canaux calciques

Les canaux calciques retrouvés sur la plupart des cellules possèdent trois conformations : l'état fermé où le canal est fermé mais disponible à l'ouverture (forme prédominante dans la cellule polarisée); le mode ouvert ou activé, promu par des vagues de dépolarisation dépassant un certain niveau de potentiel; l'état inactivé dans lequel le canal calcique est fermé mais non disponible à l'ouverture, favorisé par une dépolarisation prolongée (Tsien, 1996). En se basant sur le type de stimulus requis pour convertir un canal à son état activé, les canaux calciques ont été séparés en 2 grandes catégories: les canaux voltage-dépendants (VOC) et les canaux récepteur-dépendant (ROC) (Tsien, 1996).

Les canaux voltage-dépendants (VOC)

Les canaux voltage-dépendants ont été différenciés en 4 sous-types : L (Long ou Lent), T (Transitoire), N (Neuronal) et R (cellules endothéliales) (Triggle, 1996; Tsien, 1996). Les canaux calciques dépendants du voltage de type L représentent la voie majeure d'entrée de calcium par dépolarisation dans le muscle lisse vasculaire et sont facilement bloqués par les dihydropyridines, les phénylalkylamines et les benzothiazépines. Dans le muscle lisse, ils sont impliqués dans le développement de la tension de la paroi (contraction-relaxation) en procurant une partie du calcium extracellulaire nécessaire, provenant de l'extérieur de la cellule. Les canaux T ont été retrouvés dans une variété de tissus, entre autres dans les cellules neuronales, les cellules musculaires lisses, cardiaques et squelettiques. Ils sont activés par de faibles dépolarisations, ont une faible

conductivité et un temps d'ouverture transitoire assez court. Par conséquent, ils sont plutôt impliqués dans l'initiation des potentiels d'action que dans l'homéostasie du calcium intracellulaire. Les canaux N ne sont retrouvés qu'au niveau des cellules neuronales et sont activés par une forte dépolarisation. Ils sont insensibles aux bloqueurs calciques et peuvent jouer un rôle important dans la régulation de la libération des neuro-transmetteurs. Les canaux R ont été découverts récemment dans les cellules endothéliales humaines, canines et de rats. Ils sont insensibles à la nifédipine (bloqueurs des canaux L uniquement), mais sont inhibés par la PN200-110 (bloqueur à la fois des types L et R) (Bkaily et al, 1992; Bkaily et al, 1993).

Les canaux récepteurs-dépendants (ROC)

Les ROC incluent tous les canaux calciques qui ne sont pas ouverts par la dépolarisation mais plutôt par l'activation de récepteurs membranaires. Cette évidence est basée sur des observations obtenues avec des neurotransmetteurs ou des hormones comme l'acétylcholine, les catécholamines, l'histamine, etc... qui sont capables de stimuler l'influx calcique et de provoquer une contraction vasculaire en absence de dépolarisation. L'un des mécanismes proposés par lequel la stimulation d'un récepteur pourrait augmenter l'entrée du calcium par le canal calcique, est l'activation de l'adénylate cyclase sous le contrôle d'une protéine G produisant la formation subséquente d'AMP cyclique suite à la liaison du neurotransmetteur à son récepteur (Triggle, 1996). Des protéines cellulaires sont phosphorylées après l'activation des récepteurs et impliqueraient une ou plusieurs composantes des canaux calciques. Des changements dans le fonctionnement du canal, associés à la phosphorylation d'une protéine spécifique située dans le canal, conduisent à un changement conformationnel qui favorise le passage des ions calciques. Des études plus récentes ont également proposé l'existence de 2 autres types de canaux calciques : les SMOC (« second messenger-operated calcium channels ») et les MOC (« myogenic-operated channels ») (Snutch and Reiner, 1992).

Il a été proposé que les SMOC sont activés par la génération de seconds messagers à l'intérieur de la cellule en réponse à l'activation du récepteur. Ces seconds messagers sont des produits générés par l'hydrolyse des phosphoinositides membranaires. Quant au MOC, ils semblent impliqués dans la régulation du tonus vasculaire.

1.6.6.3. Utilisation dans l'hypertension

Les antagonistes calciques sont utilisés dans le contrôle de différents niveaux d'hypertension. L'avantage des antagonistes calciques de type dihydropyridine est leur aspect sécuritaire, même si les incidences d'effets secondaires sont élevées, particulièrement avec les agents à action de courte durée (Furberg et al., 1995; Furberg and Psaty, 1996; Epstein, 1996; Epstein, 1997). L'utilisation du vérapamil et du diltiazem a été associée à une incidence d'effets secondaires symptomatiques moindre, même si la sécurité représente une question majeure chez les patients avec des perturbations nodales ou de conduction. Les antagonistes calciques sont fréquemment utilisés en combinaison avec les β -bloqueurs, les diurétiques ou les inhibiteurs de l'ECA. De façon surprenante, il y a des évidences que la restriction de sodium n'a pas d'effet antihypertenseur additionnel lorsque combinée à un blocage des canaux calciques (Morgan et al., 1986; Nicholson et al., 1987; Redon et al., 1993), ce qui est contraire à la combinaison avec d'autres classes de médicaments antihypertenseurs où les effets additifs ont été rapportés. Il a été suggéré que le blocage des canaux calciques, particulièrement avec la classe des dihydropyridines, est utile chez les patients âgés où le dysfonctionnement des réponses réflexes ajoutent à l'efficacité et diminuent les problèmes associés avec l'activation sympathique (Kiowski et al., 1985).

1.6.7. Inhibiteurs de l'ECA

Plusieurs inhibiteurs de l'ECA sont maintenant disponibles pour l'usage clinique et plus de 50 nouveaux composés sont en développement. L'introduction des inhibiteurs de l'ECA a non seulement produit une nouvelle approche thérapeutique pour le traitement de l'hypertension et de la défaillance cardiaque, mais a aussi conduit à une meilleure compréhension des différentes fonctions physiologiques de l'ECA (Brown and Vaughan, 1998; Salvetti, 1990; Unger et al., 1990). L'ECA est distribuée abondamment dans différents tissus ou types cellulaires. De façon prédominante, elle est localisée à la surface luminale de l'endothélium vasculaire, mais a aussi été retrouvée dans les fluides corporels (plasma, fluide cérébrospinal), dans les cellules épithéliales du rein (tubules en bordures en brosses), dans le tractus gastrointestinal, dans les testicules et aussi dans les structures épithéliales et neuronales du cerveau (Erdös, 1975; Erdös and Skidgel, 1987). Tel que mentionné auparavant, l'ECA est impliquée dans le système rénine-angiotensine, où elle convertit l'angiotensine I en angiotensine II, mais elle hydrolyse aussi d'autres peptides biologiquement actifs comme la bradykinine, la substance P, les enképhalines et l'hormone lutéinisante (LHRH;

luteinizing hormone releasing hormone) (Brown and Vaughan, 1998; Erdös, 1975; Salvetti, 1990; Unger et al., 1990).

Pharmacologie

Les inhibiteurs de l'ECA (dont l'énalapril, qui est utilisé dans nos études) diffèrent entre eux par leur structure chimique, leur puissance, leur biodisponibilité, leur demi-vie plasmatique, leur voie d'élimination, leur distribution et leur affinité pour l'ECA tissulaire, et dépendamment s'ils sont administrés comme pro-drogues, les inhibiteurs de l'ECA peuvent être classifiés en trois groupes selon leur structure chimique (Brown and Vaughan, 1998). Le captopril est le prototype des inhibiteurs de l'ECA contenant un groupement sulfhydryl; les autres sont le fentapril, le pivalopril, le zofénopril et l'alacepril. Des études *in vitro* suggèrent que la présence du groupement sulfhydryl confère des propriétés autres que l'inhibition de l'ECA à ces agents, comme un rôle protecteur de radicaux libres et des effets sur la prostaglandines (Mira et al., 1994; Zusman, 1987). La signification clinique de ces effets restent dorénavant à démontrer. Le fosinopril est le seul agent approuvé de la famille des inhibiteurs de l'ECA qui contient un groupement phosphinyl. La majorité des autres inhibiteurs de l'ECA contiennent un groupement carboxyl. Le captopril diffère des autres inhibiteurs de l'ECA par sa courte demi-vie d'élimination. À l'exception du fosinopril, du trandolapril et du spirapril, les inhibiteurs de l'ECA comme l'énalapril sont éliminés de façon prédominante à travers par les reins. Pour cette raison, des réductions de doses sont requises lorsqu'il y a dysfonctionnement rénal. La majorité des inhibiteurs de l'ECA dont l'énalapril, sont administrés comme pro-drogues qui demeurent inactives jusqu'à leur estérification dans le foie (Brown and Vaughan, 1998). Ces pro-drogues ont une biodisponibilité orale augmentée comparativement à leurs formes actives. L'ECA est présent dans le plasma de même que dans les tissus, et il y a des différences dans l'affinité relative des inhibiteurs de l'ECA. Par exemple, Fabris et al. ont examiné la liaison de différents inhibiteurs de l'ECA dans des homogénats de coeur et ont trouvé que l'ordre de puissance est enalaprilat = quinaprilat = benazaprilat >perindoprilat>lisinoprilat>fosinoprilat (Fabris et al., 1989). Plusieurs investigateurs ont démontré que les effets des inhibiteurs de l'ECA sur la pression artérielle corrèle mieux avec les niveaux tissulaires de l'ECA que de l'ECA circulante. La signification clinique de ces différences dans la liaison tissulaire n'a toutefois pas été établie (Cohen and Kurz, 1982; Sakaguchi et al., 1988).

Les mécanismes d'action

Les inhibiteurs de l'ECA sont caractérisés comme des inhibiteurs compétitifs. Ils sont dirigés vers des sites actifs de l'enzyme (Brown and Vaughan, 1998; Shapiro and Riordan, 1984; Shapiro and Riordan, 1984). Les différences dans les caractéristiques de liaison peuvent largement expliquer les différences en terme de puissance et de durée d'action entre les inhibiteurs de l'ECA. La réduction des niveaux d'Ang II circulante dans le sang conduit à une diminution des effets du peptide sur le tonus vasculaire, la libération d'aldostérone et la rétention de sodium et constitue le principal mécanisme de l'action antihypertensive des inhibiteurs de l'ECA. Un mécanisme d'action à plus long terme des inhibiteurs de l'ECA pourrait résider dans l'inhibition des actions trophiques de l'Ang II. En effet, il a été postulé que l'Ang II est un facteur de croissance ou modulateur, et peut ainsi jouer un rôle dans le développement et le maintien de l'hypertrophie et/ou l'hyperplasie myocardique et vasculaire (Schelling et al., 1991). Ainsi, les inhibiteurs de l'ECA peuvent prévenir ou induire une régression structurale ventriculaire gauche ou vasculaire, ce qui contribue au maintien de la réduction de la pression artérielle. L'inhibition de l'ECA dans l'endothélium vasculaire des poumons, et dans les vaisseaux des autres organes et le plasma sanguin, contribue la réduction des niveaux circulants d'Ang II. Cependant, des évidences expérimentales et cliniques ont montré que la pression peut être réduite par les inhibiteurs de l'ECA sans pour autant que le niveau plasmatique du système rénine-angiotensine soit affecté. Ceci a conduit à l'hypothèse du rôle du système rénine-angiotensine-aldostérone tissulaire. Ainsi, des effets pharmacologiques additionnels de ces médicaments ont été considérés. Parce que l'ECA est identique à l'enzyme qui dégrade la bradykinine, la kininase II, les inhibiteurs de l'ECA peuvent, théoriquement, potentialiser l'effet direct des kinines endogènes (ou relayé par l'EDRF) et des prostaglandines. Jusqu'à ce jour, l'implication des kinines endogènes dans les effets des inhibiteurs de l'ECA n'est pas clairement définie. Il a été démontré que les inhibiteurs de l'ECA interfèrent avec la transmission sympathique, probablement en antagonisant l'action facilitatrice de l'Ang II sur le relâchement des transmetteurs présynaptiques, et en améliorant la fonction des baroréflexes. De plus, des actions des inhibiteurs de l'ECA, possiblement non reliées à l'inhibition de l'ECA, comme les altérations de la perméabilité du sodium dans les CML ont été décrites (Brown and Vaughan, 1998).

Tel que déjà discuté, le système rénine-angiotensine joue une rôle de pivot dans la régulation de la pression artérielle. La livraison réduite de sodium de la macula densa, la pression de perfusion rénale réduite, et l'activité sympathique stimule toutes la sécrétion de rénine par les cellules

juxtaglomérulaires, la source classique de rénine dans le système rénine-angiotensine circulant (Sealey and Laragh, 1990). Alternativement, la rénine peut être produite localement dans les tissus (Danser et al., 1994; Dzau, 1993b). L'Ang II est un vasoconstricteur puissant, agissant directement sur les cellules musculaires lisses (Folkow et al., 1961). De plus, l'Ang II interagit avec le système nerveux sympathique de façon périphérique et central pour augmenter le tonus vasculaire (Zimmerman et al., 1984). L'Ang II produit une expansion volumique à travers une rétention sodique (via l'aldostérone (Biron et al., 1961) et la vasoconstriction rénale et la rétention de fluide (via l'hormone antidiurétique) (Padfield and Morton, 1977). Au niveau cellulaire, l'Ang II favorise la migration, la prolifération et l'hypertrophie des CML et des cardiomyocytes (Bell and Madri, 1990; Daemen et al., 1991; Dostal et al., 1996; Huckle and Earp, 1994; Itoh et al., 1993).

Tel que mentionné auparavant, en plus de catalyser la formation de l'Ang II, l'ECA (ou kininase II) catalyse la dégradation de la bradykinine (Erdös and Skidgel, 1987). Dans des tissus ou organes spécifiques, la bradykinine produit une contraction du muscle lisse (e.g., utérine ou iliaque), augmente la perméabilité vasculaire, stimule les fibres périphériques et augmente la sécrétion de mucus (Proud and Kaplan, 1988). Cependant, la bradykinine favorise également une vasodilatation en stimulant la production de métabolites de l'acide arachidonique, d'oxyde nitrique, et le facteur hyperpolarisant dérivé de l'endothélium vasculaire (Vanhoutte, 1989). Dans le rein, la bradykinine produit une natriurèse par des effets tubulaires directs (Stein et al., 1972). La plupart des effets physiologiques de la bradykinine semblent relayés par les récepteurs B₂ (Bao et al., 1992; Gohlke et al., 1994; Ito et al., 1997; Linz et al., 1995; Regoli and Barabe, 1980).

En résumé, l'ECA pourrait contrôler l'équilibre entre les propriétés vasodilatatrices et vasoconstrictrices. Les inhibiteurs de l'ECA altèrent cet équilibre en diminuant la formation d'Ang II et la dégradation de la bradykinine. Les inhibiteurs de l'ECA altèrent aussi la formation et la dégradation de plusieurs autres substances vasoactives comme la substance P, mais la contribution de ces composés aux effets thérapeutiques ou secondaires des inhibiteurs de l'ECA est inconnue (Cascieri et al., 1984; Marceau, 1995; Marceau, 1997).

1.6.8. Antagonistes des récepteurs AT₁ de l'Ang II

Au cours de la dernière décennie, le blocage du système rénine-angiotensine avec les inhibiteurs de l'ECA est devenu une des thérapies les plus acceptées pour le traitement de l'hypertension et de la

défaillance cardiaque. Malgré l'acceptation accrue des inhibiteurs de l'ECA, des recherches pour trouver d'autres voies de blocage du système rénine-angiotensine sont en cours. Il y a plusieurs raisons pour explorer des voies alternatives.

Premièrement, les inhibiteurs de l'ECA ont des effets secondaires comme la toux, qui est couramment rencontrée (Dzau, 1992). L'ECA n'est pas une enzyme spécifique dans le sens qu'elle hydrolyse d'autres substrats que l'Ang I comme la bradykinine, la substance P ou les enképhalines (Brown and Vaughan, 1998). Il a été supposé, sans pour autant être prouvé, que la toux et l'oedème pulmonaire pouvaient être causées par une inhibition de la dégradation de ces peptides (Dzau, 1992). De plus, l'inhibition à long terme de l'ECA ne semble pas supprimer complètement l'activité du système rénine-angiotensine, le niveau d'Ang II plasmatique et d'aldostérone étant augmenté par une hausse compensatoire de la sécrétion de rénine selon un mécanisme de rétroaction négative (Brown and Vaughan, 1998). Dans le but de contourner les limites des inhibiteurs de l'ECA, les antagonistes des récepteurs de l'Ang II ont été développés (Timmermans et al., 1993b).

Mécanismes d'action

Il y a 20 ans, l'antagonisme des récepteurs de l'Ang II a été utilisé comme nouvelle approche pour bloquer le système rénine-angiotensine (Timmermans et al., 1993b). Lorsque les antagonistes peptidiques des récepteurs à l'Ang II sont devenus disponibles, ils diminuent la pression sanguine dans les modèles animaux d'hypertension de même que chez les patients hypertendus (Brunner et al., 1973; Brunner et al., 1971; Gavras et al., 1973). Dans les premiers composés, la saralasin, a été le plus fréquemment utilisée mais elle a été par la suite abandonnée à cause de sa nature peptidique obligeant une administration parentérale et de son activité agoniste partielle. Récemment, des antagonistes des récepteurs de l'Ang II non-peptidiques et oralement actifs ont été développés (Mimran et al., 1999; Stroth and Unger, 1999). La disponibilité de ces nouveaux composés a permis une nouvelle approche pour bloquer le système rénine-angiotensine. Ceci a de plus amélioré notre compréhension des récepteurs de l'Ang II en révélant l'existence d'au moins deux différents sous-types de récepteurs à l'Ang II, AT₁ et AT₂ (Timmermans et al., 1993b).

Hétérogénéité des récepteurs de l'Ang II

Le développement de nouveaux antagonistes des récepteurs de l'Ang II a conduit à la mise en évidence de différents sous-types de récepteurs à l'Ang II. Ainsi, en comparant les effets inhibiteurs de la saralasin, le premier antagoniste peptidique des récepteurs à l'Ang II, et le losartan, il était clair que selon le tissu étudié, les résultats n'étaient pas les mêmes (Chiu et al., 1989; Stroth and Unger, 1999). Lorsque la liaison de l'Ang II a été étudiée dans les microsomes de cellules corticales surrénaliennes, la saralasin a produit 100% d'inhibition, alors que le losartan a antagonisé seulement 75-80% de la liaison même à haute concentration (Chung et al., 1996). Les 20-25% des sites de liaison qui ne sont pas bloqués par le losartan peuvent en fait être inhibés par la saralasin ou par le PD123177 ou le PD123319, des composés non-peptidiques développés par Parke-Davis (Chung et al., 1996). Ces études suggèrent qu'il y a au moins deux populations de récepteurs à l'Ang II. La population qui est inhibée par le losartan est désignée AT₁, alors que celle qui est résistante au losartan mais bloquée par le PD123177 a été désignée AT₂ (Chung et al., 1996). La majorité des effets de l'Ang II sont relayés par les récepteurs AT₁. La pharmacologie des antagonistes des récepteurs AT₁ a été abondamment revue par Timmermans et ses collaborateurs (Timmermans et al., 1993b). Ces agents bloquent potentiellement la liaison aux récepteurs AT₁ dans les membranes d'une variété de tissus. *In vitro*, les antagonistes des récepteurs AT₁ inhibent les effets contractiles de l'Ang II sur les préparations de CML vasculaires, et *in vivo*, les bloqueurs AT₁ de l'Ang II préviennent ou renversent tout les effets aigus connus de l'Ang II : (1) réponses pressives rapides; (2) réponses pressives lentes; (3) les effets stimulateurs du système nerveux sympathique périphérique; (4) tous les effets du système nerveux central (la soif, le relâchement de vasopressine, le tonus sympathique); (5) le relâchement de catécholamines adrénaliennes; (6) la sécrétion d'aldostérone; (7) tous les effets directs ou indirects de l'Ang II sur le rein; et (8) les effets sur la croissance (Timmermans et al., 1993b).

Le blocage des récepteurs AT₁ réduit la pression artérielle chez les animaux avec une hypertension génétique ou rénovasculaire de même que chez les animaux transgéniques exprimant le gène rénine humaine (Chung et al., 1996). Cependant, les antagonistes des récepteurs AT₁ ont très peu d'effet sur la pression artérielle chez les animaux hypertendus avec un niveau de rénine bas, e.g. les rats déoxycorticostérone acétate-sel hypertendus (DOCA-salt) (Chung et al., 1996). La plupart des inhibiteurs démontrent un antagonisme compétitif et surmontable, mais certains montrent un antagonisme insurmontable, une observation qui a conduit à l'idée que les récepteurs peuvent exister

sous deux conformations avec différentes affinités pour les antagonistes (Stroth and Unger, 1999). Les antagonistes des récepteurs AT₁ de l'Ang II sont très sélectifs. Ils ne déplacent pas les ligands qui se lient aux canaux calciques, ou adrénergiques, muscariniques, dopaminergiques, sérotoninergiques, ou autres, et ils n'antagonisent pas les actions de la vasopressine, des catécholamines, de l'acétylcholine, de la sérotonine, de la bradykinine ou de l'histamine (Timmermans et al., 1993b).

2.0. Prolifération et Apoptose

2.1. Cycle cellulaire

D'une division à l'autre, la cellule est le siège d'une série d'événements s'enchaînant selon une chronologie précise (Figure 5). La phase qui précède l'entrée en phase S, où il y a synthèse et réplication d'ADN, est appelée Gap1 ou G_1 . La phase 2 ou Gap2 suit la période de synthèse d'ADN et précède la phase M (mitose) où il y a mitose ou division du matériel génétique, du cytoplasme ainsi que des membranes biologiques afin de donner deux cellules filles. Selon l'environnement cellulaire (présence de facteurs de croissance, présence de substances inhibant la croissance, l'état de confluence, etc...), et l'état même de la cellule (taille, état du matériel génétique, etc...), c'est en phase G_1 du cycle cellulaire que la décision se prend quant à l'avenir de la cellule. Ainsi, quatre choix peuvent s'offrir à la cellule en phase G_1 : 1) continuer en phase S si les points de contrôle ont été surmontés en G_1 , 2) s'arrêter en phase G_1 afin de permettre la réplication de son matériel génétique au besoin, 3) retourner en quiescence (sortir du cycle cellulaire, appelée également phase G_0 , si par exemple il n'y a pas de facteurs de croissance dans l'environnement immédiat de la cellule ou 4) sortir du cycle cellulaire pour entrer dans d'autres phases comme la différenciation ou l'apoptose. Il est à noter que la cellule peut décider d'entrer en apoptose à plusieurs stades du cycle : S, G_2 et même G_0 .

2.1.1. Mesure de la prolifération

Il est important de noter qu'une différence majeure existe entre les études de la prolifération chez les animaux et chez l'humain. En effet, chez les animaux, il est pratique d'utiliser des analogues marqués de thymidine (par exemple, le bromodéoxyuridine (BrDu) ou la thymidine tritiée radioactive ($^3\text{H-TdR}$) (Schwartz et al., 1996). Tel que montré à la Figure 6, la réplication cellulaire peut être détectée directement, par marquage de la synthèse d'ADN (soit la transition G_1 -S) avec des analogues de la thymidine, ou indirectement, par des anticorps par hybridation *in situ* contre l'ARN ou par les protéines qui sont régulées à la hausse durant le cycle cellulaire (par exemple, PCNA, mRNA pour histone H1).

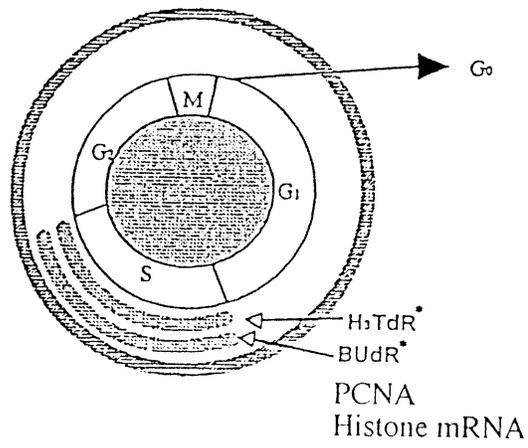


Figure 6 : Le cycle cellulaire et les mesures de prolifération .

2.2. L'apoptose

Introduit en 1972 dans le vocabulaire biologique et médical par Kerr et al. (Kerr et al., 1972), apoptose est un mot grec signifiant « chute » des pétales (d'une fleur) ou des feuilles (d'un arbre). Ce terme imagé désigne une forme particulière de mort cellulaire où, après de profonds remaniements structuraux et fonctionnels, la cellule apoptotique se détache de ses voisines pour être phagocytée par les cellules environnantes. L'apoptose est d'abord un phénomène physiologique régulateur équilibrant le nombre de cellules d'un tissu normal (Wyllie, 1992). Elle s'inscrit donc dans la vie de la cellule au même titre que la différenciation ou la mitose (Williams, 1993) mais elle s'oppose à la sénescence qui dépend de l'âge et du potentiel de division de la cellule (Barrett and Preston, 1994). Contrairement à la nécrose (Kerr et al., 1972; Williams et al., 1992; Wyllie et al., 1980), une autre forme de mort cellulaire de type « accidentelle » ou « caotique », l'apoptose doit être considérée comme une approche autonome, relativement indépendante de l'environnement (Tableau III). C'est un processus cellulaire actif mettant en action le métabolisme propre de la cellule, constatation qui a introduit le concept de mort cellulaire programmée (Arends and Wyllie, 1991; Raff, 1992) ou suicide cellulaire (Martin, 1993; Raff, 1992). En fait, la programmation de la mort cellulaire, qui suppose l'existence de gènes contrôlant l'expression de protéines responsables de l'apoptose à un moment donné de la vie cellulaire ou en réponse à des signaux environnementaux donnés, est longtemps restée une hypothèse jusqu'aux travaux d'Ellis et Horwitz démontrant l'existence dans la nématode *Caenorhabditis elegans* (*C. elegans*), de gènes inhibiteurs ou inducteurs (Ellis and Horwitz, 1986). On sait maintenant qu'il existe aussi chez les mammifères, et en particulier chez l'homme, des gènes codant pour des protéines connues sous le nom de « caspase » qui, comme chez le nématode, contrôlent l'apoptose (Raff, 1992; Tenniswood et al., 1994; Williams, 1993; Williams et al., 1992; Wyllie, 1992).

2.2.1. Caractéristiques de la cellule apoptotique

Dans un tissu, l'apoptose atteint habituellement une seule cellule ou quelques cellules isolées (Kerr et al., 1972), à l'opposé de la nécrose où la destruction est généralement pluricellulaire (Tableau III). En principe, l'apoptose évolue sous l'angle morphologique en trois étapes (Arends and Wyllie, 1991) (Figure 7). La première étape est caractérisée par la survenue brusque d'altérations nucléaires et cytoplasmiques. La chromatine de la cellule apoptotique se condense pour former un croissant homogène plus ou moins volumineux. Dans le cytoplasme, les organelles se rapprochent et

Tableau III : Nécrose et apoptose : caractéristiques et signification .

Nécrose	Apoptose
Caractéristiques morphologiques	
<ul style="list-style-type: none"> - Perte de l'intégrité membranaire - Flocculation de la chromatine - Gonflement cellulaire et lyse - Pas de formation vésiculaire - Désintégration des organelles 	<ul style="list-style-type: none"> - Déformation membranaire sans perte d'intégrité - Aggrégation de la chromatine à la membrane nucléaire - Condensation cellulaire - Formation vésiculaire liée à la membrane - Pas de désintégration des organelles
Caractéristiques biochimiques	
<ul style="list-style-type: none"> - Perte de la régulation de l'homéostasie ionique - Pas d'énergie requise (processus passif, peut survenir à 4°C) - Digestion aléatoire de l'ADN (apparence d'un nuage d'ADN après électrophorèse sur gel d'agarose) - Fragmentation d'ADN post-lytique (= évènement tardif de la mort cellulaire) 	<ul style="list-style-type: none"> - Processus hautement régulé impliquant l'activation enzymatique - Dépendant de l'ATP (processus actif, ne peut survenir à 4°C) - Fragmentation mono- et oligonucléosomale d'ADN (apparence d'échelle d'ADN après électrophorèse) - Fragmentation d'ADN pré-lytique (= évènement précoce de la mort cellulaire)
Signification physiologique	
<ul style="list-style-type: none"> - Mort d'un groupe de cellules - Induit par des perturbations non-physiologiques - Phagocytose par les macrophages - Réponse inflammatoire significative 	<ul style="list-style-type: none"> - Mort de cellules individuelles - Induit par des stimuli physiologiques - Phagocytose par les cellules adjacentes ou les macrophages - Pas de réponse inflammatoire

s'agglomèrent, particulièrement les filaments du cytosquelette et les ribosomes libres. Par contre, le réticulum endoplasmique et les mitochondries, en particulier l'ADN mitochondrial (Murgia et al., 1992) restent intacts, contrairement à la nécrose où il y a très rapidement une profonde altération morphologique et fonctionnelle des appareils de synthèse et énergétique de la cellule (Wyllie et al., 1980). La deuxième étape est marquée par l'apparition d'un crénelage de la membrane nucléaire annonçant une fragmentation nucléaire et cytoplasmique et aboutissant à la formation de fragments cellulaires, plus ou moins volumineux (Arends and Wyllie, 1991; Wyllie et al., 1980).

Les fragments cellulaires ou corps apoptotiques se détachent les uns des autres et se séparent du tissu pour être phagocytés par des macrophages ou des cellules voisines. La troisième étape est caractérisée par la dégradation des corps apoptotiques. Cette dégradation provoque des lésions de la membrane plasmique avec pour conséquence une perméabilité aux colorants vitaux et une destruction des reliquats cytoplasmiques et nucléaires par les macrophages. Fait remarquable, la disparition des corps apoptotiques ne s'accompagne d'aucune réaction inflammatoire lymphocytaire et, à distance, d'aucun phénomène fibrotique, ce qui distingue davantage l'apoptose de la nécrose. (Arends and Wyllie, 1991; Wyllie et al., 1980). L'apoptose est un phénomène rapide, Arends et Wyllie ont estimé, en effet, que l'ensemble du phénomène dure en moyenne 6h avec une fourchette de 4 à 9h, mais des chiffres de quelques minutes à 3 jours ou plus ont été rapportés selon les cellules étudiées (Arends and Wyllie, 1991; Wyllie et al., 1980).

2.2.2. Mécanismes moléculaires

2.2.2.1. Les caspases

L'apoptose est un mécanisme essentiel au cours du développement des espèces, des plus simples au plus complexes. Ce caractère remarquablement conservé au cours de l'évolution a permis, en particulier par l'étude du développement d'un petit nématode, *Caenorhabditis elegans* (*C. elegans*), d'identifier une famille de gènes codant pour des protéases à cystéine, désormais regroupées sous le terme générique de caspases, représentant les effecteurs de la mort cellulaire apoptotique (Labouesse, 1994). Au cours du développement de *C. elegans*, 131 cellules disparaissent par un processus ayant toutes les caractéristiques de l'apoptose. Trois gènes clés, *ced-3*, *ced-4* et *ced-9* sont impliqués dans la mort ou la survie de ces 131 cellules. L'analyse de mutants du gène *ced-9* a permis de définir son rôle : celui de prévenir l'apoptose des cellules devant survivre. Le clonage de *ced-9* a révélé une

homologie de séquence de son produit avec la protéine anti-apoptotique Bcl-2, connue chez l'homme depuis 1985 pour sa surexpression dans les lymphomes folliculaires de type B avec translocation t(14,18), et identifiée depuis comme le membre fondateur d'une grande et sans cesse croissante famille de protéines aux propriétés anti- et pro-apoptotiques (Reed, 1994). De façon similaire, Bcl-2 exprimé chez le nématode (ou ced-9 dans des cellules n'exprimant pas Bcl-2) conserve ses propriétés, fournissant la preuve de l'analogie structurale et fonctionnelle de ces deux molécules dans la régulation des processus apoptotiques (Vaux et al., 1992). Le rôle et le mode d'action de ced-4 commencent à se dévoiler avec la description des premiers analogues humains: ils codent pour les Apaf (« apoptosis protease-activating factor ») qui joueraient un rôle de chaperon et catalyseraient l'activation des caspases (Chinnaiyan et al., 1997; Zou et al., 1997). C'est en fait à ced-3 que revient le rôle essentiel dans la mort programmée des 131 cellules au cours du développement de *C. elegans*. Toutes les mutations réduisant ou abolissant complètement son activité entraînent en effet la survie de ces cellules, tandis que l'expression de ced-3 dans des cellules de mammifères induit leur apoptose (Yuan et al., 1993). La détermination de la séquence de ced-3 a permis d'identifier un analogue de son produit chez les mammifères, la protéine ICE (« interleukine-1B converting enzyme »), antérieurement connue pour son activité protéasique impliquée dans la maturation de l'interleukine-1 β (Nicholson et al., 1995).

Les mutations qui affectent l'activité de ced-3 touchent des régions homologues de l'ICE qui sont indispensables à son activité protéasique; cela suggère qu'une activité protéasique est essentielle à la protéine ced-3 dans l'exécution du signal apoptotique. À partir d'un organisme invertébré d'un millier de cellules, une modélisation des processus apoptotiques a pu être établie, identifiant deux grandes familles de gènes: des gènes anti-apoptotiques (Bcl-2/ced-9), qui règlent l'engagement définitif ou non vers la phase irréversible de la mort (Reed, 1994; White, 1996), et des gènes pro-apoptotiques, représentés par des protéases de la famille ICE/ced-3 (Alnemri et al., 1996). Si le schéma général est très conservé entre nématodes et mammifères, il s'est néanmoins enrichi (ou compliqué et sophistiqué) chez les mammifères de multiples gènes homologues, tant pour la famille Bcl-2 (plus de 15 gènes connus), que pour celle des protéases de la famille ICE/ced-3. Des recherches intensives ont été poursuivies pour identifier ces protéases, leur mode d'action, et les outils permettant de les activer ou de les bloquer (Fraser and Evan, 1996). Une dizaine d'analogues de ICE/ced-3 ont ainsi été rapidement clonés. Les protéases qui en ont été déduites possèdent toutes un site actif catalytique très conservé, composé d'un résidu cystéine inclus dans une séquence peptidique de type QACRG*, leur conférant une spécificité de reconnaissance et de clivage au

niveau de résidu aspartate en position P1. Les résidus entourant l'aspartate dans les substrats influencent la spécificité des différentes protéases. Ces spécificités et l'émergence de nouvelles protéases ont fait naître une nomenclature internationale; on les appelle caspases et on les numérote selon l'antériorité du clonage de leur ADNc. À ce jour, les gènes codant pour douze caspases ont été clonés ; une analyse phylogénétique permet de définir trois grandes sous-familles : celle de la caspase-1 (ICE), de la caspase-2 (ICH1), et enfin de la caspase-3 (CPP32). Les protéases de type ICE reconnaissent préférentiellement un site présentant un aspartate en P1 et un résidu hydrophobe comme la tyrosine en P4 (ce qui correspond au site YVHD* de clivage de la pro-IL1-B). Les protéases de type CPP32 ont une plus grande affinité pour les sites comprenant un résidu aspartate en P1 et un résidu anionique comme l'aspartate en P4 (sites de type DXXD*). La présence de résidus aspartate sur les protéases elles-mêmes est une autre donnée structurale très importante. En effet, toutes les caspases existent sous forme de pro-enzymes inactives, et elles subissent un clivage à ces sites qui favorisent la dimérisation de leurs deux sous-unités actives comprenant le site catalytique QACRG. Ce clivage, conduisant à l'activation de la forme pro-enzymatique inactive des caspases, est le fait d'une auto-activation ou d'un clivage par d'autres protéases à cystéine, schématiquement décrit comme un processus en cascade, en particulier dans la transmission du signal émis par Fas ou TNF (Fraser and Evan, 1996; Gueydan and Coessens, 1997; Nagata, 1997). Les régions amino-terminales des caspases, appelées les pro-domaines, font d'ailleurs l'objet de recherches intenses, tant elles semblent impliquées dans la régulation de l'activation des caspases.

La caractérisation du site catalytique de ces protéases et de leur site de reconnaissance est à l'origine du développement d'inhibiteurs facilitant l'étude fonctionnelle des caspases et ouvrant des perspectives thérapeutiques. En outre, certaines caspases sont impliquées dans les premières étapes de la transmission du signal des récepteurs contenant des domaines de mort (death domain). Ces récepteurs (TNF-4, Fas, DR3) une fois activés, recrutent à la membrane un complexe, appelé DISC (death-inducing signalling complex), composé de molécules adaptatrices (FADD, TRADD), et de la caspase-8, proche d'ICE, dite FLICE (Gueydan and Coessens, 1997; Nagata, 1997). La constitution de ce DISC est suivie du clivage protéolytique de FLICE, qui se débarrasse de sa portion amino-terminale et, devenant ainsi active, déclenche l'activation en cascade des autres caspases et la phase ultime des processus apoptotiques (Nagata, 1997).

2.2.2.2. La Famille Bcl-2

Même si on en connaît très peu sur le circuit moléculaire exact contrôlant l'apoptose, il a été suggéré que les membres de la famille des Bcl-2, incluant Bcl-2 (anti-apoptotique) et Bax (pro-apoptotique), peuvent être des régulateurs généraux de l'apoptose. Des facteurs additionnels impliqués dans la régulation de l'apoptose des cellules de mammifères en culture incluent notamment le suppresseur de tumeur p53 et les récepteurs de cytokines Fas/APO-1.

Bcl-2 a été identifié comme une translocation fréquente se produisant dans le lymphome folliculaire des cellules B humain. Il a été rapporté que Bcl-2 pouvait prévenir l'apoptose en séquestrant les radicaux libres dérivés de l'oxygène (Hockenberry et al., 1993), un effet qui pourrait avoir une relation avec son rôle putatif dans l'ischémie et l'infarctus du myocarde. Cependant, cette interprétation apparaît maintenant fautive (en effet, Bcl-2 peut inhiber la mort cellulaire même dans des conditions anaérobiques), et d'autres mécanismes d'action sont aussi plausibles. La famille de Bcl-2 comprend à peu près une douzaine de protéines, de même que des homologues structuraux ou fonctionnels, incluant la protéine de l'adénovirus E1B 19K. La protéine de l'adénovirus E1B 19K est la mieux caractérisée des homologues de la famille des Bcl-2 et agit en partie en empêchant la réduction transcriptionnelle de la protéine suppressive de tumeur p53. Plusieurs homologues de Bcl-2 ont été clonés directement sur la base de la similarité de leur séquence (Bak et Bcl-W) ou l'association physique avec Bcl-2 (Bax et Bad). Trois régions conservées, BH1, BH2 et BH3, sont présentes dans la plupart des protéines de la famille des Bcl-2. Les inhibiteurs (comme Bcl-2) de même que les stimulateurs d'apoptose (comme Bax) existent à l'intérieur de cette famille, suggérant un modèle général de l'apoptose dépendant du ratio des protéines pro- et anti-apoptotiques, peut-être agissant comme homodimères et hétérodimères. Le mécanisme précis par lequel Bcl-2 inhibe et Bax stimule l'apoptose demeure inconnu, même si beaucoup de choses sont connues sur leur co-localisation à la membrane mitochondriale. Les molécules mutées de Bcl-2 dépourvues de domaine membranaire retiennent leur habilité d'inhiber l'apoptose (Hockenberry et al., 1993) ; cependant, les mutations des domaines requis pour l'hétérodimérisation avec Bax inhibent l'activité anti-apoptotique de Bcl-2 (Yin et al., 1994). Les études de sur-expression suggèrent que l'apoptose induite par Bax suit des voies dépendantes et indépendantes des caspases (caspase-3).

En plus de l'activation des caspases, l'expression de Bax provoque une diminution du potentiel membranaire mitochondrial, la production d'espèces d'oxygène réactives, une augmentation de la

vacuolation cytoplasmique, et de la perméabilité membranaire plasmique qui ne peuvent être bloqués par les inhibiteurs de caspases (Xiang et al., 1996). Les protéines de la famille bcl-2 pourraient avoir d'autres fonctions cellulaires encore inconnues (Reed, 1994).

2.2.2.3. p53

Le gène p53, un anti-oncogène ou gène suppresseur de tumeur, code pour une nucléo-phosphoprotéine jouant un rôle important dans la prolifération cellulaire, notamment comme inhibiteur du cycle cellulaire en phase G1 et comme inducteur de la différenciation cellulaire (Levine, 1997; Levine et al., 1991). On sait que les mutations de ce gène font partie des défauts génétiques les plus fréquemment observés dans les cancers humains (Levine, 1997; Levine et al., 1991). L'inactivation du gène par mutation aboutit à la production d'une protéine fonctionnellement déficitaire. Ainsi, les mutations du gène p53 peuvent favoriser le développement des cancers (Levine, 1997; Levine et al., 1991). Le rôle du gène p53 a été étendu à l'apoptose : dans des conditions particulières de culture, la transfection du gène p53 normal (« sauvage ») provoque une apoptose dans les cellules mutantes déficientes en gène p53 (Shaw et al., 1992; Yonish-Rouach et al., 1991). Cette observation a été confirmée dans toutes les cellules étudiées jusqu'à présent. Des résultats obtenus dans une lignée cancéreuse colique suggèrent que l'action proapoptotique du gène p53 puisse être en relation avec la perte de protéines d'adhésion et/ou de contact intercellulaires souvent observée dans la transformation cancéreuse (Bates et al., 1994). Il a été proposé que p53 agisse comme « gardien du génome », gérant le point de restriction où les cellules ont l'option de réparer les dommages à leur ADN avant l'entrée en phase S ou d'entrer en apoptose (Lane, 1992). Ceci est supporté par des observations qui ont démontré qu'une lignée cellulaire dérivée d'animaux déficients en p53 ne pouvaient entrer en apoptose en réponse à des agents endommageant son ADN (Clarke et al., 1994; Clarke et al., 1993; Lowe et al., 1993a; Lowe et al., 1993b; McCarthy et al., 1994; Merritt et al., 1994). La perte de la fonction de p53 conduirait à la fixation des anomalies génétiques résultant de la réplication d'ADN endommagé. Si p53 agissait en éliminant les cellules où l'ADN est endommagé, l'intégrité de l'organisme serait maintenue, même en dépit de la perte cellulaire due à l'apoptose. Au niveau des cellules musculaires lisses sur-exprimant *c-myc* (ou E1A), Bennett et al. ont démontré que p53 induit l'expression de Fas, un facteur pro-apoptotique, sur la membrane cellulaire (Bennett et al., 1998). Parallèlement, dans les cardiomyocytes en culture, le blocage des récepteurs AT₁ de l'Ang II supprime l'apoptose induite par la transfection de p53 (Pierzchalski et al., 1997).

2.2.3. Méthodes utilisées pour évaluer l'apoptose

Les limites de la microscopie optique et la lourdeur de la microscopie électronique ont favorisé l'apparition de nouvelles techniques analysant certaines modifications nucléaires ou cytoplasmiques de l'apoptose. Les techniques analysant morphologiquement les modifications nucléaires vont des plus simples, banalement utilisées en cytologie hématologique comme la coloration par le May-Grundwald-Giemsa (Lotem and Sachs, 1993), aux colorants spécifiques de l'ADN comme les fluorochromes Hoescht 33342 ou 33258 (Bayly et al., 1994; Bonnefoy-Berard et al., 1994), l'acridine orange (Falk et al., 1993), l'iodure de propidium (Oyaizu et al., 1993) ou la DAPI (diamidino-2-phénylindole) (Hotz et al., 1994). Les colorants spécifiques de l'ADN donnent en fluorescence une image très dense correspondant sa condensation de l'ADN. Ils peuvent être utilisés en microscopie optique ou confocale à fluorescence et en cytométrie en flux, cette dernière technique permettant d'obtenir rapidement une quantification des cellules apoptotiques à la condition de prendre certaines précautions pour distinguer ces dernières des débris cellulaires non apoptotiques. La méthode confocale à fluorescence, qui est utile pour révéler les altérations de la morphologie nucléaire comme la condensation de la chromatine, offre la possibilité de balayer une plus grande surface de tissu. La condensation de la chromatine se traduit par un profond remaniement de l'ADN que Wyllie a été le premier à démontrer : la migration en gel d'électrophorèse de lysats de thymocytes apoptotiques donne des fragments d'ADN dont le poids moléculaire apparent correspond à un nucléosome, c'est-à-dire à 180 paires de bases nucléiques ou à des multiples (oligonucléosomes) de cette unité de base du filament d'ADN. La mise en évidence d'une fragmentation régulière du filament d'AND, est une des techniques les plus couramment utilisées pour détecter biochimiquement l'apoptose est l'étude de la fragmentation d'ADN par électrophorèse sur gel d'agarose (Wyllie et al., 1980). On peut par ailleurs voir par électrophorèse des fragments d'ADN de 50 à 300 kb qui pourraient en partie s'expliquer par une digestion partielle, peut-être initiale, de l'ADN (Bortner et al., 1995). Plusieurs endonucléases peuvent être responsable de la fragmentation (internucléosomale ou gros fragments) : DNase I, DNase II, NUC18, etc. (Bortner et al., 1995). Les méthodes de détection biochimique (ARN, ADN, protéines, fluorométrie avec substrat synthétique des caspases, etc.) des différents facteurs (caspases, Bcl-2, p53, entre autres) contrôlant le processus apoptotique se sont développées à un rythme accéléré.

Objectifs du projet de recherche

RÉSUMÉ GÉNÉRAL

La modélisation des approches pharmacologiques pour influencer la structure cardiovasculaire peut profiter de nos connaissances sur les mécanismes sous-jacents aux maladies cardiovasculaires, telle l'hypertension artérielle. Les médicaments antihypertenseurs ont non seulement le pouvoir de réduire la pression artérielle mais aussi d'altérer la structure cardiovasculaire. Ces agents « antiprolifératifs » peuvent inhiber le développement de l'hypertrophie cardiovasculaire, une condition pathologique de l'hypertension. Toutefois, notre compréhension des mécanismes moléculaires pouvant expliquer la modulation pharmacologique du remodelage cardiovasculaire est incomplète. L'hypertrophie cardiaque et vasculaire pourrait servir de mécanisme d'adaptation à l'augmentation de la charge sur ces tissus. Ceci implique qu'une cible primaire de la pharmacologie du remodelage cardiovasculaire serait la normalisation des variables physiques modulant la structure cardiovasculaire. Ces cibles incluent (a) une perte irréversible des petites artères et des capillaires ou la croissance excessive des petites veinules; (b) le déséquilibre prolifératif du compartiment des non-myocytes du coeur et des non-CML dans la paroi vasculaire, avec une augmentation subséquente de la déposition de la matrice extracellulaire; et (c) la migration et la modulation phénotypique des CML vers le type de croissance dans l'intima artériel. Notre laboratoire a été le premier à démontrer qu'un des mécanismes potentiels pouvant affecter le déséquilibre prolifératif des organes-cibles de l'hypertension est l'apoptose (Hamet, 1995; Hamet et al., 1995). À partir de ces résultats originaux, nous nous sommes posé trois questions qui constituent les objectifs de la présente thèse :

OBJECTIF #1 : Régulation pharmacologique de l'apoptose durant la régression de l'hypertrophie cardiovasculaire

Au niveau des petites artères musculaires, l'hypertrophie vasculaire accompagnée d'une hypertrophie ou d'une hyperplasie des CML amplifie le haut niveau de la résistance vasculaire et la pression artérielle (Folkow, 1990; Lee et al., 1995). Au niveau de l'aorte et de ces principaux branchements, l'augmentation de la masse et de la rigidité de la paroi artérielle contribuent à l'hypertension systolique et représentent un des facteurs de risque indépendants pour l'hypertrophie ventriculaire gauche (Safar and Laurent, 1993). L'hypertrophie ventriculaire gauche est une caractéristique importante de l'hypertension et un facteur de risque indépendant pour la morbidité et la mortalité cardiovasculaire. Cette hypertrophie cardiaque implique une hyperplasie des non-myocytes (fibroblastes, cellules endothéliales, etc.) et une hypertrophie des myocytes (cardiomyocytes) (Walsh and Dorn II, 1998). Par ailleurs, chez le rat spontanément hypertendu (SHR), des observations supportent le rôle critique du rein dans la pathogénèse de l'hypertension. Ainsi, il a été démontré que la pression sanguine peut être transférée par la transplantation du rein chez le SHR, et que les paramètres de l'hémodynamie rénale co-ségrèguent avec la pression sanguine dans la génération F2 (Cowley and Roman, 1996; Churchill et al., 1997). Il est reconnu que le poids relatif des reins adultes de même que la pression artérielle adulte sont plus élevés chez le SHR que chez le rat BN (Brown-Norway) (Hamet et al., 1998). Notre groupe a démontré un élargissement rénal chez les nouveaux-nés SHR comparativement aux WKY (Walter and Hamet, 1986). Nous avons suggéré que l'élévation du poids rénal chez les rats nouveaux-nés prédise un poids supérieur et une plus haute pression artérielle chez les rats adultes (Hamet et al., 1998).

Même si la prévention ou la régression de l'hypertrophie aortique, cardiaque et rénale est considérée comme une cible thérapeutique désirable, les mécanismes régulant la masse cardiovasculaire demeurent inconnus. La composante de l'hypertrophie cardiovasculaire associée à la réplication d'ADN est beaucoup moins facilement réversible que la composante due à l'accumulation de la matrice extracellulaire ou à l'augmentation de la masse sans la synthèse d'ADN *de novo*. Ainsi, le contenu en ADN cardiovasculaire peut être considéré comme une mémoire des épisodes passés de la croissance cellulaire, uniquement réversible par la mort cellulaire. Différentes classes d'agents antihypertenseurs ne réduisent pas la masse cardiovasculaire hypertrophique chez le SHR de façon égale, suggérant une régulation indépendante de la pression artérielle. Un mécanisme potentiel

contribuant à la régression de la masse cardiovasculaire élevée dans l'hypertension est le processus génétiquement régulé d'autodestruction cellulaire, l'apoptose.

L'apoptose est une forme ubiquitaire et hautement régulée de la mort cellulaire qui est impliquée dans la morphogenèse et l'homéostasie en contrepartie essentielle à la réplication cellulaire (Kerr et al., 1972; Thompson, 1995). Dans ce contexte, l'apoptose est potentiellement impliquée dans le remodelage cardiovasculaire via l'élimination des cellules musculaires lisses dans la paroi vasculaire de cellules cardiaques ou rénales. Nous avons précédemment rapporté que le haut niveau de réplication d'ADN des CML en culture d'aorte de rat spontanément hypertendu (SHR) se produit en parallèle avec une augmentation d'apoptose (Hamet et al., 1995). Ces études ont suggéré que l'élévation de l'apoptose puisse en partie contrebalancer l'élévation de la croissance cellulaire dans les vaisseaux hypertendus. Dans cette optique, l'équilibre entre l'apoptose et la réplication cellulaire (ou d'ADN) constituerait un déterminant clé dans la masse vasculaire et une potentielle cible thérapeutique pour obtenir une régression à long terme de l'hypertrophie vasculaire. **Le premier objectif de ma thèse était de savoir si l'apoptose cardiovasculaire contribue à la régression de l'hypertrophie cardiovasculaire durant une thérapie antihypertensive chez le SHR.** Les agents étudiés appartiennent à plusieurs des classes majeures d'agents pharmacologiques utilisées en clinique pour contrôler l'élévation de la pression artérielle. Nos résultats suggèrent pour la première fois que l'apoptose est impliquée dans la régression de l'hypertrophie cardiovasculaire et représente une nouvelle cible thérapeutique pour le contrôle pharmacologique de la structure cardiovasculaire.

OBJECTIF #2 : Rôle apoptotique et antiprolifératif des récepteurs AT₂ de l'angiotensine II dans les cellules musculaires lisses *in vivo*.

En résumé, la découverte des sous-types de récepteurs de l'Ang II et le développement d'antagonistes sélectifs ont permis de mieux caractériser les actions multiples de l'Ang II et ont ouvert de nouvelles perspectives pharmacologiques pour le traitement des maladies cardiovasculaires. Ainsi, les expériences effectuées *in vitro* et *in vivo* ont clairement démontré que l'activation du récepteur AT₁ par l'Ang II augmente la synthèse globale des protéines et induit une hypertrophie cellulaire dans les CML et les myocytes cardiaques. D'autre part, des travaux récents suggèrent que le sous-type AT₂ exerce un effet anti-croissance au niveau cellulaire (anti-prolifératif, anti-hypertrophique ou apoptotique selon le type cellulaire), s'opposant ainsi à l'action trophique

relayée par le récepteur AT₁ ou à l'effet mitogénique d'autres facteurs de croissance. Lorsque nous avons initié ces études, le rôle des récepteurs AT₂ sur l'apoptose n'avait jamais été montré *in vivo*, faute de modèle expérimental adéquat.

Nous avons démontré que l'apoptose des CML est augmentée de façon transitoire au début de la régression de l'aorte chez le SHR traité avec le losartan, un antagoniste sélectif des récepteurs AT₁, avec un maximum d'augmentation de l'apoptose après 1 semaine de traitement (deBlois et al., 1997). Parce que le blocage des récepteurs AT₁ résulte en une augmentation marquée du niveau plasmatique d'Ang II (Campbell et al., 1995), **nous avons émis l'hypothèse que l'Ang II agissant via les récepteurs AT₂ pouvait être impliquée dans la stimulation rapide de l'apoptose des CML en réponse au blocage des récepteurs AT₁.** Les résultats de cette étude ont démontré que les récepteurs AT₂ relayent l'apoptose des cellules musculaires lisses *in vivo*, un effet qui est transitoire et qui est dissocié de la réduction d'ADN et de la pression artérielle.

OBJECTIF #3 : La régulation de la croissance cardiovasculaire et l'apoptose par la nifédipine chez les SHR et les WKY.

Nous avons précédemment suggéré que la dérégulation de la croissance et l'apoptose cardiovasculaire contribuent à l'augmentation du contenu en ADN cardiovasculaire ou de la masse à la naissance chez les rats spontanément hypertendus (SHR), une caractéristique qui persiste chez l'animal adulte comme démontré par notre groupe et plusieurs autres. Nous avons aussi rapporté que la mort cellulaire par apoptose est augmentée de façon transitoire et précoce (à 1 semaine de traitement) au cours de la régression de l'hypertrophie cardiaque et aortique chez les SHR adultes traités avec des agents antihypertenseurs spécifiques, incluant le bloqueur de canaux calciques nifédipine. Contrairement à l'apoptose, la suppression de la synthèse d'ADN par la nifédipine a été soutenue et se produisait après la fenêtre temporelle de l'apoptose dans les cellules musculaires lisses de l'aorte.

Ces observations initiales ont soulevé plusieurs questions concernant la régulation et la signification de l'apoptose dans les organes hypertendus. **Premièrement, considérant que la nifédipine induisait une fenêtre temporelle d'apoptose au début de traitement, il n'est pas clair si un traitement intermittent à la nifédipine pouvait induire une réponse répétée de l'apoptose. Si**

c'était le cas, est-ce que cela résulterait en une réduction accrue du contenu en ADN cardiovasculaire ? Deuxièmement, la relation entre le contenu en ADN et l'hypertrophie demeure mal comprise. Si l'hypertension est rétablie suivant un arrêt de la nifédipine, est-ce que la perte du contenu en ADN serait maintenue ? Si oui, est-ce que la régression de l'hypertrophie cardiovasculaire serait maintenue ? Troisièmement, nous avons voulu déterminer si la nifédipine régule la croissance et la survie cellulaire dans le coeur et l'aorte des rats normotendus Wistar-Kyoto (WKY).

CHAPITRE 2

RÉSULTATS

Résumé d'article**ARTICLE #1**

Smooth muscle apoptotic during vascular regression in spontaneously hypertensive rats

par

deBlois D., Tea B.-S.*, Dam T.-V., Tremblay J., Hamet P.

Nous avons précédemment rapporté que l'apoptose est augmentée dans les cellules musculaires lisses d'aortes en culture de rat spontanément hypertendus (SHR) comparativement aux témoins normotendus. Comme exploration initiale, cette étude examine la régulation de l'apoptose des cellules musculaires lisses durant la régression de l'hypertrophie vasculaire dans l'aorte thoracique de rats SHR (âgés de 10-11 semaines) recevant les agents antihypertenseurs énalapril (30 mg/kg/jour), losartan (30 mg/kg/jour), nifédipine (35 mg/kg/jour), hydralazine (40 mg/kg/jour), propranolol (50 mg/kg/jour), ou hydrochlorothiazide (75 mg/kg/jour) pendant 1 à 4 semaines. Trois critères ont été utilisés pour évaluer l'apoptose des cellules musculaires lisses : (1) la fragmentation oligonucléosomale de l'ADN extrait de l'aorte, (2) la réduction du contenu en ADN aortique, et (3) la diminution du nombre de cellules musculaires lisses dans la média artérielle. La synthèse d'ADN artérielle a été évaluée par l'incorporation de [³H]-thymidine *in vivo*. Après 4 semaines de traitement, la pression systolique a été réduite significativement de >42% par le losartan, l'énalapril, et l'hydralazine, et de 23% avec la nifédipine, comparativement à des valeurs témoins de 220±5 mmHg. Cependant, ces agents ont affecté la croissance et l'apoptose vasculaire différemment. Le losartan, l'énalapril et la nifédipine ont stimulé l'apoptose des cellules musculaires lisses de 3-5 fois avant la réduction significative de la synthèse d'ADN (>25%), la masse vasculaire (>19%), ou le contenu en ADN (>38%), et ces traitements ont remarquablement réduit (de 38% à 50%) le nombre de cellules de la média artérielle tel que mesuré à 4 semaines par la méthode du dissecteur à trois dimensions. Le losartan et la nifédipine ont stimulé l'apoptose des cellules musculaires lisses avant la réduction de la pression artérielle. En revanche, l'hydralazine n'a pas affecté la masse vasculaire, l'apoptose, ou la synthèse d'ADN, même si la pression sanguine a été réduite significativement. Le propranolol ou l'hydrochlorothiazide n'ont pas affecté la pression artérielle ou la croissance vasculaire. Ainsi, l'apoptose des cellules musculaires lisses représente possiblement une nouvelle cible thérapeutique pour le contrôle du remodelage vasculaire en réponse à des agents thérapeutiques dans l'hypertension.

Smooth Muscle Apoptosis During Vascular Regression in Spontaneously Hypertensive Rats

Denis deBlois, Bun-Seng Tea, Than-Vinh Dam, Johanne Tremblay, Pavel Hamet

Abstract We previously reported that apoptosis is increased in smooth muscle cells cultured from the aorta of spontaneously hypertensive rats versus normotensive controls. As an initial in vivo exploration, we now examined smooth muscle cell apoptosis regulation during the regression of vascular hypertrophy in the thoracic aorta media of spontaneously hypertensive rats receiving the antihypertensive drug enalapril ($30 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$), losartan ($30 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$), nifedipine ($35 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$), hydralazine ($40 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$), propranolol ($50 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$), or hydrochlorothiazide ($75 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$) for 1 to 4 weeks starting at 10 to 11 weeks of age. Three criteria were used to evaluate smooth muscle cell apoptosis: (1) oligonucleosomal fragmentation of the extracted aortic DNA, (2) reduction in aortic DNA content, and (3) depletion of smooth muscle cells in the arterial media. Arterial DNA synthesis was evaluated by [^3H]thymidine incorporation in vivo. After 4 weeks of treatment, systolic blood pressure was reduced significantly by $>42\%$ with losartan, enalapril, and hydralazine, and by 23% with nifedipine, versus control values of

$220 \pm 5 \text{ mm Hg}$. However, these agents affected vascular growth and apoptosis differently. Losartan, enalapril, and nifedipine stimulated smooth muscle cell apoptosis threefold to fivefold before there was a significant reduction in DNA synthesis ($>25\%$), vascular mass ($>19\%$), or vascular DNA content ($>38\%$), and these treatments markedly reduced (by 38% to 50%) medial cell number as measured at 4 weeks by the three-dimensional disector method. Losartan and nifedipine stimulated smooth muscle cell apoptosis before reducing blood pressure. In contrast, hydralazine did not affect vascular mass, apoptosis, or DNA synthesis, although blood pressure was lowered. Propranolol or hydrochlorothiazide failed to affect hypertension or vascular growth. Thus, smooth muscle cell apoptosis represents a novel therapeutic target for the control of hypertensive vessel remodeling in response to therapeutic agents. (*Hypertension*. 1997;29[part 2]:340-349.)

Key Words • apoptosis • smooth muscle cell • angiotensin II • calcium channel antagonist

Studies in humans and in experimental models of hypertension have clearly demonstrated the importance of vascular structure in the regulation of blood pressure.¹⁻⁶ Increased vascular mass is an important feature of hypertensive vessels. At the level of small muscular arteries, vascular hypertrophy accompanied by smooth muscle cell (SMC) hypertrophy or hyperplasia acts as an amplifier for elevated vascular resistance and blood pressure.^{7,8} At the level of the aorta and its main branches, increased mass and rigidity of the arterial wall contribute to systolic hypertension and represent an independent risk factor for left ventricular hypertrophy.⁹ The remodeling of vascular structure, including the regression of vascular hypertrophy, is now considered a key therapeutic target in the effort to reduce mortality and morbidity associated with high blood pressure.¹⁰⁻¹³

Increased vascular mass associated with the replication and accumulation of smooth muscle DNA, as in genetically determined or secondary hypertension,¹⁴⁻¹⁸ represents a mode of structural remodeling that is less readily reversible than vascular hypertrophy that is solely due to increased protein synthesis without de novo DNA synthesis. Thus, the DNA content of the vessel wall (due to SMC hyperplasia or polyploidy)¹⁶ may be considered as a record of past episodes of vascular growth, contributing to the persistence of the vascular disease. Apoptosis is a

highly regulated form of programmed cell death that is involved in tissue morphogenesis and homeostasis as the essential counterpart of cell replication.^{19,20} In this context, apoptosis is potentially involved in the regulation of vascular remodeling, via the deletion of SMC in the vessel wall.²⁰ We have previously reported that the heightened DNA replication of SMC cultured from the aorta of spontaneously hypertensive rats (SHR) occurs in parallel to an increase in apoptosis.²¹ These studies suggested that increased apoptosis may in part counterbalance the heightened cell growth in hypertensive vessels. In this view, the balance between apoptosis and cell (or DNA) replication would constitute a key determinant of vascular mass and a potential therapeutic target for achieving long-term regression of vascular hypertrophy.

The present studies were designed to investigate whether SMC apoptosis contributes to the regression of vascular hypertrophy during antihypertensive therapy in the SHR. Agents tested belong to several of the major classes of drugs used in the clinic to control elevated blood pressure. Our results suggest that SMC apoptosis is a novel therapeutic target for the pharmacological control of vascular structure in hypertension.

Methods

Drug Treatments

Male SHR weighing 250 to 275 g were purchased from Charles-River (St Constant, Que) and housed for at least 10 days before initiation of drug treatment at 10 to 11 weeks of age. Treated rats were given one of the following drugs: the calcium channel blocker nifedipine ($35 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$), the angiotensin-converting enzyme inhibitor enalapril ($30 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$), the AT_1 receptor antagonist losartan ($30 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$), the smooth muscle relaxant hydralazine ($40 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$), the β -adrenoceptor blocker propranolol ($50 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$), or the diuretic hydrochloro-

From the Centre de Recherche de l'Hôtel-Dieu de Montréal, and the Departments of Pharmacology (D.deB., B.-S.T.) and Medicine (J.T., P.H.), Université de Montréal, Québec, Canada. E-mail

Correspondence to Dr Pavel Hamet, Centre de Recherche Hôtel-Dieu de Montréal, 3840 St Urbain St, Montréal, Québec H2W 1T8, Canada.

© 1997 American Heart Association, Inc.

rothiazide (HCT; $75 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$). The doses of antihypertensive drug were chosen on the basis of published reports of others or our own preliminary data showing effectiveness in reducing hypertension or cardiovascular hypertrophy in the SHR.²²⁻²⁵ All drugs were dissolved in the drinking water except for nifedipine, which was mixed with powdered food. The subsets of control rats receiving powdered rat chow without nifedipine showed similar results as the control rats given regular chow in pellets, hence the data from these control groups were pooled for analysis. Food and water, with or without drug, were renewed three times weekly and administered ad libitum. The rats were weighed each week and the dosage of drug adjusted according to their body weight and the amount of water or food consumed. All drugs were from Sigma, except nifedipine, which was provided courtesy of Bayer Canada, Toronto, and losartan and enalapril, which were courtesy of Merck Frosst, Montreal, Canada. The ability of the antihypertensive drugs to reduce aortic hypertrophy was initially examined after 4 weeks of therapy. Drugs that proved effective at 4 weeks were selected for the studies at 2 weeks and 1 week of treatment. An age-matched control group was included in each experiment.

Blood Pressure Measurements

Systolic blood pressure was measured between 8 and 12 AM in each rat by use of the tailcuff plethysmograph method (IITC). Measurements were started 1 week before treatment and performed on conscious, restrained rats previously trained for the procedure. Pressure measurements were made at weekly intervals during the treatment period and at least 2 days before animal sacrifice for tissue isolation to avoid interfering with the vascular growth response.

Tissue Isolation and Vascular Mass Measurements

To evaluate DNA synthesis *in vivo*, rats were injected IP with [methyl-³H]thymidine (0.5 mCi/kg , New England Nuclear) at 17, 9, and 1 hour before death. Rats were anesthetized with a single IM injection of ketamine (80 mg/kg), xylazine (4 mg/kg), and acepromazine (2 mg/kg), and killed by perfusion of 200 mL isotonic saline via the abdominal aorta. The thoracic aorta was isolated from the diaphragm to above the first intercostal artery and it was cleaned of fat and adventitial connective tissue. The length and wet weight of the aorta were measured before the artery was cut longitudinally to allow removal of the endothelium by scrubbing the intimal surface with a cotton tip applicator. The aorta:body weight ratio was calculated and used as an index of vascular mass. The aortic media was snap frozen in liquid nitrogen and kept at -80°C until further processing. To further confirm changes in vascular mass, we also measured the cross-sectional area of aortae isolated after 4 weeks of effective antihypertensive therapy (a blindly selected subset of tissues was used for the control and enalapril groups). A 3-mm-long ring of aorta was cut between the third and fourth intercostal arteries after weighing the vessel. The aortic rings were fixed in 4% paraformaldehyde overnight and processed according to routine histological procedures for morphometric measurements in cross-sections of paraffin-embedded arteries. The medial cross-sectional area was evaluated in $5\text{-}\mu\text{m}$ -thick, hematoxylin-stained sections of aorta. Photomicrographs of the aorta sections were taken at $200\times$ magnification, digitized, and analyzed using the NIH Image 1.6 image analysis freeware (NIH). Two measures of each tissue section were done to ensure the reproducibility of the image analysis.

DNA Extraction and Characterization

The whole aortic media was homogenized in liquid nitrogen using a mortar and pestle. An aliquot of the pulverized aortic media was weighed and total tissue DNA was extracted by the phenol and chloroform procedure, following tissue digestion steps with proteinase K and RNase A in the presence of EDTA, as described previously.²⁶ DNA concentration was determined by spectrophotometry and total DNA content per unit of aortic

length was calculated using the following equation: total aortic DNA content = (μg of DNA/ mg of aorta) \times (mg of aorta/ cm of aorta).

Oligonucleosomal DNA fragmentation into 180- to 200-bp integer fragments is a hallmark of apoptosis.²⁷ This specific pattern of DNA fragmentation appears as a "ladder" of DNA fragments after conventional agarose gel electrophoresis in various cell types undergoing apoptosis,^{27,28} including SMC.^{21,29-33} To quantify the degree of oligonucleosomal DNA fragmentation in the aortic media, $1 \mu\text{g}$ of extracted DNA was radiolabeled using terminal deoxynucleotidyl transferase and [³²P]dCTP as described previously.²⁶ Because DNA molecules from apoptotic nuclei have an increased number of free 3'OH ends as a result of enhanced endonuclease activity, these show greater incorporation of labeled dCTP. Increasing quantities of radiolabeled DNA (0.025 , 0.05 , 0.1 , 0.2 , and $0.4 \mu\text{g}$) were loaded in adjacent lanes of 1.5% agarose gels. After electrophoresis, DNA was transferred onto nylon membrane (Hybond N; Amersham) and the radioactivity associated with 150 to 1500 bp DNA fragments was quantified using a PhosphorImager (Molecular Dynamics) (Fig 1A). The PhosphorImager data were used to construct a regression line for each sample and radioactivity per unit area (cpm per pixel) was plotted as a function of DNA loaded on the gel (μg DNA). We found this approach to be useful in increasing reproducibility of the measurements. Thus, the slope of the linear regression was

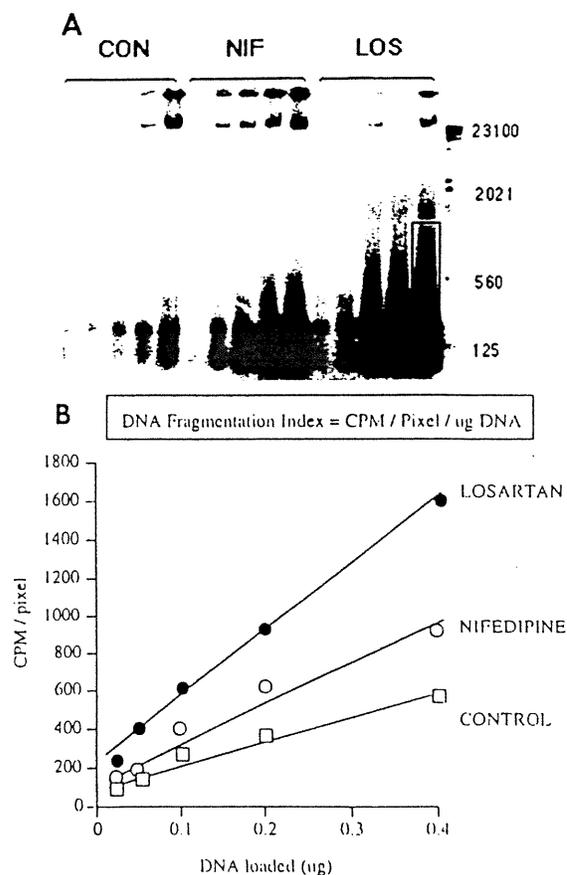


Fig 1. A, DNA laddering obtained by gel electrophoresis of DNA extracted from the aorta of control SHR (CON) or SHR treated for 1 week with nifedipine (NIF; $35 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$) or losartan (LOS; $30 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$). Increasing amounts of DNA (0.025 , 0.05 , 0.1 , 0.2 , and $0.4 \mu\text{g}$) radiolabeled with terminal deoxynucleotidyl transferase were fractionated on a 1.5% agarose gel. B, Quantification of radioactivity associated with the 150- to 1500-bp fragments as a function of the amount of DNA loaded, using a PhosphorImager as described in "Methods." The slope of the linear regression was defined as the "DNA fragmentation index" (cpm per pixel per microgram DNA), indicative of apoptosis.

TABLE 1. Effect of Antihypertensive Therapy for 4 Weeks on SHR Body Weight, and Aortic Medial Hypertrophy, DNA Content, DNA Fragmentation, and DNA Specific Activity

Experiment	Treatment (n)	Final Body Weight, g	Aorta:Body Weight Ratio, mg·mm ⁻¹ ·g ⁻¹ ×10 ⁻³	DNA Content, µg/mm	DNA Fragmentation Index, cpm·pixel ⁻¹ ·µg ⁻¹	DNA Specific Activity, cpm/100 µg
A	Control (6)	288±5	5.2±0.4	1.31±0.24	2.4±0.5	134±4
	Hydralazine (6)	292±5	5.4±0.6	1.2±0.23	3.0±1.0	136±10
	Losartan (6)	289±6	4.2±0.6*	0.48±0.05*	6.5±1.6	93±3*
B	Control (9)	306±6	5.0±0.5	1.25±0.09	2.9±0.8	110±4
	Enalapril (12)	292±9	3.9±0.3*	0.42±0.07*	16.7±4.1*	75±5*
	Nifedipine (5)	321±7	3.7±0.2*	0.94±0.07	1.2±0.7	126±9
C	Control (5)	291±14	4.6±1.2	1.17±0.26	9.6±2.7	112±8
	Propranolol (5)	291±4	4.4±1.8	1.14±0.28	10.3±5.3	119±6
	HCT (5)	292±10	4.2±2.3	0.56±0.10	5.0±1.9	129±7

Internucleosomal DNA fragmentation indicative of apoptosis is expressed as the DNA fragmentation index, as described in "Methods." The DNA specific activity reflects the incorporation of tritiated thymidine into the smooth muscle DNA over the last 24 hours in vivo. Data were analyzed by ANOVA followed by Student's *t* test with Bonferroni correction for multiple comparisons, except for DNA fragmentation index, which was analyzed using the nonparametric tests Kruskal-Wallis followed by Mann-Whitney.

**P*<.05.

defined as the "DNA fragmentation index" (Fig 1B). Commercially available DNA molecular size markers underwent radiolabeling, electrophoresis, and transfer at the same time as the extracted DNA to control for variability in the procedure. Cleavage of DNA into large fragments (eg, 20 to 50 kbp) at the site of attachment to scaffold proteins has also been described in cells undergoing apoptosis. Therefore, radiolabeling was also quantified for DNA fragments of 20 to 30 kbp, as described above.

DNA synthesis in the aortic media was quantified by measuring the incorporation of [³H]thymidine into the extracted DNA. To rule out the possibility that drug-induced changes in DNA specific activity (cpm/100 µg DNA) result from changes in thymidine transport into the cells rather than changes in DNA synthesis activity per se, the specific activity of the whole aortic tissue (cpm/mg aorta) was also measured at 1 and 2 weeks of treatment.

Determination of Smooth Muscle Cell Number

SMC number in the aortic media was measured using the three-dimensional disector method, as adapted from Mulvany et al.¹⁸ Briefly, three consecutive sections (5 µm in thickness) were obtained from aortic rings sectioned perpendicularly to the longitudinal axis of the vessel. The tissue sections were stained with hematoxylin, photographed, and printed at a final magnification of 1000×. In the top section, an area, *a_d*, of vessel wall was delineated by two parallel lines approximately perpendicular to the wall edges. A disector was defined as the three-dimensional probe bounded by *a_d* and the top surface of the "bottom" section. The disector has volume *v_d*=*a_d*×*h_d*, where *a_d* is the area of the disector and *h_d* is the height of the disector. The term *h_d* is obtained by the following equation: *h_d*=(*s*-1)×*t*, where *s* is the number of serial sections and *t* the average section thickness. Within *a_d*, the number of nucleus profiles, *n_i*, was determined and in the subsequent sections, each of the *n_i* nuclei was followed and marked. In the final section, the number of nuclei still present was determined, *n_b*. The number *n_d*=(*n_i*-*n_b*) is then the number of "downward-pointing" nucleus ends within the disector when counting from top to bottom. Although binucleate SMC reportedly exist in SHR arteries, these cells account for less than 0.5% of the SMC in the thoracic aorta of 12-week-old SHR.³⁴ Therefore, on the basis that each cell contains only one nucleus, an estimate of cell numerical density, *N_v*, is given by *N_v*=*n_d*/*v_d*. The number of cells per unit vessel length then was estimated from *a_i*×*N_v*, where *a_i* is the medial cross-sectional area determined with the image analyzer as described above. Nuclear length was measured using the following equation: nuclear length=(*n_i*/*n_d*)×*h_d*.

Statistical Analysis

Data were analyzed using analysis of variance and unpaired Student's *t* test with Bonferroni correction for multiple compar-

isons where appropriate. The DNA fragmentation index was analyzed using the nonparametric tests Kruskal-Wallis followed by Mann-Whitney because of unequal variance between the groups and because we have no evidence that the index is a normally distributed variable. Values are presented as mean±SEM, and *P*<.05 was considered statistically significant.

Results

The ability of the antihypertensive drugs to reduce vascular hypertrophy and growth in the thoracic aorta was initially examined after 4 weeks of therapy in the SHR (Table 1). Drugs that proved effective in reducing vascular hypertrophy at 4 weeks were selected for the studies at 2 weeks and 1 week of treatment (Table 2). In addition, to facilitate intergroup comparisons, selected changes in vascular growth parameters are also presented in Fig 3, where the data are expressed as a percentage of control values (from paired animals without treatment) and plotted as a function of time after initiation of therapy with selected drugs.

Systemic Changes During Drug Administration

Rats used in this study were hypertensive before initiation of therapy, with an average pretreatment value of systolic blood pressure of 176±2 mm Hg (*n*=110; no difference between control and experimental groups). During the experimental period, systolic pressure increased further in untreated animals, up to 203±5 mm Hg at 2 weeks (*n*=39) and 220±5 mm Hg at 4 weeks (*n*=25). Fig 2A shows the evolution of systolic blood pressure in control and treated rats over the 4-week experimental period. Systolic blood pressure was not significantly affected in rats receiving propranolol or HCT for 4 weeks (Fig 2B) but it was significantly reduced in rats receiving either hydralazine (47% reduction in final pressure), losartan (42% reduction), enalapril (44% reduction), or nifedipine (23% reduction). Significant reduction in blood pressure was achieved after 1 week with enalapril or hydralazine, after 2 weeks with losartan, and after 3 weeks with nifedipine (Fig 2A). Thus, at the high doses used in this study, the drugs showed the following order of potency for blood pressure reduction: enalapril ≥hydralazine >losartan >nifedipine >>HCT ≥propranolol.

Pretreatment values of body weight were 260±2 g (*n*=110). All rats gained weight during the experimental period but final values of body weight were similar be-

TABLE 2. Effect of Antihypertensive Therapy for 1 or 2 Weeks on SHR Body Weight, and Aortic Medial Hypertrophy, DNA Content, DNA Fragmentation, DNA Specific Activity, and Tissue Specific Activity

Duration of Treatment	Treatment (n)	Final Body Weight, g	Aorta:Body Weight Ratio, $\text{mg} \cdot \text{mm}^{-1} \cdot \text{g}^{-1} \times 10^{-3}$	DNA Content, $\mu\text{g}/\text{mm}$	DNA Fragmentation Index, $\text{cpm} \cdot \text{pixel}^{-1} \cdot \mu\text{g}^{-1}$	DNA Specific Activity, $\text{cpm}/100 \mu\text{g}$	Aortic Tissue Specific Activity, $\text{cpm}/10 \text{mg}$
1 week	Control (5)	270±11	4.8±0.8	1.07±0.29	2.7±0.5	118±2	56±9
	Losartan (5)	264±3	4.2±0.7	0.96±0.24	14.2±3.3*	111±10	42±5
	Nifedipine(5)	271±8	4.3±0.9	1.00±0.31	8.7±3.0*	115±6	41±10
2 weeks	Control (14)	276±7	6.1±0.6	1.31±0.14	1.8±0.5	125±6	33±4
	Enalapril (6)	277±9	5.2±0.2	1.61±0.18	6.3±2.3	150±10	ND
	Losartan (5)	283±5	3.7±0.7*	0.66±0.22*	7.4±2.7*	94±3*	38±5
	Nifedipine (5)	313±8	3.4±0.3*	0.55±0.06*	1.0±0.5	72±7*	41±7

Internucleosomal DNA fragmentation indicative of apoptosis is expressed as the DNA fragmentation index, as described in "Methods." The DNA specific activity and the tissue specific activity reflect the incorporation of tritiated thymidine into the smooth muscle DNA or into the whole aortic media, respectively, over the last 24 hours in vivo. Data were analyzed by ANOVA followed by Student's *t* test with Bonferroni correction for multiple comparisons, except for DNA fragmentation index, which was analyzed using the nonparametric tests Kruskal-Wallis followed by Mann-Whitney.

**P*<.05.

tween corresponding control and experimental groups at 1, 2, and 4 weeks (not shown). Daily water consumption was increased in rats treated with losartan (by 20%) or enalapril (by 23%). Powdered food consumption was not different between the nifedipine and the corresponding control group (not shown).

Effect of Drugs on Vascular Hypertrophy and DNA Content

At 4 weeks the aorta:body weight ratio was not affected by hydralazine, propranolol, or HCT (Table 1). In contrast, there was a significant reduction in aortic mass at 4 weeks in rats given losartan (19% reduction), enalapril (22% reduction), or nifedipine (26% reduction). Further studies at earlier times revealed a significant reduction in aortic mass as early as 2 weeks with losartan or nifedipine but not enalapril (Table 2 and Fig 3A). The aorta of untreated animals showed no increase in vascular mass between tissues isolated at 1, 2, and 4 weeks, suggesting that the drug-induced reductions in vascular mass represented a regression rather than a prevention of vascular hypertrophy. As a further confirmation that vascular mass was decreased, the aortic cross-sectional area was significantly decreased by losartan, enalapril, or nifedipine but not hydralazine for 4 weeks (Table 3).

To further analyze vascular growth, aortic DNA content was evaluated per length of vessel. The length of the freshly isolated thoracic aorta was 30 ± 1 mm ($n=26$) in untreated animals at 4 weeks, and this value was not affected by any of the treatments studied (not shown). Among all the drugs studied, only losartan and enalapril reduced aortic DNA content significantly, by 63% and 66%, respectively, in the aorta after 4 weeks of treatment (Table 1). In contrast, DNA content at 2 weeks showed a significant 60% to 65% reduction with nifedipine and losartan, and no evidence of reduction with enalapril (Table 2 and Fig 3B). Administration of losartan or nifedipine for a shorter period of time (1 week) did not affect total DNA content in the aorta. Because the enalapril-induced reduction in DNA content required more than 2 weeks of treatment, this drug was not included in the 1-week studies designed to examine apoptosis.

Effect of Drugs on SMC Apoptosis

The therapy-induced reduction in DNA content in the thoracic aorta suggested a stimulation of apoptosis and a corresponding reduction in SMC number. To test this hypothesis, the DNA fragmentation index was evaluated as

described in "Methods." Losartan caused a threefold to fivefold increase in internucleosomal DNA fragmentation. This effect of losartan was highest at 1 week and sustained as late as 4 weeks after beginning of treatment (Tables 1 and 2, and Fig 3C). Enalapril also stimulated internucleosomal DNA fragmentation by threefold to fivefold, although the highest effect was observed at 4 weeks. In nifedipine-treated rats, internucleosomal DNA fragmentation was increased at 1 week only. The DNA fragmentation index for the large 20- to 30-kbp DNA fragments showed no significant change with treatment (not shown), compared with control values of 1.8 ± 0.1 cpm per pixel per microgram DNA ($n=40$).

The three-dimensional disector method was used to determine whether the reduced DNA content corresponded to a reduced SMC number in the arterial wall (Table 3). In the aorta of untreated rats, we found 116 ± 6 SMC per micrometer of vessel length. This SMC number is comparable to what Owens³⁵ reported in the aorta of untreated 3-month-old SHR, using a different method of evaluation. We found that the SMC number per length of aorta was significantly reduced by 50% with losartan, by 47% with enalapril, and by 38% with nifedipine. In contrast, the potent antihypertensive effect of hydralazine did not result in reduced SMC number in the arterial wall. Thus, there was a highly significant correlation between the aortic DNA content and the number of SMC in the arterial wall ($P<.001$; $r=.6$). Although losartan, enalapril, and nifedipine significantly reduced the cross-sectional area and therefore the total mass of the aorta, the reduction in SMC number was large enough so that the SMC numerical density was also significantly decreased in the arterial wall (Table 3). None of the treatments under study with the disector method affected significantly the average nuclear length of arterial SMC, which was $15 \pm 1 \mu\text{m}$ in the untreated aorta, a value comparable with the results obtained by Mulvany et al¹⁸ in SHR small mesenteric arteries using the same method.

Effect of Drugs on DNA Synthesis

As shown in Table 2, several treatments caused a significant reduction in arterial DNA specific activity without affecting radioactivity levels in the whole vascular media (at least at 2 weeks), thus suggesting an inhibition of SMC DNA synthesis. Within 4 weeks, the specific activity of aortic DNA was decreased by losartan, enalapril, and nifedipine but not by hydralazine, propranolol, or HCT (Tables 1 and 2). The kinetic but not the magnitude of the

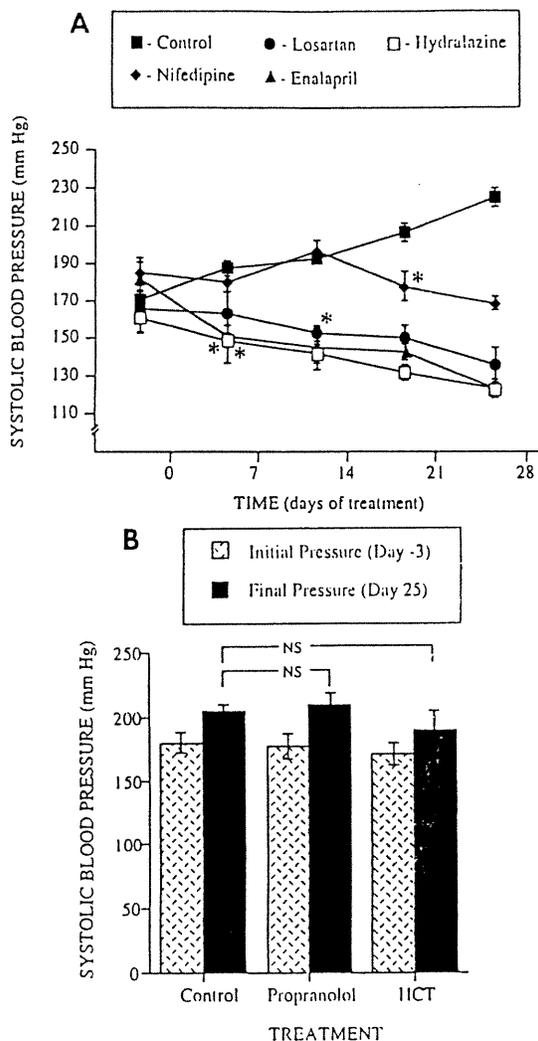


FIG 2. A, Progressive increase in systolic blood pressure in untreated 10- to 11-week-old SHR and the reversal of hypertension in SHR treated for 4 weeks with losartan ($30 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$), enalapril ($30 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$), nifedipine ($35 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$), or hydralazine ($40 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$). B, Systolic blood pressure at the beginning and end of a 4-week treatment with propranolol ($50 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$) or hydrochlorothiazide (HCT; $75 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$) in SHR. Systolic pressure was measured by tailcuff plethysmography as described in "Methods." Day 0 refers to the beginning of drug administration. Values are mean \pm SEM ($n=5$ to 14 rats). *First occurrence of a significant difference between treated and control groups ($P<.05$).

inhibitory effect varied between losartan, enalapril, and nifedipine (Fig 3D). Thus, DNA specific activity was significantly reduced by losartan at 2 and 4 weeks (25% and 31% reduction, respectively), by nifedipine at 2 weeks only (42% reduction), and by enalapril at 4 weeks only (32% reduction).

Effects of a Lower Dose of Losartan

The regulation of aortic growth was examined in rats treated with a lower dose of losartan for 4 weeks. As shown in Table 4, administration of losartan ($10 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$) to SHR was unable to reverse the pre-existing hypertension but prevented the further development of high blood pressure. Interestingly, this treatment did not result in any significant change in aortic

mass, DNA fragmentation, DNA specific activity, or DNA content at 4 weeks.

Discussion

Increased vascular mass is an important feature of hypertensive vessels. In the adult SHR, the thoracic aorta shows medial hypertrophy and a higher SMC DNA content and synthesis rate as compared to normotensive animals.^{3,7,17,34-38} In the absence of high blood pressure, SHR SMC cultured in vitro maintain an increased growth behavior, including hyperresponsiveness to growth factors, accelerated entry into S phase of the cell cycle, reduced cell-contact inhibition, and high incidence of polyploidy, suggesting a pressure-independent dysregulation of growth.³⁹⁻⁴⁴ We have reported that SMC cultured from SHR aorta also exhibit a heightened propensity to undergo apoptosis, eg, in response to growth factor withdrawal.²¹ We recently reviewed⁴⁵ the possible role of apoptosis in regulating vascular mass and DNA content, a hypothesis that has never been examined in hypertensive vessels. The balance between SMC DNA synthesis and degradation determines the total DNA content of the arterial media, which in turn is a primary determinant of vascular mass. Thus, the aim of the present studies was to investigate the regulation of SMC apoptosis during the regression of aortic medial hypertrophy induced by antihypertensive therapy in the SHR.

Time Window of Apoptosis

Within 4 weeks of effective antihypertensive therapy, we observed a reduction in aortic mass in rats treated with losartan, enalapril, or nifedipine but not hydralazine. Several lines of evidence suggest that the regression of vascular hypertrophy was associated with increased SMC apoptosis. First, there was a marked increase in internucleosomal fragmentation of the DNA in the aortic media. This specific pattern of DNA is a hallmark feature of apoptosis observed in several types of cells²⁷ including SMC in culture.^{21,30-33} Second, there was a significant reduction in aortic DNA content in the weeks following the initial burst of internucleosomal DNA fragmentation. Finally, the number of SMC in the aortic wall was reduced after 4 weeks of losartan, enalapril, or nifedipine but not hydralazine, in correlation with the effects of these drugs on aortic DNA content. The present data on the kinetics of arterial SMC apoptosis during drug therapy are reminiscent of our recent observations in the heart adapting to pressure overload caused by aortic coarctation.²⁶ In this model, the development of cardiac hypertrophy is preceded by a transient increase in apoptosis, notably in cardiomyocytes. We suggested that the design of therapeutic approaches aimed at controlling cardiovascular remodeling should take into account the presence of time windows of apoptosis during pathogenesis.⁴⁶ The present studies provide evidence that windows of rapid change in apoptosis also occur in response to drug therapy.

SMC Apoptosis and Blood Pressure

The stimulation of SMC apoptosis could be dissociated from the antihypertensive effects of the drugs tested. Although hydralazine was very effective at reducing hypertension, it did not affect DNA fragmentation, DNA content, SMC number, or vascular mass at 4 weeks. Furthermore, the stimulation of SMC apoptosis was more rapid with losartan or nifedipine (1 week) than with enal-

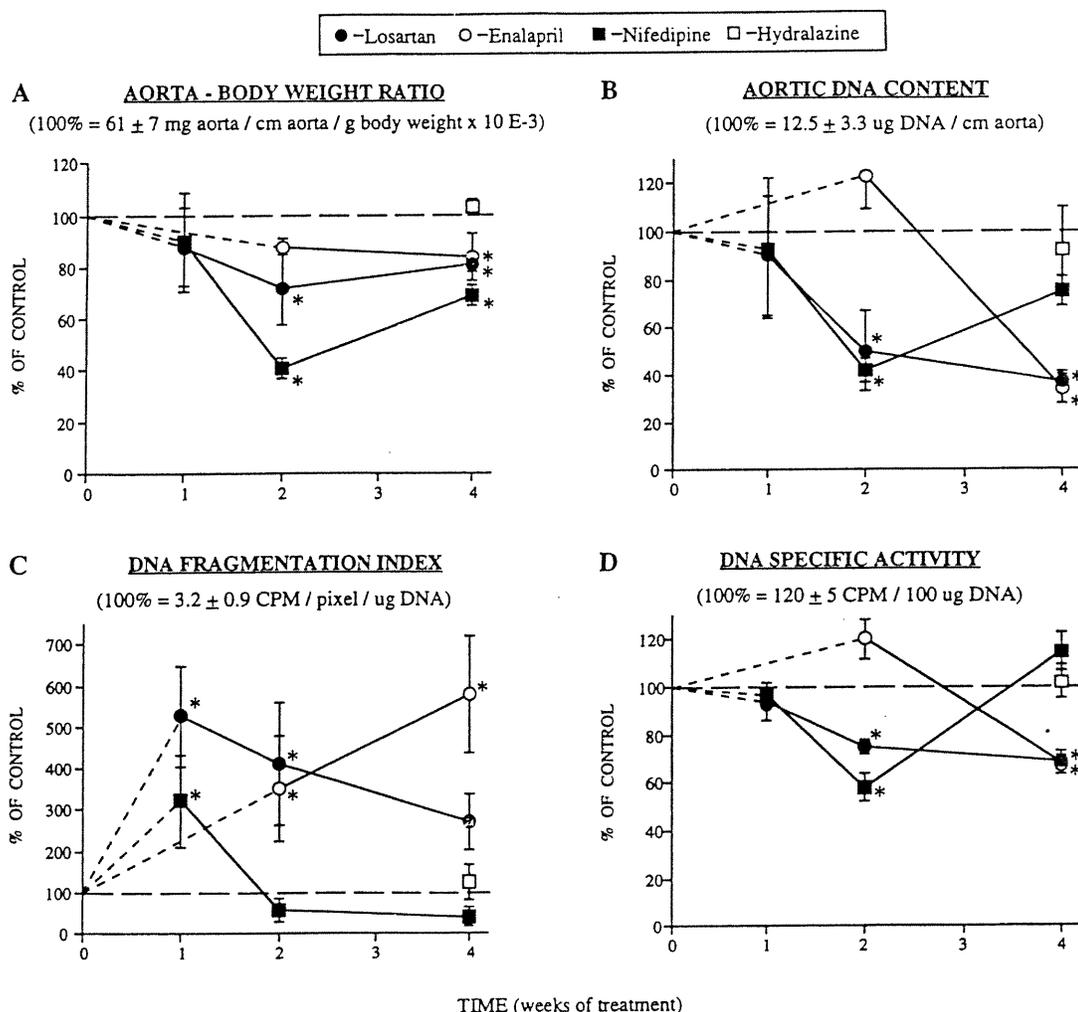


FIG 3. Changes in growth-related parameters in the aortic media of SHR receiving losartan ($30 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$), enalapril ($30 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$), nifedipine ($35 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$), or hydralazine ($40 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$) for 1 to 4 weeks. A, Vascular mass expressed as the aorta:body weight ratio. B, Aortic DNA content. C, Aortic DNA fragmentation index, indicative of apoptosis. D, Aortic DNA specific activity, indicative of DNA synthesis in vivo. The data were taken from Tables 1 and 2, expressed as a percentage of the corresponding control values and plotted as a function of time after initiation of drug therapy.

april (2 weeks), whereas blood pressure reduction was more rapid and pronounced with enalapril (1 week) than with losartan (2 weeks) or nifedipine (>2 weeks). Taken together, these data strongly suggest that drug-induced SMC apoptosis was not a secondary response to blood

pressure reduction. Consistent with this, calcium channel blockers stimulate apoptosis independently of hemodynamic changes in cultured SMC.⁴⁷

Several groups reported a dissociation between blood pressure reduction and aortic mass regression in the SHR

TABLE 3. Effect of 4-Week Antihypertensive Therapy on Medial Cross-Sectional Area, SMC Nuclear Length, SMC Numerical Density, and SMC Number in the Aortic Media of SHR

	Control (n=9)	Losartan (n=6)	Enalapril (n=7)	Nifedipine (n=5)	Hydralazine (n=6)
Measurements on cross-sections					
Medial cross-section, mm^2	0.32 ± 0.01	$0.23 \pm 0.01^*$	$0.26 \pm 0.01^*$	$0.27 \pm 0.01^*$	0.32 ± 0.01
Measurements on disectors					
Total volume of disectors, $\text{mm}^3 \times 10^{-6}$	238 ± 27	322 ± 34	256 ± 19	164 ± 24	204 ± 20
No. of nuclei in top sections	123 ± 15	115 ± 10	107 ± 7	71 ± 12	126 ± 8
No. of nuclei still present in bottom sections	37 ± 7	38 ± 6	47 ± 6	27 ± 6	49 ± 9
Average nuclear length, μm	15 ± 1	15 ± 1	18 ± 1	16 ± 1	15 ± 1
Cell numerical density, $\text{mm}^{-3} \times 10^{-6}$	36 ± 1	$25 \pm 2^*$	$24 \pm 2^*$	$26 \pm 2^*$	38 ± 2
Combined measurements					
No. of cells/ μm of aorta	116 ± 6	$58 \pm 6^*$	$61 \pm 4^*$	$72 \pm 5^*$	122 ± 11
% reduction in cell number	...	50%	47%	38%	...

Medial cross-sectional area was measured using a computerized image analysis system, as described in "Methods." A blindly selected subset of tissues was used for the control and enalapril groups.

* $P < .05$ by ANOVA followed by Student's t test with Bonferroni correction for multiple comparisons.

TABLE 4. Effect of 4-Week Antihypertensive Therapy With a Low Dose of Losartan ($10 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$) on SHR Systolic Blood Pressure, Body Weight, and Aortic Medial Hypertrophy, DNA Content, DNA Fragmentation, and DNA Specific Activity

	Control (n=6)	Losartan (n=6)
Initial systolic blood pressure, mm Hg	173±10	174±8
Final systolic blood pressure, mm Hg	217±7	172±7*
Final body weight, g	297±7	290±7
Aorta:body weight ratio, $\text{mg} \cdot \text{mm}^{-1} \cdot \text{g}^{-1} \times 10^{-3}$	5.1±0.6	5.7±0.6
DNA content, $\mu\text{g}/\text{mm}$	1.31±0.07	0.94±0.11
DNA fragmentation index, $\text{cpm} \cdot \text{pixel}^{-1} \cdot \mu\text{g}^{-1}$	4.2±1.2	3.9±1.5
DNA specific activity, $\text{cpm}/100 \mu\text{g}$	104±1	92±2

Internucleosomal DNA fragmentation indicative of apoptosis is expressed as the DNA fragmentation index, as described in "Methods." The DNA specific activity reflects the incorporation of tritiated thymidine into the smooth muscle DNA over the last 24 hours in vivo.
* $P < .05$ by Student's *t* test.

on the basis of comparative studies between hydralazine and losartan,⁴⁸ a calcium channel blocker,⁴⁹ or an ACE inhibitor.⁵⁰ The present results extend these findings by showing that nifedipine induced aortic mass regression before systolic pressure reduction (ie, at 2 and 3 weeks, respectively). Increased SMC apoptosis may account for this early structural effect of the calcium channel blocker. SMC apoptosis may also contribute, along with vasodilatation⁵¹ and decreased extracellular matrix accumulation,⁵² to increase the compliance of large conduit arteries in response to ACE inhibitors, AT₁ antagonists or calcium channel blockers, a major beneficial effect of these drugs against left ventricular hypertrophy and systolic hypertension.^{22,53}

The available evidence from previous studies suggests that in SHR the antihypertensive and antihypertrophic effects of β -blockers and diuretics are modest, slow to develop, and may be more pronounced when the drugs are administered before hypertension is established.^{24,25,54-56} Thus, although propranolol and HCT did not significantly affect blood pressure or vascular structure at this established phase of SHR hypertension, we cannot rule out that an earlier or more prolonged schedule of administration may affect arterial SMC apoptosis.

SMC Apoptosis and DNA Synthesis

Heightened DNA replication rates are often associated with and even counterbalanced by an increase in SMC apoptosis. Cho et al²⁹ reported that high rates of DNA synthesis in specific arteries of the neonatal lamb do not translate to a corresponding increase in vascular DNA content. In these arteries which show regression after birth the high rates of SMC DNA synthesis are counterbalanced by heightened apoptosis. SMC apoptosis is also markedly increased in the developing neointimal lesion after balloon catheter injury in rats.^{57,58} Apoptosis and DNA replication are both found mainly among SMC located near the luminal surface of the neointima, suggesting that apoptosis may regulate the cellularity of the lesion in the face of chronic cell proliferation.⁵⁹ Bennett et al³⁰ reported that SMC overexpressing the proto-oncogene and growth-related transcription factor *c-myc* showed an increased rate of DNA replication that was resistant to inhibition by serum withdrawal or interferon- γ . In an apparent paradox, however, serum withdrawal or interferon- γ indeed abolished the accumulation of *c-myc* cells. This discrepancy between the high rates of DNA synthesis and the low rates of cell accumulation could be explained by the markedly increased

frequency of apoptosis in the *c-myc* cells in response to serum withdrawal or interferon- γ treatment. Thus, *c-myc* overexpression stimulates both cell proliferation and death by apoptosis, and the balance between proliferation and death is controlled by survival and cytostatic signals from the environment. Overall, the data on SMC apoptosis regulation suggest that the need for survival signals may be increased in cells stimulated to undergo replication. It is intriguing to speculate that the early increase in aortic SMC apoptosis, preceding the inhibition of DNA synthesis, represented a failure of SMC to adapt rapidly to reduced levels of survival factors such as angiotensin II or extracellular calcium influx.

Several groups reported that the aorta of SHR has an increased percentage of polyploid SMC, a feature which correlates in part with the severity of hypertension and which is significantly reduced by ACE inhibitors or losartan but not hydralazine or diuretics.^{7,16,38,43,60} Assuming equal frequencies of apoptotic cell death among diploid and tetraploid SMC, the decrease in aortic DNA content would overestimate SMC mortality by one third. Indeed, in the present study treatment with losartan caused a greater reduction in DNA content than in SMC number in the aorta after 4 weeks (63% reduction in DNA versus 47% reduction in cellularity, respectively). A similar pattern was observed with enalapril (66% versus 50% reduction, respectively). In contrast, nifedipine caused a smaller reduction in DNA content than in SMC number (25% versus 38% reduction, respectively). It is intriguing to speculate that these differences may reflect differential rates of apoptosis in polyploid versus diploid SMC. Clearly, further studies are needed to investigate apoptosis regulation and arterial SMC polyploidy.

Detailed studies by Owens³⁵ did not detect a change in vascular DNA content or SMC number in the aorta of SHR treated with the ACE inhibitor captopril. Differences in experimental design may explain the discrepancies between the latter and present studies. First, captopril was administered to SHR for 3 months beginning at 2 months of age, ie, before the onset of hypertension. In contrast, rats used in the present study were already hypertensive when drug therapy was initiated and their aorta was examined at earlier times thereafter. Second, we observed a marked reduction of the preexisting hypertension (at least with inhibitors of the angiotensin II pathway), whereas the treatment with captopril³⁵ mainly prevented the development of high blood pressure over time. It is intriguing to

speculate that stimulation of SMC apoptosis in the arterial media may require aggressive antihypertensive therapy causing abrupt yet specific changes in the homeostatic environment of the cells in the arterial wall. In support of this view, we showed that a lower dose of losartan that prevented, but did not reverse, the progression of hypertension in SHR failed to affect aortic mass, DNA fragmentation index, or DNA content at 4 weeks. Previous studies support the view that rates of blood pressure change over time may be critical in determining SMC growth behavior. For instance, the gradual increase in blood pressure in SHR, Goldblatt rats, and DOCA-salt and norepinephrine-induced models of hypertension results in increased aortic SMC ploidy.^{15,16} In contrast, the abrupt increase in intra-aortic blood pressure that follows suprarenal aortic coarctation is associated with the rapid and significant increase in aortic SMC hyperplasia.⁶¹ The regulation of SMC apoptosis in normotensive rats, which show less prominent hemodynamic responses to antihypertensive drugs than SHR, remains to be determined. An additional though nonexclusive possibility is that the depletion of SMC in the arterial wall is transient and reversible within the first months of drug therapy. Indeed, our data with nifedipine at 2 and 4 weeks (Fig 3) are consistent with such a complex regulation of SMC growth in the arterial wall. Ultimately, it is conceivable that vascular remodeling without a net change in vascular mass or cell number (eutrophic vascular remodeling)⁶² may result from the reversible depletion of SMC via a balanced process of SMC apoptosis and replication.

Molecular Mechanisms Regulating SMC Apoptosis

It is important to note that the triggering of apoptosis is dependent on a balance of environmental cues that are far from being specific to apoptosis. In vitro studies have identified several factors that can modulate, in parallel or in opposition, SMC DNA replication and apoptosis. For instance, DNA replication is inhibited and apoptosis is increased via the cAMP pathway, the nitric oxide pathway, interferon- γ , or calcium channel blockers.^{21,32,33,47,63} In contrast, platelet-derived growth factor or insulin-like growth factor-1 inhibits apoptosis and promotes DNA replication.^{31,64,65} In addition, overexpression of the transcription factor *c-myc* or its adenoviral functional homologue E1A increases both DNA replication and apoptosis in SMC.^{66,67} Finally, basic fibroblast growth factor and epidermal growth factor stimulate DNA replication without affecting SMC apoptosis.^{31,68} We have recently reported further evidence for the independent regulation of DNA synthesis and cell death by apoptosis in cultured SMC.⁶⁹ To our knowledge, the present study is the first to describe the regulation by pharmacological agents of arterial SMC apoptosis in vivo.

Angiotensin II acting via AT₁ receptors may act as a survival factor for SMC. Both the ACE inhibitor enalapril and the angiotensin II AT₁ receptor antagonist losartan potentially increased SMC apoptosis in the aorta. Angiotensin II binding to AT₁ receptors may inhibit SMC apoptosis either directly or indirectly by stimulating the production of autocrine survival factors, including platelet-derived growth factor and insulin-like growth factor-1,^{31,64,65} or by stimulating the production of specific extracellular matrix molecules, such as osteopontin,⁷⁰ in the arterial wall. Disruption of binding to the $\alpha_v\beta_3$ integrin receptor for osteopontin induces apoptosis in angiogenic blood vessels.⁷¹ In

fact, a growing body of evidence suggests that extracellular matrix proteins regulate apoptosis by interacting with cellular integrin receptors and modulating intracellular protein tyrosine phosphatase activity.⁷² Stimulation of the AT₂ receptor subtype for angiotensin II is a potential pathway for the rapid stimulation of SMC apoptosis in losartan-treated animals, a condition where plasma levels of angiotensin II are markedly increased.⁷³ Recently, the angiotensin AT₂ receptor subtype has been implicated in the reduction of high blood pressure,^{74,75} the inhibition of arterial SMC DNA replication,⁷⁶ and the induction of apoptosis in fibroblasts, ovarian cells and neuronal cells via the activation of protein tyrosine phosphatase pathways.^{77,78}

Enalapril effects on SMC apoptosis, DNA synthesis, and vascular mass were comparable in magnitude though delayed compared with losartan, which was the most potent inducer of apoptosis or inhibitor of DNA synthesis. The faster onset for blood pressure reduction with enalapril may involve the reduced breakdown of endogenous vasodilatory kinins.⁷⁹ Effects of kinins on apoptosis are unknown, but it is possible that kinin-induced secretion of NO by endothelial cells may contribute to stimulate SMC apoptosis in vivo.⁶³

Nifedipine had a transient effect on arterial growth and apoptosis. Recent retrospective epidemiological studies suggested that treatment of hypertensive patients with rapidly acting formulations of nifedipine (as in the present study) might increase the risk of coronary mortality⁸⁰ or cancer.⁸¹ In the latter study, inhibition of apoptotic cell death by nifedipine was proposed as a putative mechanism for the promotion of neoplastic growth. The present study does not provide evidence supporting this hypothesis. Clearly, these clinical issues remain to be clarified within the framework of prospective studies. Notably, it remains unclear whether the putative risk increases might represent a class effect of calcium channel blockers, a secondary effect related to sympathetic activation with short acting formulations of nifedipine⁸² (in the case of coronary mortality), or simply a medication-independent association between hypertension and cancer.⁸³ The present data suggest that antihypertensive medications have complex effects on growth and apoptosis which need to be explored further in the long term.

It has been suggested that long-term benefits from antihypertensive therapies may depend on the remodeling of vascular structure with the normalization of wall-to-lumen ratio.¹⁰⁻¹² Recent studies in hypertensive humans indicated that blood pressure reduction is accompanied with significant remodeling of small muscular arteries in patients treated with ACE inhibitors or a calcium channel antagonist but not β -blockers.⁸⁴⁻⁸⁶ The present studies suggest that SMC apoptosis is one of the earliest events in the sequence of changes taking place during drug-induced regression of vascular hypertrophy. It remains unclear what is the long-term significance of apoptosis on SMC population dynamics in the arterial wall. Another critical question is whether the regulation of apoptosis is vessel specific, as it has been suggested for SMC growth behavior.^{70,87}

In summary, nifedipine and inhibitors of the angiotensin pathway stimulated SMC apoptosis early during regression of vascular hypertrophy in the thoracic aorta, before SMC DNA replication was inhibited, and independently of blood pressure reduction. Thus, a major goal of research should be to better characterize mechanisms regulating

apoptotic SMC death in vivo and its putative role in hypertensive vessel remodeling in disease and in response to therapeutic agents.

Acknowledgments

This work was supported by grants from the Medical Research Council of Canada (MT-10803 and MT-12563), the Heart and Stroke Foundation of Canada, and Bayer Canada. B.-S. Tea received a studentship from the Medical Research Council of Canada and T.-V. Dam received a fellowship from Merck Frosst Canada. Special thanks are extended to Dr Pierre Moreau and Dr Stephen M. Schwartz for fruitful discussion and to Suzanne Carlotto, Manon Léveillé, Zachary Perras, and Nathalie Rousseau for assistance in animal care and surgery.

References

- Folkow B. Physiological aspects of primary hypertension. *Physiol Rev.* 1982;62:347-504.
- Mulvany MJ. Are vascular abnormalities a primary cause or secondary consequence of hypertension? *Hypertension.* 1991;18(suppl 1):1-52-1-57.
- Lee RMKW, Smeda JS. Primary versus secondary structural changes of the blood vessels in hypertension. *Can J Physiol Pharmacol.* 1985;63:392-401.
- Schiffirin EL. Reactivity of small blood vessels in hypertension: Relation with structural changes. *Hypertension.* 1992;19(suppl II):II-1-II-9.
- Heagerty AM, Aalkjaer C, Bund SJ, Korsgaard N, Mulvany MJ. Small artery structure in hypertension: dual processes of remodeling and growth. *Hypertension.* 1993;21:391-397.
- Heistad DD, Armstrong ML, Baumbach GL, Faraci FM. Sick vessel syndrome: recovery of atherosclerotic and hypertensive vessels. *Hypertension.* 1995;26:509-513.
- Lee RM, Owens GK, Scott-Burden T, Head RJ, Mulvany MJ, Schiffirin EL. Pathophysiology of smooth muscle in hypertension. *Can J Physiol Pharmacol.* 1995;73:574-584. Review.
- Folkow B. "Structural factor" in primary and secondary hypertension. *Hypertension.* 1990;16:89-101.
- Safar ME, Laurent S. Behaviour of conduit arteries in hypertension. *Clin Exp Hypertens.* 1993;15:1033-1045. Review.
- Boudier HAJ, van Bortel LMAB, De Mey JGR. Remodeling of the vascular tree in hypertension: drug effects. *Trends Pharmacol Sci.* 1990;11:240-245.
- Mulvany MJ. Determinants of vascular structure. *J Cardiovasc Pharmacol.* 1992;19(suppl 5):S1-S6.
- Mulvany MJ. The development and regression of vascular hypertrophy. *J Cardiovasc Pharmacol.* 1992;19(suppl 2):S22-S27.
- Safar ME, Levy BI, London GM. Arterial structure in hypertension and the effects of angiotensin converting enzyme inhibition. *J Hypertens Suppl.* 1992;10:S51-S57. Review.
- Owens GK, Schwartz SM. Vascular smooth muscle cell hypertrophy and hyperploidy in the Goldblatt hypertensive rat. *Circ Res.* 1983;53:491-501.
- Yamori Y, Mano M, Nara Y, Horie R. Catecholamine-induced polyploidization in vascular smooth muscle cells. *Circulation.* 1987;75(suppl 1):I-92-I-95.
- Owens GK. Control of hypertrophic versus hyperplastic growth of vascular smooth muscle cells. *Am J Physiol.* 1989;257:H1755-H1765.
- Walker SV, Hamet P. Enhanced DNA synthesis in heart and kidney of newborn spontaneously hypertensive rats. *Hypertension.* 1986;8:520-525.
- Mulvany MJ, Baandrup U, Gundersen HLG. Evidence for hyperplasia in mesenteric resistance vessels of spontaneously hypertensive rats using a three-dimensional dissector. *Circ Res.* 1985;57:794-800.
- Kerr JFR, Wyllie AH, Currie AR. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer.* 1972;26:239-257.
- Thompson GB. Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. *Science.* 1995;267:1456-1462.
- Hamet P, Richard L, Dam T-V, Teiger E, Orlov SN, Gaboury L, Gossard F, Tremblay J. Apoptosis in target organs of hypertension. *Hypertension.* 1995;26:642-648.
- Frohlich ED, Sasaki O, Chien Y, Arita M. Changes in cardiovascular mass, left ventricular pumping ability and aortic distensibility after calcium antagonists in Wistar-Kyoto and spontaneously hypertensive rats. *J Hypertens.* 1992;10:1369-1378.
- Oddie CJ, Dilley RJ, Bobik A. Long-term angiotensin II antagonism in spontaneously hypertensive rats: effects on blood pressure and cardiovascular amplifiers. *Clin Exp Pharmacol Physiol Suppl.* 1992;19:392-395.
- Igawa T, Ikeno K, Watanabe K, Kimura Y. Dose-related inhibitory effects of the beta-adrenoceptor blocking drug carteolol and propranolol on cardiac hypertrophy in spontaneously hypertensive rats. *Eur J Pharmacol.* 1984;104:93-99.
- Kobayashi H, Sano T, Tarazi RC, Fouad-Tarazi FM. Effects of anti-hypertensive drugs on heart and resistance vessels. *Cardiovasc Res.* 1990;24:137-143.
- Teiger E, Dam TV, Richard L, Wisniewsky C, Tea BS, Gaboury L, Tremblay J, Schwartz K, Hamet P. Apoptosis in pressure overload-induced heart hypertrophy in the rat. *J Clin Invest.* 1996;97:2891-2897.
- Bortner CD, Oldenburg NBE, Cidlowski JA. The role of DNA fragmentation in apoptosis. *Trends Cell Biol.* 1995;5:21-26.
- Oberhammer F, Wilson JW, Dive C, Morris ID, Kichman JA, Wakeling AE, Walker PR, Sikorska M. Apoptotic death in epithelial cells: cleavage of DNA to 300 and/or 50 kb fragments prior to or in the absence of internucleosomal fragmentation. *EMBO J.* 1993;12(9):3679-3684.
- Cho A, Courtman DW, Langille BL. Apoptosis (programmed cell death) in arteries of the neonatal lamb. *Circ Res.* 1995;76:168-175.
- Bennett MR, Evan GI, Newby AC. Deregulated expression of the c-myc oncogene abolishes inhibition of proliferation of rat vascular smooth muscle cells by serum reduction, interferon-gamma, heparin, and cyclic nucleotide analogues and induces apoptosis. *Circ Res.* 1994;74:525-536.
- Bennett MR, Evan GI, Schwartz SM. Apoptosis of human vascular smooth muscle cells derived from normal vessels and coronary atherosclerotic plaques. *J Clin Invest.* 1995;95:2266-2274.
- Miura M, Shu H, Rotello R, Hartweg EA, Yuan J. Induction of apoptosis in fibroblasts by IL-1 beta-converting enzyme, a mammalian homolog of the C elegans cell death gene ced-3. *Cell.* 1993;75:653-660.
- Orlov SN, Dam TV, Tremblay J, Hamet P. Apoptosis in vascular smooth muscle cells: role of cell shrinkage. *Biochem Biophys Res Commun.* 1996;221:708-715.
- Owens GK. Differential effects of antihypertensive drug therapy on vascular smooth muscle cell hypertrophy, hyperploidy, and hyperplasia in the spontaneously hypertensive rat. *Circ Res.* 1985;56:525-536.
- Owens GK. Influence of blood pressure on development of aortic medial smooth muscle hypertrophy in spontaneously hypertensive rats. *Hypertension.* 1987;9:178-187.
- Owens GK, Schwartz SM. Alterations in vascular smooth muscle mass in the spontaneously hypertensive rat: role in cellular hypertrophy, hyperploidy, and hyperplasia. *Circ Res.* 1982;51:280-289.
- Loeb AL, Bean BL. Antihypertensive drugs inhibit hypertension-associated aortic DNA synthesis in the rat. *Hypertension.* 1986;8:1135-1142.
- Dominiczak AF, Devlin AM, Lee WK, Anderson NH, Bohr DF, Reid JL. Vascular smooth muscle polyploidy and cardiac hypertrophy in genetic hypertension. *Hypertension.* 1996;27:752-759.
- Scott-Burden T, Resink TJ, Baur U, Burgin M, Buhler FR. Epidermal growth factor responsiveness in smooth muscle cells from hypertensive and normotensive rats. *Hypertension.* 1989;13:295-304.
- Hamet P, Hadrava V, Kruppa U, Tremblay J. Transforming growth factor β expression and effect in aortic smooth muscle cells from spontaneously hypertensive rats. *Hypertension.* 1991;17:896-901.
- Hamet P, Hadrava V, Kruppa U, Tremblay J. Vascular smooth muscle cell hyper-responsiveness to growth factors in hypertension. *J Hypertens Suppl.* 1988;6:S36-S39.
- Hadrava V, Tremblay J, Sekaly RP, Hamet P. Accelerated entry of aortic smooth muscle cells from spontaneously hypertensive rats into the S phase of the cell cycle. *Biochem Cell Biol.* 1992;70:599-604.
- Conyers RB, Kwan CY, Lee RM. Alterations in beta-adrenoceptors and polyploidy in cultured aortic smooth muscle cells from different age groups of spontaneously hypertensive rats and Wistar-Kyoto rats. *J Hypertens.* 1995;13:507-515.
- Lee RM, Conyers RB, Kwan CY. Incidence of multinucleated and polyploid aortic smooth muscle cells cultured from different age groups of spontaneously hypertensive rats. *Can J Physiol Pharmacol.* 1992;70:1496-1501.
- Hamet P, deBlois D, Dam T-V, Richard L, Teiger E, Tea B-S, Orlov SN, Tremblay J. Apoptosis and vascular wall remodeling in hypertension. *Can J Physiol Pharmacol.* 1996;74:850-861.
- Hamet P, Moreau P, Dam T-V, Orlov SN, Tea B-S, deBlois D, Tremblay J. The time window of apoptosis: a new component in the

- therapeutic strategy for cardiovascular remodeling. *J Hypertens.* 1996;14(suppl 5):S65-S70.
47. Leszczynski D, Shao Y, Luokkamaki M, Foegh ML. Apoptosis of vascular smooth muscle cells: protein kinase C and oncoprotein Bcl-2 are involved in regulation of apoptosis in non-transformed rat vascular smooth muscle cells. *Am J Pathol.* 1994;145:1265-1270.
 48. Soltis EE. Alterations in vascular structure and function after short-term losartan treatment in spontaneously hypertensive rats. *J Pharmacol Exp Ther.* 1993;266:642-646.
 49. Ferrante F, Abbate F, Ciriaco E, Laura R, Amenta F. Influence of irradipine treatment on the morphology of the aorta in spontaneously hypertensive rats. *J Hypertens.* 1994;12:523-531.
 50. Benetos A, Albaladejo P, Levy BI, Safar ME. Acute and long-term effects of angiotensin converting enzyme inhibition on larger arteries and cardiac hypertrophy: mechanical and structural parameters. *J Hypertens Suppl.* 1994;12:S21-S29.
 51. Safar ME, Levy BI. Mechanical function and histological structure of the arterial wall. The response to antihypertensive treatment. *Drugs.* 1993;46(suppl 2):68-74. Review.
 52. Albaladejo P, Bouaziz H, Duriez M, Gohlke P, Levy BI, Safar ME, Benetos A. Angiotensin-converting enzyme inhibition prevents the increase in aortic collagen in rats. *Hypertension.* 1994;23:74-82.
 53. Safar ME, Frohlich ED. The arterial system in hypertension: a prospective view. *Hypertension.* 1995;26:10-14.
 54. Yamori Y, Tarazi RC, Ooshima A. Effect of beta-receptor-blocking agents on cardiovascular structural changes in spontaneous and noradrenaline-induced hypertension in rats. *Clin Sci.* 1980;59:457s-460s.
 55. Benetos A, Poitevin P, Prost PL, Safar ME, Levy BI. Life survival and cardiovascular structures following selective beta-blockade in spontaneously hypertensive rats. *Am J Hypertens.* 1994;7:186-192.
 56. Contard F, Glukhova M, Marotte F, Narcisse G, Schatz C, Swynghedauw B, Guez D, Samuel JL, Rappaport L. Diuretic effects on cardiac hypertrophy in the stroke prone spontaneously hypertensive rat. *Cardiovasc Res.* 1993;27:429-434.
 57. Bochaton-Piallat ML, Gabbiani F, Redard M, Desmoulière A, Gabbiani G. Apoptosis participates in cellularity regulation during rat aortic intimal thickening. *Am J Pathol.* 1995;146:1059-1064.
 58. Han DK, Haudenschild CC, Hong MK, Tinkle BT, Leon MB, Liao G. Evidence for apoptosis in human atherogenesis and in a rat vascular injury model. *Am J Pathol.* 1995;147:267-277.
 59. Clowes AW, Reidy MA, Clowes MM. Kinetics of cellular proliferation after arterial injury: smooth muscle growth in the absence of endothelium. *Lab Invest.* 1983;49:327-333.
 60. Devlin AM, Gordon JF, Davidson AO, Clark JS, Hamilton CA, Morton JJ, Campbell AM, Reid JL, Dominiczak AF. The effects of perindopril on vascular smooth muscle ploidy in stroke-prone spontaneously hypertensive rats. *J Hypertens.* 1995;13:211-218.
 61. Owens GK, Reidy MA. Hyperplastic growth response of vascular smooth muscle cells following induction of acute hypertension in rats by aortic coarctation. *Circ Res.* 1985;57:695-705.
 62. Mulvany MJ, Baumbach GL, Aalkjaer C, Heagerty AM, Korsgaard N, Schiffrin EL, Heistad DD. Vascular remodeling. *Hypertension.* 1996;28:505-506.
 63. Fukuo K, Hata S, Suhara T, Nakahashi T, Shinto Y, Tsujimoto Y, Morimoto S, Ogihara T. Nitric oxide induces upregulation of Fas antigen and apoptosis in vascular smooth muscle cells. *Hypertension.* 1996;27:823-826.
 64. Itoh H, Mukoyama M, Pratt RE, Gibbons GH, Dzau VJ. Multiple autocrine growth factors modulate vascular smooth muscle cell growth response to angiotensin II. *J Clin Invest.* 1993;91:2268-2274.
 65. Nafilan AJ, Pratt RE, Dzau VJ. Induction of platelet-derived growth factor A-chain and *c-myc* gene expressions by angiotensin II in cultured rat vascular smooth muscle cells. *J Clin Invest.* 1989;83:1419-1424.
 66. Bennett MR, Evan GI, Newby AC. Deregulated expression of the *c-myc* oncogene abolishes inhibition of proliferation of rat vascular smooth muscle cells by serum reduction, interferon- γ , heparin, and cyclic nucleotide analogues and induces apoptosis. *Circ Res.* 1994;74:525-536.
 67. Bennett MR, Evan GI, Schwartz SM. Apoptosis of rat vascular smooth muscle cells is regulated by p53 dependent and independent pathways. *Circ Res.* 1995;77:266-273.
 68. Jackson CL, Schwartz SM. Pharmacology of smooth muscle cell replication. *Hypertension.* 1992;20:713-736.
 69. Hamet P, Orlov SN, Tremblay J. Dissociation of DNA synthesis and apoptosis in vascular smooth muscle cells. *Hypertension.* 1996;28:529. Abstract.
 70. deBlois D, Lombardi DM, Su JE, Clowes AW, Schwartz SM, Giachelli CM. Angiotensin II induction of osteopontin expression and DNA synthesis in rat arteries. *Hypertension.* 1996;28:1055-1063.
 71. Brooks PC, Montgomery AMP, Rosenfeld M, Reisfeld RA, Hu T, Klier G, Cheresch DA. Integrin $\alpha_5\beta_3$ antagonists promote tumor regression by inducing apoptosis in angiogenic blood vessels. *Cell.* 1994;79:1157-1164.
 72. Meredith J, Fazeli B, Schwartz MA. The extracellular matrix as a cell survival factor. *Mol Biol Cell.* 1993;4:953-961.
 73. Timmermans PBMWM, Wong PC, Chiu AT, Herblin WF, Benfield P, Carini DJ, Lee RJ, Wexler RR, Saye JAM, Smith RD. Angiotensin II receptors and angiotensin II receptor antagonists. *Pharmacol Rev.* 1993;45:205-251.
 74. Ichiki T, Labosky PA, Shiota C, Okuyama S, Imagawa Y, Fogo A, Niimura F, Ichikawa I, Hogan BL, Inagami T. Effects on blood pressure and exploratory behaviour of mice lacking angiotensin II type-2 receptor. *Nature.* 1995;377:748-750.
 75. Hein L, Barsh GS, Pratt RE, Dzau VJ, Kobilka BK. Behavioural and cardiovascular effects of disrupting the angiotensin II type-2 receptor in mice. *Nature.* 1995;377:744-747.
 76. Nakajima M, Hutchinson HG, Fujinaga M, Hayashida W, Morishita R, Zhang L, Horiuchi M, Pratt RE, Dzau VJ. The angiotensin II type 2 (AT2) receptor antagonizes the growth effects of the AT1 receptor: gain-of-function study using gene transfer. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1995;92:10663-10667.
 77. Yamada T, Horiuchi M, Dzau VJ. Angiotensin II type 2 receptor mediates programmed cell death. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1996;93:156-160.
 78. Tanaka M, Ohnishi J, Ozawa Y, Sugimoto M, Usuki S, Naruse M, Murakami K, Miyazaki H. Characterization of angiotensin II receptor type 2 during differentiation and apoptosis of rat ovarian cultured granulosa cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 1995;207:593-598.
 79. Bao G, Gohlke P, Qadri F, Unger T. Chronic kinin receptor blockade attenuates the antihypertensive effect of ramipril. *Hypertension.* 1992;20:74-79.
 80. Furberg CD, Patsy BM, Meyer JV. Nifedipine: dose-related increase in mortality in patients with coronary heart disease. *Circulation.* 1995;92:1326-1331.
 81. Pahor M, Guralnik JM, Salive ME, Corti MC, Carbonin P, Havlik RJ. Do calcium channel blockers increase the risk of cancer? *Am J Hypertens.* 1996;9:695-699.
 82. Epstein M. Calcium antagonists: still appropriate as first line antihypertensive agents. *Am J Hypertens.* 1996;9:110-121.
 83. Hamet P. Cancer and hypertension: an unresolved issue. *Hypertension.* 1996;28:321-324.
 84. Schiffrin EL, Deng LY, Larochelle P. Progressive improvement in the structure of resistance arteries of hypertensive patients after 2 years of treatment with an angiotensin I-converting enzyme inhibitor. Comparison with effects of a β -blocker. *Am J Hypertens.* 1995;8:229-236.
 85. 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;25:474-481.
 86. Schiffrin EL, Deng LY. Structure and function of resistance arteries of hypertensive patients treated with a beta blocker or a calcium channel antagonist. *J Hypertens.*
 87. Daemen MJAP, DeMey JGR. Regional heterogeneity of arterial structural changes. *Hypertension.* 1995;25:464-473.

Résumé d'article**ARTICLE #2**

Apoptosis during regression of cardiac hypertrophy in spontaneously hypertensive rats: temporal regulation and spatial heterogeneity.

par

Tea B.-S., Dam T.-V., Moreau P., Hamet P., deBlois D.

Nous avons précédemment rapporté qu'une augmentation de l'apoptose participe à la régression de l'hypertrophie aortique chez les rats spontanément hypertendus. Pour explorer davantage le rôle potentiel de l'apoptose dans la thérapie cardiovasculaire, nous avons examiné l'apoptose durant la régression de l'hypertrophie dans le coeur des rats spontanément hypertendus recevant les agents antihypertenseurs; énalapril (30 mg/kg/jour), losartan (35 mg/kg/jour), nifédipine (30 mg/kg/jour), hydralazine (40 mg/kg/jour), propranolol (50 mg/kg/jour), ou hydrochlorothiazide (75 mg/kg/jour) pendant 1 à 4 semaines, commençant à 10-11 semaines d'âge. La pression systolique et le rythme cardiaque ont été mesurés par la pléthysmographie caudale. Les marqueurs de l'apoptose incluent la fragmentation oligonucléosomale de l'ADN extrait du coeur ou dans des coupes histologiques *in situ* marquées avec la terminal déoxynucléotidyl transférase. La synthèse d'ADN cardiaque a été évaluée par l'incorporation de [³H]-thymidine *in vivo*. Tous les agents ont réduit de >20% la charge hémodynamique cardiaque, définie comme étant le produit de la pression systolique et le rythme cardiaque, à 4 semaines. Cependant, seulement la nifédipine, l'énalapril, le losartan, et le propranolol ont réduit la masse cardiaque (>19%) à l'intérieur de 4 semaines. La régression de l'hypertrophie cardiaque a été accompagnée par une augmentation de 50% à 300% dans la fragmentation d'ADN, une réduction de 30% dans le contenu en ADN cardiaque et une réduction de >20% de la synthèse d'ADN. L'induction de l'apoptose est rapide et transitoire à l'intérieur de 4 semaines de traitement à la nifédipine, à l'énalapril ou au losartan. Avec les agents qui ont provoqué une régression de l'hypertrophie cardiaque, l'augmentation de la fragmentation d'ADN a eu lieu principalement dans la région du sub-épicaarde. Ainsi, l'induction transitoire de l'apoptose dans le sub-épicaarde apparaît comme une caractéristique du coeur en régression en réponse à des agents antihypertenseurs chez le SHR.

Apoptosis During Regression of Cardiac Hypertrophy in Spontaneously Hypertensive Rats

Temporal Regulation and Spatial Heterogeneity

Bun-Seng Tea, Than-Vinh Dam, Pierre Moreau, Pavel Hamet, Denis deBlois

Abstract—We previously reported that increased apoptosis participates in the regression of aortic hypertrophy in spontaneously hypertensive rats. To further document the potential role of apoptosis in cardiovascular therapy, we examined apoptosis during regression of hypertrophy in the heart of spontaneously hypertensive rats receiving the antihypertensive drug enalapril (30 mg · kg⁻¹ · d⁻¹), losartan (30 mg · kg⁻¹ · d⁻¹), nifedipine (35 mg · kg⁻¹ · d⁻¹), hydralazine (40 mg · kg⁻¹ · d⁻¹), propranolol (50 mg · kg⁻¹ · d⁻¹), or hydrochlorothiazide (75 mg · kg⁻¹ · d⁻¹) for 1 to 4 weeks, starting at 10 to 11 weeks of age. Systolic blood pressure and heart rate were measured by the tail-cuff method. Markers of apoptosis included oligonucleosomal DNA fragmentation in extracted cardiac DNA or in situ in ventricular cross sections labeled with terminal deoxynucleotidyl transferase. Cardiac DNA synthesis was evaluated by [³H]-thymidine incorporation in vivo. All drugs reduced cardiac workload, defined as the product of blood pressure and heart rate, by >20% at 4 weeks. However, only nifedipine, enalapril, losartan, and propranolol reduced cardiac mass (>19%) within 4 weeks. Regression of cardiac hypertrophy was accompanied by a 50% to 300% increase in DNA fragmentation and a >20% reduction in DNA synthesis, resulting in a >20% reduction in cardiac DNA content after 4 weeks. Apoptosis induction occurred early and was transient within 4 weeks of nifedipine, enalapril, or losartan administration. With all regression-inducing drugs, the increase in DNA fragmentation occurred mainly in the subepicardium. Thus, transient induction of apoptosis in the subepicardium appears to be a characteristic feature of the early response to drug-induced regression of cardiac hypertrophy in spontaneously hypertensive rats. (*Hypertension*. 1999;34:229-235.)

Key Words: β -adrenergic antagonist ■ calcium channel blocker ■ AT₁ antagonist ■ ACE inhibitor

Although cardiac hypertrophy is an independent risk factor for cardiovascular morbidity and mortality, the mechanisms regulating cardiac mass remain poorly defined. Different classes of antihypertensive drugs are not equally effective at reducing left ventricular mass, suggesting a blood pressure-independent regulation.¹ Cardiac hypertrophy involves both cellular hyperplasia (mainly in nonmyocytes) and hypertrophy (mainly in myocytes).² A potential mechanism contributing to the suppression of cardiac hypertrophy is the gene-regulated process of physiological cell self-destruction called apoptosis.³ Cardiac apoptosis has been documented during normal neonatal maturation,^{4,5} aging,⁶ hypertension,⁷⁻¹⁰ ischemia, and failure.¹¹

The spontaneously hypertensive rat (SHR) is a model of genetically determined cardiac hypertrophy with increased cardiac mass and DNA content at birth,¹² further suggesting blood pressure-independent regulation. In this model, cardiac alterations evolve from concentric hypertrophy to dilated cardiomyopathy and heart failure.¹³ Results from our group

suggest that neonatal cardiac hypertrophy in SHRs might be due in part to an imbalance between cell growth and apoptosis favoring DNA accumulation.⁵ As the heart of untreated adult SHRs adapts to hypertension and progresses toward failure, cardiac internucleosomal DNA fragmentation (a hallmark of apoptosis) increases notably in cardiomyocytes.^{7,9,14} Regulation of the cell growth/cell death balance during antihypertensive therapy, particularly during the process of cardiac hypertrophy regression, is poorly understood. Diez et al⁹ and Fortuno et al¹⁰ recently reported that cardiomyocyte apoptosis is reduced after prolonged inhibition of the angiotensin pathway during the established phase of hypertension in SHRs. The same group also reported evidence suggesting increased susceptibility to apoptosis in coronary smooth muscle cells (SMCs) of SHRs that received long-term treatment with an angiotensin I-converting enzyme (ACE) inhibitor.¹⁵ These data are consistent with those in our previous report showing that the stimulation of SMC apoptosis precedes regression of aortic hypertrophy in SHRs.¹⁶ Thus, we

Received October 12, 1998; first decision November 9, 1998; revision accepted April 20, 1999.

From the University of Montreal Hospital (CHUM) Research Center, Departments of Pharmacology and Medicine and the Faculty of Pharmacy, University of Montreal, Quebec, Canada.

Correspondence to Denis deBlois, CHUM Research Center, 3840 St. Urbain St, Montreal, Quebec H2W 1T8, Canada. E-mail

© 1999 American Heart Association, Inc.

Hypertension is available at <http://www.hypertensionaha.org>

examined the balance between cell replication and apoptosis during the early phase of cardiac mass reduction in response to several of the major classes of antihypertensive drugs in SHR. To the best of our knowledge, the present study provides the first evidence that apoptosis is stimulated during the reversal of cardiac hypertrophy.

Methods

Animal Procedures

The majority of the 132 male SHR (Charles-River, St. Constant, Canada) included in the present study were used previously in another study to demonstrate increased apoptosis of aortic SMCs during regression of vascular hypertrophy in response to antihypertensive treatment.¹⁶ In brief, rats were treated for 1 to 4 weeks with the following drugs, starting at 10 to 11 weeks of age: nifedipine (35 mg · kg⁻¹ · d⁻¹; gift of Bayer, Toronto, Canada), enalapril (30 mg · kg⁻¹ · d⁻¹; gift of Merck-Frosst, Montreal, Canada), losartan (30 mg · kg⁻¹ · d⁻¹; gift of Merck-Frosst, Canada), propranolol (50 mg · kg⁻¹ · d⁻¹; Sigma Chemical Co, St. Louis, Mo), diuretic hydrochlorothiazide (75 mg · kg⁻¹ · d⁻¹; Sigma), and hydralazine (40 mg · kg⁻¹ · d⁻¹; Sigma). Systolic blood pressure and heart rate were determined weekly in all rats by the tail-cuff method.¹⁶ Cardiac workload was calculated as the product of blood pressure and heart rate.¹⁷ To evaluate DNA synthesis *in vivo*, rats were injected intraperitoneally with [methyl-³H]-thymidine (0.5 mCi · kg⁻¹) 17, 9, and 1 hour before killing. Rats were anesthetized with a single intramuscular injection of a mixture of ketamine (80 mg · kg⁻¹), xylazine (4 mg · kg⁻¹), and acepromazine (2 mg · kg⁻¹). Rats were killed by venous draining with retrograde perfusion of 200 mL of isotonic saline via the abdominal aorta. The whole heart was isolated and weighed, and equatorial 3-mm sections of both ventricles were fixed in 4% paraformaldehyde. The remaining cardiac tissue was immediately frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C until analysis. Animal handling protocols were approved by the Animal Care Committee of the University of Montreal Hospital Research Center.

DNA Analysis

Hearts were pulverized in liquid nitrogen with a mortar and pestle. Aliquots of frozen tissue powder were weighed, cardiac DNA was extracted by the phenol-chloroform method, and DNA content per milligram of tissue powder was calculated. Specific activity of extracted DNA aliquots (50 µg), indicative of DNA synthesis *in vivo*, were measured by liquid scintillation counting. Apoptosis was quantified by use of the oligonucleosomal DNA fragmentation index as previously described.¹⁶ In brief, the extracted cardiac DNA was labeled on free 3'OH ends with terminal deoxynucleotidyl transferase (TdT) and ³²P-dCTP. For each sample, different quantities (0.025 to 0.4 µg) of the TdT-labeled DNA were separated on 1.5% agarose gel, transferred onto Hybond N⁺ nylon membrane, and exposed to a ³²P-sensitive screen. A PhosphorImager was used to quantify the mean optical density per pixel in the region between 180 and 1500 bp for each lane. These results were divided by the corresponding value obtained with an internal standard in the gel (1-µg λDNA/HindIII fragments). For each tissue sample, the DNA fragmentation index (arbitrary units · µg⁻¹ DNA) was calculated as the slope of the optical density ratio versus the amount of cardiac DNA loaded. To localize the anatomic regions of the heart undergoing apoptosis, internucleosomal DNA fragments were detected in paraformaldehyde-fixed, paraffin-embedded cross sections of ventricles by *in situ* 3'OH end radiolabeling by use of TdT and [³²P]dCTP and a PhosphorImager system, as we described previously.^{7,8} Mean optical density per pixel was evaluated separately in the endocardial area (area scanned: 12 500 pixels) and subepicardial areas (area scanned: 7700 pixels) in a blindly selected subset of samples per group (n=5). To confirm that the TdT signal was associated with cell nuclei and to rule out a possible "edge effect," nonradioactive *in situ* 3'OH end labeling was performed with the TdT-mediated dUTP nick-end labeling (TUNEL) method with diaminobenzidine as a chromogen. Positive controls were treated with

DNase I to induce the formation of DNA strand breaks. In negative controls, TdT addition was omitted. Sections were counterstained with hematoxylin.

Statistics

Data were analyzed by analysis of variance and unpaired Student's *t* test with Bonferroni correction for multiple comparisons when appropriate. The DNA fragmentation index was analyzed with the nonparametric Kruskal-Wallis test followed by the nonparametric Mann-Whitney test because of unequal variance between the groups and because we have no evidence that the index is a normally distributed variable. Values are mean ± SEM, and *P* < 0.05 was considered statistically significant.

Results

Systemic and Hemodynamic Changes During Drug Therapy

Pretreatment values of body weight of all rats were 252 ± 2 g (n=132). Body weight gain was not affected by the treatments (not shown). All rats showed high systolic blood pressure before the beginning of treatment (174 ± 4 mm Hg; n=132) and at 4 weeks (220 ± 5 mm Hg; n=25). As previously reported,¹⁶ systolic pressure in these rats was reduced at 4 weeks with hydralazine (44% reduction), losartan (40% reduction), enalapril (44% reduction), and nifedipine (33% reduction), but pressure was unchanged with propranolol or hydrochlorothiazide when treated rats were compared with paired controls. Heart rate was not different between control and experimental groups before treatment (pretreatment values: 354 ± 10 bpm; n=132), and this parameter did not change in untreated animals over the course of the experiment. Heart rate was reduced significantly after 2 weeks with propranolol (16% reduction) and hydrochlorothiazide (13% reduction), after which time these values remained stable. Nifedipine increased heart rate at 2 weeks by 11%, after which time this value remained stable. Heart rate was not affected by losartan, enalapril, or hydralazine (not shown). Cardiac workload was not different between control and experimental groups before treatment (pretreatment values 61 ± 2 × 10³ mm Hg · bpm; n=132), and this parameter increased by 33% in untreated animals during the course of the experiment, mainly as a result of the increase in blood pressure. Although the drugs tested showed distinct effects on blood pressure and heart rate, all treatments reduced cardiac workload when treated rats were compared with controls at 4 weeks, eg. with losartan (42% reduction), enalapril (45% reduction), nifedipine (28% reduction), propranolol (35% reduction), hydralazine (40% reduction), and hydrochlorothiazide (38% reduction). All drugs reduced cardiac workload significantly as early as 1 week after the start of treatment except nifedipine, which reduced cardiac workload significantly by 4 weeks.

Effect of Drugs on Cardiac Hypertrophy and DNA Content

The effects of drug treatments that affected cardiac mass and growth parameters are summarized in Figure 1, where data are expressed as a percentage of control values from untreated animals and plotted as a function of time after initiation of therapy. Cardiac mass (heart to body weight ratio) was significantly reduced after 2 weeks of nifedipine and 4 weeks

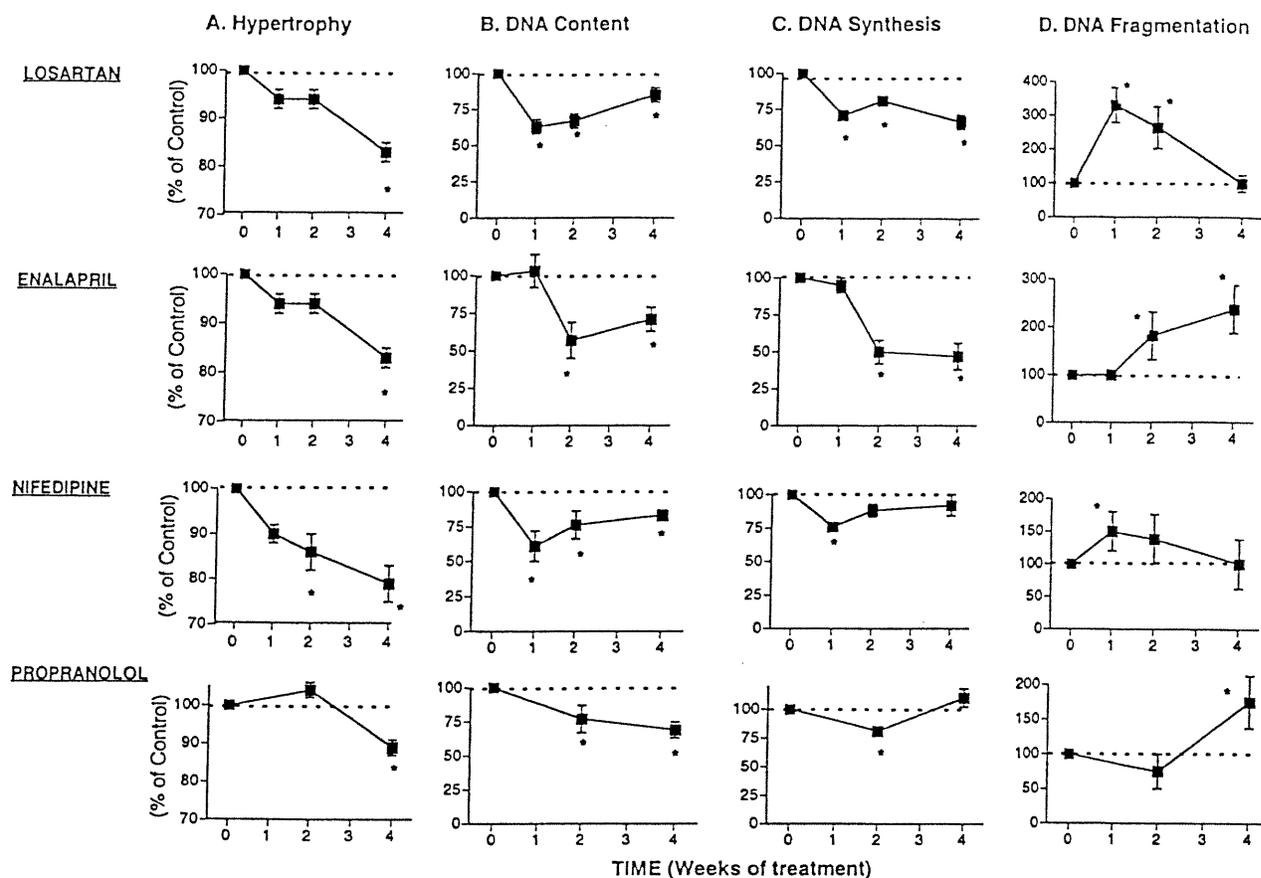


Figure 1. Changes in growth-related parameters in the heart of SHR rats receiving losartan, enalapril, nifedipine, or propranolol for 1 to 4 weeks: cardiac mass (A); cardiac DNA content (B); cardiac DNA specific activity, indicative of DNA synthesis in vivo (C); and internucleosomal DNA fragmentation index, indicative of apoptosis (D). Data are expressed as a percentage of the corresponding control values in age-matched, untreated rats and are plotted as a function of time after initiation of drug therapy. *Significant difference ($P < 0.05$) between experimental and paired control groups.

of losartan, enalapril, or propranolol (Figure 1A). In untreated animals, cardiac mass did not increase significantly between 1 week ($5.2 \pm 0.4 \times 10^{-3}$; $n=10$) and 4 weeks ($5.3 \pm 0.1 \times 10^{-3}$; $n=25$), suggesting a regression rather than a prevention of cardiac hypertrophy with the treatments. Cardiac mass was not affected after 4 weeks of treatment with hydralazine ($4.8 \pm 0.1 \times 10^{-3}$; $n=6$) or hydrochlorothiazide ($5.1 \pm 0.2 \times 10^{-3}$; $n=6$). To further analyze cardiac growth, the total cardiac DNA content normalized for body weight was evaluated (Figure 1B). Cardiac DNA content ($\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ body weight) was not affected after 4 weeks of treatment with hydralazine (5.4 ± 0.3 ; $n=6$) or hydrochlorothiazide (4.0 ± 1.0 ; $n=6$) in treated rats as compared with controls (4.8 ± 0.2 ; $n=25$). In contrast, cardiac DNA content was significantly reduced at 1 week with losartan or nifedipine and at 2 weeks with enalapril or propranolol. In summary, regression of cardiac hypertrophy was associated with a reduction in cardiac DNA content.

Effect of Drugs on DNA Synthesis and Degradation

Within 24 hours before they were killed, all rats were injected with [^3H]-thymidine to evaluate DNA replication in vivo. The specific activity of whole-heart homogenates ($\text{cpm} \cdot 100 \text{ mg}^{-1}$ tissue) was similar in controls at 1 to 4 weeks (eg, at 1 week:

218 ± 9 ; $n=10$), and this parameter was not affected by treatment (eg, with losartan at 1 week: 222 ± 41 ; $n=5$), suggesting similar cardiac uptake of [^3H]-thymidine. In contrast to cardiac homogenate, however, cardiac DNA showed a decrease in specific activity ($\text{cpm} \cdot 100 \mu\text{g}^{-1}$ DNA) with drug treatment, suggesting an inhibition of cardiac DNA synthesis (Figure 1C). Cardiac DNA synthesis was reduced significantly with losartan (beginning at 1 week) and enalapril (beginning at 2 weeks) and was reduced transiently with nifedipine (at 1 week) and propranolol (at 2 weeks). In contrast, DNA synthesis was not affected by hydralazine (851 ± 41 ; $n=6$) or hydrochlorothiazide (759 ± 50 ; $n=5$) in treated rats as compared with controls at 4 weeks (757 ± 72 ; $n=25$). In controls, DNA synthesis was not different between 1 and 4 weeks (not shown). Autoradiography showed small numbers of [^3H]-thymidine-positive cells with no specific localization in the ventricular wall (not shown). In summary, cardiac regression was associated with a reduction in cardiac DNA synthesis.

We tested the hypothesis that apoptosis contributed to the reduction in cardiac DNA content. Oligonucleosomal DNA fragmentation was similar in controls at 1 to 4 weeks (eg, at 1 week: 1.0 ± 0.1 arbitrary units $\cdot \mu\text{g}^{-1}$ DNA; $n=10$). However, DNA fragmentation was increased as early as 1 week with nifedipine or losartan (Figure 1D). Enalapril and pro-

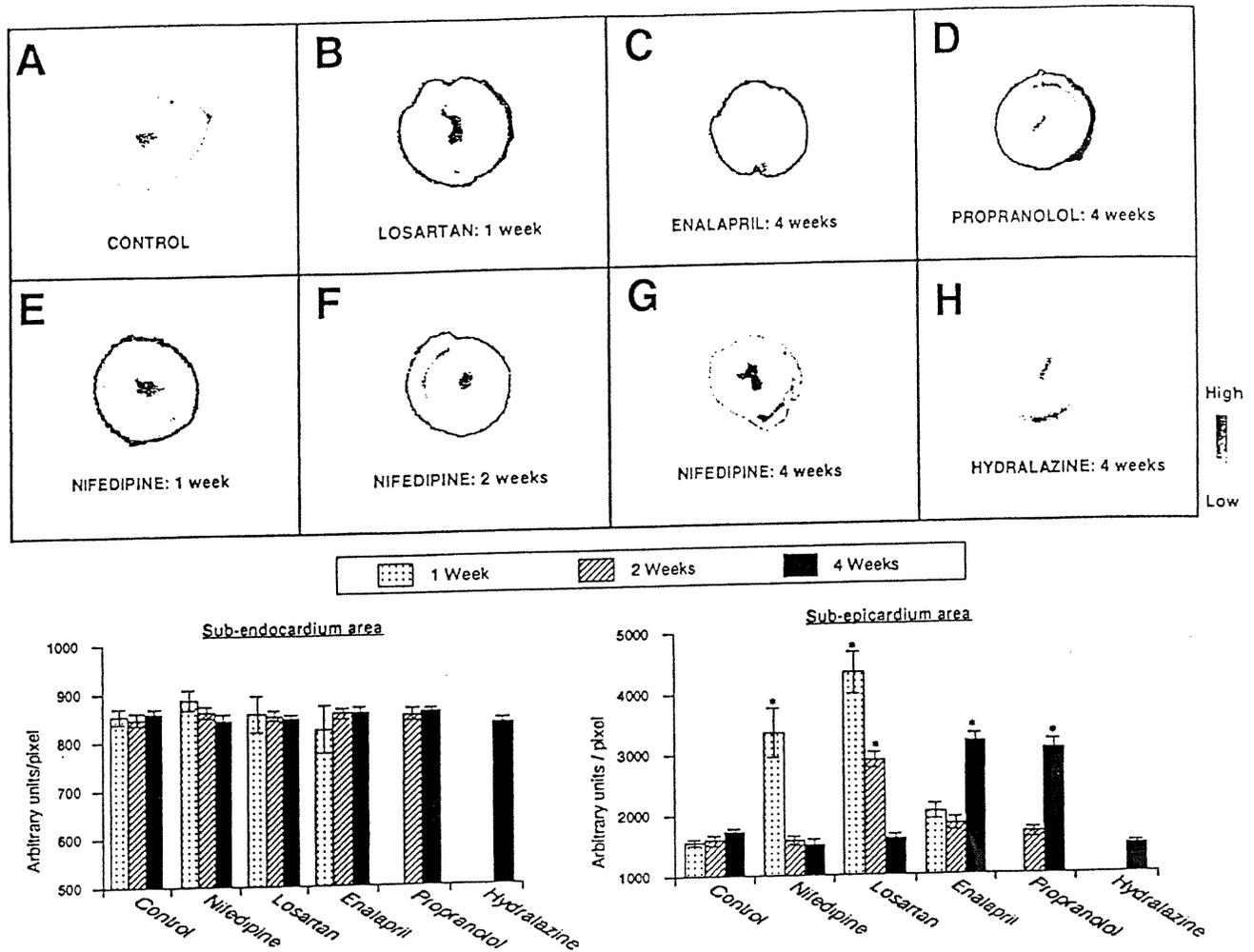


Figure 2. Detection of internucleosomal DNA fragments in situ in ventricular cross sections of hearts from control SHR (A) and SHR treated with losartan for 1 week (B) and enalapril (C) or propranolol (D) for 4 weeks. These specimens were isolated at the peak of DNA fragmentation, as measured by gel electrophoresis. E–G, Full time course of changes in cardiac DNA fragmentation is shown for nifedipine. H, A specimen from hydralazine-treated SHR, which showed no apoptosis or regression, is shown for comparison. The lower panels show bar graph representations of internucleosomal DNA fragments in the subendocardium (left) and subepicardium (right) areas in hearts from treated and untreated SHR. Note that no data are presented for propranolol at 1 week and hydralazine at 1 and 2 weeks. The drug-induced increase in DNA fragmentation during regression of cardiac hypertrophy occurred predominantly in the sub-epicardium. *Significant difference ($P < 0.05$) between experimental and paired control groups.

pranolol stimulated DNA fragmentation at 2 and 4 weeks, respectively. In contrast, DNA fragmentation was not affected at 4 weeks with hydralazine (0.6 ± 0.2 ; $n=6$) or hydrochlorothiazide (0.5 ± 0.1 ; $n=5$) in treated rats as compared with controls (0.8 ± 0.2 ; $n=25$). Thus, the regression of cardiac hypertrophy was associated with increased apoptotic activity.

The anatomic distribution of cells undergoing apoptosis is presented in Figure 2A to 2H, which shows the density of radiolabeled DNA fragments across the ventricular wall in hearts from rats given placebo or treatment, as detected with a PhosphorImager. The time points selected for losartan, enalapril, and propranolol (in Figure 2B to 2D) correspond to the peak increase in internucleosomal fragmentation observed in the DNA extracted from the whole heart (Figure 1D). Bar graphs in the lower panels of Figure 2 show the mean density of radiolabeled DNA fragments as quantified separately in the epicardial and endocardial areas. In control hearts, the

epicardial and endocardial areas showed higher DNA fragmentation in both ventricles (Figure 2A). In hearts undergoing regression, however, the main increase in DNA fragmentation appeared in the area of the epicardium in both ventricles (Figures 2B to 2E). In contrast, there was no change in signal in hearts from rats treated for 4 weeks with hydralazine (Figure 2H) or hydrochlorothiazide (not shown). The time-dependent changes in situ DNA fragmentation are shown for nifedipine in Figures 2E to 2G. The use of the nonradioactive digoxigenin-based TUNEL method confirmed the nuclear localization of the labeling signal in the subepicardial and subendocardial areas (not shown). Few, if any, TUNEL-positive cells were found to be associated with vascular structures at the time points examined. Levels of DNA fragmentation in the whole heart (Figure 1D) correlated significantly with DNA fragmentation in the epicardial area ($P < 0.001$; $r=0.8$) but not the endocardial area. Thus, regression of cardiac hypertrophy was associated with apoptosis in the subepicardial area.

Discussion

The significant new finding of the present study is that, regardless of the class of antihypertensive drug administered to SHR, those drugs able to induce cardiac hypertrophy regression were also found to induce a localized increase in apoptosis in the subepicardium. Drugs active in this regard included a calcium channel blocker, an ACE inhibitor, an AT₁ receptor antagonist, and a β -adrenoreceptor antagonist. Evidence of apoptosis includes a rapid increase in cardiac DNA fragmentation coupled with a reduction in cardiac DNA content within 4 weeks of therapy.

The induction of apoptosis was transient, a feature most evident with nifedipine. Losartan and enalapril did not cause a steady decline in cardiac DNA content after the initial burst of DNA fragmentation and drop in DNA content, also suggesting temporary activation of apoptosis around 1 week. The more sustained elevation of the DNA fragmentation index may reflect the persistence of DNA fragments in the cardiac tissue beyond the early period of active apoptosis. Transient episodes of apoptosis induction were previously observed during normal, pathological, or therapy-induced cardiovascular remodeling,^{8,11,16,18} a phenomenon we referred to as "time window of apoptosis."¹⁸ For instance, we reported that regression of aortic hypertrophy in SHR is accompanied by a time window in SMC apoptosis in response to losartan or nifedipine, with a peak increase within 1 week of treatment.¹⁶ With enalapril, apoptosis in the aorta is slower to develop, with the highest levels reached after 2 weeks. In the present study, the induction of cardiac apoptosis followed a similar time course during regression of hypertrophy with these 3 drugs. The faster onset of apoptosis activation with losartan versus enalapril may implicate the activation of AT₂ receptors for angiotensin II in animals treated with an AT₁ antagonist but not an ACE inhibitor.¹⁹ It is noteworthy that propranolol increased cardiac apoptosis in SHR, considering our previous observation that the β -blocker does not affect aortic apoptosis within 4 weeks in the same animals.¹⁶ Thus, these results strongly suggest that apoptosis is regulated in a time- and organ-specific manner by cardiovascular drugs *in vivo*.

With losartan or propranolol, the suppression of cardiac DNA synthesis was dissociated in time from the induction of apoptosis. With losartan, there was a sustained inhibition of DNA synthesis over 4 weeks, whereas the DNA fragmentation index was transiently increased at 1 and 2 weeks only. With propranolol, DNA synthesis was decreased transiently at 2 weeks and DNA fragmentation was increased at 4 weeks only. Together, these data suggest that cardiac DNA content is determined by a dynamic balance between DNA synthesis and degradation and that these 2 parameters may be regulated independently in the heart during drug treatment.

Cardiac workload was reduced by all drugs tested, including hydralazine and hydrochlorothiazide. The latter drugs, however, did not affect cardiac mass, growth, or apoptosis within 4 weeks even though hydralazine showed a potent antihypertensive effect. Large doses of β -blockers and diuretics, such as in the present study, are known to be poorly effective in reversing hypertension in SHR.^{20,21} We cannot rule out a possible effect of these drugs on cardiac apoptosis

with an earlier or more prolonged schedule of drug administration. In contrast, losartan and nifedipine stimulated apoptosis at 1 week, before blood pressure was significantly reduced. With enalapril, apoptosis was stimulated at 2 weeks, ie, after blood pressure was significantly reduced (at 1 week). Although nifedipine did not reduce blood pressure as much as enalapril or losartan, these 3 drugs were equipotent in reducing cardiac mass and DNA content at 4 weeks. Together, these results suggest that the trophic changes in the heart were not secondary to hemodynamic changes. We previously reached similar conclusions in our study of SMC apoptosis in the SHR aorta undergoing regression.¹⁶ Although it is conceivable that the antihypertensive response to therapy was underestimated because of the stress induced in rats during immobilization for blood pressure measurements by the tail-cuff method, the results with hydralazine clearly demonstrate that cardiac growth and apoptosis can be fully dissociated from blood pressure regulation.

Studies are under way in our laboratory to determine the relative importance of myocyte and nonmyocyte apoptosis in the present model of cardiac regression. It is tempting to speculate that apoptosis occurred preferentially in noncardiomyocytes, notably fibroblasts, during the early phase of cardiac regression. Fibrosis is an important factor in the decreased distensibility, causing impairment of cardiac performance during left ventricular hypertrophy. Angiotensin II and catecholamines stimulate fibroblast hyperplasia, and blockade of these pathways *in vivo* suppresses cardiac fibrosis.²² In contrast, previous studies showed that the number of cardiomyocytes is not reduced after cardiac regression in response to long-term treatment with ACE inhibitors,²³ calcium channel blockers,²⁴ or β -blockers,²⁵ suggesting that these treatments do not stimulate apoptosis predominantly in cardiomyocytes. Moreover, these treatments improve cardiac function and reduce cardiovascular mortality.^{26,27} ACE inhibition suppresses cardiomyocyte apoptosis in the hypertrophic heart of SHR^{9,10,14} and dogs.²⁸ In contrast, angiotensin II acting via AT₁ receptors and β -adrenergic agonists stimulate cardiomyocyte apoptosis *in vivo* and *in vitro*.²⁹⁻³² At this point, however, the possibility of increased cardiomyocyte apoptosis during the early phase of cardiac regression cannot be totally excluded. Panizo-Santos et al³³ reported that administration of quinapril decreased the percentage of tetraploid cardiomyocytes in SHR, suggesting that either nuclear division or apoptosis was induced in polyploid cardiomyocytes. Thus, evaluation of the global myocardial response will likely be complex, in part because of the time-dependent and cell-specific apoptotic responses.

A striking feature of apoptosis during cardiac regression is its specific localization in the subepicardium, suggesting heterogeneity in cardiac cell phenotype or local environment across the ventricular wall. Several studies have documented a negative transmural gradient in the percentage of myocardial shortening and strain from the subendocardium to the subepicardium.³⁴ Heterogeneity in cardiomyocyte phenotype is also well documented. Subepicardial and subendocardial cardiomyocytes differ in terms of intracellular free ion concentrations,^{35,36} kinetics of ion channel activity,³⁷⁻⁴⁰ and receptor expression.⁴¹ Lukas and Antzelevitch³⁷ reported that

in vivo differences in repolarization rates between epicardial and endocardial cardiomyocytes are maintained in vitro, further supporting the hypothesis of phenotypical heterogeneity in these cells. Fortuno et al¹⁰ recently reported a heterogeneous distribution of cardiomyocyte apoptosis in hearts of 16-week-old SHR, with the highest levels in the subendocardium and mesocardium. Losartan reduced subendocardial and mesocardial apoptosis without affecting subepicardial apoptosis measured after 14 weeks of treatment.¹⁰ The specific induction of apoptosis in the subepicardium in the present study is in contrast to the typically diffuse distribution of apoptosis in adult hearts during pathological remodeling in response to a metabolic, hemodynamic, or immune insult.⁴² Previous studies in the ischemic rat heart suggested that ventricular function is more resistant to myocyte cell loss if it is localized rather than diffuse.^{43,44} Whether phenotypic heterogeneity exists in cardiac fibroblasts is currently unknown. Additional studies are needed to determine the mechanisms underlying the heterogeneous distribution of apoptotic cells in the heart undergoing rapid regression in response to antihypertensive therapy. It is possible that apoptosis in subepicardial cells during therapy-induced regression of hypertrophy may help preserve cardiac function by decreasing ventricular wall thickness without increasing ventricular cavity. Indeed, an increase in ventricular cavity would tend to increase wall stress and precipitate ventricular dysfunction.²

In summary, we provide evidence that apoptosis is induced in the subepicardium of the hearts of SHR during the first 4 weeks of antihypertensive drug therapy, regardless of the class of drug able to induce regression of cardiac hypertrophy and independently of blood pressure reduction. In contrast to the time window of apoptosis, there was a sustained reduction in cardiac mass, DNA content, and DNA synthesis. These results reinforce the suggestion that apoptosis is a potential therapeutic target in controlling, and perhaps initiating, cardiovascular remodeling. Caution should be exercised, however, when translating the present findings to the human population that receives long-term treatment with antihypertensive medication.

Acknowledgments

This work was supported by grants from the Medical Research Council of Canada (MT-10803) and Bayer Canada. B.-S. Tea holds a studentship from the Medical Research Council of Canada. D. deBlois and P. Moreau are scholars from the Fonds de la Recherche en Santé du Québec. We thank Drs Johanne Tremblay and Charles E. Murray for fruitful discussions.

References

- Agabiti-Rosei E. Evaluation of the cardiac effects of antihypertensive agents. *J Cardiovasc Pharmacol*. 1994;23(suppl 5):S42-S48.
- Walsh RA, Dorn GW II. Growth and hypertrophy of the heart and blood vessels. In: Alexander RW, Schlant RC, Fuster V, eds. *The Heart*. New York, NY: McGraw-Hill; 1998:155-168.
- Thompson GB. Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. *Science*. 1995;267:1456-1462.
- Kajstura J, Mansukhani M, Cheng W, Reiss K, Krajewski S, Reed JC, Quaini F, Sonnenblick EH, Anversa P. Programmed cell death and expression of the protooncogene *bcl-2* in myocytes during postnatal maturation of the heart. *Exp Cell Res*. 1995;219:110-121.
- Moreau P, Tea BS, Dam TV, Hamet P. Altered balance between cell replication and apoptosis in hearts and kidneys of newborn SHR. *Hypertension*. 1997;30:720-724.
- Kajstura J, Cheng W, Sarangarajan R, Li P, Li B, Nitahara JA, Chappnick S, Reiss K, Olivetti G, Anversa P. Necrotic and apoptotic myocyte cell death in the aging heart of Fischer 344 rats. *Am J Physiol*. 1996;271:H1215-H1228.
- Hamet P, Richard L, Dam T-V, Teiger E, Orlov SN, Gaboury L, Gossard F, Tremblay J. Apoptosis in target organs of hypertension. *Hypertension*. 1995;26:642-648.
- Teiger E, Dam TV, Richard L, Wisniewsky C, Tea BS, Gaboury L, Tremblay J, Schwartz K, Hamet P. Apoptosis in pressure overload-induced heart hypertrophy in the rat. *J Clin Invest*. 1996;97:2891-2897.
- Diez J, Panizo A, Hernandez M, Vega F, Sola I, Fortuno MA, Pardo J. Cardiomyocyte apoptosis and cardiac angiotensin-converting enzyme in spontaneously hypertensive rats. *Hypertension*. 1997;30:1029-1034.
- Fortuno MA, Ravassa S, Etayo JC, Diez J. Overexpression of Bax protein and enhanced apoptosis in the left ventricle of spontaneously hypertensive rats: effects of AT₁ blockade with losartan. *Hypertension*. 1998;32:280-286.
- Anversa P, Kajstura J, Olivetti G. Myocyte death in heart failure. *Curr Opin Cardiol*. 1996;11:245-251. Review.
- Walter SV, Hamet P. Enhanced DNA synthesis in heart and kidney of newborn spontaneously hypertensive rats. *Hypertension*. 1986;8:520-525.
- Bing OH, Brooks WW, Robinson KG, Slawsky MT, Hayes JA, Litwin SE, Sen S, Conrad CH. The spontaneously hypertensive rat as a model of the transition from compensated left ventricular hypertrophy to failure. *Mol Cell Cardiol*. 1995;27:383-396.
- Li Z, Bing OH, Long X, Robinson KG, Lakatta EG. Increased cardiomyocyte apoptosis during the transition to heart failure in the spontaneously hypertensive rat. *Am J Physiol*. 1997;272:H2313-H2319.
- Diez J, Panizo A, Hernandez M, Pardo J. Is the regulation of apoptosis altered in smooth muscle cells of adult spontaneously hypertensive rats? *Hypertension*. 1997;29:776-780.
- deBlois D, Tea B-S, Dam T-V, Tremblay J, Hamet P. Smooth muscle cell apoptosis during vascular regression in spontaneously hypertensive rats. *Hypertension*. 1997;29:340-349.
- Ostman-Smith I. Reduction by oral propranolol treatment of left ventricular hypertrophy secondary to pressure-overload in the rat. *Br J Pharmacol*. 1995;116:2703-2709.
- Hamet P, Moreau P, Dam T-V, Orlov SN, Tea B-S, deBlois D, Tremblay J. The time window of apoptosis: a new component in the therapeutic strategy for cardiovascular remodeling. *J Hypertens*. 1996;14(suppl 5):S65-S70.
- Tea B-S, Der Sarkissian S, Hamet P, deBlois D. Apoptotic and anti-proliferative role of angiotensin II receptor subtype 2 in vascular smooth muscle cells of spontaneously hypertensive rats. *Hypertension*. 1998;32:600. Abstract.
- Igawa T, Ikeno K, Watanabe K, Kimura Y. Dose-related inhibitor effects of the beta-adrenoceptor blocking drug carteolol and propranolol on cardiac hypertrophy in spontaneously hypertensive rats. *Eur J Pharmacol*. 1984;104(1-2):93-99.
- Kobayashi H, Sano T, Tarazi RC, Fouad-Tarazi FM. Effects of antihypertensive drugs on heart and resistance vessels. *Cardiovasc Res*. 1990;24:137-143.
- Booz GW, Baker KM. Molecular signalling mechanisms controlling growth and function of cardiac fibroblasts. *Cardiovasc Res*. 1995;30:537-543. Review.
- Beinlich CJ, Rissinger CJ, Morgan HE. Mechanisms of rapid growth in the neonatal pig heart. *J Mol Cell Cardiol*. 1995;27:273-281.
- Campbell SE, Turek Z, Rakusan K, Kazda S. Cardiac structural remodeling after treatment of spontaneously hypertensive rats with nifedipine or nisoldipine. *Cardiovasc Res*. 1993;27:1350-1358.
- Gerdes AM, Moore JA, Hines JM. Regional changes in myocyte size and number in propranolol-treated hyperthyroid rats. *Lab Invest*. 1987;57:708-713.
- Lejemtel TH, Sonnenblick EH, Frishman WH. Diagnosis and management of heart failure. In: Alexander RW, Schlant RC, Fuster V, eds. *The Heart*. New York, NY: McGraw-Hill; 1998:745-781.
- Gong L, Zhang W, Zhu Y, Zhu J, Kong D, Page V, Ghadirian P, LeLori J, Hamet P. Shanghai trial of nifedipine in the elderly (STONE). *J Hypertens*. 1996;14:1237-1245.

28. Goussev A, Sharov VG, Shimoyama H, Tanimura M, Lesch M, Goldstein S, Sabbah HN. Effects of ACE inhibition on cardiomyocyte apoptosis in dogs with heart failure. *Am J Physiol*. 1998;275:H626-H631.
29. Kajstura J, Cigola E, Malhotra A, Li P, Cheng W, Meggs LG, Anversa P. Angiotensin II induces apoptosis of adult ventricular myocytes in vitro. *J Mol Cell Cardiol*. 1997;29:859-870.
30. Communal C, Singh K, Pimentel DR, Colucci WS. Norepinephrine stimulates apoptosis in adult rat ventricular myocytes by activation of the beta-adrenergic pathway. *Circulation*. 1998;98:1329-1334.
31. Shizukuda Y, Buttrick PM, Geenen DL, Borczuk AC, Kitsis RN, Sonnenblick EH. Beta-adrenergic stimulation causes cardiocyte apoptosis: influence of tachycardia and hypertrophy. *Am J Physiol*. 1998;275:H961-H968.
32. Pierzchalski P, Reiss K, Cheng W, Cirielli C, Kajstura J, Nitahara JA, Rizk M, Capogrossi MC, Anversa P. p53 Induces myocyte apoptosis via the activation of the renin-angiotensin system. *Exp Cell Res*. 1997;234:57-65.
33. Panizo-Santos A, Sola JJ, Pardo-Mindan FJ, Hernandez M, Cenarruzabeitia E, Diez J. Angiotensin converting enzyme inhibition prevents polyploidization of cardiomyocytes in spontaneously hypertensive rats with left ventricular hypertrophy. *J Pathol*. 1995;177:431-437.
34. Palmon LC, Reichek N, Yeon SB, Clark NR, Brownson D, Hoffman E, Axel L. Intramural myocardial shortening in hypertensive left ventricular hypertrophy with normal pump function. *Circulation*. 1994;89:122-131.
35. Cook SJ, Chamunorwa JP, Lancaster MK, O'Neill SC. Regional differences in the regulation of intracellular sodium and in action potential configuration in rabbit left ventricle. *Pflugers Arch*. 1997;433:515-522.
36. Figueredo VM, Brandes R, Weiner MW, Massie BM, Camacho SA. Endocardial versus epicardial differences of intracellular free calcium under normal and ischemic conditions in perfused rat hearts. *Circ Res*. 1993;72:1082-1090.
37. Lukas A, Antzelevitch C. Differences in the electrophysiological response of canine ventricular epicardium and endocardium to ischemia: role of the transient outward current. *Circulation*. 1993;88:2903-2915.
38. Miyoshi S, Miyazaki T, Moritani K, Ogawa S. Different responses of epicardium and endocardium to KATP channel modulators during regional ischemia. *Am J Physiol*. 1996;271:H140-H147.
39. Yang ZK, Boyett MR, Janvier NC, McMorn SO, Shui Z, Karim F. Regional differences in the negative inotropic effect of acetylcholine within the canine ventricle. *J Physiol (Lond)*. 1996;492:789-806.
40. Clark RB, Bouchard RA, Salinas-Stefanon E, Sanchez-Chapula J, Giles WR. Heterogeneity of action potential waveforms and potassium currents in rat ventricle. *Cardiovasc Res*. 1993;27:1795-1799.
41. Beau SL, Tolley TK, Saffitz JE. Heterogeneous transmural distribution of beta-adrenergic receptor subtypes in failing human hearts. *Circulation*. 1993;88:2501-2509.
42. Anversa P, Olivetti G, Leri A, Liu Y, Kajstura J. Myocyte cell death and ventricular remodeling. *Curr Opin Nephrol Hypertens*. 1997;6:169-176. Review; see comments.
43. Olivetti G, Capasso JM, Meggs LG, Sonnenblick EH, Anversa P. Cellular basis of chronic ventricular remodeling after myocardial infarction in rats. *Circ Res*. 1991;68:856-869.
44. Anversa P, Zhang X, Li P, Capasso JM. Chronic coronary artery constriction leads to moderate myocyte loss and left ventricular dysfunction and failure in rats. *J Clin Invest*. 1992;89:618-629.

Résumé d'article**ARTICLE #3**

Apoptosis during regression of renal mass in spontaneously hypertensive rats.

par

Tea B.-S., Hamet P., deBlois D.

Nous avons précédemment rapporté qu'une augmentation de l'apoptose participe à la régression de l'hypertrophie aortique chez les rats spontanément hypertendus (SHR). Pour explorer davantage le rôle potentiel de l'apoptose dans la pharmacothérapie cardiovasculaire, nous examinons dans cette étude la régulation de l'apoptose dans la régression de la masse rénale de rats SHR âgés de 10-11 semaines, recevant l'énalapril (30 mg/kg/jour), le losartan (30 mg/kg/jour), la nifédipine (35 mg/kg/jour), l'hydralazine (40 mg/kg/jour), le propranolol (50 mg/kg/jour), ou l'hydrochlorothiazide (75 mg/kg/jour) pendant 1 à 4 semaines. La pression systolique et le rythme cardiaque ont été mesurés par pléthysmographie. Les marqueurs d'apoptose incluaient la fragmentation internucléosomale d'ADN du rein ou par marquage *in situ* des sections de reins avec la terminal déoxynucléotidyl transférase. La synthèse d'ADN rénale a été évaluée par l'incorporation de [³H]-thymidine, *in vivo*. Tous les médicaments ont réduit le travail cardiaque, défini comme étant le produit de la pression artérielle et le rythme cardiaque, de >20% après 4 semaines. Cependant, seulement l'énalapril, le losartan et l'hydrochlorothiazide ont réduit la masse rénale (>19%) après 4 semaines de traitement. La régression de la masse rénale était accompagnée d'une augmentation de la fragmentation d'ADN de 60% à 140% et d'une réduction de >14% de la synthèse d'ADN. Ceci résultait en une diminution de >20% du contenu d'ADN rénal après 4 semaines de traitement. L'induction de l'apoptose se produisait de façon précoce et a été transitoire au cours des 4 semaines de traitement à l'énalapril ou au losartan. L'augmentation de la fragmentation d'ADN était localisée principalement dans le cortex rénal pour les médicaments qui induisaient la régression de la masse rénale. Ainsi, l'induction transitoire de l'apoptose dans le cortex semble être une caractéristique spécifique de la régression de la masse rénale en réponse aux inhibiteurs de l'angiotensine II et aux diurétiques.

**APOPTOSIS DURING REGRESSION OF RENAL MASS
IN SPONTANEOUSLY HYPERTENSIVE RATS**

Bun-Seng Tea, Pavel Hamet and Denis deBlois¹

Short title: Tea et al – Apoptosis during renal mass regression

Keywords: apoptosis, angiotensin II, diuretic, hypertension.

Departments of Pharmacology and Medicine, University of Montreal

Laboratory of Pharmacology of Vascular Pathologies,

and Laboratory of Molecular Pathophysiology

University of Montreal Hospital Research Center (CHUM)

Hôtel-Dieu Pavilion

3850 St. Urbain St., Montréal, Québec H2W 1T8, Canada

Tel. [REDACTED], Fax: (514) 843-2911

e-mail: [REDACTED]

¹Author for correspondence

ABSTRACT

We previously reported that increased apoptosis participates in the regression of aortic and cardiac hypertrophy in spontaneously hypertensive rats. To further document the potential role of apoptosis in cardiovascular therapy, we now examined apoptosis during regression of kidney mass of spontaneously hypertensive rats receiving the antihypertensive drug enalapril (30 mg/kg/day), losartan (30 mg/kg/day), nifedipine (35 mg/kg/day), hydralazine (40 mg/kg/day), propranolol (50 mg/kg/day), or hydrochlorothiazide (75 mg/kg/day) for 1 to 4 weeks, starting at 10-11 weeks of age. Systolic blood pressure were measured by the tail-cuff method. Markers of apoptosis included oligonucleosomal DNA fragmentation in extracted kidney DNA or *in situ* in kidney cross-sections labeled with terminal deoxynucleotidyl transferase. Kidney DNA synthesis was evaluated by [³H]-thymidine incorporation *in vivo*. Systolic blood pressure was significantly reduced after 4 weeks of treatment by >42% with losartan, enalapril and hydralazine, and by 23% with nifedipine versus control values of 220±5 mmHg. However, only enalapril, losartan, and hydrochlorothiazide reduced kidney mass (>19%) after 4 weeks of treatment. Regression of kidney mass was accompanied by a 60% to 140% increase in DNA fragmentation and a >14% reduction in DNA synthesis. As a result, a >20% reduction in renal DNA content was observed after 4 weeks. Apoptosis induction occurred early and was transient within 4 weeks of enalapril or losartan administration. With all regression-inducing drugs, the increase in DNA fragmentation occurred mainly in the cortex. Thus, transient induction of apoptosis in the cortex appears to be a characteristic feature of the early response to drug-induced regression of kidney mass in SHR.

INTRODUCTION

Although the causes of essential hypertension vary, it has been postulated that the kidney may be primarily involved (de Wardener, 1990a; de Wardener, 1990b; Guyton et al., 1972). This view is supported by reports demonstrating that essential hypertension was permanently cured by nephrectomy and transplantation of a kidney from a normotensive donor in humans (Curtis et al., 1983; Guidi et al., 1985). The kidney and high blood pressure are closely related (Cowley and Roman, 1996). In the Spontaneously Hypertensive Rat (SHR) model, an increasing body of evidence supports the critical role of the kidneys in the pathogenesis of hypertension. Thus, it has been shown that high blood pressure can be transferred together with transplantation of the SHR kidney, and that parameters of renal hemodynamics co-segregate with blood pressure in the F2 generation (Harrap and Doyle, 1988; Rettig et al., 1990a; Uber and Rettig, 1996). Furthermore, it has been demonstrated that in F2 hybrids derived from a cross of SHR and WKY (Wistar Kyoto rat) strains, the reduced diameter of the renal afferent arteriole at the age of seven weeks is associated with increased blood pressure at the age of 23 weeks (Norrelund et al., 1994). It is well known that adult relative kidney weights as well as adult blood pressure are higher in SHR than in BN (Brown-Norway) rats. Our group has demonstrated a kidney enlargement in newborn SHR when compared to WKY (Moreau et al., 1997; Walter and Hamet, 1986). Recently, we suggested that higher kidney weight in newborn rats might predict higher kidney weight and higher blood pressure in adult rats (Hamet et al., 1998).

Different classes of antihypertensive drugs are not equally effective at reducing cardiovascular mass, suggesting a blood pressure independent regulation. A potential mechanism contributing to the suppression of the increased cardiovascular mass in hypertension is the gene-regulated process of physiological cell self-destruction called apoptosis. The occurrence of apoptosis in the kidney has been documented in a number of conditions including during neonatal development (Moreau et al., 1997), hypertension (Hamet et al., 1995), ischemia (Gobe et al., 1990) and polycystic disease (Woo, 1995). Recently, we reported that increased DNA synthesis and decreased apoptosis might favor renal hyperplasia in newborn SHR kidneys (Moreau et al., 1997). The regulation of the cell growth – cell death balance during antihypertensive therapy, and particularly during the process of mass regression, is

poorly understood. Thus, we now examined the balance between cell replication and apoptosis during the early phase of renal mass reduction in response to several of the major classes of antihypertensive drugs in SHR. To our knowledge, the present study provides the first evidence that apoptosis is stimulated during the reversal of kidney mass. Modulation of renal apoptosis through pharmacological means could serve as a therapeutic modality in the future.

METHODS

Animal procedures

Male SHR (Charles-River, Que) included in the present study were previously used to demonstrate increased apoptosis during regression of aortic and cardiac hypertrophy in response to antihypertensive treatment (deBlois et al., 1997; Tea et al., 1999). Briefly, rats were treated for 1 to 4 weeks with the following drugs starting at 10-11 weeks of age: nifedipine (35 mg/kg/day; gift of Bayer, Canada); enalapril (30mg/kg/day; gift of Merck-Frosst, Canada); losartan (30 mg/kg/day; gift of Merck-Frosst, Canada); propranolol (50 mg/kg/day; Sigma, MO) diuretic hydrochlorothiazide (75 mg/kg/day; Sigma, NO) and hydralazine (40 mg/kg/day; Sigma, NO). Weekly determination of systolic blood pressure was obtained in all rats by the tail cuff method (deBlois et al., 1997; Tea et al., 1999). To evaluate DNA synthesis *in vivo*, rats were injected IP with [methyl-³H]-thymidine (0.5 mCi/kg, New England Nuclear) at 17, 9, and 1 hours before sacrifice. Anesthetized rats were killed by perfusion of 200 mL isotonic saline via the abdominal aorta and draining via the jugular vein. The whole two kidneys were isolated, weighed and equatorial 3 mm section of both kidneys was fixed in 4% paraformaldehyde. The remaining kidney tissue was immediately frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C until analysis. Animal studies were conducted in accordance with institutional guidelines.

DNA analysis

The two kidneys were pooled and pulverized in liquid nitrogen using a mortar and pestle. Aliquots of frozen tissue powder were weighed, kidney DNA was extracted by the phenol-chloroform method, and DNA content per mg of tissue powder was calculated. Specific activity of extracted DNA aliquots (50 µg), indicative of DNA synthesis *in vivo*, were measured by liquid scintillation counting. Apoptosis was

quantified using the oligonucleosomal DNA fragmentation index as previously described (deBlois et al., 1997; Tea et al., 1999). Briefly, the extracted kidney DNA was labeled on free 3'OH-ends using terminal deoxynucleotidyl transferase (TdT, GIBCO BRL) and ^{32}P -dCTP (Amersham). For each sample, different quantities (0.025–0.4 μg) of the TdT-labeled DNA were separated on 1.5% agarose gel, transferred onto Hybond N⁺ nylon membrane (Amersham) and exposed to a ^{32}P -sensitive screen. A PhosphoImager (Molecular Dynamics) was used to quantify the mean optical density (O.D.) per pixel in the region between 180 bp and 1500 bp for each lane. These results were divided by the corresponding value obtained with an internal standard in the gel (1 μg $\lambda\text{DNA}/\text{Hind III}$ fragments, Gibco BRL). For each tissue sample, the DNA fragmentation index (arbitrary units/ μg DNA) was calculated as the slope of the O.D. ratio versus the amount of cardiac DNA loaded. To localize the anatomical regions of the kidney undergoing apoptosis, internucleosomal DNA fragments were detected in paraformaldehyde-fixed, paraffin-embedded cross-sections of kidneys by *in situ* 3'OH end radiolabeling using TdT and [^{32}P]dCTP and a PhosphoImager system, as we described previously{1611,1686}. Mean O.D. per pixel was evaluated into the whole kidney.

Statistics

Data were analyzed by analysis of variance (ANOVA) and unpaired Student's *t* test with Bonferroni correction for multiple comparisons when appropriate. The DNA fragmentation index was analyzed using the nonparametric tests Kruskal-Wallis followed by Mann-Whitney because of unequal variance between the groups and because we have no evidence that the index is a normally distributed variable. Values are presented as mean \pm SEM, and $P < 0.05$ was considered statistically significant.

RESULTS

Systemic and Hemodynamic Changes During Drug Therapy

Pretreatment values of body weight of all rats were 252 ± 2 g (n=132). Body weight gain was not affected by the treatments (Table 1). All rats showed high systolic blood pressure (174 ± 4 mmHg; n=132) before beginning of treatment and 220 ± 5 mmHg at 4 weeks (n=25). As previously reported (deBlois et al., 1997; Tea et al., 1999), systolic pressure in these rats was reduced at 4 weeks with hydralazine (44% reduction), losartan (40% reduction), enalapril (44% reduction) or nifedipine (33% reduction), but pressure was unchanged with propranolol or hydrochlorothiazide as compared to paired controls. Heart rate was not different between control and experimental groups before treatment (pre-treatment values: 354 ± 10 BPM; n=132) and this parameter did not change in untreated animals over the course of the experiment.

Effect of Drugs on Kidney Mass and DNA Content

Kidney mass was significantly reduced after 4 weeks of losartan, enalapril or hydrochlorothiazide therapy (Table 1). In untreated animals, kidney mass did not increase significantly between 1 week ($5.4 \pm 0.4 \times 10^{-3}$; n=10) and 4 weeks ($4.6 \pm 0.1 \times 10^{-3}$; n=25), suggesting a regression rather than a prevention of kidney with the treatment. Kidney mass was not affected after 4 weeks of treatment with hydralazine ($4.7 \pm 0.1 \times 10^{-3}$; n=6), nifedipine ($4.5 \pm 0.2 \times 10^{-3}$; n=6) or propranolol ($4.5 \pm 0.1 \times 10^{-3}$; n=6). To further analyze kidney growth, the total kidney DNA content normalized for body weight was evaluated (Table 1). Kidney DNA content ($\mu\text{g/g}$ body weight) was not affected after 4 weeks of treatment with hydralazine (5.8 ± 0.7 ; n=6), nifedipine (5.6 ± 0.7 ; n=6) or propranolol (5.6 ± 0.5 ; n=6) as compared with controls (5.7 ± 0.7 ; n=25). In contrast, kidney DNA content was significantly reduced starting at 2 week with losartan and at 4 weeks with enalapril or hydrochlorothiazide. In summary, regression of kidney mass was associated with a reduction in kidney DNA content.

Effect of Drugs on DNA Synthesis and Degradation

Within 24 hours of sacrifice, all rats were injected with ^3H -thymidine to evaluate DNA replication *in vivo*. The specific activity of whole two kidneys homogenates (cpm/100 mg tissue) was similar in

controls at 1 to 4 weeks (e.g., at 1 week: 248 ± 10 ; $n=10$), and this parameter was not affected with treatment (e.g., with losartan at 1 week: 216 ± 34 ; $n=5$), suggesting similar kidney uptake of ^3H -thymidine. In contrast to kidney homogenate, however, kidney DNA showed a decrease in specific activity (cpm/100 μg DNA) with drug treatment, suggesting an inhibition of kidney DNA synthesis (Table 1). Kidney DNA synthesis was reduced significantly with losartan and enalapril (beginning at 2 week) and hydrochlorothiazide (at 4 weeks). In contrast, DNA synthesis was not affected with hydralazine (654 ± 38 ; $n=6$), nifedipine (556 ± 36 ; $n=5$) or propranolol (605 ± 60 ; $n=5$) as compared with controls at 4 weeks (586 ± 44 ; $n=25$). In controls, DNA synthesis was not different between 1 and 4 weeks. In summary, kidney regression was associated with a reduction in kidney DNA synthesis.

We tested the hypothesis that apoptosis contributed to the reduction in kidney DNA content. Oligonucleosomal DNA fragmentation was similar in controls at 1 to 4 weeks (e.g., at 1 week: 1.0 ± 0.1 arbitrary units/ μg DNA; $n=10$). However, DNA fragmentation was increased transiently as early as 2 weeks with enalapril or losartan (Table 1). Hydrochlorothiazide stimulated DNA fragmentation at 4 weeks. In contrast, DNA fragmentation was not affected at 4 weeks with hydralazine (5.2 ± 1.3 ; $n=6$), nifedipine (4.5 ± 0.2 ; $n=6$), or propranolol (5.5 ± 0.3 ; $n=5$) as compared with controls (5.9 ± 0.4 ; $n=25$). Thus, the regression of kidney mass was associated with increased apoptotic activity.

The anatomical distribution of cells undergoing apoptosis is presented in Figure 1, which shows the density of radiolabeled DNA fragments in kidney cross-sections at the level of the renal artery from rats given placebo or treatment, as detected using a PhosphoImager. The time points selected for losartan, enalapril and hydrochlorothiazide in Figure 1 correspond to the peak increase in internucleosomal fragmentation observed in the DNA extracted from the kidney. In kidneys undergoing regression, the main increase in DNA fragmentation appeared in the area of the cortex (Figure 1). In contrast, there was no change in signal in kidneys from rats treated for 4 weeks with hydralazine, nifedipine or propranolol (data not shown).

DISCUSSION

Strong evidence exists that there is a renal basis for the development of hypertension in spontaneously hypertensive rats (SHR). The most convincing evidence has come from studies in which SHR kidneys were transplanted into normotensive recipients, resulting in hypertension in the recipients (Bianchi et al., 1974; Rettig and Unger, 1991). Similar findings have been made in other hypertensive strains (Dahl and Heine, 1975; Rettig and Unger, 1991). Furthermore, treatment of the SHR donors with antihypertensive drugs (eg, ACE inhibitors), including prenatally, does not prevent the development of hypertension in normotensive recipients (F1 hybrids) (Rettig et al., 1990b). Although questions have been raised about the interpretation of the results of such studies (Rettig and Unger, 1991), the results do suggest that hypertension in the SHR primarily is in large part regulated by renal factors. One possibility is that there is hypertrophy of the preglomerular vessels in the SHR kidney. Such arterial hypertrophy occurs in other nonrenal beds (Folkow, 1982; Heagerty et al., 1993), and if it occurred in the kidney, it could increase renal resistance by vessel wall encroachment into the vessel lumen and by eliciting increased responsiveness to vasoconstrictor substances (Folkow, 1982; Korner and Angus, 1992). Goldblatt himself pointed out that narrowing of intrarenal arteries would be functionally identical to narrowing of the main renal artery, a known cause of hypertension (Goldblatt, 1947). Several reports have now indicated that there is indeed renal vessel hypertrophy in SHR. Smeda and colleagues (Smeda et al., 1988) have reported increased medial cross-sectional area throughout the renal arterial tree in both prehypertensive (4 weeks) and older hypertensive (21 weeks) rats, and other researchers (Gattone et al., 1983; Skov et al., 1990) have shown narrowing of the afferent arteriolar lumen without medial hypertrophy.

It is well known that adult relative kidney weight as well as adult blood pressure is higher in SHR than in BN (Brown-Norway) rats (Hamet et al., 1998). Our group has demonstrated a kidney enlargement in newborn SHR when compared to WKY (Moreau et al., 1997; Walter and Hamet, 1986). We suggested that higher kidney weight in newborn rats might predict higher kidney weight and higher blood pressure in adult rats (Hamet et al., 1998). Different classes of antihypertensive drugs are not equally effective at reducing kidney mass, suggesting a blood pressure independent regulation (Cowley and Roman, 1996).

A potential mechanism contributing to the suppression of the increased cardiovascular mass in hypertension is through apoptosis. The significant new finding of the present study is that, only inhibitors of the renin-angiotensin pathway and diuretics were able to induce renal mass regression and induce a localized increase in apoptosis in the renal cortex. Evidence for apoptosis include an increase in DNA fragmentation coupled with a reduction in renal DNA content after 4 weeks of therapy.

In this study, hydrochlorothiazide stimulated apoptosis at 4 weeks, even though the blood pressure was not significantly reduced. With enalapril, apoptosis was stimulated at 2 weeks, i.e. after blood pressure was significantly reduced (at 1 week). Taken together, these short-term results suggest that the trophic changes in the kidney were not secondary to hemodynamic changes and that renal apoptosis is not associated with the antihypertensive effect, at least with the class of drugs tested in this study. However, we did not look further than 4 weeks of therapy. We previously reached similar conclusions in our study of apoptosis in the SHR aorta and heart undergoing regression (deBlois et al., 1997)(Tea et al., 1999). Harrap et al. (Harrap et al., 1986) reported observations that chronic treatment (between 4 and 16 weeks of age) with perindopril, an ACE inhibitor, prevented the development of hypertension in SHR. After withdrawal of perindopril treatment, the antihypertensive effect persisted and was accompanied by a reduction of renal vascular resistance. Interestingly, in essential hypertensive patients, lisinopril increased renal blood flow significantly during blood pressure reduction, whereas nifedipine, a calcium antagonist, did not (Shimamoto and Shimamoto, 1995).

Among the renal defects in SHR, the hemodynamic abnormality as indicated by an elevated renal vascular resistance is of particular interest. The renin-angiotensin system may play a pivotal role in the increased renal vascular resistance in the SHR. If SHR are treated from an early age with ACE inhibitors, elevation of renal vascular resistance (Kost and Jackson, 1993; Li and Jackson, 1989) and development of hypertension can be prevented (Korner and Bobik, 1995; Kost and Jackson, 1993; Li and Jackson, 1989). Interestingly, the renal vasoconstrictor response to AngII was significantly greater in SHR than WKY (Kost et al., 1994; Kost and Jackson, 1993; Li and Jackson, 1989). A recent study (Kost et al., 1994) showed that the enhanced responsiveness to AngII occurred selectively in the kidney of SHR and not other vessels, carotid, hindquarter, or mesenteric vasculatures. The observation that the antihypertensive

response induced by a renin or ACE inhibitor or by AT₁ receptor antagonism in SHR is abolished after bilateral nephrectomy suggests that the kidney is a major site of action for these agents (Bunkenburg et al., 1991; Inagami et al., 1991). This conclusion was further confirmed by Wood et al. (Wood et al., 1993) whose study showed that valsartan, a type 1 Ang II receptor antagonist lowered blood pressure in SHR after intrarenal administration but had no significant effect on blood pressure after intravenous administration. Hydralazine and nifedipine lowered significantly high blood pressure after 4 weeks of treatment while the renal mass was not affected. Hydrochlorothiazide did not affect hypertension while renal mass was reduced after 4 weeks of treatment. These results suggest a dissociation between the blood pressure lowering effect and the kidney mass. On the other hand, consistent with these observations, it has been suggested that marked loss of renal mass does not cause hypertension because, as long as there is a proper balance between glomerular filtration capability and tubular reabsorption, as little as 10% of normal kidney mass can excrete the normal daily load of salt without a significant rise in arterial pressure (Cowley and Roman, 1996).

Thus, investigation of the effects of ACE inhibitors on the structure of the renal vessels seems particularly important. In extrarenal vessels, e.g., mesenteric, cerebral, hindquarter, and thoracic aorta, previous investigations including ours, have indicated that media hypertrophy occurs in various sizes of vessels - aorta, arteries, and arterioles – in SHR and that antihypertensive treatment with ACE inhibitors prevents media growth (Clozel et al., 1989; Hajdu et al., 1991; Owens, 1987; Rizzoni et al., 1995). In the renal vasculature in SHR, some reports have indicated that there is a media hypertrophy in the main renal, arcuate, and interlobular arteries (Smeda et al., 1988). Ang II is known to cause hypertrophy of vascular smooth muscle cells, mesangial and epithelial cells and induce proliferation of mesangial, epithelial and interstitial cells (Cowley et al., 1996), blockers of the renin-angiotensin-aldosterone system such as ACE inhibitors, AT₁ antagonists and diuretics, may have the opposite effect in SHR, as several experimental studies have shown (deBlois et al., 1997; Owens, 1987; Rizzoni et al., 1995). One of the mechanism of action of renal mass regression induced by ACE inhibitors and AT₁ antagonists might implicate the induction of apoptosis in renal cells.

Studies are underway in our laboratory to determine the relative importance of vascular SMC, mesangial and epithelial cells in the present model of kidney mass regression. An important feature of renal apoptosis during pharmacotherapy is its localization in the renal cortex. The reason for this selective localization is unknown. One hypothesis is that hypertension is accompanied by a narrowing of the post glomerular vessel network by interstitial fibrosis in the cortex area. This has been suggested to lead to an increase resistance of the renal cortical blood flow. We speculate that ACE inhibitors, AT₁ receptor antagonists and diuretics might increase the renal cortical blood flow by reducing interstitial fibrosis by apoptosis in the cortex area, and thus contributing to decrease the renal vascular resistance. Further studies aimed at establishing the renal function in parallel to the renal structure remodeling after antihypertensive therapy are needed.

In summary, we provided evidence that apoptosis is induced in the kidney, predominantly in the cortex of SHR kidney during the first 4 weeks of antihypertensive drug therapy, irrespective of the class of drug able to induce regression of renal mass and independently of blood pressure reduction. In contrast to the time window of apoptosis, there was a sustained reduction in kidney mass, DNA content and DNA synthesis. These results reinforce the suggestion that apoptosis is a potential therapeutic target in controlling the development of renal disorders associated with hypertension.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by grants from the Medical Research Council of Canada (MRC) (MT-10803 and MT-12563), the Heart and Stroke Foundation of Canada, and Bayer Canada. B.S. Tea holds a studentship from the MRC. D. deBlois is a Scholar from the Fonds de la Recherche en Santé du Québec (FRSQ).

REFERENCES

- Bianchi, G., U. Fox, G.F. Difrancesco, A.M. Giovanetti, and D. Pagetti.** 1974. Blood pressure changes produced by kidney cross transplantation between spontaneously hypertensive rats and normotensive rats. *Clin Sci Mol Med.* 47:435-448.
- Bunkenburg, B., C. Schnell, H.P. Baum, F. Cumin, and J.M. Wood.** 1991. Prolonged angiotensin II antagonism in spontaneously hypertensive rats: hemodynamic and biochemical consequences. *Hypertension.* 18:278-288.
- Clozel, J.P., H. Kuhn, and F. Hefti.** 1989. Effects of cilazapril on the cerebral circulation in spontaneously hypertensive rats. *Hypertension.* 14:645-651.
- Cowley, A.W., and R.J. Roman.** 1996. The role of the kidney in hypertension. *JAMA.* 275:1581-1589.
- Curtis, J.J., R.G. Luke, H.P. Dustan, M. Kashgarian, J.D. Whelchel, P. Jones, and A.G. Diethelm.** 1983. Remission of essential hypertension after renal transplantation. *N Engl J Med.* 309:1009-1015.
- Dahl, L.K., and M. Heine.** 1975. Primary role of renal homografts in setting chronic blood pressure levels in rats. *Circ Res.* 36:692-696.
- de Wardener, H.E.** 1990a. The primary role of the kidney and salt intake in the aetiology of essential hypertension, part I. *Clin Sci.* 79:193-200.
- de Wardener, H.E.** 1990b. The primary role of the kidney and salt intake in the aetiology of essential hypertension, part II. *Clin Sci.* 79:289-297.
- deBlois, D., B.S. Tea, T.V. Dam, J. Tremblay, and P. Hamet.** 1997. Smooth muscle apoptosis during vascular regression in spontaneously hypertensive rats. *Hypertension.* 29:340-349.
- Folkow, B.** 1982. Physiological aspects of primary hypertension. *Physiol Rev.* 62:347-504.
- Gattone, V.H., A.P. Evan, L.R. Willis, and F.C. Luft.** 1983. Renal afferent arteriole in the spontaneously hypertensive rat. *Hypertension.* 5:8-16.
- Gobe, G.C., R.A. Axelson, and J.W. Searle.** 1990. Cellular events in experimental unilateral ischaemic renal atrophy and in regeneration after contralateral nephrectomy. *Lab Invest.* 63:770-779.
- Goldblatt, H.** 1947. The renal origin of hypertension. *Physiol Rev.* 27:120-165.

Guidi, E., G. Bianchi, E. Rivolta, C. Ponticelli, F. Quarto di Palo, L. Minetti, and E. Polli. 1985. Hypertension in man with a kidney transplant: role of familial versus other factors. *Nephron*. 41:14-21.

Guyton, A.C., T.G. Coleman, A.W. Cowley, K.W. Scheel, R.D. Manning, and R.A. Norman. 1972. Arterial pressure regulation : overriding dominance of the kidneys in long-term regulation and in hypertension. *Am J Med*. 52:584-594.

Hajdu, M.A., D.D. Heistad, S. Ghoneim, and G.L. Baumbach. 1991. Effects of antihypertensive treatment on composition of cerebral arterioles. *Hypertension*. 18:15-21.

Hamet, P., Z. Pausova, P. Dumas, Y.L. Sun, J. Tremblay, M. Pravenec, J. Kunes, D. Krenova, and V. Kren. 1998. Newborn and adult recombinant inbred strains: A tool to search for genetic determinants of target organ damage in hypertension. *Kidney Intern*. 53.

Hamet, P., L. Richard, T.V. Dam, E. Teiger, S.N. Orlov, L. Gaboury, F. Gossard, and J. Tremblay. 1995. Apoptosis in target organs of hypertension. *Hypertension*. 26:642-648.

Harrap, S.B., and A.I. Doyle. 1988. Genetic co-segregation of renal hemodynamics and blood pressure in the spontaneously hypertensive rat. *Clin Sci*. 74:63-69.

Harrap, S.B., J.A. Nicolai, and A.E. Doyle. 1986. Persistent effects on blood pressure and renal haemodynamics following chronic angiotensin converting enzyme inhibition with perindopril. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 13:753-765.

Heagerty, A.M., C. Aalkjaer, S.J. Bund, N. Korsgaard, and M. Mulvany. 1993. Small artery structure in hypertension: dual processes of remodeling and growth. *Hypertension*. 21:391-397.

Inagami, T., T. Murakami, K. Higuchi, and S. Nakajo. 1991. Roles of renal and vascular renin in spontaneous hypertension and switching of the mechanism upon nephrectomy: lack of hypotensive effects of inhibition of renin, converting enzyme, and angiotensin II receptor blocker after bilateral nephrectomy. *Am J Hypertens*. 4:15S-22S.

Korner, P.I., and J.A. Angus. 1992. Structural determinants of vascular resistance properties in hypertension: hemodynamic and model analysis. *J Vasc Res*. 29:293-312.

Korner, P.I., and A. Bobik. 1995. Cardiovascular development after enalapril in spontaneously hypertensive and Wistar-Kyoto rats. *Hypertension*. 25:610-619.

- Kost, C.K., W.A. Herzer, P. Li, and E.K. Jackson.** 1994. Vascular reactivity to angiotensin II is selectively enhanced in the kidneys of spontaneously hypertensive rats. *J Pharmacol Exp Ther.* 269:82-88.
- Kost, C.K., and E.K. Jackson.** 1993. Enhanced renal angiotensin II subtype I receptor responses in the spontaneously hypertensive rat. *Hypertension.* 21:420-431.
- Li, P., and E.K. Jackson.** 1989. Enhanced slow-pressor response to angiotensin II in spontaneously hypertensive rats. *J Pharmacol Exp Ther.* 251:251.
- Moreau, P., B.S. Tea, T.V. Dam, and P. Hamet.** 1997. Altered balance between cell replication and apoptosis in hearts and kidneys of newborn SHR. *Hypertension.* 30:720-724.
- Norrelund, H., K.L. Christensen, N.J. Samani, P. Kimber, M.J. Mulvany, and N. Korsgaard.** 1994. Early narrowed afferent arteriole is a contributor to the development of hypertension. *Hypertension.* 24:301-308.
- Owens, G.** 1987. Influence of blood pressure on development of aortic medial smooth muscle hypertrophy in spontaneously hypertensive rats. *Hypertension.* 9:178-187.
- Rettig, R., C. Foberth, D. Koff, H. Strauss, and T. Unger.** 1990a. Role of the kidney in the pathogenesis of primary hypertension. *Clin Exp Hypertens.* A12:957-1002.
- Rettig, R., C. Folberth, G. Strauss, D. Kopf, R. Waldherr, and T. Unger.** 1990b. Role of the kidney in primary hypertension: a renal transplantation study in rats. *Am J Physiol.* 258:F606-F611.
- Rettig, R., and T. Unger.** 1991. The role of the kidney in the aetiology of hypertension: renal transplantation studies in rats. *Trends Pharmacol Sci.* 12:243-245.
- Rizzoni, D., M. Castellano, E. Porteri, G. Bettoni, M. Muiesan, A. Cinelli, and E.A. Rosei.** 1995. Effects of low and high doses of fosinopril in the structure and function of resistance arteries. *Hypertension.* 26:118-123.
- Shimamoto, H., and Y. Shimamoto.** 1995. Lisinopril improves aortic compliance and renal flow: comparison with nifedipine. *Hypertension.* 25:327-334.
- Skov, K., M.J. Mulvany, and N. Korsgaard.** 1990. Morphology of renal afferent arterioles in spontaneously hypertensive rats. *Hypertension.* 20:821-827.

- Smeda, J.S., R.M. Lee, and J.B. Forrest.** 1988. Structural and reactivity alterations of the renal vasculature of spontaneously hypertensive rats prior to and during established hypertension. *Circ Res.* 63:518-533.
- Tea, B.S., T.V. Dam, P. Moreau, P. Hamet, and D. deBlois.** 1999. Apoptosis during regression of cardiac hypertrophy in spontaneously hypertensive rats. Temporal regulation and spatial heterogeneity. *Hypertension.* 34:229-235.
- Uber, A., and R. Rettig.** 1996. Pathogenesis of primary hypertension - Lessons from renal transplantation studies. *Kidney Int.* 49:S42-S45.
- Walter, S.V., and P. Hamet.** 1986. Enhanced DNA synthesis in heart and kidney of newborn spontaneously hypertensive rats. *Hypertension.* 8:520-525.
- Woo, D.** 1995. Apoptosis and loss of renal tissue in kidney polycystic diseases. *N Engl J Med.* 333:18-25.
- Wood, J.M., C.R. Schnell, and N.R. Levens.** 1993. Kidney is an important target for the antihypertensive action of an angiotensin II receptor antagonist in spontaneously hypertensive rats. *Hypertension.* 21:1056-1061.

LENGENDS

FIGURE 1. Renal apoptosis as detected with radiolabeled TUNEL in cross-sections of kidneys from treated kidneys chosen at their peak effect on DNA fragmentation index. Peak effect of DNA fragmentation are shown in rats administered with (A) placebo (2 weeks), (B) losartan (2 weeks), (C) enalapril (2 weeks), (D) nifedipine (2 weeks), (E) placebo (4 weeks), (F) losartan (4 weeks), (G) enalapril (4 weeks) and (H) hydrochlorothiazide (4 weeks). As shown, the increased apoptosis induced by losartan (2 weeks), enalapril (2 weeks) or hydrochlorothiazide (4 weeks) treatment occurred predominantly in the cortex area.

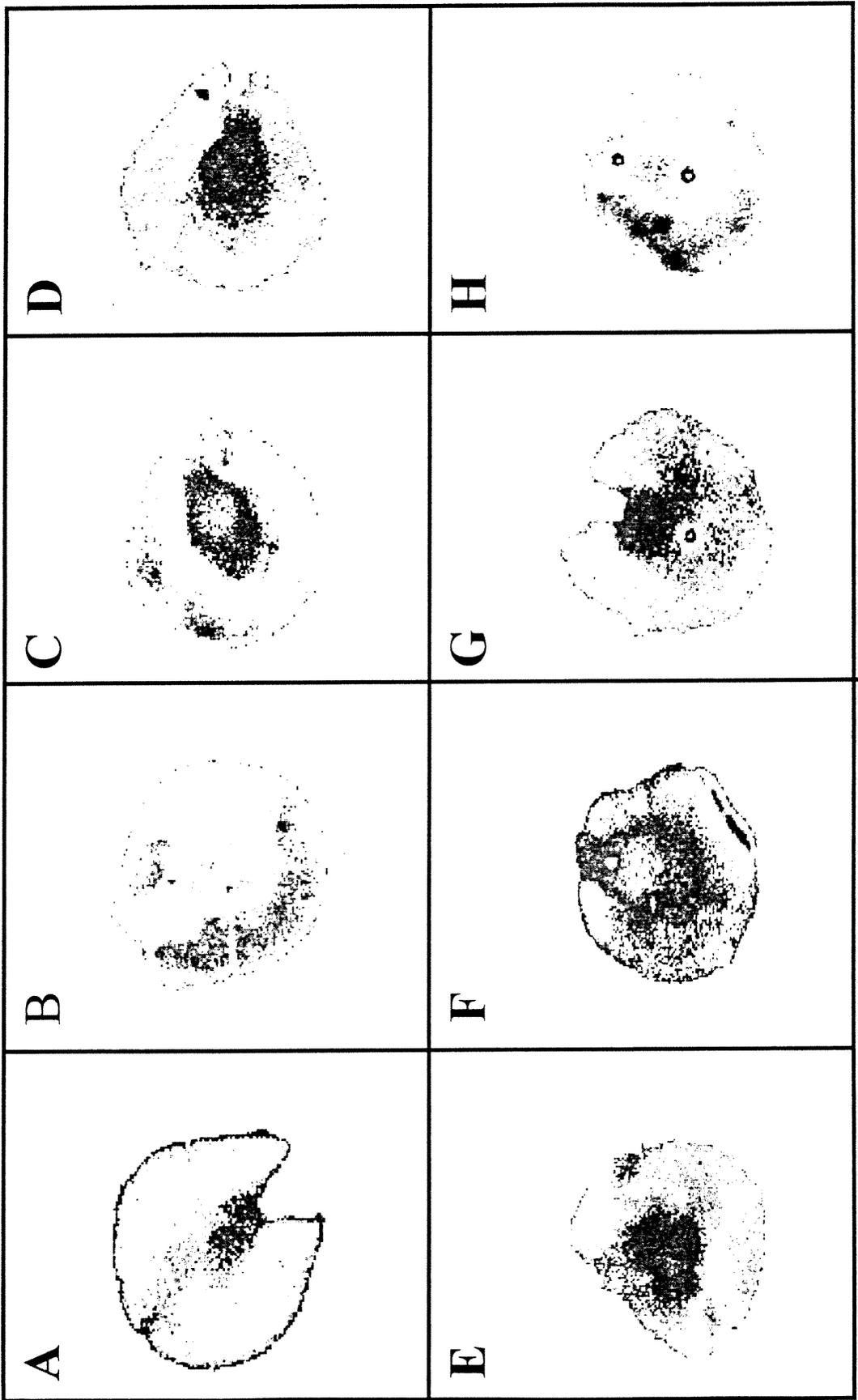


Table 1 : Effect of antihypertensive therapy for 1, 2 or 4 weeks on SHR body weight, kidney mass, DNA content, DNA fragmentation, DNA specific activity, and tissue specific activity .

Duration of Treatment	Treatment (n)	Final Body Weight (g)	Kidney to Body Weight Ratio ($\times 10^{-3}$)	Kidney DNA Content/Body Weight ($\mu\text{g/g}$)	DNA Fragmentation Index (arbitrary units/ μg)	DNA Specific Activity (cpm/100 μg)	Kidney Tissue Specific Activity (cpm/100 mg tissue)
<u>1 week</u>	Control (10)	264 \pm 8	5.4 \pm 0.4	5.9 \pm 0.7	5.1 \pm 0.9	714 \pm 58	248 \pm 10
	Enalapril (5)	239 \pm 12	5.4 \pm 0.6	5.6 \pm 0.5	4.0 \pm 0.8	654 \pm 42	203 \pm 19
	Losartan (5)	264 \pm 3	5.5 \pm 0.1	6.1 \pm 0.4	4.2 \pm 0.8	638 \pm 47	232 \pm 41
	Nifedipine (5)	271 \pm 8	5.5 \pm 0.1	6.1 \pm 0.3	4.1 \pm 1.0	621 \pm 46	198 \pm 21
	Control (18)	276 \pm 7	5.9 \pm 0.1	5.9 \pm 0.3	4.1 \pm 1.1	592 \pm 33	234 \pm 24
<u>2 weeks</u>	Enalapril (6)	277 \pm 9	5.0 \pm 0.1	5.6 \pm 0.6	9.9 \pm 1.6 *	410 \pm 74 *	210 \pm 14
	Losartan (5)	283 \pm 5	4.3 \pm 0.1 *	4.4 \pm 0.5 *	9.1 \pm 1.5 *	507 \pm 23 *	216 \pm 34
	Nifedipine (5)	313 \pm 8	5.0 \pm 0.1	5.5 \pm 0.3	4.8 \pm 1.6	519 \pm 35	221 \pm 23
	Propranolol (4)	291 \pm 14	5.2 \pm 0.3	5.0 \pm 0.4	4.6 \pm 1.2	569 \pm 10	212 \pm 15
	Control (25)	290 \pm 6	4.6 \pm 0.1	5.7 \pm 0.7	5.9 \pm 0.4	586 \pm 44	225 \pm 13
<u>4 weeks</u>	Enalapril (12)	292 \pm 9	4.0 \pm 0.1 *	4.4 \pm 0.4 *	5.1 \pm 0.9	431 \pm 34 *	310 \pm 12 *
	Losartan (6)	289 \pm 6	4.2 \pm 0.1 *	4.4 \pm 0.3 *	6.6 \pm 0.5	461 \pm 37 *	330 \pm 35 *
	Nifedipine (10)	297 \pm 7	4.5 \pm 0.2	5.6 \pm 0.7	4.5 \pm 0.2	556 \pm 36	297 \pm 43
	Propranolol (5)	291 \pm 4	4.5 \pm 0.1	5.6 \pm 0.5	5.5 \pm 0.3	605 \pm 60	223 \pm 21
	Hydrochlorothiazide (5)	292 \pm 10	4.1 \pm 0.1 *	4.3 \pm 0.4 *	8.4 \pm 0.4 *	617 \pm 33	230 \pm 15
	Hydralazine (6)	292 \pm 5	4.7 \pm 0.1	5.8 \pm 0.7	5.2 \pm 1.3	654 \pm 38	231 \pm 18

* P < 0.05 by ANOVA followed by Student's *t* test with Bonferroni correction for multiple comparisons, except for DNA fragmentation index which was analyzed using the non-parametric tests Kruskal-Wallis followed by Mann-Whitney. * P < 0.05.
n=5, for cardiac specific activity (cpm/100 mg of cardiac tissue)

Résumé d'article

ARTICLE #4

Apoptotic and antiproliferative role of angiotensine II receptor subtype 2 in vascular smooth muscle cells of spontaneously hypertensive rats *in vivo*.

par

Tea B.-S., Der Sarkissian D., Hamet P., deBlois D.

Récemment, nous avons démontré que la régression de l'hypertrophie aortique induite par le losartan chez les rats SHR s'accompagne d'une augmentation transitoire de l'apoptose après 1 semaine de thérapie. Parce qu'un blocage des récepteurs AT₁ de l'angiotensine *in vivo* augmente l'angiotensine II plasmatique, la présente étude a pour objectif d'examiner la contribution relative des récepteurs de type AT₁ et AT₂ dans la modulation de la croissance et de l'apoptose des cellules musculaires lisses aortiques de rat génétiquement hypertendus (SHR). Les rats traités ont reçu l'antagoniste AT₁ sélectif valsartan (VAL; 30 mg/kg/jour), l'antagoniste AT₂ sélectif PD123319 (PD; 30 mg/kg/jour par infusion sous-cutanée) ou la combinaison des deux médicaments (VAL + PD) pendant 1-2 semaines. Les rats non-traités (CON) ont reçu un placebo. La synthèse d'ADN a été mesurée par l'incorporation de ³H-thymidine *in vivo*. L'apoptose a été mesurée par la détection de l'accumulation des protéines pro- et anti-apoptotiques (Bax et Bcl-2) et a été quantifiée par marquage radioactif par la terminal déoxynucléotidyl transférase des fragments internucléosomaux de l'ADN extrait. Après 1 semaine, la pression systolique a été réduite de 11-15% dans les groupes VAL et VAL+PD (vs CON: 193±5 mmHg) seulement. Le groupe VAL seul a augmenté de 2.7-fois la fragmentation d'ADN (vs CON: 2.4±0.5 unités arbitraires/pixel) et du ratio Bax/Bcl-2 (un index de susceptibilité à l'apoptose) à 1 semaine. L'induction de l'apoptose a précédé la réduction significative de la synthèse d'ADN (24%), du contenu en ADN (25%), de la masse vasculaire (18%) ou du nombre de cellules musculaires lisses dans la média de l'aorte (33%) à 2 semaines. Le PD seul n'a pas affecté ces paramètres. Cependant une co-administration de PD a aboli les changements de l'apoptose, la synthèse d'ADN, le contenu en ADN, l'hypertrophie vasculaire et le nombre de cellules induits par VAL. Les ARNm des récepteurs AT₁ et AT₂ ont été détectés dans l'aorte par la méthode du RT-PCR. Les résultats de la présente étude démontrent pour la première fois que les récepteurs AT₂ relayent l'apoptose des cellules musculaires lisses *in vivo*, un effet qui est transitoire et qui est dissocié de la suppression de la réplication d'ADN des cellules musculaires lisses et la pression artérielle.

Proapoptotic and Growth-Inhibitory Role of Angiotensin II Type 2 Receptor in Vascular Smooth Muscle Cells of Spontaneously Hypertensive Rats In Vivo

Bun-Seng Tea, Shant Der Sarkissian, Rhian M. Touyz, Pavel Hamet, Denis deBlois

Abstract—Angiotensin type 2 (AT₂) receptors for angiotensin II suppress cell growth and induce apoptosis in vitro, but their role is poorly defined in vivo. We reported that transient induction of smooth muscle cell (SMC) apoptosis precedes DNA synthesis inhibition and aortic hypertrophy regression in spontaneously hypertensive rats treated with the AT₁ antagonist losartan or the converting-enzyme inhibitor enalapril. Although both drugs are equipotent in reducing SMC number, apoptosis occurs significantly earlier with losartan than enalapril. To examine the role of AT₂ receptors in this model, spontaneously hypertensive rats were given valsartan, an AT₁ antagonist, or enalapril, in combination or not with the AT₂ antagonist PD123319 for 1 or 2 weeks. Control rats received vehicle. Systolic blood pressure was reduced similarly by valsartan and enalapril but it was not significantly affected by PD123319. Angiotensin II plasma levels were increased (6-fold) with valsartan and reduced (80%) with enalapril but unaffected by PD123319. Valsartan significantly increased internucleosomal DNA fragmentation indicative of apoptosis at 1 week only (2.7-fold) and significantly reduced aortic mass (18%), SMC number (33%), and DNA synthesis (24%, measured by ³H-thymidine incorporation) at 2 weeks. These valsartan-induced changes were prevented by PD123319. In contrast, enalapril-induced DNA fragmentation (2-fold increase at 2 weeks) was not affected by PD123319. PD123319 given alone did not affect growth or apoptosis. AT₁ and AT₂ receptor mRNAs were detected in the aorta by reverse transcription–polymerase chain reaction. Together, these results provide the first evidence that AT₂ receptors mediate vascular mass regression by stimulating SMC apoptosis in vivo, an effect seen during AT₁ receptor blockade but not during converting-enzyme inhibition. (*Hypertension*. 2000;35:1069-1073.)

Key Words: angiotensin II ■ muscle, smooth, vascular ■ losartan ■ enalapril

Two main subtypes of specific cell membrane receptors for angiotensin II (Ang II) have been pharmacologically defined and cloned, namely angiotensin type 1 (AT₁) receptors, which are blocked specifically by antagonists such as valsartan, and angiotensin type 2 (AT₂) receptors, which are blocked specifically by PD123319.¹ AT₁ receptors represent the predominant receptor subtype in the adult rat arterial wall, in which they stimulate smooth muscle cell (SMC) contraction and growth.¹ Although AT₂ receptors are predominantly expressed in SMC during fetal development, low levels of expression are found in the aorta of adult rats including spontaneously hypertensive rats (SHR).² A growing body of evidence suggests that AT₁ and AT₂ receptors elicit countervailing influences on the cell growth-death balance. In cultured SMC, AT₁ receptors promote growth and inhibit apoptosis, whereas AT₂ receptors elicit opposite effects.¹⁻⁴ However, AT₂ receptor regulation of SMC number by apoptosis has never been examined in vivo. Moreover, the role of AT₂ receptors in vascular remodeling in vivo is controversial.⁵⁻⁸

The regression of vascular hypertrophy is a potential therapeutic target for the reduction of complications associated with hypertension. In SHR, aortic hypertrophy is associated with increased vascular mass and DNA content.^{9,10} SHR SMC show enhanced growth in vitro and in vivo^{10,11} and an increased propensity to undergo apoptosis in response to growth factor withdrawal in vitro.¹² Recently, we reported that blockade of the Ang II pathway in SHR induces a transient increase in aortic SMC apoptosis at the onset of vascular hypertrophy regression, an effect that is not secondary to blood pressure reduction.¹³ Although the AT₁ receptor antagonist losartan and the angiotensin-converting enzyme (ACE) inhibitor enalapril are equipotent in reducing SMC number in the SHR aorta, SMC apoptosis occurs significantly earlier with losartan (at 1 week) than with enalapril (at 2 weeks).¹³ Inhibition of SMC DNA synthesis is also observed, but it is sustained and temporally dissociated because it occurs after the early time window of SMC apoptosis. AT₁ receptor blockade in vivo increases Ang II plasma levels¹⁴

Received November 22, 1999; first decision December 8, 1999; revision accepted December 17, 1999.

From the Centre de Recherche, Centre Hospitalier de l'Université de Montréal (CHUM) (B.-S. T., S.D.S., P.H., D.D.), Montreal, Quebec, Canada, and The Clinical Research Institute of Montreal (R.M.T.).

Correspondence to Denis deBlois, Centre de Recherche, CHUM–Hôtel-Dieu, 3840 St Urbain St, Room 7-132B, Montreal, Quebec H2W 1T8, Canada.

and allows unopposed activation of AT₂ receptors, whereas suppression of Ang II production by ACE inhibitors reduces activation of both AT₁ and AT₂ receptors. Thus, we hypothesized that Ang II acting through AT₂ receptors may be involved in SMC apoptosis stimulation in response to AT₁ receptor blockade but not in response to ACE inhibition. To the best of our knowledge, this is the first report of AT₂ receptor-dependent cell deletion by apoptosis in the cardiovascular system in vivo.

Methods

Nine- to 10-week-old male SHR were purchased from Charles River (St Constant, Canada) and housed for ≥ 10 days before study. Food and water were administered ad libitum. Rats ($n=5$ to 8 per group) were treated for 1 to 2 weeks with the selective AT₁ antagonist valsartan (30 mg/kg per day; gift of Novartis, Toronto, Canada) in the drinking water, the selective AT₂ antagonist PD123319 (30 mg/kg per day; gift of Parke-Davis, Ann Arbor, Mich) by continuous subcutaneous infusion with an osmotic minipump (Alzet, model 4 ML1 or 4 ML2), or a combination of both drugs. PD123319 was dissolved in saline (pH 3.0, adjusted with 0.1 mol/L sodium citrate). A subgroup of rats received enalapril (30 mg/kg per day PO, Sigma Chemical Co) in combination or not with PD123319 for 2 weeks. Control animals received vehicle. All animal manipulations were conducted according to institutional guidelines.

Systolic blood pressure was determined in conscious, restrained rats by the tail-cuff method as we described previously.¹³ Rats were killed, and the aorta media was prepared for the following measurements as we described previously¹³: vascular cross-sectional area, SMC number (using the 3-dimensional dissector method), DNA synthesis (in vivo ³H-thymidine incorporation into DNA during the last 2 hours before death), and the oligonucleosomal DNA fragmentation index (indicative of apoptosis). To examine aortic gene expression for AT₁ and AT₂ receptors, 4 untreated SHR were killed, and the thoracic aortas were isolated, dissected, and cut longitudinally into 2 halves. One half was immediately frozen; the other was denuded of endothelium as described above before freezing. Total mRNA was extracted, and reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) was used as we described previously,¹⁵ with minor modifications. Briefly, RT was performed in a reaction volume of 30 μ L containing 4.55 μ g RNA, 1.5 μ L of 10 mmol/L dNTP, 6 μ L of BRL 5 \times buffer, 0.6 μ L Oligo (dT)₁₂₋₁₈ primer (0.5 μ g/ μ L), 1.5 μ L of 200 U/ μ L M-MLVRT, 0.9 μ L rRNasin (RNase inhibitor) 40 U/ μ L, and 3 μ L of DTT 0.1 mol/L at 37°C for 1 hour. The reaction was inactivated at 95°C for 5 minutes. After first-strand synthesis of RNA, 2 μ L cDNA was amplified with specific primers as described previously.¹⁵ The amplification profile involved denaturation at 95°C for 60 seconds, annealing at 57°C for 60 seconds, and extension at 72°C for 60 seconds for 30 cycles. After amplification, PCR products were electrophoresed on a 1.5% agarose gel for 1 hour at 9 V/cm gel. Bands corresponding to RT-PCR products were visualized by UV light after agarose gel electrophoresis, and their intensities were measured by densitometry.

Statistics

Values are presented as mean \pm SEM. Data from treated groups were compared with those of the control group by ANOVA and an unpaired Student's *t* test with Bonferroni correction for multiple comparisons. A value of $P < 0.05$ was considered statistically significant.

Results

Expression of mRNA of both AT₁ and AT₂ receptors was evident in denuded aorta, suggesting that both receptor subtypes are expressed in aortic SMC (Figure 1). The nondenuded aorta showed similar levels of AT₁ receptor expression as compared with the denuded vessel but a

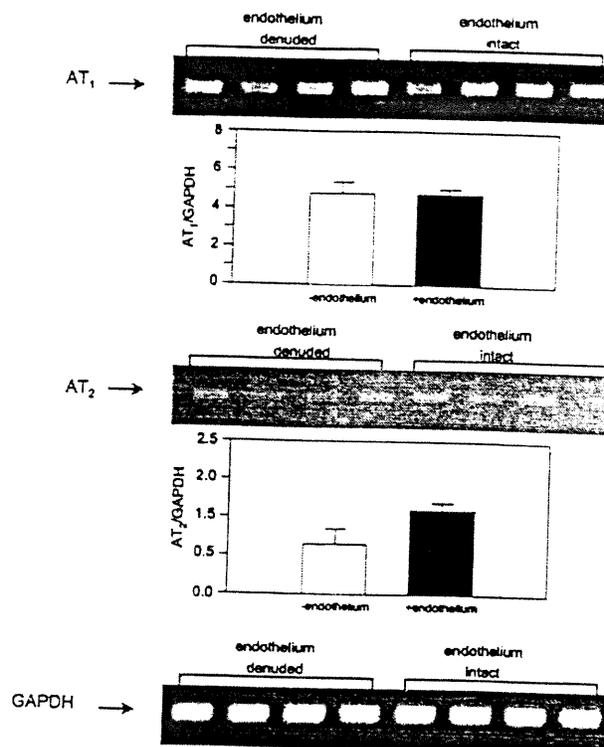


Figure 1. Detection of AT₁ and AT₂ mRNAs by RT-PCR in endothelium-denuded and endothelium-intact aorta from untreated SHR ($n=4$). Bar graphs represent mean \pm SEM. GAPDH mRNA is internal control. Amount of AT₁ and AT₂ mRNA was measured by scanning and is expressed as ratio of optical density of AT receptor mRNA to GAPDH mRNA.

tendency toward higher levels of AT₂ receptor expression, possibly caused by the presence of endothelium.

Study With Valsartan

In rats treated with valsartan alone, high blood pressure was significantly reduced after 1 and 2 weeks (170 ± 3 and 164 ± 3 mm Hg, respectively) as compared with control animals (191 ± 3 and 189 ± 4 mm Hg, respectively). Cotreatment with PD123319 did not affect the antihypertensive effect of valsartan (165 ± 3 mm Hg at 2 weeks). PD123319 alone did not significantly affect blood pressure (178 ± 3 mm Hg at 2 weeks). Final body weights were not significantly affected by valsartan (223 ± 10 g), PD123319 (258 ± 7 g), or valsartan+PD123319 (225 ± 10 g), as compared with control animals (245 ± 7 g). Within 2 weeks, PD123319 alone did not affect SMC DNA fragmentation (Figure 2A) and DNA synthesis (Figure 2B) or final SMC number (Figure 2C), medial cross-sectional area (Figure 2D), and aortic mass (5.24 ± 0.29 mg/mm per gram $\times 10^{-3}$ vs control values: 5.14 ± 0.17 mg/mm per gram $\times 10^{-3}$). In contrast, administration of valsartan alone significantly increased SMC DNA fragmentation (2.7-fold at 1 week only) and reduced aortic SMC number (by 33% at 2 weeks), suggesting SMC death by apoptosis. Valsartan-induced SMC apoptosis at 1 week was followed at 2 weeks by a significant reduction of SMC DNA synthesis, medial cross-sectional area, and aortic mass (18% reduction). However, coadministration of PD123319 prevented valsartan-induced changes in DNA fragmentation,

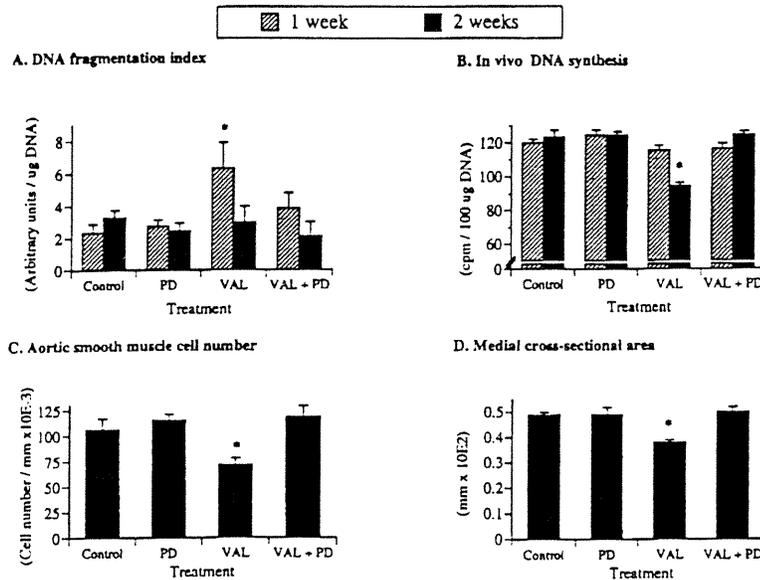


Figure 2. Changes in A, internucleosomal DNA fragmentation; B, aortic SMC DNA synthesis; C, SMC number; and D, medial hypertrophy in aorta of SHR treated for 1 or 2 weeks with valsartan (VAL), PD123319 (PD), or a combination of VAL and PD. Stimulation of DNA fragmentation and suppression of DNA synthesis induced by VAL were prevented by cotreatment with PD. Reduction in aortic SMC number and medial cross-sectional area induced by VAL were prevented by cotreatment with PD. PD given alone did not affect these parameters. *Significantly different ($P < 0.05$) from control group ($n = 5$ to 8 per group).

DNA synthesis, SMC number, medial cross-sectional area, and aortic mass (5.03 ± 0.25 mg/mm per gram $\times 10^{-3}$ at 2 weeks). The total radioactivity in aortic smooth muscle homogenates was not different between treated and untreated animals (eg, 46 ± 3 cpm/10 mg protein in the valsartan group at 2 weeks vs 50 ± 7 cpm/10 mg protein in the control group), thus ruling out differences in tissue uptake of ^3H -thymidine. Ang II plasma levels (485 ± 84 pg/mL in the control group) were increased significantly after 2 weeks in the valsartan group (2916 ± 457 pg/mL) or valsartan+PD123319 group (3195 ± 540 pg/mL). PD123319 alone did not affect Ang II levels (561 ± 76 pg/mL).

Study With Enalapril

We showed previously that SMC DNA fragmentation is increased but that DNA synthesis and aortic hypertrophy are not yet reduced after a 2-week treatment with enalapril in the SHR aorta.¹³ We examined whether coadministration of PD123319 affects the induction of SMC apoptosis at 2 weeks of enalapril therapy. Valsartan-treated rats were used as positive controls. In this study, high blood pressure was significantly and similarly reduced by enalapril (143 ± 1 mm Hg) and valsartan (144 ± 1 mm Hg) versus control animals (191 ± 2 mm Hg) at 2 weeks. The antihypertensive effect of enalapril at 2 weeks was not prevented by PD123319 cotreatment (143 ± 1 mm Hg). The significant antihypertensive effects of each treatment were also similar at 1 week (data not shown). Final body weights were not significantly affected by valsartan (275 ± 5 g), enalapril (272 ± 7 g), or enalapril+PD123319 (277 ± 13 g) as compared with control animals (270 ± 4 g). Treatment with enalapril alone caused a significant 2-fold increase in SMC DNA fragmentation (Figure 3). In contrast to valsartan, however, the enalapril-induced increase in DNA fragmentation was not prevented by coadministration of PD123319. As in our previous study,¹³ enalapril administration for 2 weeks did not reduce SMC DNA synthesis (123 ± 2 vs 127 ± 4 cpm/100 μ g in control animals), aortic DNA content (0.92 ± 0.05 vs

1.05 ± 0.06 μ g/mm in control animals), or aortic mass (4.7 ± 0.1 vs 5.2 ± 0.1 mg/mm per gram $\times 10^{-3}$ in control animals). Consistent with the data described above, valsartan administration for 2 weeks significantly reduced SMC DNA synthesis (25%), aortic DNA content (39%), and aortic mass (17%), whereas DNA fragmentation was no longer elevated at that time point. Ang II plasma levels were markedly reduced after 2 weeks of enalapril (87 ± 11 pg/mL) or enalapril+PD123319 (83 ± 13 pg/mL).

Discussion

We previously reported that losartan and enalapril are equipotent in reducing aortic SMC number in SHR.¹³ One interpretation of these results is that reduced AT₁ receptor activity with both treatments decreased SMC growth and survival. However, the effects were initiated significantly earlier with losartan than with enalapril. Because AT₁ blockade increases Ang II plasma levels,¹⁴ we hypothesized that the suppression of SMC growth-survival may involve AT₂ receptors in SHR treated with an AT₁ antagonist but not an

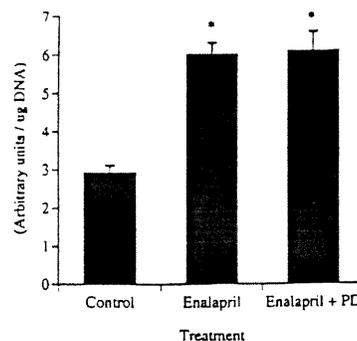


Figure 3. Changes in internucleosomal DNA fragmentation in aortic SMC in SHR treated for 2 weeks with enalapril, PD123319 (PD), or a combination of enalapril and PD. Stimulation of DNA fragmentation induced by enalapril was not prevented by cotreatment with PD. *Significantly different ($P < 0.05$) from control group ($n = 5$ per group).

ACE inhibitor. In the present study, we confirmed that mRNA for both receptor subtypes are expressed in the SHR aorta. Recently, we reported a correlation between levels of AT₁ and AT₂ receptor protein and mRNA in SHR vessels.¹⁵ Consistent with our previous findings,¹³ AT₁ receptor blockade induced a transient burst of SMC apoptosis at the onset of the regression of aortic hypertrophy and before SMC DNA replication was suppressed. In rats receiving enalapril, SMC apoptosis was stimulated at 2 weeks, but DNA synthesis and aortic hypertrophy were not yet reduced as previously shown.¹³

The significant new finding is that PD123319 blocked the proapoptotic and growth-inhibitory effects of valsartan, suggesting a role for AT₂ receptors in regulating SMC fate *in vivo*. The lack of effect of PD123319 administered alone suggests that AT₂ receptors do not elicit tonic proapoptotic or antigrowth effects on SMC under basal conditions in the aorta of young adult SHR. This is in contrast to late gestation, when SMC DNA replication is stimulated by AT₂ blockade.¹⁶ Interestingly, cotreatment with valsartan and PD123319 did not affect SMC DNA replication and apoptosis. These data suggesting that basal AT₁ and AT₂ receptor activity do not regulate SMC growth-survival are possibly related to the short treatment period examined. Alternatively, AT₁ receptors may downregulate the AT₂ pathway, which suggests that the countervailing influence of these 2 receptors is an important determinant of SMC fate. The latter interpretation is more consistent with the known role of AT₁ receptors in Ang II-dependent vascular disorders.^{1,2,17} Such a paradigm also may explain the significant antigrowth effect of AT₂ receptors in aortic SMC before birth,¹⁶ because AT₂ receptors predominate over AT₁ receptors at that time.¹⁸ Possible nonspecific effects of PD123319 cannot be ruled out. It should be mentioned, however, that the present dose of PD123319 results in plasma antagonist concentrations that are widely regarded as highly specific for AT₂ receptors (250 nmol/L).¹⁹ Ang II plasma levels were markedly elevated by valsartan but not affected by PD123319. Therefore, the simplest explanation for the present results is that AT₁ receptor blockade rapidly reduced aortic SMC accumulation by favoring Ang II-dependent AT₂ receptor activity, with proapoptotic and antigrowth consequences. Consistent with this, PD123319 did not block SMC apoptosis induced by enalapril (that is, in a model in which Ang II production was markedly reduced). That ACE inhibitors and AT₁ antagonists elicit convergent effects in part through different pathways has been documented in rat models of cardiovascular remodeling.²⁰⁻²² In these studies, increased activity of the kinin B₂ receptor pathway has been implicated in the beneficial effects of ACE inhibitors. It should be mentioned that although both B₂ and AT₂ receptors stimulate endothelial production of nitric oxide,^{2,23} a known stimulant of SMC apoptosis,^{3,24} only ACE inhibitors prevent kinin degradation and B₂ receptor desensitization.^{25,26} These added effects may help increase SMC apoptosis with enalapril. Reduced Ang II levels during ACE inhibition may contribute further by correcting endothelial dysfunction in SHR.²⁷ In contrast, AT₂ receptors are able to stimulate SMC apoptosis independent of endothelial cells.²

Reducing arterial wall tension stimulates SMC apoptosis in rabbit vessels, suggesting that blood pressure-dependent apoptotic pathways are possible.²⁸ However, we previously reported that blood pressure reduction with hydralazine does not induce aortic SMC apoptosis in SHR.¹³ In the present study, PD123319 suppressed apoptosis, even though the antihypertensive effect of valsartan was not affected. Thus, the causal relation between blood pressure and SMC apoptosis is complex and modulated by endocrine factors. As previously observed,¹³ apoptosis induction and growth suppression were temporally dissociated during treatment. Because PD123319 blocked both events, it is not possible to determine whether growth suppression was secondary to apoptosis induction or, alternatively, a primary effect of AT₂ stimulation. That AT₂ receptors suppress growth-associated signaling pathways and ultimately DNA replication, however, is supported by several *in vitro* studies.² Previous reports have shown contrasting effects of PD123319 on vascular mass regulation *in vivo*. Some⁵⁻⁷ but not all^{8,29} groups observed that PD123319 administration for 10 weeks attenuates aortic mass in SHR or rats given long-term infusions of Ang II. None of these studies examined the balance between SMC DNA replication and apoptosis. It is known, however, that long-term Ang II infusion stimulates SMC DNA replication through AT₁ receptors.^{29,30} Interestingly, short-term Ang II infusion in normotensive rats was recently shown to induce SMC apoptotic activity through both AT₁ and AT₂ receptors, although effects on SMC number or DNA replication were not determined.³¹ In contrast, the present results clearly show that short-term treatment with PD123319 in SHR potently suppresses the induction of SMC apoptosis, the inhibition of SMC growth, and the rapid regression of SMC number and vascular mass induced by an AT₁ receptor antagonist. The discrepancies with the studies mentioned above may reflect differences in experimental models and/or schedule of drug administration. For instance, the documented suppression of endothelial cell growth by AT₂ receptors³² raises the possibility that long-term blockade of this receptor with PD123319 may alter endothelial cell behavior *in vivo*, an important determinant of vascular mass.³³ Our RT-PCR data in vessels with or without endothelium suggest that AT₂ receptors are expressed in SHR aortic endothelial cells, as previously shown in smaller rat vessels.³⁴ Thus, a role for endothelial AT₂ receptors in the present model may not be ruled out. In the short time period examined, however, we consider a direct effect on AT₂ receptors in SMC more likely because of the rapidity of the responses observed. Whether the present observations are vessel specific remains to be determined. Aortic hypertrophy is important in isolated systolic hypertension and left ventricular hypertrophy,³⁵ although arterioles are the major site of increased vascular resistance in hypertension.³⁶

In conclusion, this study in SHR provides the first evidence that AT₂ receptors induce arterial SMC deletion by apoptosis *in vivo*. AT₂ receptors also reduced SMC growth and vascular mass but did not affect blood pressure during AT₁ receptor blockade. In comparison, enalapril-induced apoptosis was not affected by AT₂ receptor blockade, suggesting different mechanism(s) of action for ACE inhibitors and AT₁ antago-

nists. Although the therapeutic significance of these findings remains to be established, we speculate that AT₂-mediated SMC apoptosis may contribute to the potent inhibitory effects of AT₁ antagonists on vascular hypertrophic remodeling in cardiovascular disorders.

Acknowledgments

This work was supported in part by an establishment grant to Denis deBlois as a scholar from the Fonds de la Recherche en Santé du Québec, a grant from the Medical Research Council of Canada (MRCC; MT-10803), and by Novartis Canada. Bun-Seng Tea holds a studentship from MRCC. We gratefully acknowledge the assistance of Gang He in the RT-PCR studies.

References

1. Timmermans PBMWM, Wong PC, Chiu AT, Herblin WF, Benfield P, Carini DJ, Lee RJ, Wexler RR, Saye JAM, Smith RD. Angiotensin II receptors and angiotensin II receptor antagonists. *Pharmacol Rev.* 1993; 45:205–251.
2. Horiuchi M, Akishita M, Dzau VJ. Recent progress in angiotensin II type 2 receptor research in the cardiovascular system. *Hypertension.* 1999;33:613–621.
3. Pollman MJ, Yamada T, Horiuchi M, Gibbons GH. Vasoactive substances regulate vascular smooth muscle cell apoptosis: countervailing influences of nitric oxide and angiotensin II. *Circ Res.* 1996;79:748–756.
4. Yamada T, Akishita M, Pollman MJ, Gibbons GH, Dzau VJ, Horiuchi M. Angiotensin II type 2 receptor mediates vascular smooth muscle cell apoptosis and antagonizes angiotensin II type 1 receptor action: an in vitro gene transfer study. *Life Sci.* 1998;63:PL289–PL295.
5. Sabri A, Levy BI, Poitevin P, Caputo L, Faggini E, Marotte F, Rappaport L, Samuel JL. Differential roles of AT₁ and AT₂ receptor subtypes in vascular trophic and phenotypic changes in response to stimulation with angiotensin II. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1997;17:257–264.
6. Levy BI, Benessiano J, Henrion D, Caputo L, Heymes C, Duriez M, Poitevin P, Samuel JL. Chronic blockade of AT₂-subtype receptors prevents the effect of angiotensin II on the rat vascular structure. *J Clin Invest.* 1996;98:418–425.
7. Otsuka S, Sugano M, Makino N, Sawada S, Hata T, Niho Y. Interaction of mRNAs for angiotensin II type 1 and type 2 receptors to vascular remodeling in spontaneously hypertensive rats. *Hypertension.* 1998;32:467–472.
8. Li JS, Touyz RM, Schiffrin EL. Effects of AT₁ and AT₂ angiotensin receptor antagonists in angiotensin II-infused rats. *Hypertension.* 1998; 31:487–492.
9. Walter SV, Hamet P. Enhanced DNA synthesis in heart and kidney of newborn spontaneously hypertensive rats. *Hypertension.* 1986;8:520–525.
10. Owens GK. Control of hypertrophic versus hyperplastic growth of vascular smooth muscle cells. *Am J Physiol.* 1989;257(6 pt 2):H1755–H1765.
11. Hadrava V, Kruppa U, Russo RC, Lacourciere Y, Tremblay J, Hamet P. Vascular smooth muscle cell proliferation and its therapeutic modulation in hypertension. *Am Heart J.* 1991;122:1198–1203.
12. Hamet P, Richard L, Dam T-V, Teiger E, Orlov SN, Gaboury L, Gossard F, Tremblay J. Apoptosis in target organs of hypertension. *Hypertension.* 1995;26:642–648.
13. deBlois D, Tea B-S, Dam T-V, Tremblay J, Hamet P. Smooth muscle cell apoptosis during vascular regression in spontaneously hypertensive rats. *Hypertension.* 1997;29:340–349.
14. Campbell DJ, Kladis A, Valentijn AJ. Effects of losartan on angiotensin and bradykinin peptides and angiotensin-converting enzyme. *J Cardiovasc Pharmacol.* 1995;26:233–240.
15. Touyz RM, Endemann D, He G, Li JS, Schiffrin EL. Role of AT₂ receptors in angiotensin II-stimulated contraction of small mesenteric arteries in young SHR. *Hypertension.* 1999;33:366–372.
16. Nakajima M, Hutchinson HG, Fujinaga M, Hayashida W, Morishita R, Zhang L, Horiuchi M, Pratt RE, Dzau VJ. The angiotensin II type 2 (AT₂) receptor antagonizes the growth effects of the AT₁ receptor: gain-of-function study using gene transfer. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1995;92: 10663–10667.
17. Matsubara H. Pathophysiological role of angiotensin II type 2 receptor in cardiovascular and renal diseases. *Circ Res.* 1998;83:1182–1191.
18. Viswanathan M, Tsutsumi K, Correa FMA, Saavedra JM. Changes in expression of angiotensin receptor subtypes in the rat aorta during development. *Biochem Biophys Res Commun.* 1991;179:1361–1367.
19. Keiser JA, Major TC, Lu GH, Davis LS, Panek RL. Is there a functional cardiovascular role for AT₂ receptors? *Drug Dev Res.* 1993;29:94–99.
20. Farhy RD, Carretero OA, Ho K-L, Scicli AG. Role of kinins and nitric oxide in the effects of angiotensin converting enzyme inhibitors on neointima formation. *Circ Res.* 1993;72:1202–1210.
21. Linz W, Scholkens BA. A specific B₂-bradykinin receptor antagonist HOE 140 abolishes the antihypertrophic effect of ramipril. *Br J Pharmacol.* 1992;105:771–772.
22. Liu YH, Yang XP, Sharov VG, Nass O, Sabbah HN, Peterson E, Carretero OA. Effects of angiotensin-converting enzyme inhibitors and angiotensin II type 1 receptor antagonists in rats with heart failure: role of kinins and angiotensin II type 2 receptors. *J Clin Invest.* 1997;99: 1926–1935.
23. Berthiaume N, Hess F, Chen A, Regoli D, D'Orleans-Juste P. Pharmacology of kinins in the arterial and venous mesenteric bed of normal and B₂ knockout transgenic mice. *Eur J Pharmacol.* 1997;333:55–61.
24. Fukuo K, Hata S, Suhara T, Shinto Y, Tsujimoto S, Morimoto S, Ogihara T. Nitric oxide induces upregulation of Fas and apoptosis in vascular smooth muscle. *Hypertension.* 1996;27:823–826.
25. Marcic B, Deddish PA, Jackman HL, Erdos EG. Enhancement of bradykinin and resensitization of its B₂ receptor. *Hypertension.* 1999;33: 835–843.
26. Minshall RD, Erdos EG, Vogel SM. Angiotensin I-converting enzyme inhibitors potentiate bradykinin's inotropic effects independently of blocking its inactivation. *Am J Cardiol.* 1997;80:132A–136A.
27. Boulanger CM. Secondary endothelial dysfunction: hypertension and heart failure. *J Mol Cell Cardiol.* 1999;31:39–49.
28. Bayer IM, Adamson SL, Langille BL. Atrophic remodeling of the artery-cuffed artery. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1999;19:1499–1505.
29. Van Kleef EM, Fingerle J, Daemen MJ. Angiotensin II-induced progression of neointimal thickening in the balloon-injured rat carotid artery is AT₁ receptor mediated. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1996;16: 857–863.
30. deBlois D, Viswanathan M, Su JE, Clowes AW, Saavedra JM, Schwartz SM. Smooth muscle DNA replication in response to angiotensin II is regulated differently in the neointima and media at different times after balloon injury in the rat carotid artery: role of AT₁ receptor expression. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1996;16:1130–1137.
31. Diep QN, Li JS, Schiffrin EL. In vivo study of AT₁ and AT₂ angiotensin receptors in apoptosis in rat blood vessels. *Hypertension.* 1999;34: 617–624.
32. Stoll M, Steckelings UM, Paul M, Bottari SP, Metzger R, Unger T. The angiotensin AT₂-receptor mediates inhibition of cell proliferation in coronary endothelial cells. *J Clin Invest.* 1995;95:651–657.
33. Luscher TF. The endothelium in hypertension: bystander, target or mediator? *J Hypertens.* 1994;12:S105–S116.
34. Nora EH, Munzenmaier DH, Hansen-Smith FM, Lombard JH, Greene AS. Localization of the ANG II type 2 receptor in the microcirculation of skeletal muscle. *Am J Physiol.* 1998;275:H1395–H1403.
35. Safar ME, Laurent S. Behaviour of conduit arteries in hypertension. *Clin Exp Hypertens.* 1993;15:1033–1045.
36. Folkow B. "Structural factor" in primary and secondary hypertension. *Hypertension.* 1990;16:89–101.

Résumé d'article

ARTICLE #5

Nifedipine regulation of cardiovascular growth and apoptosis in SHR and WKY rats

par

Tea B.-S., deBlois D, Hamet P.

Nous avons rapporté que la nifédipine augmente l'apoptose de façon transitoire et précoce dans la régression de l'hypertrophie cardiaque et aortique chez le rat spontanément hypertendu (SHR). Dans cette étude, nous avons examiné : 1) la possibilité qu'un traitement intermittent à la nifédipine puisse résulter en une augmentation répétée de l'apoptose et une réduction continue du contenu en ADN; 2) la relation entre le contenu en ADN cardiovasculaire et l'hypertrophie durant une thérapie à la nifédipine; et 3) les effets différentiels de la nifédipine chez le SHR comparativement au rat normotendu Wistar-Kyoto (WKY). Les rats SHR et WKY ont reçu de la nifédipine (35 mg/kg/jour) de façon continue pendant 1 à 7 semaines ou de façon intermittente durant les deux premières et dernières semaines de la période expérimentale de 7 semaines (n=5 / groupe). Les témoins non-traités ont reçu de la nourriture ordinaire. L'apoptose a été évaluée en mesurant la fragmentation d'ADN oligosomale ou l'activation de la caspase-3. La synthèse d'ADN *in vivo* a été évaluée par l'incorporation de ³H-thymidine durant les 2 dernières heures avant le sacrifice. Chez les SHR traités continuellement, la nifédipine a augmenté la fragmentation d'ADN cardiovasculaire à 1 semaine seulement, alors que la pression sanguine, la synthèse d'ADN et le contenu en ADN cardiovasculaire ont été réduits de façon soutenue pendant les 7 semaines de thérapie. L'interruption de la thérapie à la nifédipine pendant 3 semaines a résulté en un renversement de la baisse de la pression sanguine et la régression de l'hypertrophie cardiovasculaire, alors que la synthèse d'ADN et le contenu en ADN n'ont peu ou pas changé. Un second traitement à la nifédipine a produit une augmentation répétée de la fragmentation d'ADN cardiovasculaire et une régression répétée de l'hypertrophie, alors que la synthèse d'ADN et le contenu en ADN n'ont peu ou pas changé. L'activité de la caspase-3 cardiaque a été augmentée significativement à 1 semaine suivant l'administration de la première thérapie mais pas après la seconde. Chez les rats WKY, l'administration de la nifédipine n'a affecté aucun de ces paramètres. Ainsi, une thérapie intermittente à la nifédipine a induit des épisodes répétés de la fragmentation d'ADN cardiovasculaire. La seconde fenêtre d'apoptose a été plus faible en intensité, suggérant que l'induction de l'apoptose cardiovasculaire par des agents antihypertenseurs soit sous une forte influence homéostatique. L'effet différentiel de la nifédipine sur l'apoptose chez les SHR et WKY représente un phénotype intermédiaire pour des études de pharmacogénétiques dans l'hypertension.

**NIFEDIPINE REGULATION OF CARDIOVASCULAR GROWTH AND APOPTOSIS IN SHR
AND WKY RATS**

Bun-Seng Tea, Denis deBlois¹, Pavel Hamet^{1,2}

Short title: Tea et al – Nifedipine regulation of cardiovascular growth and apoptosis

University of Montreal Hospital Research Center (CHUM)

Departments of Medicine and Pharmacology, University of Montreal

3850 St. Urbain St., Montreal, Quebec H2W 1T8, Canada

Tel. [REDACTED] Fax: (514) 843-2753, email: [REDACTED]

¹ These two authors contributed equally to the manuscript.

² Author for correspondence.

ABSTRACT

Objectives: We previously reported that nifedipine transiently increases apoptosis early during regression of cardiac and aortic hypertrophy in spontaneously hypertensive rats (SHR). In this study, we examined: 1) whether intermittent nifedipine treatment results in a repeated burst of apoptosis and a further reduction in cardiovascular DNA content; 2) the relationships between cardiovascular DNA content and hypertrophy during nifedipine therapy; and 3) the differential effects of nifedipine in SHR and normotensive Wistar-Kyoto (WKY) rats. **Methods:** Starting at 16 weeks of age, SHR and WKY rats were given regular chow or nifedipine ($35 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{day}^{-1}$ in chow) either continuously for 1 to 7 weeks, or intermittently during the first and last 2 weeks of the 7-week experimental period ($n=5$ rats per group). Apoptosis was evaluated by oligosomal DNA fragmentation. DNA synthesis *in vivo* was evaluated by ^3H -thymidine incorporation 1-2 hours before sacrifice. Blood pressure was measured by the tail-cuff method. **Results:** In continuously treated-SHR, nifedipine increased cardiovascular DNA fragmentation at 1 week only, while blood pressure, cardiovascular DNA synthesis and cardiovascular DNA content were reduced sustainly over 7 weeks. Interruption of nifedipine therapy for 3 weeks resulted in the reversal of reduced blood pressure and cardiovascular hypertrophy regression, while DNA synthesis and DNA content showed little or no change. The second nifedipine treatment caused a repeated increase in cardiovascular DNA fragmentation and a repeated regression of hypertrophy, while DNA synthesis and DNA content showed little or no change. In WKY rats, nifedipine administration did not affect any of the above parameters. **Conclusions:** Cardiovascular apoptosis was associated with the initiation of nifedipine therapy in SHR. The lack of further DNA reduction with repeated nifedipine therapy, however, suggests that cardiovascular apoptosis induction by anti-hypertensive drugs is under strong homeostatic regulation. The differential effect of nifedipine on apoptosis in SHR and WKY represents a novel intermediary phenotype for future pharmacogenetic studies in hypertension.

Discipline: Experimental; **Object of study:** Heart, Vasculature; **Level:** organ; **Field of study:** Pathophysiology, Pharmacology;

Keywords: hypertension; anti-hypertensive agents; apoptosis; hypertrophy; rats, inbred SHR

INTRODUCTION

Increased cardiovascular mass is associated with the pathogenesis of hypertension and may contribute to the maintenance of the disease.¹⁻³ Because DNA content is a potential determinant of cardiovascular mass,⁴ the regulation of DNA synthesis and degradation is a potential therapeutic target for the control of hypertension and its sequelae.⁵ However, the regulation of cell growth and apoptosis (programmed cell death) remains poorly understood⁶, particularly during antihypertensive therapy⁷.

The spontaneously hypertensive rat (SHR) model of high blood pressure shows dysregulated cardiovascular cell growth and apoptosis at birth and throughout life.⁷⁻¹⁴ Recent studies revealed that regression of cardiovascular hypertrophy with anti-hypertensive medication in SHR implicates a modulation of the cardiovascular cell growth - cell death balance.^{12,13,15-18} Moreover, cardiovascular apoptosis regulation is not a secondary response to blood pressure reduction with anti-hypertensive therapy.^{12,15,18} We first observed that cell death by apoptosis is increased as a transient burst early (at 1 week) during the regression of cardiac and aortic hypertrophy in adult SHR treated with specific antihypertensive drugs, including the calcium channel blocker nifedipine.^{15,18} In contrast to apoptosis, nifedipine suppression of DNA synthesis in aortic smooth muscle cell (SMC) is sustained and occurs after the time window of apoptosis, suggesting dissociation between these two parameters *in vivo*.¹⁵ We previously observed a time window of apoptosis also at the onset of cardiac hypertrophy due to aortic coarctation in the rat¹⁹, suggesting that early and transient induction of apoptosis may be a significant component of cardiovascular remodeling.

Our initial observations in SHR raised several questions regarding the regulation and significance of apoptosis in hypertensive organs. The present study was thus designed to address the following issues. First, considering that nifedipine induces a time window of apoptosis early after an initial treatment, it is unclear whether intermittent nifedipine treatment results in repeated apoptotic responses, and if so, whether this results in a further reduction of cardiovascular DNA content. Second, the relationship between cardiovascular DNA content and hypertrophy remains poorly understood. If hypertension is re-established following nifedipine withdrawal, it is unclear whether organ DNA loss will be maintained, and if so, whether regression of cardiovascular hypertrophy will be maintained. Finally, we sought to

determine whether nifedipine regulates cell growth and survival in the normotensive Wistar-Kyoto (WKY) rat strain.

METHODS

Animal and surgical procedures

The investigations conform with the *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals* published by the National Institute of Health (NIH Publication No. 85-23, revised 1996). Male SHR and WKY rats used in this study were purchased from Charles-River (St-Constant, Que) and housed for at least 10 days before initiation of drug treatment at 16 weeks of age. Food and water were administered *ad libitum*. Treated rats received nifedipine ($35 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{day}^{-1}$) in the powdered food either continuously for 1, 2, 5 or 7 weeks, or intermittently, i.e. nifedipine administration was interrupted after 2 weeks and reinitiated 3 weeks thereafter for an additional 1 or 2 weeks ($n=5$ per group). Untreated controls received regular powdered chow and were studied at 0 and 7 weeks. A group of rats ($n=5$) was also studied at the end of the 3 week treatment interruption period. Systolic blood pressure was determined in conscious restrained rats by the tail-cuff method using a photoelectric tail pulse detector (IITC, Landing, NJ) as we previously described¹⁵. Pressure measurements were made at weekly intervals during treatment and at least 2 days before animal sacrifice to avoid interfering with cardiovascular growth. To evaluate DNA synthesis *in vivo*, rats received an intra-peritoneal injection of ^3H -thymidine ($0.5 \text{ mCi} \cdot \text{kg}^{-1}$, New England Nuclear, Mississauga, Canada) 1 to 2 hours before sacrifice. To rule out the possibility that drug-induced changes in DNA specific activity ($\text{cpm} \cdot 100 \mu\text{g}^{-1} \text{ DNA}$) resulted from changes in tissue uptake of thymidine, the specific activity of whole cardiac or aortic homogenate ($\text{cpm} \cdot \text{mg}^{-1} \text{ protein}$) was also measured. Rats were anesthetized with a single intra-muscular injection of ketamine ($80 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$; Ayerst, Guelph, Canada), xylazine ($4 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$; Bayer, Etobicoke, Canada), and acepromazine ($2 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$; Ayerst, Montreal, Canada), and killed by perfusion of 200 mL isotonic saline via the abdominal aorta and draining via the jugular vein. The thoracic aorta was isolated between the diaphragm and the first intercostal artery and cleaned of fat and adventitial connective tissue before measuring its length and wet weight. The endothelium was scrapped off the aortic intima with a cotton tip applicator in order to measure DNA dynamics specifically the SMC. The heart was isolated and both atria were removed before measuring cardiac weight. The aorta:body weight ratio and heart:body weight ratio were calculated and used as index

of cardiovascular mass. We have previously shown that changes in aortic : body weight ratio reflect changes in aortic cross-sectional area.¹⁵ The aorta media and the heart were snap frozen in liquid nitrogen and kept at -80°C until further processing.

Cardiovascular DNA analyses

Programmed cell death occurring via apoptosis is characterized by extensive internucleosomal degradation of DNA into multiples of 180 bp fragments a result of endogenous endonuclease activation. This pattern of DNA fragmentation appears as a "DNA ladder" following gel electrophoresis of extracted DNA. Frozen tissues were pulverized in liquid nitrogen and processed as previously described for DNA extraction¹⁵. Briefly, aliquots of frozen tissue powder were weighed and incubated in buffer containing 20 mM ethylenediamine tetracetic acid (EDTA), 50 mM Tris-HCl (pH 8.0), 0.5% sodium dodecyl sulfate (SDS) and 500 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ Proteinase K for 3 hours at 50°C, and treated with RNase A (Final concentration: 250 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) for 1 hour at 37°C. After extraction with phenol and chloroform, DNA was precipitated with cold ethanol 100% and resuspended in deionized H₂O. DNA concentration was determined by spectrophotometry and DNA content per mg of tissue powder was calculated.

One μg of extracted DNA was labeled by enzymatic assay, using terminal deoxynucleotidyl transferase (Tdt, Gibco BRL, Grand Island, NY). DNA was labeled in buffer containing 2 mM CoCl₂, 0.5 mM DTT, 100 mM potassium cacodylate, 166 μM ³²P-dCTP (3000 Ci $\cdot\text{mmol}^{-1}$, Amersham, Oakville, ON), and 20 units of Tdt. The samples were incubated for 60 min. at 37°C. The following quantities of labeled DNA were loaded on 1.5% agarose gel: 0.025 mg, 0.05 mg, 0.1 mg, 0.2 mg and 0.4 mg. DNA was then subjected to electrophoresis at 90V for 3.5 hours, transferred onto Hybond N⁺ nylon membrane (Amersham, Oakville, ON), exposed to a phosphor-sensitive screen and analyzed with a PhosphorImager system (Molecular Dynamics, Sunnyvale, CA). One μg of standard DNA molecular weight (λ DNA/Hind III fragments, Gibco BRL) underwent radiolabeling, electrophoresis, and transfer at the same time as the extracted DNA to control the variability in the procedure and to increase reproducibility. The optical density of each line was calculated for the region between 150 to 1500 bp and then divided by the value obtained by the standard DNA molecular weight in the same base pair length. As previously reported¹⁵, the slope obtained by plotting the average optical density versus the DNA concentrations loaded was quantified and the value obtained was defined as the DNA fragmentation index, indicative of

apoptosis for each sample. Cleavage of DNA into large fragments (e.g. 20 to 50 kbps) at the site of attachment to scaffold proteins has also been described in cells undergoing apoptosis. Therefore radiolabeling was also quantified for DNA fragments of 20 to 30 kilobase pairs, as described above. To evaluate cardiovascular DNA synthesis, the *in vivo* incorporation of ^3H -thymidine into the aortic media or cardiac ventricles was quantified by measuring the specific activity of the extracted DNA. Only DNA specific activity was measured because we have shown previously that nifedipine treatment did not affect the uptake of ^3H -thymidine into the aortic or the cardiac tissue.^{15,18}

Statistics

Data were analyzed by analysis of variance (ANOVA) and unpaired Student's t-test with Bonferroni correction for multiple comparisons. Data obtained from treated animals were compared to control (untreated group) values at Weeks 0 or 7. Values are presented as mean \pm SEM, and $P < .05$ was considered statistically significant.

RESULTS

Figure 1 shows the evolution of systolic blood pressure in control and nifedipine-treated rats. WKY rats were normotensive at the beginning and end of the study, and showed no significant blood pressure response to nifedipine given continuously or intermittently (Figure 1A). All SHR were hypertensive before initiation of therapy, and their systolic blood pressure showed further increase in the absence of treatment (Figure 1B). Continuous nifedipine administration to SHR reduced blood pressure progressively over 7 weeks, with a significant effect within 1 week of treatment. In SHR withdrawn from treatment after 2 weeks, blood pressure returned to control (untreated group) levels within 2 weeks. When nifedipine was reintroduced after the 3-week interruption period, there was a significant reduction in blood pressure within 1 week, although values remained higher than in continuously treated-SHR at the end of the experimental period.

Pre-treatment values of body weight were 304+9 g (n=42) in SHR and 367+5 g (n=42) in WKY rats. All rats gained weight during the experimental period but final values of body weight were similar between corresponding untreated and treated groups at 7 weeks (not shown). Powdered food consumption (vehicle for nifedipine) was not different between treated and untreated groups (not shown).

Effects of nifedipine on the heart

In the present study, changes in oligonucleosomal DNA fragmentation was used to detect the induction of apoptosis, ³H-thymidine incorporation 1-2 hours before sacrifice was used to evaluate DNA synthesis *in vivo*. The heart:body weight ratio and the aortic mass per unit length were used as indexes of cardiovascular mass. During the 7-week experimental period, the heart of untreated WKY rats showed minimal changes in DNA fragmentation index, DNA content or mass index, while DNA synthesis showed a tendency to decrease. In this strain, nifedipine had no significant effect on cardiac DNA dynamics, cardiac mass index (Figure 2). In untreated SHR, there were minimal changes in DNA synthesis, DNA content or mass index, while DNA fragmentation showed a tendency to decrease over 7 weeks (Figure 3). With continuous nifedipine therapy in SHR, DNA fragmentation was significantly increased at 1 week only, while DNA synthesis was reduced maximally as early as 1 week and on. Cardiac DNA content showed a marked reduction at 1 week and no reduction thereafter. SHR cardiac mass index was reduced significantly after 2

weeks of nifedipine with no further change thereafter. Following withdrawal from nifedipine for 3 weeks, SHR cardiac DNA fragmentation remained unchanged or slightly decreased, while DNA synthesis, organ mass index and to a lesser extent DNA content showed a tendency to increase back to pre-treatment values. When nifedipine was reintroduced after the 3-week interruption period, there was a significant increase in DNA fragmentation at 1 week only. Cardiac mass index showed a decrease towards values seen in continuously treated-SHR, while there was no significant change in DNA synthesis and DNA content at the end of the experimental period. Overall, nifedipine treatment in SHR reduced their increased cardiac DNA content, DNA synthesis and mass index down to levels seen in WKY rats. However, the cardiac DNA fragmentation index remained noticeably lower in SHR (~7% at 7 weeks) as compared to WKY rats, even following nifedipine therapy. In contrast, cardiac accumulation of larger (20 to 30 kbp) DNA fragments was similar between SHR and WKY rats (5.3 ± 2.1 and 6.9 ± 2.5 arbitrary units $\bullet \mu\text{g}^{-1}$ DNA, respectively), and this parameter was not affected by nifedipine therapy (not shown).

Effects of nifedipine on the aorta

Over 7 weeks, the aorta of untreated WKY showed minimal changes in DNA synthesis, DNA content or mass index, while the DNA fragmentation index showed a tendency to decrease (Table 1). In this strain, continuous or intermittent nifedipine therapy had no significant effect on aortic DNA dynamics or aortic mass index. In untreated SHR, there were minimal changes in DNA synthesis, DNA content or DNA fragmentation, while the aortic mass index showed a tendency to increase over 7 weeks (Table 2). Nifedipine had significant anti-trophic effects in the SHR aorta, where changes were relatively similar to those seen in the SHR heart, with minor differences. With continuous administration of nifedipine, aortic DNA fragmentation was significantly increased at 1 week only, while DNA synthesis showed significant reduction at 2 week of treatment and thereafter. As result, aortic DNA content showed a marked reduction at 2 weeks and no reduction thereafter. Aortic mass index was reduced significantly after 2 weeks of nifedipine with no further change thereafter. Following withdrawal from nifedipine for 3 weeks, aortic DNA fragmentation, DNA synthesis and DNA content remained suppressed as compared to pre-treatment values. In contrast, aortic mass index was increased back to levels seen in untreated rats. When nifedipine was reintroduced after the 3-week interruption period, there was a significant increase in DNA fragmentation at 1 week only while there was no significant change in DNA synthesis and DNA content

within 2 weeks. In contrast, aortic mass index showed a significant decrease within 1 week of nifedipine re-administration. Overall, nifedipine treatment in SHR reduced their increased aortic DNA content and mass index down to levels seen in WKY rats. At 16 to 23 weeks of age, SHR exhibited lower aortic DNA synthesis as compared to WKY rats and this parameter was lowered further with nifedipine administration. In contrast, the DNA fragmentation index at the beginning of the experimental period was lower in SHR than WKY rats. After 7 weeks, however, the DNA fragmentation index was similar between SHR and WKY rats even in animals receiving nifedipine therapy. Aortic accumulation of larger (20 to 30 kbp) DNA fragments was also similar between SHR and WKY rats (5.8 ± 1.5 and 6.6 ± 2.5 arbitrary units $\cdot \mu\text{g}^{-1}$ DNA, respectively), and this parameter was not affected by nifedipine therapy (not shown).

DISCUSSION

Regulation of cardiovascular apoptosis

In the present study, we observed a significant and transient increase in cardiac and aortic DNA fragmentation at 1 week of continuous nifedipine administration in SHR. This increase was accompanied by a reduction in DNA content in the heart (at 1 week) and aorta (at 2 weeks). Even though nifedipine treatment was maintained for 7 weeks, the DNA fragmentation index returned to basal levels at 2 weeks and remained unchanged thereafter. Following the initial burst of DNA fragmentation and loss of DNA at 1-2 weeks, no further reduction in DNA content was observed. Taken together, these data confirm our previous observations that nifedipine induces a time window of cardiovascular apoptosis during the early days of therapy in SHR.^{15,18} We previously showed that DNA content correlates with cell number in the aortic media, strongly suggesting that apoptosis occurred in SMC.¹⁵ The cell type undergoing apoptosis in the heart with nifedipine is not identified at this time. However, we recently observed that inhibitors of the angiotensin II pathway (valsartan, enalapril) induced apoptosis selectively in non-cardiomyocytes in the SHR heart (deBlois et al, unpublished results). As an extension, we hypothesize that a similar mechanism may contribute to the suppression of myocardial hypertrophy and fibrosis, as seen in hypertensive patients or SHR treated with calcium channel blockers.²⁰⁻²²

In contrast to continuous treatment, an intermittent schedule of nifedipine therapy resulted in a repeated wave of cardiovascular DNA fragmentation. Similar to the initial wave, the second wave of DNA fragmentation was transient and observed at 1 week of nifedipine. These data suggest an association between initiation of nifedipine therapy and induction of apoptosis in the SHR heart and aorta. Following re-initiation of nifedipine therapy, however, cardiovascular DNA content showed no significant reduction. As discussed below, these data suggest that the second wave of apoptosis was of smaller magnitude. In contrast to the small DNA fragments, generation of the larger DNA fragments (20 to 30 kbps) was not different between control and untreated SHR, suggesting differential regulation of DNA cleavage into small and large fragments during nifedipine-induced apoptosis.

Cardiovascular apoptosis was increased concomitantly with significant blood pressure reduction at 1 week of continuous or repeated nifedipine therapy. Moreover, nifedipine did not affect blood pressure or

cardiovascular apoptosis in WKY rats. Thus, the present data does not allow us to clearly dissociate the pro-apoptotic and antihypertensive effects of nifedipine. However, we previously reported that antihypertensive treatment with hydralazine does not affect cardiovascular apoptosis, DNA synthesis or DNA content in SHR,^{15,18} suggesting that apoptosis is not a secondary response to blood pressure reduction in the present model. Diez et al¹² also reported that cardiomyocyte apoptosis in SHR is dissociable from blood pressure regulation. Finally, the full re-establishment of hypertension in SHR withdrawn from nifedipine for 3 weeks (present study) did not affect the cardiovascular DNA fragmentation index, further suggesting dissociation between blood pressure and apoptosis.

Two non-exclusive explanations may be proposed to explain the “tachyphylactic” nature of cardiovascular DNA reduction in nifedipine-treated SHR. Nifedipine may cause the depletion of a cell sub-population at a higher risk of undergoing apoptosis. It is known that SHR show a greater frequency of polyploid cells in the heart and aorta.⁴ The antihypertensive treatments that normalize cardiovascular polyploidy^{23,24} also induce cardiovascular apoptosis in SHR.¹⁵ Thus, candidate cells for preferential apoptosis induction may include polyploid cells. Alternatively, apoptotic cells may render neighboring cells more resistant to apoptosis, e.g. as a result of apoptotic body ingestion by viable cells. Further studies are needed to test these hypotheses.

Methodological considerations for apoptosis measurement in vivo

In vivo apoptosis is a complex and elusive phenomenon that is best assessed by comparing multiple related parameters. These include reduction in organ DNA content, which reveals the magnitude but not the mechanism of cell death, and oligonucleosomal DNA fragmentation, which suggests apoptosis induction but does not provide information on the magnitude of the response. Studies in the nematode *C. elegans* revealed that death by apoptosis and removal of apoptotic bodies are regulated by different genes.²⁵⁻²⁷ Thus, one limitation of the DNA fragmentation index is that it depends on the production as well as post-mortem removal of DNA fragments in tissues. Moreover, the DNA fragmentation index depends not only on the number of apoptotic cells but also on the degree of fragmentation of the cellular DNA. If cells undergoing apoptosis produce smaller DNA fragments, this will increase the DNA fragmentation index (which relies on the specific, tdt-mediated, 3'-OH end labeling of oligosomal DNA fragments in the 150 to 1500 bps length range). Alterations in one or many of these processes, e.g.,

production of smaller DNA fragments or slower rates of DNA fragment elimination may account for the presence of a strong DNA fragmentation index without significant loss of DNA, as observed following the second nifedipine treatment in SHR. Based on the lack of significant drop in DNA content after the repeated nifedipine administration, we suggest that the second time window of apoptosis induced by intermittent nifedipine therapy was shorter/weaker. A better, albeit possibly less sensitive, indicator of ongoing apoptosis at the time of tissue isolation may be the detection of activated caspases, a class of enzymes involved as effectors of the cell death program early in the process of apoptosis in several cell types,²⁸ including in the heart following ischemia-reperfusion.²⁹ Consistent with this interpretation, in preliminary studies we detected an increase in cardiac caspase-3 activity in SHR after 1 week during the initial but not repeated nifedipine administration schedule (deBlois et al, unpublished results).

Regulation of DNA synthesis in SHR

In the aorta, apoptosis induction occurred earlier than DNA synthesis inhibition (i.e. at 1 and 2 weeks, respectively). Sustained inhibition of cardiovascular DNA synthesis was observed even at 3 weeks following interruption of treatment. This was most evident in the aorta. Thus, consistent with our previous observations,¹⁵ these data suggest that regulation of cardiovascular DNA synthesis and degradation may be dissociated *in vivo*. DNA synthesis in the heart and aorta could also be dissociated from blood pressure regulation, at least within the 3-week treatment interruption, because full re-induction of hypertension resulted in no or weak re-stimulation of cardiovascular DNA synthesis. Finally, DNA synthesis was noticeably higher in the heart than in the aorta in SHR (a feature also seen in WKY rats). We speculate that DNA synthesis in the heart may reflect the ongoing growth of fibroblasts leading to progressive cardiac fibrosis with aging.

Regulation of cardiovascular mass in SHR

A large body of evidence suggest that hypertension involves proliferative disorders with primary and secondary components.^{2,7} In the present study, we have examined the relationships between mass and DNA content in the heart and aorta as affected by anti-hypertensive therapy. Several lines of evidence suggest dissociation between these tissue parameters. First, cardiac DNA content was reduced maximally at 1 week, i.e. before significant regression of cardiac hypertrophy was achieved at 2 weeks. Second, the regression of cardiovascular hypertrophy was loss within 3 weeks after interruption of nifedipine

treatment, while DNA content remained suppressed, particularly in the aorta. The dissociation between cardiovascular mass and DNA content may reflect different rates of DNA synthesis/degradation versus extracellular matrix accumulation or cell size regulation. Importantly, the present data do not support the hypothesis that reducing DNA content prevents the re-induction of cardiovascular hypertrophy with hypertension. This may be relevant to the issue of low compliance during nifedipine therapy, insofar as normalization of cardiovascular hypertrophy, and possibly reduction of target organ damage, may be less than optimal with intermittent anti-hypertensive treatment. Whether cardiovascular function, e.g., tissue contractility or compliance, is affected by DNA loss remains to be determined. In this regard, it will be important to identify the type of cell undergoing drug-induced apoptosis, e.g., cardiomyocytes vs non-cardiomyocytes or diploid vs polyploid cells.

Comparisons between SHR and WKY

A growing body of evidence suggests that the modulation of growth and apoptosis during the course of life is altered in hypertension. In newborn SHR, reduced levels of DNA fragmentation and increased rates of DNA synthesis leading to increased DNA content have been described in the heart or aorta.^{8,14} Cardiovascular cells from adult SHR exhibit increased DNA synthesis and a shorter cell cycle.⁷ Cardiac DNA fragmentation in SHR is increased during the period of high blood pressure development at 8 weeks of age but not at later stages of life.^{11,30} At the cellular level, however, cardiomyocyte apoptosis is increased in aging SHR as compared to WKY rats.^{31,32} In the present study, it is noteworthy that the cardiac DNA fragmentation index was greater in WKY rats than SHR. This is in apparent contradiction with the stability of the DNA content in the WKY heart. Moreover, cardiac DNA synthesis in WKY rats was not increased as a possible compensatory mechanism for apoptosis. As discussed above, production of smaller DNA fragments or slower rates of DNA fragment elimination may account for the greater DNA fragmentation index in WKY versus SHR heart. Thus, it is possible that the DNA fragmentation index overestimates the SHR/WKY difference in ongoing cardiac apoptosis at that age. In contrast to the small DNA fragments, generation of the larger DNA fragments (20 to 30 kbps) was not different between SHR and WKY rats, suggesting differential processing of DNA fragments between these two strains. Whatever the underlying causes for the difference in the DNA fragmentation index, untreated SHR clearly showed an overall pattern of increased cardiovascular growth, with enhanced DNA synthesis, increased DNA

content, organ hypertrophy and similar or lower accumulation of DNA fragments as compared to WKY rats.

Aortic SMC from SHR show greater apoptosis upon growth factor withdrawal *in vitro*.^{11,33,34} The present study extends these findings by showing that SHR cells also show a greater propensity to undergo apoptosis in response to an anti-trophic stimulus *in vivo*, as compared to WKY. The lack of effect of nifedipine on WKY blood pressure, cardiovascular mass or DNA dynamics further implicates the dysregulation of cell growth and apoptosis in the hypertensive syndrome, although further studies are needed to better understand the causal relationships with high blood pressure. We propose that a component of the proliferative disorder in hypertension is genetically derived and possibly involved in the pathogenesis of the disease, including neonatal hyperplasia and apoptosis suppression. Additional components are clearly secondary to blood pressure, although they may be under control of genes of susceptibility to high blood pressure.^{35,36}

Summary

We have used two complementary parameters (oligonucleosomal DNA fragmentation coupled with the reduction in cardiac or aortic DNA content) to conclude that apoptosis induction was associated with the initiation of nifedipine therapy in SHR. However, DNA reduction was more important after initial than repeated therapy, suggesting that apoptosis induction by anti-hypertensive drugs is under strong homeostatic regulation. Moreover, the SHR/WKY difference in nifedipine effect suggests that apoptosis induction represents a novel intermediary phenotype for future pharmacogenetic studies aimed at discovering genes regulating the response to drug treatment in hypertension.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by grants from the Medical Research Council of Canada (MT-10803) and from Bayer Canada. D. D. is a Scholar from the Fonds de la Recherche en Santé du Québec. B.-S. Tea holds a studentship from the Medical Research Council of Canada.

REFERENCES

1. Folkow, B. "Structural factor" in primary and secondary hypertension. *Hypertension* **16**, 89-101 (1990).
2. Hamet, P, Tremblay, J, Pang, SC, Walter, SV & Wen, YI. Primary versus secondary events in hypertension. *Can J Physiol Pharmacol* **63**, 380-386 (1985).
3. Lee, RMKW & Smeda, JS. Primary versus secondary structural changes of the blood vessels in hypertension. *Can J Physiol Pharmacol* **63**, 392-401 (1985).
4. Owens, GK. Control of hypertrophic versus hyperplastic growth of vascular smooth muscle cells. *Am J Physiol* **257(6Pt2)**, H1755-H1765 (1989).
5. Hamet, P, deBlois, D, Dam, T-V, Richard, L, Teiger, E, Tea, B-S et al. Apoptosis and vascular wall remodeling in hypertension. *Can J Physiol Pharmacol* **74(7)**, 850-861 (1996).
6. Thompson, CB. Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. *Science* **267**, 1456-1462 (1995).
7. Hamet, P. Proliferation and apoptosis in hypertension. *Curr Opin Nephrol Hypertens* **4**, 1-7 (1995).
8. Walter, SV & Hamet, P. Enhanced DNA synthesis in heart and kidney of newborn spontaneously hypertensive rats. *Hypertension* **8**, 520-525 (1986).

9. Hadrava, V, Tremblay, J & Hamet, P. Abnormalities in growth characteristics of aortic smooth muscle cells in spontaneously hypertensive rats. *Hypertension* **13**, 589-597 (1989).
10. Lee, RM, Owens, GK, Scott-Burden, T, Head, RJ, Mulvany, MJ & Schiffrin, EL. Pathophysiology of smooth muscle in hypertension. [Review]. *Can J Physiol Pharmacol* **73**, 574-584 (1995).
11. Hamet, P, Richard, L, Dam, T-V, Teiger, E, Orlov, SN, Gaboury, L et al. Apoptosis in target organs of hypertension. *Hypertension* **26**, 642-648 (1995).
12. Diez, J, Panizo, A, Hernandez, M, Vega, F, Sola, I, Fortuno, MA et al. Cardiomyocyte apoptosis and cardiac angiotensin-converting enzyme in spontaneously hypertensive rats. *Hypertension* **30**, 1029-1034 (1997).
13. Diez, J, Panizo, A, Hernandez, M & Pardo, J. Is the regulation of apoptosis altered in smooth muscle cells of adult spontaneously hypertensive rats? *Hypertension* **29**, 776-780 (1997).
14. Moreau, P, Tea, BS, Dam, TV & Hamet, P. Altered balance between cell replication and apoptosis in hearts and kidneys of newborn SHR. *Hypertension* **30**, 720-724 (1997).
15. deBlois, D, Tea, B-S, Dam, T-V, Tremblay, J & Hamet, P. Smooth muscle cell apoptosis during vascular regression in spontaneously hypertensive rats. *Hypertension* **29**, 340-349 (1997).
16. Sharifi, AM & Schiffrin, EL. Apoptosis in aorta of deoxycorticosterone acetate-salt hypertensive rats: effect of endothelin receptor antagonism. *JHypertens* **15**, 1441-1448 (1997).
17. 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* **11**, 1108-1116 (1998).
18. Tea, B-S, Dam, T-V, Moreau, P, Hamet, P & deBlois, D. Apoptosis during regression of cardiac hypertrophy in spontaneously hypertensive rats: temporal regulation and spatial heterogeneity. *Hypertension* **(In press)** (1999).

19. Teiger, E, Dam, TV, Richard, L, Wisnewsky, C, Tea, BS, Gaboury, L et al. Apoptosis in pressure overload-induced heart hypertrophy in the rat. *JClinInvest* **97**, 2891-2897 (1996).
20. Vogt, M & Strauer, BE. Response of hypertensive left ventricular hypertrophy and coronary microvascular disease to calcium antagonists. *Am J Cardiol* **76**, 24D-30D (1995).
21. Campbell, SE, Turek, Z, Rakusan, K & Kazda, S. Cardiac structural remodelling after treatment of spontaneously hypertensive rats with nifedipine or nisoldipine. *Cardiovasc Res* **27**, 1350-1358 (1993).
22. Strauer, BE & Schwartzkopff, B. Objectives of high blood pressure treatment: left ventricular hypertrophy, diastolic function, and coronary reserve. *Am J Hypertens* **11**, 879-881 (1998).
23. Devlin, AM, Gordon, JF, Davidson, AO, Clark, JS, Hamilton, CA, Morton, JJ et al. The effects of perindopril on vascular smooth muscle polyploidy in stroke-prone spontaneously hypertensive rats. *JHypertens* **13**, 211-218 (1995).
24. Dominiczak, AF, Devlin, AM, Lee, WK, Anderson, NH, Bohr, DF & Reid, JL. Vascular smooth muscle polyploidy and cardiac hypertrophy in genetic hypertension. *Hypertension* **27**, 752-759 (1996).
25. Wu, YC & Horvitz, HR. The *C. elegans* cell corpse engulfment gene *ced-7* encodes a protein similar to ABC transporters. *Cell* **93**, 951-960 (1998).
26. Wu, YC & Horvitz, HR. *C. elegans* phagocytosis and cell-migration protein CED-5 is similar to human DOCK180 [see comments]. *Nature* **392**, 501-504 (1998).
27. Horvitz, HR. Genetic control of programmed cell death in the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Cancer Res* **59**, 1701s-1706s (1999).
28. Porter, AG & Janicke, RU. Emerging roles of caspase-3 in apoptosis. *Cell Death Differ* **6**, 99-104 (1999).
29. Yaoita, H, Ogawa, K, Maehara, K & Maruyama, Y. Attenuation of ischemia/reperfusion injury in rats by a caspase inhibitor. *Circulation* **97**, 276-281 (1998).

30. Hamet, P, Moreau, P, Dam, T-V, Orlov, SN, Tea, B-S, deBlois, D et al. The time window of apoptosis: a new component in the therapeutic strategy for cardiovascular remodeling. *JHypertens* **14** (Suppl 5), S65-S70 (1996).
31. Diez, J, Fortuno, MA & Ravassa, S. Apoptosis in hypertensive heart disease. *Curr Opin Cardiol* **13**, 317-325 (1998).
32. Li, Z, Bing, OH, Long, X, Robinson, KG & Lakatta, EG. Increased cardiomyocyte apoptosis during the transition to heart failure in the spontaneously hypertensive rat. *Am J Physiol* **272**, H2313-H2319 (1997).
33. Tagami, M, Yamagata, K, Nara, Y, Fujino, H, Kubota, A, Numano, F et al. Ultrastructural analysis of survival in cultured smooth muscle cells isolated from stroke-prone spontaneously hypertensive rats: effect of growth factors. *Cell Tissue Res* **285**, 205-215 (1996).
34. Champagne, MJ, Dumas, P, Orlov, SN, Bennett, MR, Hamet, P & Tremblay, J. Protection against necrosis but not apoptosis by heat-stress proteins in vascular smooth muscle cells: evidence for distinct modes of cell death. *Hypertension* **33**, 906-913 (1999).
35. Hamet, P, Kaiser, MA, Sun, Y, Page, V, Vincent, M, Kren, V et al. HSP27 locus cosegregates with left ventricular mass independently of blood pressure. *Hypertension* **28**, 1112-1117 (1996).
36. Lodwick, D, Kaiser, MA, Harris, J, Privat, P, Vincent, M, Sassard, J et al. Failure of the heat-shock protein 70 locus to cosegregate with blood pressure in spontaneously hypertensive rat x Wistar-Kyoto rat cross. *J Hypertens* **11**, 1047-1051 (1993).

LEGENDS:

Figure 1. Line graph showing systolic blood pressure regulation over 7 weeks in SHR and WKY rats during continuous or intermittent nifedipine administration ($35 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{day}^{-1}$) and in untreated rats. Intermittent therapy consisted in 2 weeks of nifedipine followed by 3 weeks of placebo and then another 2 weeks of nifedipine. Systolic pressure was measured by tail-cuff plethysmography as described in Methods. Values are mean + SEM ($n= 5$ rats per group).

* Significant difference ($P<.05$) between untreated and treated (continuous or intermittent nifedipine) rats at the corresponding time point, by ANOVA followed by Student's *t* test with Bonferroni correction for multiple comparisons.

Figure 2. Line graphs showing the effects of continuous or intermittent nifedipine treatment ($35 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{day}^{-1}$) on cardiac DNA fragmentation, synthesis, content and mass in WKY rats. Untreated rats received placebo. Intermittent therapy consisted in 2 weeks of nifedipine followed by 3 weeks of placebo, followed by 2 weeks of nifedipine. The DNA fragmentation index, indicative of apoptosis, cardiac DNA synthesis, DNA content and mass index were evaluated as described in Methods. Values are mean \pm SEM ($n= 5$ rats per group). * No significant difference was detected between treated and untreated rats (at Weeks 0 or 7), by ANOVA followed by Student's *t* test with Bonferroni correction for multiple comparisons.

Figure 3. Line graphs showing the effects of continuous or intermittent nifedipine treatment ($35 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{day}^{-1}$) on cardiac DNA fragmentation, synthesis, content and mass in SHR. Untreated rats received placebo. Intermittent therapy consisted in 2 weeks of nifedipine followed by 3 weeks of placebo, followed by 2 weeks of nifedipine. The DNA fragmentation index, indicative of apoptosis, aortic DNA synthesis, DNA content and mass index were evaluated as described in Methods. Values are mean \pm SEM ($n= 5$ rats per group). * Significant difference ($P<.05$) between treated and untreated rats at Weeks 0 or 7, by ANOVA followed by Student's *t* test with Bonferroni correction for multiple comparisons.

Figure 4. Line graphs showing the effects of continuous or intermittent nifedipine treatment (35 mg/kg/day) on caspase-3 activity in SHR hearts. Untreated SHR received placebo. Intermittent therapy consisted in 2 weeks of nifedipine followed by 3 weeks of placebo, followed by 2 weeks of nifedipine. Caspase-3 activity was evaluated in cardiac by cleavage of the specific substrate DEVD-AMC, as described in Methods. Values are mean \pm SEM (n= 5 rats/group). * Significant difference (P<.05) between treated and untreated rats at Weeks 0 or 7, by ANOVA followed by Student's *t* test with Bonferroni correction for multiple comparisons.

Figure 1

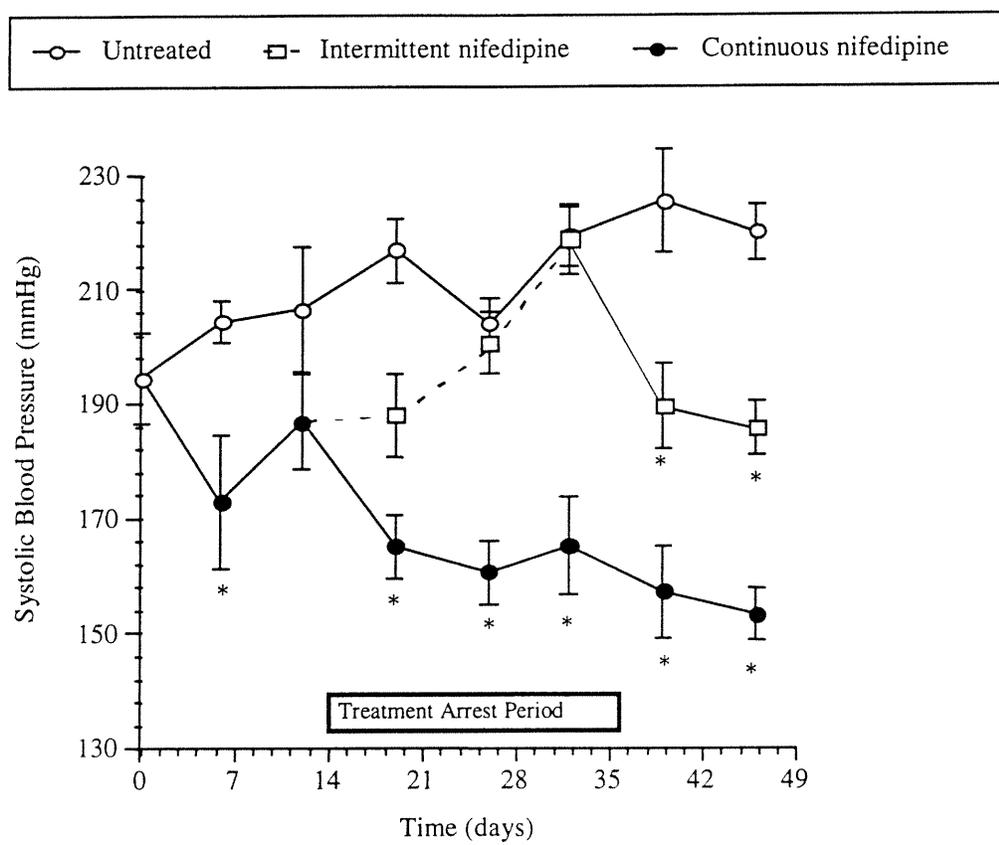
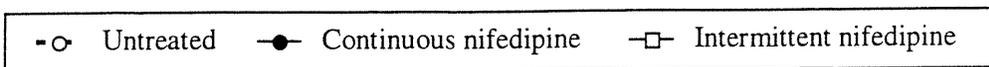
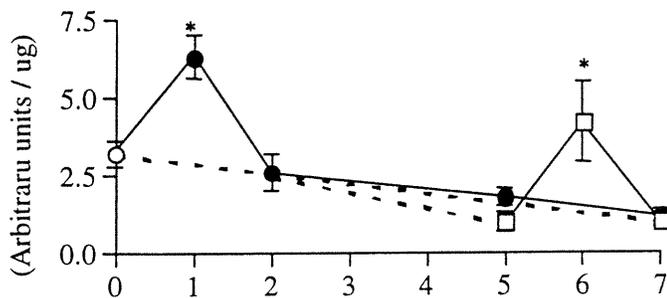


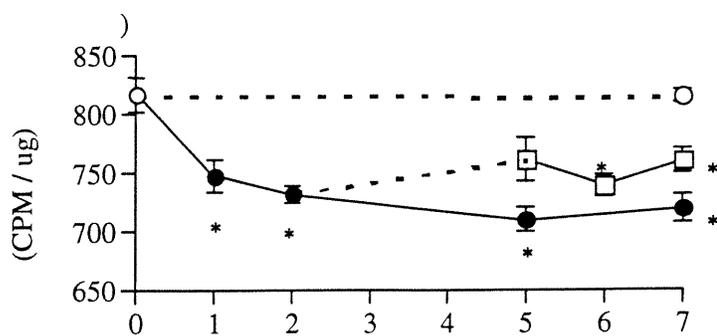
Figure 2



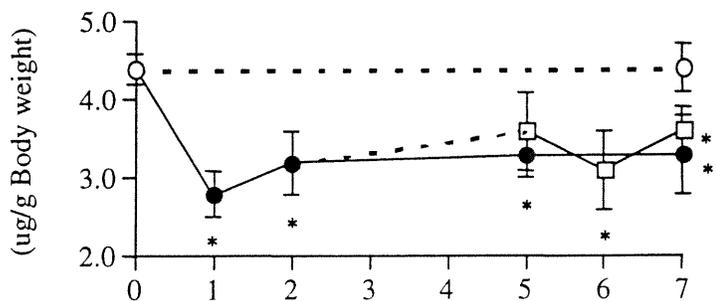
A. DNA fragmentation index



B. DNA synthesis



C. DNA content



D. Cardiac mass index

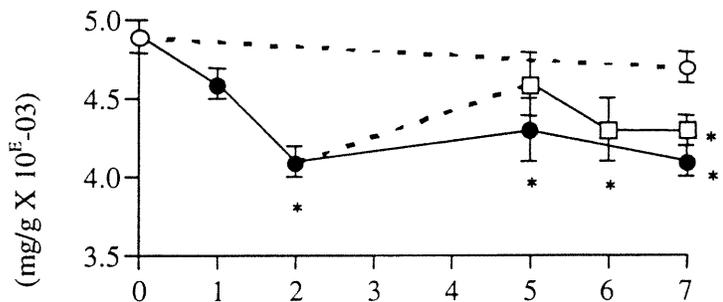
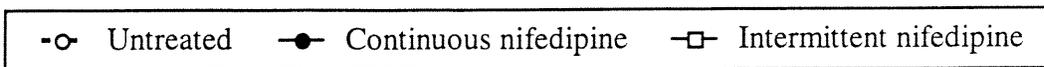
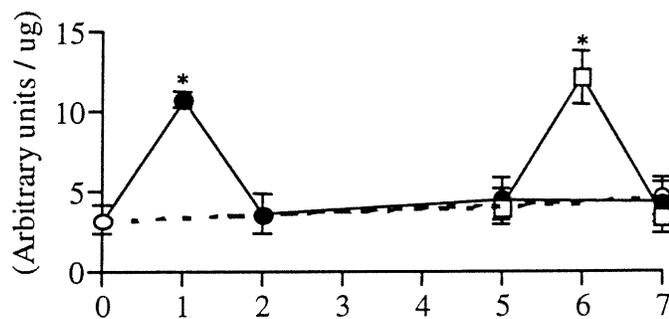


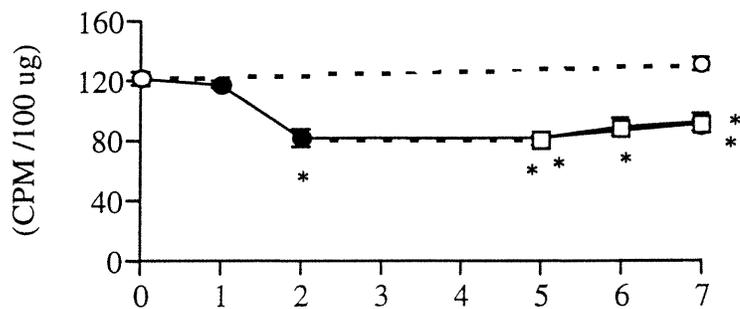
Figure 3



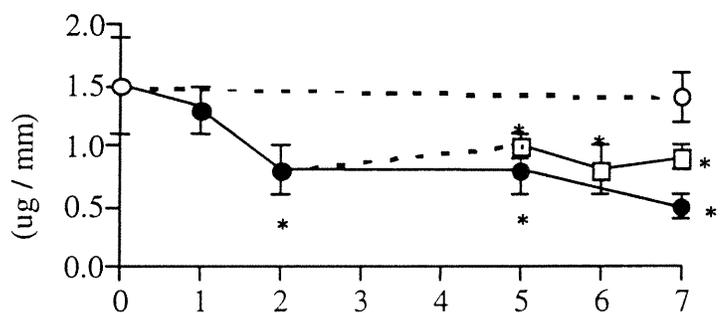
A. DNA fragmentation index



B. DNA synthesis



C. DNA content



D. Aortic mass index

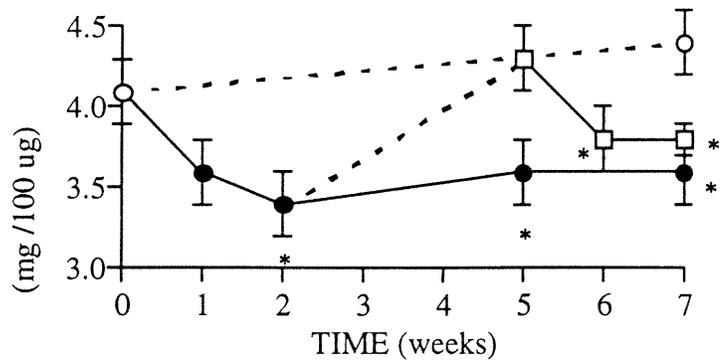
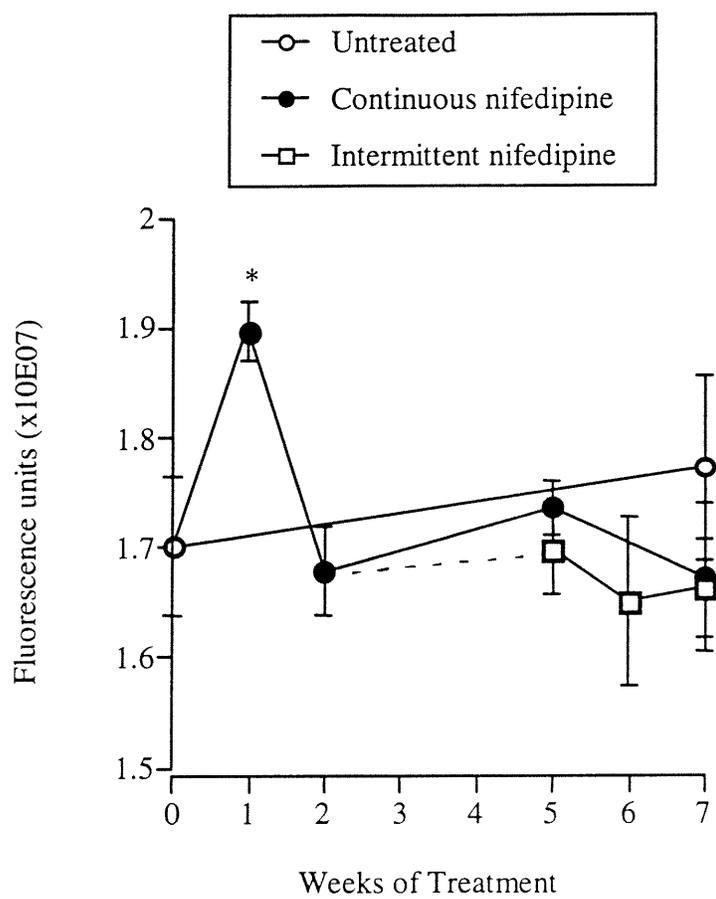


Figure 4



CHAPITRE 3

CONCLUSION GÉNÉRALE ET IMPLICATION CLINIQUE

3.0 CONCLUSION GÉNÉRALE ET IMPLICATIONS CLINIQUES

Étant donné que l'hypertension touche environ 25% de la population canadienne et que son incidence croît avec l'âge (Joffres et al., 1997), il apparaît important de bien comprendre les mécanismes physiopathologiques qui sous-tendent cette condition afin de pouvoir concevoir des approches thérapeutiques rationnelles permettant de prévenir efficacement les complications. Les causes de l'augmentation de la masse cardiovasculaire dans l'hypertension peuvent être de deux ordres : une réponse secondaire à la haute pression artérielle ou une réponse primaire attribuable à des facteurs génétiques, hormonaux ou métaboliques. En effet, en réponse à une augmentation de la pression sanguine, la structure cardiovasculaire est altérée de telle sorte qu'il y a une augmentation de la masse musculaire ou un réarrangement des éléments cellulaires et non-cellulaires autour d'une lumière plus petite mais sans changement de la masse. Ces changements sont susceptibles d'augmenter la réactivité vasculaire. Mais surtout, ils augmentent la résistance périphérique, caractéristique de l'hypertension. En effet, la résistance vasculaire augmente à la puissance quatre du rayon de la lumière interne des vaisseaux (Mulvany, 1990; Mulvany, 1992).

D'autre part, l'augmentation de la masse cardiovasculaire déterminée par les facteurs génétiques à la naissance peut, en soi, contribuer à l'hypertension et représenter un facteur de risque indépendant de morbidité et de mortalité. De même, un dérèglement métabolique, causé par une sténose rénale par exemple (entraînant une activation du système rénine-angiotensine) peut conduire à l'hypertrophie cardiovasculaire, en partie indépendamment de la pression artérielle. L'augmentation de la masse cardiovasculaire associée à la réplication et à l'accumulation d'ADN des CML, comme dans l'hypertension génétique ou secondaire, pourrait représenter un mode de remodelage structural moins facilement réversible que l'hypertrophie cardiovasculaire qui est uniquement due à une augmentation de la synthèse protéique sans synthèse d'ADN *de novo*. Nous avons rapporté que l'hyperplasie cardiaque et rénale chez les SHR nouveaux-nés est associée à un déséquilibre entre la réplication cellulaire et l'apoptose favorisant l'accumulation d'ADN (Moreau et al., 1997). Chez le jeune SHR adulte, l'élévation chronique de la croissance cellulaire est en partie contrebalancée par une élévation parallèle de l'apoptose cardiaque et rénale (Hamet et al., 1995a). Même si la prévention ou la régression de l'hypertrophie cardiovasculaire est considérée comme une cible thérapeutique désirable, les mécanismes régulant la masse cardiaque, aortique et rénale demeurent encore mal définis.

Mon projet de doctorat m'a permis d'examiner la régulation de l'apoptose et de la croissance (synthèse d'ADN) au cours de la régression de l'hypertrophie aortique, cardiaque et rénale, induite par une thérapie antihypertensive chez le SHR. La présence de l'apoptose dans les maladies cardiovasculaires conduit à un changement de paradigme : l'accumulation d'ADN n'est plus considérée comme un phénomène irréversible !

1.0 Fenêtre apoptotique: mécanisme

Les premières observations impliquant le phénomène apoptotique dans les organes cardiovasculaires hypertendus en régression, proviennent de nos études initiales. Nous avons démontré que l'apoptose des CML est augmentée de façon transitoire (du moins avec les antagonistes calciques et les antagonistes des récepteurs AT₁) au cours de la régression de l'hypertrophie vasculaire chez le SHR, phénomène que nous avons décrit comme la « fenêtre temporelle d'apoptose ». Nous avons observé le même phénomène dans le coeur et dans le rein (avec les bloqueurs du système rénine-angiotensine).

1.1. Induction de la fenêtre d'apoptose :

Une question intéressante à résoudre est de savoir si l'induction de la fenêtre d'apoptose pouvait être due à une déprivation de facteurs de survie ou à une activation directe des signaux apoptotiques. Bennett et al. ont rapporté que la sur-expression du proto-oncogène et facteur transcriptionnel de croissance *c-myc* dans les CML induit un haut niveau de réplication d'ADN qui est résistant à l'inhibition par déprivation de sérum ou par l'interféron-gamma (Bennett et al., 1994). Paradoxalement, la déprivation de sérum et l'interféron-gamma abolissent l'accumulation des cellules *c-myc*. Cette divergence entre le haut niveau de synthèse d'ADN et un bas niveau d'accumulation d'ADN a pu être expliquée par une fréquence élevée d'apoptose dans les cellules *c-myc* en réponse à la déprivation de sérum ou au traitement à l'interféron-gamma. Ainsi, la sur-expression de *c-myc* stimule la prolifération et la mort cellulaire par apoptose, et l'équilibre entre ces deux phénomènes est contrôlé par des signaux de survie de l'environnement. Ces données sur l'apoptose suggèrent que le besoin en facteurs de survie est augmenté dans les cellules progressant dans le cycle cellulaire. Par le fait même, nous avons émis des hypothèses initiales qui supposaient que l'augmentation précoce de l'apoptose aortique représentait un échec des CML à s'adapter rapidement au niveau réduit des signaux de survie tels l'Ang II (via AT₁) et l'influx de calcium extracellulaire (via les canaux calciques de type L) puisque que les bloqueurs du système rénine-angiotensine et les antagonistes calciques sont capables d'induire l'apoptose aortique.

Par contre, récemment Bennett et al. ont aussi démontré que les CML sur-exprimant *c-myc* (ou l'homologue fonctionnel E1A), déprivées en sérum pouvait activer directement le ligand Fas (facteur pro-apoptotique) par une translocation du cytoplasme vers la membrane (Bennett et al., 1998). Ceci suggère qu'il n'y a pas de distinction fondamentale entre la mort par déprivation de facteurs de survie et la mort par activation directe des récepteurs de mort (Fas, TNF, AT₂). Par conséquent, l'induction de l'apoptose dans notre modèle pourrait être un phénomène en cascade, déclenché par la déprivation de facteurs de survie et impliquant ultimement l'activation des récepteurs membranaires pro-apoptotiques. Nos résultats avec le bloqueur AT₂ supportent cette hypothèse.

Il est intéressant de constater que dans l'aorte, l'apoptose précède l'inhibition de la synthèse d'ADN chez les rats SHR traités au losartan, au valsartan, à l'énalapril ou à la nifédipine. La diminution de la prolifération cellulaire pourrait s'expliquer en partie par une augmentation de la mort cellulaire ou une diminution du nombre de CML à haut potentiel de croissance. Dans ce cas, nous faisons intervenir l'hypothèse voulant que les CML aortiques sont hétérogènes, avec l'existence d'une sous-population à haut potentiel de croissance, et d'apoptose en réponse à la thérapie. Par contre, cette relation ne semble pas être applicable dans le coeur ou le rein. En effet, dans le coeur des rats SHR traités au losartan, à l'énalapril ou à la nifédipine, la diminution de la synthèse d'ADN a lieu au même point temporel que l'induction de l'apoptose. Avec le propranolol, la synthèse d'ADN cardiaque a été augmentée de façon transitoire à 2 semaines alors que la fragmentation d'ADN a été augmentée à 4 semaines seulement. Dans le rein des rats SHR traités au losartan et à l'énalapril, la diminution de la synthèse d'ADN s'est produite au même point que l'induction d'apoptose à 2 semaines. Avec l'hydrochlorothiazide, l'apoptose est augmentée à 4 semaines sans changement de la synthèse d'ADN. La différence des réponses observées dans l'aorte comparativement au coeur ou au rein pourrait s'expliquer par la complexité de la composition cellulaire de ces organes et par l'existence de plus d'un type cellulaire impliqué dans l'apoptose comparativement à la média de l'aorte, où les CML vasculaires composent la grande majorité des cellules.

Parallèlement, une des questions importantes était de savoir si l'apoptose au cours de la régression de l'hypertrophie cardiovasculaire est un mécanisme adaptatif en réponse à la baisse de la pression artérielle ou un mécanisme inducteur de la diminution de la pression artérielle. À priori, il ne semble pas y avoir de lien entre la baisse de la pression artérielle et l'induction de l'apoptose dans les organes cardiovasculaires en régression. Dans l'aorte, la stimulation de l'apoptose cardiovasculaire a pu être dissociée des effets antihypertenseurs des agents pharmacologiques

étudiés. En effet, même si hydralazine a été très efficace pour réduire l'hypertension, ce médicament n'a pas affecté la fragmentation d'ADN, le contenu en ADN, le nombre de CML ou la masse aortique, cardiaque ou rénale après 4 semaines de traitement. Par contre, on sait que l'hydralazine diminue la pression artérielle par vasodilatation périphérique provoquant une activation du système rénine-angiotensine et du système sympathique. Or, les agents inducteurs d'apoptose semblent être des antagonistes de ces deux systèmes (losartan, énalapril, propranolol). Il est possible que l'activation du système rénine-angiotensine et sympathique ait contribué à inhiber l'apoptose dépendante de la baisse de la pression artérielle. Les travaux de Langille suggèrent que l'induction de la mort cellulaire est associée à une baisse de la pression artérielle (Cho et al., 1997). Dans notre modèle, toutefois, nous n'avons pas trouvé de données dans ce sens. Nous avons démontré que le propranolol et l'hydrochlorothiazide augmentent l'apoptose cardiaque et rénale, respectivement, sans pour autant baisser la pression artérielle. De plus, la stimulation de l'apoptose des CML a été plus rapide avec le losartan ou la nifédipine (1 semaine) qu'avec l'énalapril (2 semaines), alors que la réduction de la pression sanguine a été plus rapide et prononcée avec l'énalapril (1 semaine) qu'avec le losartan (2 semaines) ou la nifédipine (>2 semaines). Dans le coeur, le losartan et la nifédipine ont stimulé l'apoptose et réduit la croissance à 1 semaine, avant la réduction significative de la pression sanguine. Avec l'énalapril, l'apoptose a été stimulée et la croissance a été inhibée à 2 semaines, c'est-à-dire après que la pression sanguine soit réduite (à 1 semaine). Dans le rein, l'apoptose a été stimulée à 2 semaines par l'énalapril, c'est-à-dire après que la pression artérielle ne soit significativement réduite (à 1 semaine). Tous les médicaments étudiés incluant l'hydralazine, le propranolol et la nifédipine ont réduit la charge cardiaque. Cependant, ces agents n'ont pas affecté la masse rénale, la croissance ou l'apoptose à l'intérieur de 4 semaines même si l'hydralazine a réduit significativement la pression artérielle.

Il pourrait y avoir un lien entre l'absence d'apoptose rénale avec la nifédipine et l'absence de réduction persistante de la pression après l'interruption du traitement, tel que démontré dans notre dernière étude. On sait que les inhibiteurs de l'ECA ont des effets persistants sur la baisse de la pression artérielle après interruption du traitement (Harrap et al., 1986) et qu'ils sont capables d'induire l'apoptose rénale, tel que démontré avec l'énalapril et le losartan. Il est intrigant de spéculer que l'induction de l'apoptose pourrait être impliquée dans la persistance de la réduction de la pression après l'interruption du traitement. Par contre, l'hydrochlorothiazide a augmenté l'apoptose rénale sans pour autant diminué la pression (du moins après 4 semaines). Ceci suggère que la corrélation entre l'apoptose rénale et la baisse de pression n'est pas parfaite.

1.2. Fermeture de la fenêtre apoptotique :

La nature transitoire du phénomène apoptotique durant la régression cardiovasculaire est énigmatique. Plusieurs mécanismes pourraient expliquer la fermeture de la fenêtre apoptotique : (1) déplétion en cellules polyploïdes, (2) formation de corps apoptotiques qui peuvent rendre les cellules avoisinantes plus résistantes à la mort cellulaire, (3) diminution de la synthèse d'ADN et (4) baisse de la pression artérielle.

Premièrement, une explication possible de la nature transitoire de l'induction de l'apoptose cardiovasculaire pourrait être la susceptibilité augmentée d'une sous-population de cellules à mourir en réponse à certaines thérapies antihypertensives : les cellules polyploïdes. Il a été suggéré par Owens et al. que la plus grande proportion du changement total de la masse musculaire lisse chez le SHR était due à une augmentation double à triple de la fréquence en cellules tétraploïdes et octaploïdes (Owens, 1989a; Owens and Schwartz, 1983). Celles-ci pourraient représenter jusqu'à cinq fois la masse d'une cellule diploïde du WKY. La signification d'un changement fixe de la ploïdie cellulaire dans l'étiologie de l'hypertension demeure inconnue. À l'heure actuelle, on en connaît peu concernant les altérations fonctionnelles possibles qui peuvent être associées au développement de la polyploïdie même si on sait que l'hypertrophie cardiaque, qui est caractérisée par un développement de la polyploïdie, est associée à de profondes altérations des myosines et des propriétés contractiles (Struijker-Boudier et al., 1995a). Les cellules polyploïdes (en G₂) pourraient être plus susceptibles que les cellules diploïdes à entrer en apoptose. Il a été démontré *in vitro* et *in vivo* que les cellules polyploïdes de l'aorte et du coeur sont plus nombreuses chez le SHR comparativement au WKY (Owens, 1989b). De façon intéressante, il a aussi été démontré que l'incidence de la polyploïdie aortique et cardiaque est réduite par les agents antihypertenseurs qui sont capables d'induire l'apoptose chez le SHR (par exemple, le losartan et l'énalapril mais non l'hydralazine) (Dominiczak et al., 1996; Panizo-Santos et al., 1995). Assumant un nombre égal de cellules diploïdes et tétraploïdes apoptotiques, la diminution du contenu en ADN aortique surestimerait le nombre de CML mortes par environ 33%. Ainsi, un traitement avec le losartan a causé une plus grande réduction du contenu en ADN qu'en nombre de CML dans l'aorte après 4 semaines (63% de réduction en ADN versus 47% de réduction cellulaire). Un effet similaire a été observé avec l'énalapril (66% versus 50% de réduction). Par contre, avec nifédipine la réduction du contenu en ADN a été plus faible que la réduction en nombre de cellules musculaires lisses. Avec le valsartan, ceci n'a pas été reproduit car la réduction d'ADN a été de 39% alors que la réduction en nombre de CML a été de 33%. Ceci pourrait s'expliquer par le fait que les rats traités au valsartan

l'ont été sur une plus courte période, soit 2 semaines seulement. Dans le traitement intermittent à la nifédipine, si nous posons comme hypothèse que la grande majorité des cellules polyploïdes meurent par apoptose suite à la première administration, il est concevable qu'un traitement intermittent puisse résulter en une plus faible réduction du contenu en ADN suite à une seconde administration puisqu'une sous-population de cellules à risque de mourir par apoptose (cellules polyploïdes) serait déjà éliminée après la première « vague » d'apoptose. Or, tel que discuté dans le dernier article, la réduction du contenu en ADN a été moindre et non significative après une interruption de traitement à la nifédipine. Clairement, on a besoin d'études ultérieures pour élucider la régulation de l'apoptose et de la polyploïdie des cellules musculaires lisses et cardiaques.

Alternativement, les cellules apoptotiques pourraient rendre les cellules avoisinantes plus résistantes à l'apoptose, suite à l'ingestion de corps apoptotiques par les cellules viables par exemple. Il n'est pas exclu que les cellules apoptotiques puissent relâcher des facteurs paracrines qui rendent potentiellement les cellules avoisinantes plus résistantes à la mort cellulaire.

Par ailleurs, il est possible que la fermeture de la fenêtre apoptotique puisse être associée à la diminution de la synthèse d'ADN. En effet, il est à noter que dans l'aorte, le coeur et le rein, la fermeture de la fenêtre apoptotique avec le losartan coïncide avec la diminution de la synthèse d'ADN. Avec l'énalapril et le propranolol (dans le coeur), et l'hydrochlorothiazide (dans le rein), le point temporel de la fermeture de la fenêtre n'est pas connu puisque nous n'avons pas d'observation au-delà de 4 semaines de traitement.

Finalement, la baisse de la pression pourrait aussi être impliquée dans l'arrêt de l'induction de l'apoptose. Dans ce cas, la haute pression artérielle aurait un effet pro-apoptotique transitoire selon l'hypothèse suivante: l'induction de l'apoptose cardiovasculaire au début de traitement serait due "au déséquilibre entre les signaux de survie (Ang II, influx de calcium) et le stress mécanique imposé aux cellules. Ainsi, la baisse de pression permettrait de rétablir un certain équilibre.

De façon intéressante, dans le modèle de la surcharge de pression causée par une coarctation aortique, le développement de l'hypertrophie cardiaque, de la fibrose et de la défaillance cardiaque est précédé d'une augmentation transitoire de l'apoptose, notamment dans les cardiomyocytes (Teiger et al., 1996). On ignore le rôle de cette vague précoce et transitoire d'apoptose dans le développement de la maladie cardiaque. Une possibilité est que l'apoptose initie le développement de l'hypertrophie et la défaillance cardiaque, puisque la vague de mort cellulaire précède les changements structuraux et fonctionnels cardiaques. Dans ce modèle, l'apoptose des

cardiomyocytes favoriserait la prolifération des non-cardiomyocytes, la formation de foyers fibrotiques dans la paroi ventriculaire et le dysfonctionnement cardiaque. Une autre possibilité est que l'apoptose des cardiomyocytes puisse être un mécanisme compensatoire et que l'échec de ce mécanisme soit permissif au développement de l'hypertrophie cardiaque. Il est intrigant de constater que deux phénomènes opposés, la régression et le développement de l'hypertrophie cardiaque, puissent impliquer une fenêtre d'apoptose. L'explication pourrait être simple : ce ne sont pas les mêmes cellules cardiaques impliquées. En effet, tel que discuté plus tard, l'Ang II, les catécholamines et le calcium intracellulaire pourraient agir comme facteur de survie des non-myocytes tout en étant des facteurs pro-apoptotiques des myocytes.

2.0. Mécanismes de l'apoptose durant la régression de l'hypertrophie cardiovasculaire

Il est important de noter que les agents capables d'induire l'apoptose dans l'aorte, le coeur ou le rein ont la caractéristique commune de réduire potentiellement le calcium intracellulaire par leur mécanisme d'action. Le calcium intracellulaire pourrait être un facteur de survie des cellules impliquées dans la réponse apoptotique au cours de la régression. En effet, dans les CML d'aorte, la diminution du calcium intracellulaire par la nifédipine et l'énalapril pourrait expliquer l'induction de l'apoptose. Par contre pour le losartan, l'apoptose des CML semble AT_2 -dépendante bien que les changements de calcium cytoplasmique induit par l'Ang II soient relayés par les récepteurs AT_1 (Munzenmaier and Greene, 1995). Par ailleurs, il est connu que la stimulation de l'AMPC par un agoniste β -adrénergique augmente le calcium intracellulaire dans les cellules cardiaques mais le diminue dans le muscle lisse vasculaire (Dzau et al., 1994). Bien que l'on ait pas pu mesurer les niveaux de calcium intracellulaire dans nos études, les inhibiteurs de l'Ang II, les bloqueurs calciques et les bloqueurs β -adrénergiques peuvent diminuer le flux de calcium intracellulaire dans les CML. Dans les non-cardiomyocytes, les récepteurs AT_2 ne semblent pas être impliqués dans la réponse apoptotique. Donc, la diminution du calcium intracellulaire apparaît comme une bonne hypothèse pour expliquer les effets apoptotiques du losartan, de l'énalapril et de la nifédipine. Pour ce qui est du propranolol, on ignore encore son effet sur le calcium intracellulaire des non-myocytes (fibroblastes).

Le SHR est un modèle où les systèmes rénine-angiotensine et sympathique sont augmentés comparativement aux WKY (Yamori, 1983). Le calcium intracellulaire est aussi plus élevé et en excès dans l'aorte et le coeur du SHR (Yamori, 1983). Ceci pourrait expliquer pourquoi les médicaments qui ont induit une augmentation de l'apoptose chez le SHR n'ont pas d'effet chez le

WKY. Le contrôle du niveau de calcium intracellulaire pourrait jouer un rôle important dans la réponse apoptotique d'une cellule. Spécifiquement, la diminution du calcium intracellulaire pourrait être impliquée.

2.1. Régulation cellules-spécifiques de l'apoptose

2.1.1. Hypertrophie cardiaque

L'hypertrophie cardiaque implique une hyperplasie (des fibroblastes, en général) et une hypertrophie (des myocytes, en général) cellulaire (Struijker-Boudier et al., 1995b). L'augmentation de la taille des myocytes représente un phénomène compensatoire initial en réponse à une augmentation de la charge cardiaque due à la haute pression artérielle. Cette hypertrophie compensatoire est bénéfique au début de l'adaptation mais elle est suivie d'une détérioration des symptômes conduisant ultimement à la défaillance cardiaque (Struijker-Boudier et al., 1995b). L'augmentation du nombre de fibroblastes produit une fibrose, une augmentation de la rigidité ventriculaire et donc, une diminution de la distensibilité et de la réserve en oxygène du coeur (Struijker-Boudier et al., 1995b). Même si les changements structuraux des cardiomyocytes représentent une adaptation du coeur à l'augmentation de la pression, la réduction de la performance cardiaque est causée de façon primaire par des événements dans le compartiment non-myocytaire (Struijker-Boudier et al., 1995b). L'Ang II, les catécholamines et le calcium intracellulaire semblent jouer un rôle opposé dans la régulation de la survie des myocytes et des non-myocytes cardiaques ou dans les cellules musculaires lisses et les cellules endothéliales vasculaires.

En effet, l'Ang II et les agonistes β -adrénergiques augmentent l'apoptose des cardiomyocytes *in vivo* et *in vitro* (Communal et al., 1997; Kajstura et al., 1997b; Shizukuda et al., 1997). Le blocage des récepteurs AT_1 supprime l'apoptose induite par la transfection de p53 dans les cardiomyocytes en culture (Pierzchalski et al., 1997b). De plus, le mécanisme d'inhibition de l'apoptose implique une augmentation du calcium cytosolique via la protéine kinase C (Pierzchalski et al., 1997b). Par contre, l'Ang II et les catécholamines stimulent l'hyperplasie des fibroblastes *in vivo* et *in vitro* (Booz and Baker, 1995; Sadoshima and Izumo, 1993). Cette hyperplasie serait relayée par une augmentation du calcium intracellulaire qui agit en synergie avec la protéine kinase C (Allen et al., 1988). Donc, l'Ang II et les agonistes β -adrénergiques via le calcium intracellulaire pourraient avoir des effets opposés sur les myocytes et les non-myocytes.

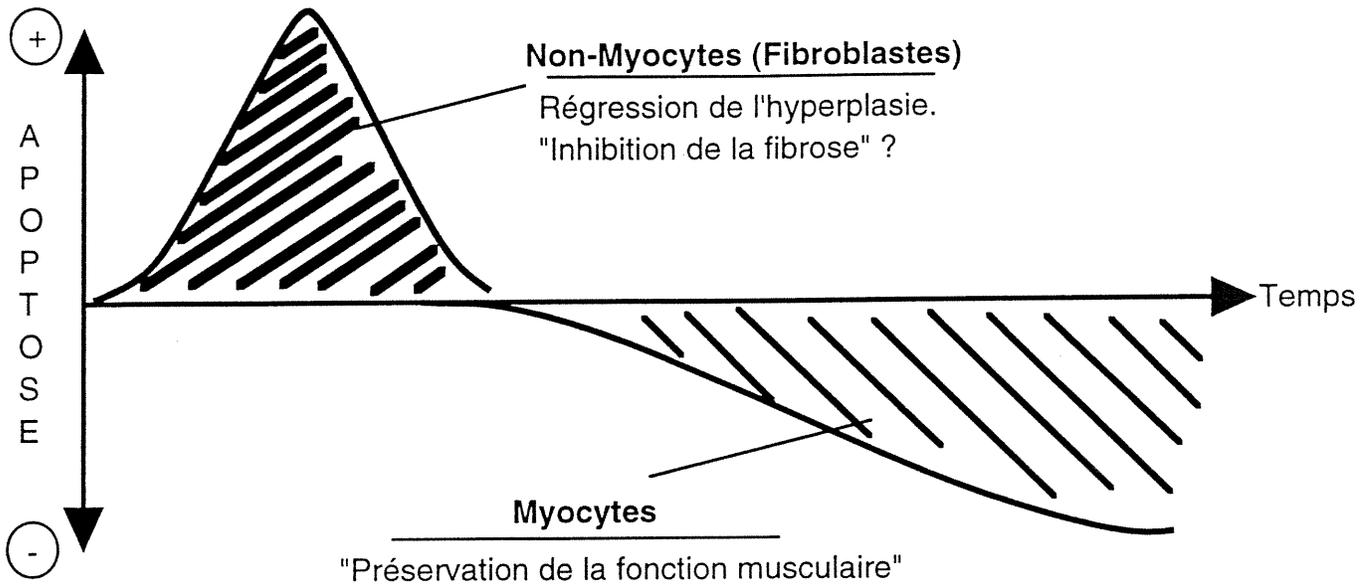


Figure 7. Hypothèse du mécanisme de l'apoptose durant la régression de l'hypertrophie cardiaque : Mesure des types cellulaires apoptotiques en fonction du temps durant la régression.

Plusieurs indices suggèrent que l'apoptose n'a pas été augmentée de façon prédominante dans les cardiomyocytes au cours d'un traitement antihypertenseur. En effet, nos études subséquentes sur les cœurs de rats SHR traités au valsartan ont démontré que les non-myocytes (eg, fibroblastes, cellules endothéliales, etc.) étaient les cellules qui entraient en apoptose durant la régression de l'hypertrophie (Tea et al., 1999b). De plus, plusieurs autres études antérieures ont démontré que la taille des cardiomyocytes est réduite mais pas leur nombre durant la régression cardiaque en réponse aux inhibiteurs de l'ECA (Beinlich et al., 1995), aux bloqueurs calciques (Amann et al., 1992; Campbell et al., 1993) ou aux β -bloqueurs (Gerdes et al., 1987). La réduction de la taille des cardiomyocytes se produit aussi avec un blocage des récepteurs AT₁ (Kojima et al., 1994a) mais pas avec les vasodilatateurs comme l'hydralazine (Smith et al., 1990). Tous ces traitements ont été reconnus pour améliorer la fonction cardiaque aussi bien chez l'humain que dans les modèles animaux d'hypertrophie cardiaque (Given et al., 1985; Jafri et al., 1987; Pitt et al., 1997; Swedberg and Kjeksus, 1988). Le groupe de Diez et al. a rapporté que l'administration du losartan ou du quinapril, un inhibiteur de l'ECA, pour 14 semaines réduisait l'apoptose des cardiomyocytes des SHR âgés de 30 semaines au niveau observé chez les WKY (Diez et al., 1997b; Fortuno et al., 1998). Le losartan a aussi réduit le ratio des protéines régulatrices d'apoptose Bax sur Bcl-2 dans le ventricule gauche du SHR (Fortuno et al., 1998), fournissant ainsi une base moléculaire de la réduction de l'apoptose. Dans le coeur défaillant du SHR, un traitement à long terme au captopril a aussi réduit l'apoptose des cardiomyocytes (Li et al., 1997). Il est intrigant de constater qu'un traitement à court terme (à l'intérieur de 4 semaines dans notre étude) augmente l'apoptose cardiaque alors qu'un traitement à long terme (14 semaines) (Diez et al., 1997b) réduit l'apoptose cardiaque. Une explication plausible pourrait être une régulation différentielle de l'apoptose selon le type cellulaire impliqué.

En effet, nos résultats préliminaires suggèrent que la sur-stimulation des récepteurs AT₂ induit l'apoptose des non-myocytes durant la régression cardiaque en réponse à un bloqueur des récepteurs AT₁ de l'Ang II (Der Sarkissian S. et al.; 1999). On sait que la fibrose est un facteur important dans la diminution de la distensibilité causant un dysfonctionnement de la performance cardiaque durant l'hypertrophie ventriculaire gauche (Struijker-Boudier et al., 1995). L'Ang II et les catécholamines stimulent l'hyperplasie des fibroblastes et le blocage de ces voies *in vivo* supprime la fibrose cardiaque (Booz and Baker, 1995; Sadoshima and Izumo, 1993). À court terme, une stimulation sélective de l'apoptose dans les fibroblastes par les bloqueurs de la voie de l'Ang II pourrait contribuer aux effets de ces médicaments dans l'inhibition de la fibrose cardiaque (voir Figure 7). À

long terme, on sait que les antagonistes de la voie de l'Ang II améliorent la fonction du myocarde et la survie (par exemple, chez les humains avec insuffisance cardiaque). Or, ceci est en accord avec les données d'autres équipes qui ont démontré une réduction de l'apoptose des cardiomyocytes avec un traitement à long terme des rats SHR avec le losartan, le quinapril (Diez et al., 1997b; Fortuno et al., 1998) ou le captopril (Li et al., 1997).

Cependant, il faut mentionner que la possibilité que l'apoptose des cardiomyocytes soit élevée durant la phase précoce de la régression cardiaque ne peut être totalement exclue. Diez et al. ont rapporté que l'administration de quinapril a diminué le pourcentage de cardiomyocytes tétraploïdes chez le SHR, suggérant ainsi que la division nucléaire ou l'apoptose était induite dans les cardiomyocytes polyploïdes à un certain point temporel durant la période de 14 semaines de traitement (Diez et al., 1997b). Ces données soulèvent la possibilité que les inhibiteurs de la voie de l'angiotensine pourraient induire l'apoptose dans les cardiomyocytes polyploïdes de façon précoce durant le traitement chez le SHR. D'autres études seront nécessaires pour établir si les effets bénéfiques des inhibiteurs de l'ECA, les antagonistes AT₁, les bloqueurs β et les bloqueurs calciques chez les patients avec défaillance cardiaque sont dus, en partie, à la capacité de ces agents de supprimer la perte des cardiomyocytes ou à induire la perte des non-myocytes par apoptose.

2.1.2. Hypertrophie vasculaire

Dans l'hypertension, le changement majeur de la croissance au niveau des grosses artères (comme l'aorte) est l'hypertrophie des CML avec une augmentation subséquente de l'épaisseur de la paroi, avec ou sans réduction de la lumière et une augmentation de la matrice extracellulaire. L'hypertrophie des CML dans l'aorte est généralement reconnue comme étant un changement adaptatif, se produisant une fois l'hypertension établie. Cette hypertrophie peut être accompagnée d'une polyploïdie des CML, un processus qui semble être absent dans les petites artères de SHR et dans d'autres modèles d'hypertension (Owens, 1989a; Owens and Schwartz, 1982). Ces changements sont associés à un dysfonctionnement endothélial tel que démontré par une réduction de la relaxation endothélium-dépendante (Dohi et al., 1990). De plus, l'expression de facteurs de croissance est augmentée comme la TGF- β_1 , les substances vasoactives locales comme l'Ang II, les protéines matricielles comme le collagène et l'élastine, et les protéinases matricielles comme la collagénase et l'élastase (Dzau et al., 1994). Ces altérations dans la structure et la fonction vasculaire prédisposent les patients avec hypertension à des séquelles comme l'athérosclérose, l'ischémie du myocarde, les accidents cérébrovasculaires et la défaillance rénale.

En plus des facteurs hémodynamiques, l'endothélium répond à une multitude de stimuli par des événements couplés aux récepteurs. L'ion calcium semble jouer un rôle important dans la fonction de transduction du signal de l'endothélium. Les changements intracellulaires de calcium par des facteurs humoraux sont relayés par l'activation du métabolisme des phosphoinositols, ou par les canaux ioniques couplés aux récepteurs, ou par l'activation d'agonistes de canaux potassiques des cellules endothéliales (Dzau et al., 1994). La surface endothéliale est constamment exposée aux facteurs humoraux, aux médiateurs inflammatoires et aux forces physiques. L'équilibre homéostatique est maintenu par des substances vasoactives (vasoconstrictives ou vasodilatatrices), pro-coagulantes et anti-coagulantes, pro-inflammatoires et anti-inflammatoires, et les promoteurs et inhibiteurs de la croissance. Dans nos expériences, il faut noter que l'endothélium de l'aorte thoracique présent *in vivo* n'a été dénudé qu'avant d'extraire l'ADN. Il n'est donc pas exclu que les différents facteurs endothéliaux puissent contribuer à l'induction de la fenêtre apoptotique dans l'aorte en réponse aux différents agents antihypertenseurs, tel la nifédipine, le losartan et l'énalapril. L'endothélium est le siège de nombreux promoteurs de la croissance et inhibiteurs de l'apoptose des CML comme l'Ang II, la NE, l'endothéline, le FGF et le PDGF (Dzau et al., 1994). L'endothéline induit la croissance des CML et ses effets mitogéniques sont augmentés en présence d'autres facteurs vasoactifs comme l'Ang II. De plus, l'endothéline même peut potentialiser les effets mitogéniques des substances vasoactives comme l'Ang II. D'un autre côté, l'Ang II, le TGF- β , l'interleukine-1, l'épinéphrine, l'arginine et la vasopressine peuvent induire l'expression d'ARN messager de l'endothéline dans les cellules endothéliales en culture. Même si le rôle de l'endothéline dans l'hypertension est controversé, elle pourrait potentiellement réguler non seulement le tonus mais aussi la prolifération et la survie des CML (Sharifi et al., 1997; Sütsch et al., 1997).

D'un autre côté, l'endothélium est aussi le siège de nombreux inhibiteurs de la croissance et inducteurs d'apoptose des CML comme le NO, les prostaglandines et le TGF- β . Le NO peut inhiber la croissance des CML aortiques induite par le sérum, le PDGF, le bFGF, l'EGF et l'Ang II. La prostacycline et les prostaglandines E1 et E2 inhibent la synthèse d'ADN et la prolifération des CML aortiques en culture (Dzau et al., 1994). L'oxide nitrique, un important médiateur de la vasodilatation, l'inhibition des plaquettes, et la suppression de la prolifération musculaire lisse, régulent l'expression de Fas à la hausse et induisent l'apoptose des CML (Fukuo et al., 1996; Pollman et al., 1996). D'autres vasodilatateurs comme l'ANP et le peptide natriurétique de type C peuvent aussi induire l'apoptose des CML (Trindade et al., 1995). Fait à noter, il a été démontré que l'Ang II

inhibe l'apoptose induite par le NO (Pollman et al., 1996). Un autre important peptide vasoconstricteur, l'endothéline-1, peut également contrebalancer les promoteurs de l'apoptose, et un antagonisme du récepteur à l'endothéline est associé à une apoptose augmentée (Sharifi and Schiffrin, 1997).

L'endothélium exprime des récepteurs à l'Ang II (AT₁ et AT₂) et l'enzyme de conversion de l'Ang II. Il est possible que le dysfonctionnement endothélial dans l'hypertension puisse être corrigé par un blocage de la voie de l'Ang II (avec l'énalapril ou le losartan) qui stimule les facteurs pro-apoptotiques (eg, NO) au niveau de l'endothélium et inhibe les facteurs anti-apoptotiques (eg, Ang II, endothéline) des CML. On peut spéculer qu'un équilibre entre les vasodilatateurs, qui sont des inhibiteurs de la croissance et les vasoconstricteurs, qui sont des promoteurs de la croissance, pourrait être impliqué dans le processus apoptotique.

2.2. Apoptose différentielle des organes

Les réponses apoptotiques semblent être contrôlées de manière spécifique selon les organes. En effet, le propranolol a augmenté l'apoptose dans le coeur mais pas dans l'aorte. Bien que l'aorte soit dotée de récepteurs β -adrénergiques (surtout de type β_2), la stimulation de l'AMPc par un agoniste β -adrénergique augmente le calcium intracellulaire dans les cardiomyocytes mais pas dans le muscle lisse vasculaire (Struijker-Boudier et al., 1995b). L'effet opposé de l'AMPc dans la contraction du muscle cardiaque versus la dilatation du muscle lisse vasculaire pourrait expliquer pourquoi propranolol a augmenté l'apoptose cardiaque sans affecter les CML vasculaires. Ceci suggère un rôle important pour le calcium intracellulaire dans la régulation de l'apoptose.

De façon intéressante, l'hydrochlorothiazide a augmenté l'apoptose rénale sans affecter le coeur ou l'aorte. Ceci est parfaitement compatible avec son site d'action principal qui se situe dans les tubules rénaux. Par contre, il faut mentionner que les diurétiques peuvent diminuer l'hypertrophie cardiaque en clinique (Schmieder et al., 1996) secondairement à la baisse de la pression artérielle. Par le fait même, nous ne pouvons exclure la possibilité d'une induction de l'apoptose cardiaque ou aortique avec un traitement à plus long terme avec l'hydralazine ou l'hydrochlorothiazide.

2.2.1. Spécificité anatomique de l'apoptose

L'augmentation spécifique de l'apoptose dans le sub-épicaarde pourrait être expliquée par une hétérogénéité des phénotypes cellulaires ou de l'environnement local. En effet, les myocytes

démontrent des phénotypes différents selon leur origine endocardique ou épicaudique. Par exemple, le courant potassique, le calcium ou le sodium intracellulaire diffère entre les myocytes épicaudiques en conditions normale et ischémique (Cook et al., 1997; Lukas and Antzelevitch, 1993). Aussi, l'existence d'une distribution transmurale des récepteurs β -adrénergiques a été rapportée dans les cœurs humains défaillants (Beau et al., 1993). De plus, une hétérogénéité de l'environnement local a été reconnue. En effet, plusieurs études ont démontré que (1) le myocarde intramural raccourci dans l'hypertension avec hypertrophie ventriculaire gauche (Palmon et al., 1994), (2) le neuropeptide Y réduit préférentiellement la perfusion myocardique dans l'épicarde (Gutterman and Morgan, 1995) et (3) l'épicarde, les cellules M et endocardiques démontrent des réponses distinctes, et parfois, opposées à une multitude de médicaments (Anyukhovskiy et al., 1996; Drouin et al., 1995). Fortuno et al. ont récemment rapporté une distribution hétérogène d'apoptose des cœurs de SHR âgés de 16 semaines, avec les plus hauts niveaux dans le sub-endocarde et le mésocarde (Fortuno et al., 1998). Le losartan a réduit l'apoptose sub-endocardique et mésocardique sans affecter l'apoptose sub-épicaudique après 14 semaines de traitement (Fortuno et al., 1998). L'induction spécifique d'apoptose dans le sub-épicaudique dans notre étude est contraire à la distribution diffuse typique d'apoptose cardiaque adulte durant le remodelage pathologique en réponse à une attaque métabolique, hémodynamique ou immunitaire (Anversa et al., 1997). Des études antérieures ont soulevé la possibilité que la fonction cardiaque puisse être affectée différemment, dépendamment de la distribution de la mort des myocytes dans la paroi ventriculaire. Le groupe d'Anversa et al. a rapporté qu'une occlusion coronarienne complète causant une mort cellulaire segmentale produit un dysfonctionnement cardiaque minimal si moins de 35 % des cardiomyocytes ventriculaires sont perdus (Olivetti et al., 1991). En revanche, le même groupe a observé qu'une occlusion coronarienne partielle causant une apoptose diffuse et une perte de moins de 15% des cardiomyocytes ventriculaires résulte en un dysfonctionnement ventriculaire significatif (Anversa et al., 1992). Des études supplémentaires seront requises pour déterminer les mécanismes expliquant la distribution hétérogène des cellules apoptotiques dans le cœur en régression rapide en réponse à une thérapie antihypertensive. Finalement, il est intrigant de spéculer que l'apoptose dans les cellules sub-épicaudiques durant la régression de l'hypertrophie cardiaque puisse aider à préserver la fonction cardiaque en diminuant l'épaisseur de la paroi ventriculaire sans augmenter la cavité ventriculaire. En effet, une augmentation de la cavité tend à augmenter le stress de la paroi et à précipiter le dysfonctionnement ventriculaire.

D'autre part, une importante caractéristique de l'apoptose rénale en régression est sa localisation spécifique dans le cortex. L'explication de cette sélectivité est inconnue jusqu'à présent. Une hypothèse est que l'hypertension est accompagnée par d'un rétrécissement du réseau de vaisseaux post-glomérulaires cause une fibrose dans la région du cortex (Cowley and Roman, 1996). Nous spéculons que les inhibiteurs de l'ECA, les antagonistes des récepteurs AT₁ ainsi que les diurétiques augmentent le flot sanguin rénal en réduisant la fibrose interstitielle par apoptose dans le cortex, et ainsi contribuent à diminuer la résistance vasculaire rénale.

3.0. Rôle des récepteurs AT₂ de l'aorte *in vivo*

L'Ang II exerce des influences majeures sur le coeur et les vaisseaux via ses effets sur l'hémodynamie systémique et le volume sanguin. Des données récentes suggèrent que ce peptide exerce des effets structuraux à long terme à travers ses actions directes sur la croissance. Les actions cardiovasculaires majeures de l'Ang II sont principalement relayées par le sous-type de récepteurs AT₁. Récemment, un second sous-type de récepteurs a été cloné : AT₂. Le récepteur AT₂ est abondamment exprimé dans les tissus foétaux, mais il est seulement présent à de faibles niveaux dans les tissus adultes comme le coeur et l'aorte (Viswanathan et al., 1991). Son rôle antiprolifératif et apoptotique a été décrit dans plusieurs systèmes de cellules en culture, *in vitro* (Horiuchi et al., 1997; Tanaka et al., 1995; Yamada et al., 1996a). Nous avons démontré précédemment que l'inhibiteur de l'ECA, énalapril, et l'antagoniste des récepteurs AT₁, losartan, augmentaient l'apoptose des CML dans l'aorte des SHR. Il a été démontré que l'activation des récepteurs AT₁ inhibe la sécrétion de la rénine et l'augmentation subséquente de l'Ang II (Timmermans et al., 1993). Or, un blocage des récepteurs AT₁ enlève cette inhibition et par conséquent favorise l'accumulation d'Ang II circulante, qui pourrait à son tour se lier aux récepteurs AT₂. À partir de ceci, il était intrigant de savoir par quel mécanisme un blocage des récepteurs AT₁ de l'AngII par le losartan pouvait induire l'apoptose ? À priori, deux hypothèses étaient plausibles : (1) Les récepteurs AT₁ de l'Ang II agissent comme des facteurs de survie des CML; (2) Les récepteurs AT₂ de l'Ang II agissent comme des inducteurs d'apoptose. En effet, la liaison de l'Ang II aux récepteurs AT₁ pourrait inhiber l'apoptose (voir Figure 9) directement ou indirectement en stimulant la production de facteurs de survie autocrine, comme le PDGF et l'IGF-1, ou en stimulant la production de molécules spécifiques de la matrice extracellulaire (Bennett et al., 1995a; Itoh et al., 1993; Naftilan et al., 1989), comme l'ostéopontine dans la paroi artérielle (deBlois et al., 1996). Il a été démontré que la perturbation de la liaison au récepteur à l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ pour l'ostéopontine induit l'apoptose dans les vaisseaux

sanguins angiogéniques (Brooks et al., 1994). En fait, plusieurs résultats suggèrent que les protéines de la matrice extracellulaire régulent l'apoptose en interagissant avec les récepteurs cellulaires d'intégrines et en modulant les protéines à activité tyrosine phosphatase (Meredith et al., 1993).

Nos données suggèrent que l'induction de l'apoptose des CML chez les rats traités au valsartan a été induite par une sur-stimulation des récepteurs AT₂. Supportant cette observation, la stimulation des récepteurs AT₂ *in vitro* induit l'apoptose dans différents types cellulaires incluant les cellules PC12W, les cellules ovariennes, de même que les CML transfectées avec AT₂ et les fibroblastes 3T3 (Horiuchi et al., 1997; Tanaka et al., 1995; Yamada et al., 1996a). Dzau et al. ont étudié l'effet du récepteur AT₂ sur les MAP kinases, qui sont des régulateurs clés de différentes cascades de kinases et de signaux de survie cellulaire pour la croissance cellulaire et l'apoptose. Ils ont observé que l'Ang II inactivait les MAP kinases (p42 MAPK et p44 MAPK) en déphosphorylant un résidu tyrosine. Et ils ont suggéré que le récepteur AT₂ active les MKP-1 via le couplage aux protéines G, résultant en une inactivation de Bcl-2 et l'induction d'apoptose. La stimulation de l'apoptose par les récepteurs AT₂ pourrait impliquer la déphosphorylation de Bcl-2 par les MAP kinase phosphatase-1 (Horiuchi et al., 1997). Nos résultats préliminaires indiquent une augmentation transitoire du ratio Bax/Bcl-2 dans les CML après une semaine de traitement au valsartan. Cette augmentation est abolie par l'addition d'un antagoniste des récepteurs AT₂. Il reste à déterminer si un mécanisme passant par la voie des MAP kinases est impliqué.

La réplication et l'apoptose des CML en réponse au blocage des récepteurs AT₁ *in vivo* pourraient être dissociées. En effet, l'inhibition de la synthèse d'ADN (à 2 semaines) a été retardée comparativement à la fenêtre temporelle de l'apoptose des CML (à 1 semaine) chez les rats traités avec valsartan.. Alternativement, la diminution de l'apoptose suivant l'augmentation initiale de la mort cellulaire pourrait être reliée, du moins en partie, à la réduction de la réplication de l'ADN dans les CML. L'équipe de Dzau a démontré que le récepteur AT₂ relaye la régulation développementale de la diminution de la synthèse d'ADN dans l'aorte du rat à des stades avancés de la gestation (Nakajima et al., 1995a). En utilisant la technique de transfert du gène des récepteurs AT₂ *in vivo*, ils ont démontré que la sur-expression du transgène AT₂ résultait en une atténuation de l'hyperplasie néointimale et une diminution de la synthèse d'ADN. Stoll et al. ont observé une influence antiproliférative du récepteur AT₂ sur les cellules endothéliales coronariennes en culture (Stoll et al., 1995). Nos résultats ont confirmé que l'induction de l'apoptose des CML et la réduction de la croissance ont été temporairement dissociées au cours de la régression de l'hypertrophie. Étant

donné que PD123319 a bloqué ces deux événements, il est impossible de déterminer si la réduction de la croissance des CML est un phénomène secondaire à l'induction de l'apoptose ou alternativement, un effet primaire de la stimulation des récepteurs AT₂.

Pollman et al. ont rapporté que les récepteurs AT₁ inhibent l'apoptose des CML en culture exposées à l'oxide nitrique (Pollman et al., 1996). En effet, ils ont rapporté que les molécules donneurs de NO, la S-nitroso-N-acétylpenicillamine ou le nitroprusside sodium, induisent l'apoptose dans les CML en culture de lapins. L'Ang II inhibait l'apparition de l'apoptose induite par les donneurs de NO et l'enlèvement d'un facteur de croissance par les récepteurs AT₁. Contrairement aux effets du récepteur AT₁, ils ont démontré que les récepteurs AT₂ transfectés dans les CML stimulent l'apoptose après déprivation de sérum. Récemment, Dimmeler et al. ont rapporté que l'Ang II induisait l'apoptose des cellules endothéliales des veines ombilicales humaines via l'activation de la cascade des caspases (Dimmeler et al., 1997). Le blocage simultané des récepteurs AT₁ et AT₂ prévient l'apoptose induite par Ang II, alors que la stimulation sélective du récepteur AT₂ induit l'apoptose. Mis ensemble avec les effets pro-apoptotiques induits par les récepteurs AT₂ (Horiuchi et al., 1997; Tanaka et al., 1995; Yamada et al., 1996b), nos résultats suggèrent que l'accumulation des CML dans l'aorte du SHR est régulée, du moins en partie, par un équilibre entre les actions opposées des récepteurs AT₁ et AT₂ sur la survie et la croissance des CML.

Cependant, il est intéressant de noter que l'apoptose des CML et la réplication d'ADN ne sont pas différentes entre les rats SHR non-traités et ceux recevant une combinaison de valsartan et de PD123319. Ainsi, le blocage combiné des récepteurs AT₁ et AT₂ n'a pas affecté les niveaux de base de l'apoptose des CML et de la réplication d'ADN, suggérant une régulation indépendante de l'action de l'Ang II via AT₁ et AT₂ dans le modèle du SHR. Supportant cette interprétation, l'apoptose des CML et la réplication d'ADN n'étaient pas affectées lorsque le PD123319 a été administré seul, suggérant que les récepteurs AT₂ n'ont pas d'activité basale ou que celle-ci est annulée par un facteur inconnu. Le fait que valsartan induise l'apoptose et que celle-ci est complètement bloquée par le PD123319 suggère deux possibilités: (1) le valsartan réduit le signal AT₁ et donc réduit un signal de survie ou (2) le valsartan réduit rapidement l'accumulation des CML dans l'aorte de rats SHR en augmentant principalement la stimulation des récepteurs AT₂ par l'Ang II, avec ces conséquences pro-apoptotiques et anti-prolifératives. Supportant cette dernière hypothèse, nous avons noté que le PD123319 n'a pas bloqué l'apoptose induite par un traitement à

l'énalapril après 2 semaines, un modèle où la production d'Ang II est réduite. Par contre, la contribution relative de ces deux effets n'est pas claire.

On sait que la grande majorité des effets de l'Ang II sur la croissance est relayée par les récepteurs AT₁. Nos résultats ne sont pas en contradiction avec ce paradigme. Il a été démontré dans les CML et les fibroblastes que les récepteurs AT₁ pouvaient agir comme facteurs anti-apoptotiques et de croissance. Quant aux récepteurs AT₂, ils pourraient induire l'apoptose et inhiber la prolifération de ces même cellules. Dans les cardiomyocytes, il a été démontré *in vitro* que les récepteurs AT₁ induisent l'apoptose. Dans plusieurs des systèmes étudiés jusqu'à présent, les actions d'AT₂ inhibent les actions d'AT₁. Or, aucune étude jusqu'à présent n'a exploré les actions inhibitrices possibles des récepteurs AT₁ sur les récepteurs AT₂. Posons l'hypothèse que les récepteurs AT₁ inhibent les effets des récepteurs AT₂ dans les cellules musculaires lisses, les fibroblastes et les cardiomyocytes. À l'état basal, ceci se traduirait par une inhibition des effets apoptotiques et anti-prolifératifs des récepteurs AT₂ sur les fibroblastes et CML. Dans les cardiomyocytes, l'état basal représente un équilibre en l'apoptose et la croissance. Par contre, lorsque les récepteurs AT₂ sont bloqués par PD123319, les niveaux d'apoptose des cardiomyocytes demeurent inchangés puisqu'il n'y a pas d'augmentation des niveaux plasmatiques d'Ang II, due à l'inhibition rétroactive de la rénine via les récepteurs AT₁. Or, ceci est compatible avec la reconnaissance que les récepteurs AT₁ relayent la majorité des effets sur la croissance cardiovasculaire de l'Ang II. Ainsi, si l'on bloque les récepteurs AT₁, l'inhibition des actions d'AT₂ n'est plus présente d'où l'activation de l'apoptose et la réduction de la prolifération des CML et des non-myocytes notées avec le valsartan et le losartan (voir Figure 9). De plus, le groupe de Diez et al. a démontré que ce même antagonisme pouvait inhiber l'apoptose des cardiomyocytes (Diez et al., 1997b). Les conclusions ci-dessus n'excluent pas la possibilité que l'inhibition de la voie de l'Ang II *in vivo* puisse aussi augmenter la susceptibilité à l'apoptose via des mécanismes AT₂ indépendants à long terme, par exemple par la génération de NO de la voie des kinines. En effet, nous avons rapporté que l'inhibiteur de l'ECA, énalapril, a réduit la croissance et la survie des CML dans l'aorte de SHR, même si ces effets ont été retardés comparativement à ceux du losartan. Par contre, l'élimination de la production d'Ang II par les inhibiteurs de l'ECA réduit l'activation des récepteurs AT₁ et AT₂. Dans notre étude, le PD123319 n'a pas affecté l'apoptose induite par l'énalapril.

3.1. Mécanismes indépendants des récepteurs AT₂

Les antagonistes des récepteurs AT₁ bloquent l'Ang II formée par les voies dépendantes et indépendantes de l'ECA. L'ECA est exprimée par l'endothélium des vaisseaux adultes, et elle est indétectable dans la média ou l'adventia (Dzau et al., 1994). Un traitement aux antagonistes AT₁ pourrait sur-activer les récepteurs AT₂ libres et ainsi conduire à une inhibition de la prolifération des cellules endothéliales (Stoll et al., 1995) et à une réduction de la croissance des capillaires. L'importance fonctionnelle de la formation de l'Ang II indépendante de l'ECA dans le myocarde est incertaine, mais plusieurs observations suggèrent un rôle des chymases dans la formation de l'Ang II vasculaire (Brown and Vaughan, 1998). Des études ont démontré que les inhibiteurs de l'ECA sont efficaces dans la prévention du développement de l'hypertrophie ventriculaire et que cet effet peut être renversé par un antagoniste des récepteurs B2 de la bradykinine, HOE-140, suggérant que la prévention de l'hypertrophie ventriculaire gauche par les inhibiteurs de l'ECA est en partie due à la prévention de la dégradation de la bradykinine (Linz and Scholkens, 1992). Récemment, l'importance de la bradykinine dans la régression de l'hypertrophie cardiaque a été controversée. Ritchie et al. ont démontré que la bradykinine n'induit pas une régression de l'hypertrophie des myocytes en culture produite par l'Ang II. Par contre, lorsque les myocytes sont incubés avec les cellules endothéliales, la bradykinine prévient la formation de l'hypertrophie induite par l'Ang II. Ceci suggère qu'un facteur endothélial comme l'oxide nitrique est important dans l'efficacité de la bradykinine à prévenir l'hypertrophie myocytaire (Ritchie et al., 1998). Il est important de mentionner que chez les SHR et les patients hypertendus, souvent il y a dysfonction endothéliale. L'oxide nitrique peut être détruite par la formation de radicaux libres et/ou une dysfonction de l'oxide nitrique synthase.

Les CML et les cellules endothéliales d'artères et d'artérioles possèdent des récepteurs de la bradykinine (B2) (Raidoo et al., 1997). Il a été noté que la réduction de la dilatation artérielle par la bradykinine est endothélium-dépendante (Mombouli and Vanhoutte, 1992). Le quinalaprilat induit une vasodilatation artérielle chez l'humain, partiellement par une augmentation de l'oxide nitrique (Haefeli et al., 1997). De plus, la bradykinine induit une dilatation des artères coronariennes de façon NO-dépendante (Kuga et al., 1997). Les inhibiteurs de l'ECA améliorent la fonction endothéliale par un mécanisme inconnu; par contre, ils stimulent le relâchement de NO par une réduction de la dégradation de la bradykinine (Hornig et al., 1997). De plus, plusieurs observations récentes ont démontré que les inhibiteurs de l'ECA inhibent non seulement la dégradation des kinines mais aussi la désensibilisation du récepteur B2 des kinines (Marcic et al., 1999). Cet effet pourrait contribuer à l'induction d'apoptose kinine-dépendante avec les inhibiteurs de l'ECA mais non avec les

antagonistes AT₁. Les effets des kinines sur l'apoptose sont inconnus, mais il est possible que la sécrétion kinine-dépendante de NO par les cellules endothéliales puisse contribuer à la stimulation de l'apoptose des CML *in vivo* (Fukuo et al., 1996). Une approche expérimentale pour savoir si l'apoptose induite par les inhibiteurs de l'ECA est dépendante de la génération de kinines consisterait à bloquer le(s) récepteur(s) de la bradykinine.

3.2. Mécanismes dépendants des récepteurs AT₂

Des études récentes suggèrent que les récepteurs AT₂ augmentent la génération de kinines *in vivo* (Siragy and Carey, 1997). La voie AT₂ pourrait être considérée comme plus « directe » que la cascade kinine-NO endothéliale-apoptose des CML. Ceci pourrait expliquer la cinétique d'apoptose différente entre l'énalapril et le losartan ou le valsartan : AT₂ induit une apoptose plus rapide que la voie des kinines. L'observation que l'induction d'apoptose par l'énalapril n'est pas affectée par un antagoniste AT₂ suggère un mécanisme d'action spécifique des différentes classes d'antihypertenseurs, les inhibiteurs de l'ECA versus les antagonistes AT₁. Nos observations suggèrent que les niveaux plasmatiques d'Ang II sont presque complètement abolis (Tea BS et al., 2000) chez les rats traités avec énalapril pendant 2 semaines. Il n'est pas connu si les effets apoptotiques de l'énalapril reflètent la suppression prolongée de la génération d'Ang II résultant en une activité réduite du récepteur AT₁ (Pollman et al., 1996) mais sans surstimulation AT₂ ou la production augmentée d'oxide nitrique (un inducteur d'apoptose dans les CML via un mécanisme dépendant des kinines) (Fukuo et al., 1996).

Des études antérieures ont démontré des effets contradictoires du PD123319 sur la régulation de la masse vasculaire *in vivo*. Le groupe de Levy (Levy et al., 1996; Sabri et al., 1997) a rapporté que PD123319 prévenait le développement de l'hypertrophie artérielle chez les rats perfusés à l'Ang II de façon chronique pour 10 semaines, alors que le groupe de Schiffrin et al. n'a rapporté aucun effet du bloqueur AT₂ dans ce modèle (Li et al., 1998). Chez le SHR, l'administration d'une dose forte de PD123319 (100 mg/kg/jour) pour 10 semaines a réduit la masse aortique (Otsuka et al., 1998). En revanche, nos résultats démontrent clairement que le PD123319 a prévenu la réduction de la masse vasculaire, la survie des CML et la réplication d'ADN des CML induites à l'intérieur de 2 semaines lorsque les récepteurs AT₁ étaient bloqués *in vivo*. Alors qu'aucune des études sus-mentionnées a examiné directement la régulation de la réplication cellulaire et l'apoptose dans les cellules vasculaires, ces divergences avec nos résultats peuvent refléter des différences dans les

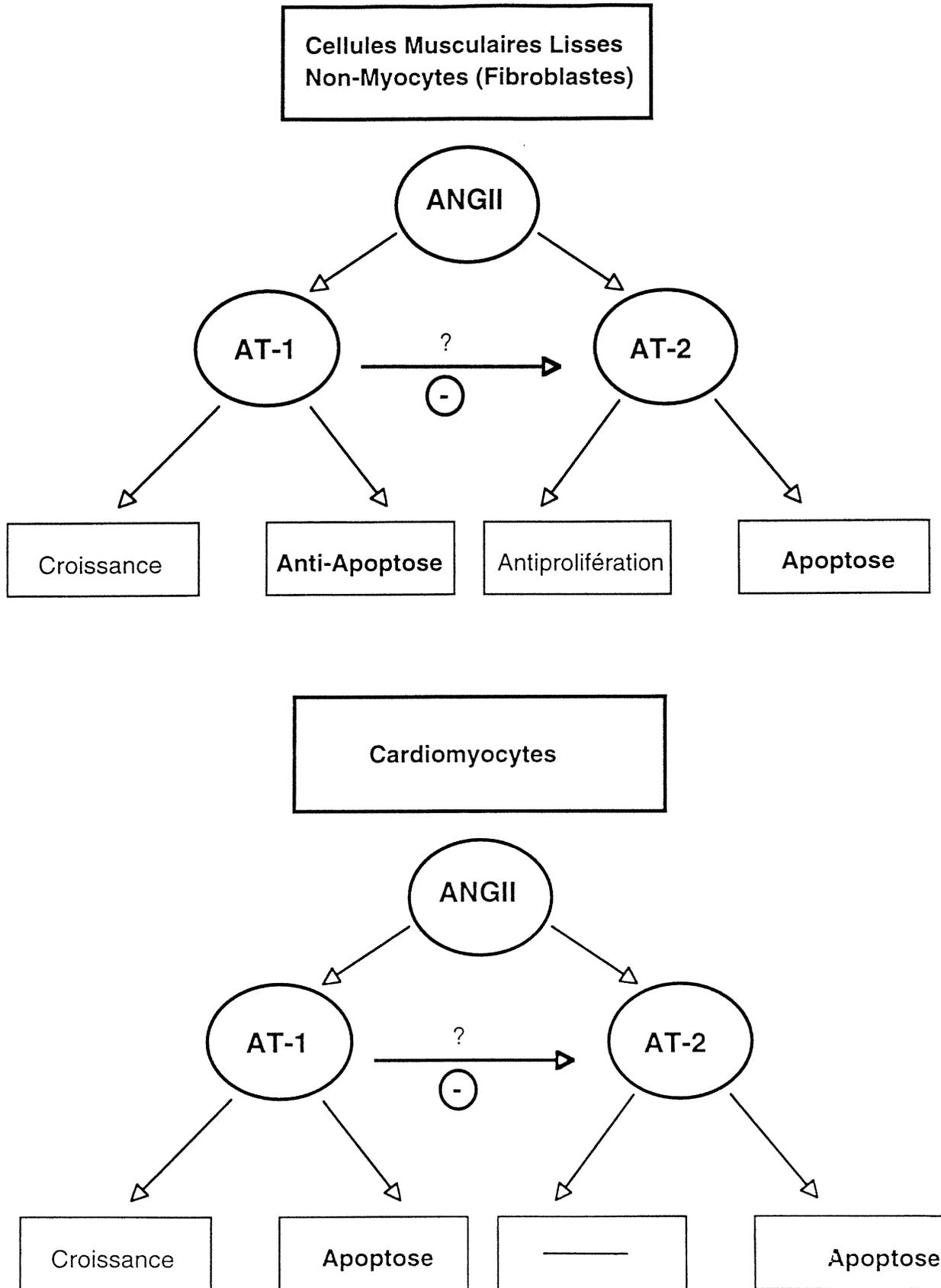


Figure 8. Rôle des récepteurs AT_1 et AT_2 dans les cellules cardiaques et les cellules musculaires lisses.

modèles expérimentaux et/ou dans l'horaire d'administration du PD123319. Par exemple, la réduction rapportée de la croissance des cellules endothéliales par les récepteurs AT₂ (Maric et al., 1998; Munzenmaier and Greene, 1996; Stoll et al., 1995), soulève la possibilité qu'un blocage à long terme de ce récepteur avec le PD123319 pourrait altérer le comportement des cellules endothéliales *in vivo*, un important déterminant du remodelage vasculaire (Lücher, 1994; Ross, 1993). Or, nos résultats confirment la présence des récepteurs dans les cellules endothéliales de l'aorte du SHR. Ainsi, le rôle possible des récepteurs AT₂ des cellules endothéliales dans la régulation de la croissance et l'apoptose des CML ne peut être exclu. Dans un laps de temps aussi court, comme dans notre étude, nous considérons qu'un effet direct des récepteurs AT₂ dans les CML serait plus plausible.

3.3. Rôle des récepteurs AT₂ dans le coeur

Nous avons examiné le rôle des récepteurs AT₂ dans le coeur de ces mêmes rats (Der Sarkissian S et al., 1999). Les résultats indiquent que les récepteurs AT₂ participent aussi à l'augmentation précoce de l'apoptose et de la réponse anti-proliférative à un bloqueur AT₁ dans le coeur chez le SHR *in vivo*. À une semaine seulement, le valsartan produisait une augmentation double la fragmentation internucléosomale d'ADN et de l'activité de caspase-3. Ces changements ont été suivis à 2 semaines d'une réduction significative du contenu en ADN (34%) et de la synthèse d'ADN (20%, mesurée par incorporation de ³H-thymidine, 2 heures avant le sacrifice). La co-administration du PD123319 a atténué les changements de la fragmentation d'ADN, du contenu et de la synthèse d'ADN par le valsartan. De plus, l'activité de la caspase-3 induite par le valsartan a été inhibée complètement par le PD123319. L'administration du PD123319 seul n'a pas eu d'effet sur ces paramètres. Nos résultats ont indiqué que l'augmentation des cellules apoptotiques est plus élevée dans la région sub-épicaudique que mid-myocardique et qu'elle affecte significativement les non-myocytes dans la région du sub-épicaudique et mid-myocardique. Toutefois, l'analyse globale du coeur révèle que la majorité des cellules apoptotiques est située dans l'épicaudique. Ces cellules seraient de type mésothéliales et auraient un taux élevé de renouvellement.

L'induction de l'apoptose a été temporaire, telle que suggérée par une augmentation transitoire de la fragmentation internucléosomale d'ADN et de l'activité des caspase-3 à l'intérieur de 2 semaines de traitement. L'activation transitoire de l'apoptose cardiaque reconnue comme étant « la fenêtre temporelle d'apoptose » a aussi été décrite dans le ventricule droit après la naissance (Kajstura et al.,

1995), dans le ventricule gauche durant l'adaptation à une surcharge de pression (Teiger et al., 1996), durant une thérapie antihypertensive (Tea et al., 1999a) et en réponse à une ischémie de reperfusion (Anversa et al., 1996). La stimulation de l'activité des caspases-3 peut être, du moins en partie, un des mécanismes moléculaires de la fenêtre temporelle de l'apoptose durant la régression cardiaque. Même si le niveau d'expression des récepteurs AT₂ est bas dans le système cardiovasculaire adulte, il est augmenté dans les cœurs en remodelage comme l'hypertrophie cardiaque (Lopez et al., 1994), l'infarctus ou l'hypertrophie des myocytes due à l'étirement mécanique (Sadoshima and Izumo, 1994). Ensemble, ces résultats nous ont fournis les premières évidences que les récepteurs AT₂ relayent l'apoptose cardiovasculaire *in vivo*. Cet effet est transitoire, il affecte les non-myocytes dans le sub-épica et peut être dissocié dans le temps de la suppression de la réplication d'ADN et de la haute pression artérielle. Selon nos connaissances, ces résultats constituent les premières observations du rôle apoptotique des récepteurs AT₂ dans le coeur *in vivo* (deBlois et al, données non publiées).

4.0. IMPLICATION CLINIQUE

4.1. L'importance de la régression de l'hypertrophie cardiovasculaire.

Au niveau vasculaire, plusieurs chercheurs ont émis l'hypothèse que l'épaississement de la paroi joue un rôle important dans le maintien de l'hypertension. Une telle altération pourrait augmenter la résistance vasculaire en exerçant deux effets. Premièrement, au niveau cardiaque, l'hypertrophie ventriculaire gauche représente un facteur de risque important pour la morbidité et la mortalité cardiovasculaire (Agabiti-Rosei, 1994). Deuxièmement, au niveau artériel, l'hypertrophie aortique contribue à l'hypertension artérielle systolique et représente un facteur de risque indépendant de l'hypertrophie ventriculaire gauche (Safar, 1993).

L'importance de la régression de l'hypertrophie cardiovasculaire est de définir si cela offre un réel bénéfice au patient au-delà de la réduction de la pression artérielle. Jusqu'à présent, il n'y a pas de données prospectives disponibles sur la morbidité et la mortalité. Des données préliminaires en Amérique du Nord suggèrent que chez les patients ayant reçu une combinaison de thérapies antihypertensives, les événements cardiovasculaires comme la défaillance cardiaque, l'infarctus du myocarde, la maladie cérébrovasculaire, l'angine et la mort sont significativement plus élevés chez les patients avec une masse ventriculaire gauche élevée à la fin du traitement chronique comparativement aux patients avec une masse ventriculaire réduite ou inchangée (Frohlich, 1983; Frohlich, 1991; Koran et al., 1991). Il y a maintenant des preuves que dans la régression de l'hypertrophie, la fonction ventriculaire systolique est maintenue et la fonction ventriculaire

diastolique est améliorée tant au repos qu'à l'exercice (Muiesan et al., 1991; Schulman et al., 1990; Trimarco et al., 1988). Ceci a été démontré avec différentes classes d'agents antihypertenseurs (incluant les inhibiteurs de l'ECA, les β -bloqueurs, les antagonistes AT_1 , les antagonistes calciques mais non les vasodilatateurs comme hydralazine) et aussi suivant la période d'arrêt de la thérapie antihypertensive. Les inhibiteurs de l'ECA peuvent ralentir la détérioration du coeur défaillant, un bénéfice qui est dû en partie à l'inhibition du remodelage cardiaque (Brown and Vaughan, 1998). Les effets bénéfiques à long terme du blocage β -adrénergique dans la défaillance cardiaque sont aussi accompagnés d'une réduction de la taille cardiaque. Un des mécanismes impliqués pourrait être l'activation de l'apoptose de non-myocytes et/ou une diminution de la croissance des non-myocytes et/ou une diminution de l'apoptose et de l'hypertrophie des myocytes. Ces observations, qui sont en accord avec les preuves croissantes qui suggèrent que l'Ang II, la norépinéphrine, et d'autres médiateurs neurohumoraux puissent évoquer une réponse de croissance maladaptative, pourraient expliquer pourquoi les inhibiteurs du système rénine-angiotensine-aldostérone et du système nerveux sympathique ralentissent la dilatation progressive du coeur défaillant.

Il a été suggéré que les diurétiques possèdent peu sinon pas de capacité à renverser l'hypertrophie ventriculaire gauche (Tarazi, 1985). Mais récemment, cette conclusion a été désapprouvée par l'étude TOMHS (Liebson et al., 1995) et par une méta-analyse de Schmieder et al. (Schmieder et al., 1996). L'étude de Schmieder et al. (Schmieder et al., 1996) suggère que les classes de médicaments antihypertenseurs ayant la plus grande capacité à réduire l'hypertrophie ventriculaire gauche en clinique sont en ordre d'efficacité : les inhibiteurs de l'ECA, les bloqueurs calciques, les diurétiques et les β -bloqueurs. Dans notre étude, tout ces médicaments ont réduit la masse cardiaque et augmenté l'apoptose cardiaque à l'intérieur de 4 semaines de traitement chez le SHR, à l'exception de l'hydrochlorothiazide et l'hydralazine. Par contre, il n'est pas exclu qu'un traitement à long terme avec le thiazide puisse prévenir l'augmentation de la masse cardiaque. Étant donné que l'ischémie myocardique peut être un problème fondamental dans la mortalité des patients avec hypertrophie ventriculaire gauche, il est important d'analyser s'il y a réduction de l'ischémie myocardique durant la régression de l'hypertrophie. Il a été démontré chez le SHR qu'une thérapie antihypertensive avec soit l'atenolol ou le bunazocin a été efficace pour prévenir l'hypertrophie cardiaque et le dommage ischémique (Tanaka et al., 1991). De plus, récemment, il a été suggéré que la régression de la masse ventriculaire gauche par une thérapie antihypertensive avec énalapril pouvait réduire l'ischémie microvasculaire et le développement subséquent de l'angine avec une amélioration subséquente de la tolérance à l'exercice (Iriarte et al., 1995).

Une des questions importantes dans la régression de l'hypertrophie ventriculaire gauche concerne la nature du processus de la régression : implique-t-elle les myocytes ou les fibroblastes. source de tissu collagèneux ? Il apparaît maintenant clair qu'il y a un excès du tissu fibreux dans l'hypertrophie pathologique. Il y a des preuves expérimentales solides qui suggèrent qu'un traitement aux inhibiteurs de l'ECA provoque une régression parallèle des myocytes et des tissus fibreux (Struijker-Boudier et al., 1995b). Une récente étude échocardiographique a démontré que la quantité de tissus fibreux qui régresse est similaire au volume de régression de l'hypertrophie myocytaire lorsqu'un inhibiteur de l'ECA est utilisé (Lucarini et al., 1994). Plusieurs études cliniques ont suggéré une amélioration de la fonction ventriculaire gauche. La régression implique-t-elle une régulation de la mort des myocytes et des fibroblastes par apoptose ? Nos études ont démontré que les antagonistes des récepteurs AT_1 peuvent induire une augmentation transitoire de l'apoptose des non-myocytes dans la région sub-épicaudique des coeurs hypertrophiés en régression. Ceci pourrait contribuer à la réduction de la fibrose myocardique. À long terme, la régression pourrait impliquer une réduction de l'apoptose des myocytes hypertrophiés et contribuer à l'amélioration de la fonction cardiaque, tel que suggéré par Diez et al. (Diez et al., 1997b).

4.2. Les voies apoptotiques comme cibles thérapeutiques potentielles dans les maladies cardiovasculaires.

L'apoptose a été étudiée considérablement pour son implication dans la réponse immunitaire, la croissance cellulaire tumorale et dans plusieurs autres processus physiologiques (Ellis et al., 1996; Ameisen, 1994). Notre groupe a été parmi les premiers à suggérer que les composantes cellulaires des vaisseaux, du coeur et des reins sont déterminées par un équilibre entre la mort cellulaire par apoptose et la croissance cellulaire (Hamet, 1995; Hamet et al., 1995b). Il a été postulé qu'un déséquilibre favorisant la survie cellulaire contribue à certains états de la maladie cardiovasculaire tels l'hypertrophie ou à l'inverse, la défaillance cardiaque. Notre groupe a démontré une augmentation de l'apoptose dans le coeur de rat génétiquement hypertendu (SHR) et, dans le coeur, le rein et le cerveaux de souris génétiquement hypertendu (Hamet et al., 1995a). Nous avons aussi rapporté que les CML d'aorte de SHR en culture montraient un plus haut niveau d'apoptose en réponse à l'AMP cyclique (Hamet et al., 1995a). De plus, il a été suggéré que la diminution des dimensions vasculaires observées dans les vaisseaux hypertendus puisse refléter un processus actif d'élimination cellulaire par apoptose conduisant à une altération de l'architecture vasculaire. En revanche, il a été rapporté que l'apoptose des CML dans les petites artères du SHR adulte est inhibée en réponse à un excès de l'expression de Bcl-2 (Diez et al., 1997a). Ensemble, ces résultats suggèrent

que l'apoptose joue un rôle important dans la pathogénèse du remodelage cardiovasculaire. L'apoptose peut donc être considérée comme une nouvelle cible pour l'intervention thérapeutique de certaines maladies cardiovasculaires. Dans les maladies cardiovasculaires, l'homéostasie normale pourrait être caractérisée par un équilibre entre la croissance et l'apoptose. Une augmentation sélective de la croissance conduit à l'hyperplasie et l'apoptose massive peut résulter en atrophie. L'apoptose peut réguler la masse cellulaire dans la paroi artérielle normale. Il a été postulé que des niveaux élevés d'apoptose observés dans les plaques des CML pourraient contribuer à la rupture de la plaque et sa dégradation (Best et al., 1999). Par conséquent, le blocage de l'apoptose dans la lésion athérosclérotique pourrait inhiber les complications et séquelles cliniques de la rupture des plaques athérosclérotiques instables. En revanche, les plaques fibreuses peu enclin à rompre pourraient être réduites par apoptose.

Depuis plus de deux décennies déjà, les bloqueurs de canaux calciques sont disponibles sur le marché pour réduire la pression sanguine chez les patients hypertendus et pour soulager la douleur due à l'angine de poitrine. À la lumière des études épidémiologiques, plusieurs observations méritent d'être mentionnées. Premièrement, l'interruption d'une thérapie est fréquente, soit par le médecin ou le patient. En effet, une observation intéressante des études cliniques est que les patients changent fréquemment d'une classe thérapeutique à une autre; ainsi, il est difficile d'attribuer les effets secondaires à une classe de médicaments en particulier. Nos données suggèrent qu'un traitement à la nifédipine après une « vacance » thérapeutique ne diminue pas davantage la masse cardiovasculaire ou le contenu en ADN. Deuxièmement, les bloqueurs de canaux calciques peuvent réduire le risque d'infarctus du myocarde comparativement aux autres thérapies, du moins dans certaines populations. Cette dernière observation est controversée. En effet, des études épidémiologiques ont suggéré que le traitement des patients hypertendus avec une formulation de la nifédipine à courte durée d'action (comme dans la présente étude) augmente le risque de la mortalité coronarienne (Furberg et al., 1995) ou le cancer (Pahor et al., 1996). Étant donné qu'une élévation du calcium intracellulaire pourrait être impliquée dans l'apoptose, il a été postulé que les bloqueurs de canaux calciques pourraient inhiber l'apoptose, conduisant directement à la croissance néoplasique. Il demeure incertain si l'augmentation du risque était un effet de classe des antagonistes classiques, un biais de prescription, un effet secondaire relié à l'activation sympathique causée par les formulations à court terme de la nifédipine (dans le cas de la mortalité coronarienne) (Epstein, 1996), ou simplement une association indépendante de la médication entre l'hypertension et le cancer (Hamet, 1996). À la lumière de nos résultats, un traitement avec le bloqueur calcique nifédipine

induit une fenêtre transitoire d'apoptose durant la régression de l'hypertrophie cardiovasculaire. Supportant nos données, une récente étude clinique incluant 30 patients hypertendus a démontré une réduction de la concentration de Bcl-2 chez les patients hypertendus traités à la nifédipine (Buemi et al., 1999). De plus, une récente revue scientifique de la littérature ne supporte pas le lien causal entre l'utilisation des antagonistes calciques et l'augmentation du risque de développement du cancer chez l'humain (Hamet, 1996).

Les développements thérapeutiques dépendront d'une meilleure compréhension de la régulation des voies de l'apoptose et de la prolifération de même que les rôles pathophysiologiques de l'apoptose dans les organes cardiovasculaires. Les cibles potentielles d'une intervention pourraient être regroupées comme suit : (1) les récepteurs membranaires des facteurs de croissance, de l'Ang II et des catécholamines; par exemple, un blocage sélectif des récepteurs AT₂ pourrait prévenir l'apoptose des CML hypertrophiées; (2) la régulation des signaux cellulaires par des inhibiteurs ou stimulateurs de kinase/phosphatase; et (3) la régulation des oncogènes par des thérapies utilisant le transfert génique local et la transcription en utilisant les oligonucléotides antisense. Par exemple, les facteurs comme le Bcl-2 et Bax, qui contrôlent l'apoptose en réponse à une variété de stimuli, pourraient fournir des cibles thérapeutiques pour la régulation de la mort cellulaire de différents types cellulaires et à partir de différents inducteurs. Une approche thérapeutique ultime est la régulation de l'apoptose de manière spécifique dans le tissu ou la cellule, et de façon coordonnée avec la prolifération.

4.3. Rôle apoptotique des récepteurs AT₂ : implications cliniques

Nos résultats impliquant les récepteurs AT₁ dans la régulation de l'apoptose cellulaire cardiovasculaire chez le SHR sont en accord avec le rôle de l'Ang II comme régulateur de la masse et de la structure cardiovasculaire. En effet, l'inhibition de la voie de l'Ang II par un antagoniste des récepteurs AT₁ ou un inhibiteur de l'ECA prévient ou diminue le développement de l'hypertrophie cardiovasculaire et augmente la survie chez les patients (ELITE (Pitt et al., 1997), CONSENSUS(1987), SOLVD (1991)) et les modèles animaux.

En clinique, les antagonistes des récepteurs AT₁ produisent une augmentation du niveau d'Ang II plasmatique, qui stimule sélectivement les récepteurs AT₂ (Timmermans et al., 1993). Ainsi, parce que le blocage des récepteurs AT₁ augmente les niveaux d'Ang II circulante, il est possible que la régression de l'hypertrophie cardiovasculaire en réponse aux bloqueurs AT₁ implique une

surstimulation des récepteurs AT₂ et une induction sélective de l'apoptose. Nos études ont démontré pour la première fois que les récepteurs AT₂ de l'Ang II induisent l'apoptose des CML de l'aorte *in vivo* chez le rat SHR. Même si la signification thérapeutique de ces résultats demeure non établie, nous avons spéculé que l'apoptose des CML induite par les récepteurs AT₂ pourrait contribuer aux effets inhibiteurs puissants des antagonistes AT₁ sur les complications cardiovasculaires associées au remodelage vasculaire hypertrophique.

La fibrose et le remodelage, maintenant reconnus dans diverses maladies cardiaques, peuvent réduire la fonction cardiaque. La défaillance cardiaque décompensatoire est associée à une augmentation de l'expression d'ARNm des protéines de la matrice extracellulaire qui se manifeste en fibrose cardiaque (Weber et al., 1993). Les récepteurs de type 1 de l'Ang II semblent être impliqués dans ce processus alors que les récepteurs de type 2 peuvent contrebalancer les effets relayés par AT₁ (Timmermans et al., 1993b). La distribution différentielle des récepteurs AT₁ et AT₂ dans les cœurs humains défaillants a été démontrée récemment (Wharton et al., 1998). Les régions à haute densité de récepteurs AT₂ sont localisées dans les zones à haute activité fibroblastique et à dépôt de collagène dans le coeur défaillant humain (Wharton et al., 1998). Ceci suggère que le système RAS est impliqué dans la fibrose cardiaque réparatrice. En réponse à l'Ang II, les fibroblastes cardiaques et les myofibroblastes produisent le TGF- β qui peut stimuler la production de matrice extracellulaire et la fibrose cardiaque. Cet effet est atténué par le losartan (Campbell and Katwa, 1997). Les récepteurs de l'Ang II semblent avoir des fonctions différentes dans les modèles de défaillance cardiaque, d'infarctus du myocarde et d'hypertension (Liu et al., 1997). Le blocage de l'Ang II, par l'inhibition de sa formation par un inhibiteur de l'ECA ou par un blocage du récepteur AT₁, peut aussi être efficace dans la régression de l'hypertrophie ventriculaire gauche en prévenant la formation d'aldostérone. En effet, il a été démontré que l'aldostérone est importante dans l'hypertrophie ventriculaire et elle est directement impliquée comme stimulant de la fibrose cardiaque (Weber and Brilla, 1991). De plus, l'aldostérone peut bloquer le recaptage extraneuronal de la norépinéphrine du myocarde et ainsi pourrait contribuer à augmenter la défaillance cardiaque et la mort subite associée à l'activation du système rénine-angiotensine-aldostérone et à l'hypertrophie ventriculaire (Barr et al., 1995; Weber and Brilla, 1991). L'inhibition de la formation d'Ang II et/ou ses effets sur le récepteur AT₁ par un inhibiteur de l'ECA et un antagoniste AT₁ ne semble pas complètement supprimer la formation d'aldostérone, car des mécanismes autres que la formation de l'Ang II, comme le potassium du sérique, sont importants pour sa régulation (Pitt, 1998). D'ailleurs, il a été récemment démontré qu'un blocage des récepteurs de l'aldostérone avec la spirinolactone réduit

substantiellement le risque de morbidité et de mortalité chez les patients avec défaillance cardiaque (Pitt et al., 1999).

L'hypertrophie cardiaque est associée avec une expression augmentée des récepteurs AT₂ de l'Ang II (Lopez et al., 1994). Cette observation peut refléter une augmentation de la fibrose, considérant que les fibroblastes sont des sites importants de l'expression des récepteurs AT₂ cardiaques (Lopez et al., 1994). Contrairement aux récepteurs AT₁, la signification de l'expression des récepteurs AT₂ de l'Ang II dans le coeur est mal définie. Or, il a été déjà démontré que les récepteurs AT₂ inhibent la croissance des fibroblastes cardiaques, la formation de la matrice extracellulaire (Nakajima et al., 1995a) et qu'ils exercent un effet chronotrope négatif (Kuizinga et al., 1998), suggérant qu'ils aient un effet cardioprotecteur. Basés sur ces résultats, il est intéressant de spéculer que le développement d'agonistes des récepteurs AT₂ pourrait constituer une nouvelle approche thérapeutique.

Récemment, une étude sur le losartan administré chez des patients âgés avec défaillance cardiaque a comparé l'efficacité de l'antagoniste des récepteurs AT₁ losartan et de l'inhibiteur de l'ECA captopril (Pitt et al., 1997). Les résultats de cette première étude ont démontré que le losartan est supérieur au captopril pour réduire la mortalité et la fréquence d'hospitalisation chez ces patients. Par contre, ces résultats n'ont pas été confirmés par la suite (Pitt et al., 2000). Néanmoins, il est permis de spéculer que les effets bénéfiques puissent être expliqués, du moins en partie, par un effet potentiel relayé par les récepteurs AT₂. Parce qu'un blocage du système rénine angiotensine est bénéfique pour les patients avec défaillance cardiaque ou maladies rénales, et étant donné que les antagonistes des récepteurs AT₁ seront probablement couramment utilisés pour le traitement des patients avec maladies cardiovasculaires et rénales dans un avenir rapproché, la découverte du rôle apoptotique des récepteurs AT₂ de l'Ang II *in vivo* pourrait représenter une nouvelle cible thérapeutique pour le contrôle du remodelage cardiovasculaire dans l'hypertension.

5.0. CONCLUSION GÉNÉRALE

La compréhension des mécanismes moléculaires déterminant la régression de l'hypertrophie cardiovasculaire en réponse à différents agents antihypertenseurs est un sujet très important tant du point de vue fondamental que clinique. Nos résultats appuient l'hypothèse selon laquelle la mort cellulaire par apoptose est un mécanisme important dans la détermination de la masse cardiovasculaire.

Les approches pharmacologiques utilisées dans ce projet de doctorat ont clairement démontré pour la première fois que (1) l'apoptose représente un mécanisme cellulaire impliqué au cours de la régression de l'hypertrophie cardiovasculaire en réponse à différents agents antihypertenseurs; (2) les récepteurs AT₂ de l'Ang II induisent l'apoptose des CML *in vivo*; (3) la réponse apoptotique à un bloqueur des canaux calciques (i) est associée à l'initiation de la thérapie, (ii) ne diminue pas davantage l'hypertrophie cardiovasculaire après une « vacance » thérapeutique.

Le développement de nouvelles thérapies dépendra d'une meilleure compréhension de la régulation des voies moléculaires de l'apoptose et de la prolifération de même que le rôle pathophysiologique de l'apoptose dans les organes cardiovasculaires.

BIBLIOGRAPHIE :

1987. CONSENSUS Trial Study Group. Effects of enalapril on mortality in severe congestive heart failure. Results of the Cooperative North Scandinavian Enalapril Survival Study (CONSENSUS). *N Engl J Med.* 316:1429-1435.

1991. SOLVD Investigators. Effects of enalapril on survival in patients with reduced left ventricular ejection fractions and congestive heart failure. *N Engl J Med.* 325:293-302.

1992a. First International Symposium on Imidazoline Preferring Receptors. *Fund Clin Pharmacol.* 6:7S-58S.

1992b. SOLVD Investigators. Effect of enalapril on mortality and the development of heart failure in asymptomatic patients with reduced left ventricular ejection fractions. *N Engl J Med.* 327:685-691.

Ablad, B. 1963. A study of the mechanism of the haemodynamic effects of hydralazine in man. *Acta Pharmacol Toxicol.* 20:1-53.

Adams, M.A., A. Bobik, P.I. Korner. 1990. Enalapril can prevent vascular amplifier development in spontaneously hypertensive rats. *Hypertension.* 16:252-260.

Agabiti-Rosei, E. 1994. Evaluation of the cardiac effects of antihypertensive agents. *J Cardio Pharmacol.* 23 (Suppl. 5):S42-S48.

Ahlquist, R.P. 1948. A study of the adrenotropic receptors. *Am J Physiol.* 153:586-600.

Alnemri, E.S., D.J. Livingston, D.W. Nicholson. 1996. Human ICE/CED-3 protease nomenclature. *Cell.* 87:171.

Ameisen, J.C. 1994. Programmed cell death (apoptosis) and cell survival regulation: relevance to AIDS and cancer. *AIDS.* 8:1197-1213.

Anderson, K.R., G.S.T.J. Sutton, J.T. Lie. 1979. Histopathological types of cardiac fibrosis in myocardial disease. *J Pathol.* 128:79-85.

Anderson, P., Y.S. Do, W.A. Hsueh. 1993. Angiotensin II causes mesangial cell hypertrophy. *Hypertension.* 21:29-35.

Anversa, P., D. Fitzpatrick, S. Argani, J.M. Cappaso. 1991. Myocyte mitotic division in the aging mammalian rat heart. *Circ Res.* 69:1159-1164.

Anversa, P., G. Olivetti, A. Leri, Y. Liu, J. Kajstura. 1997. Myocyte cell death and ventricular remodeling. *Curr Opin Nephrol Hypertens.* 6:169-176.

Anversa, P., G. Olivetti, M. Melissari, A.V. Loud. 1979. Morphometric study of myocardial hypertrophy induced by abdominal aortic stenosis. *Lab Invest.* 40:341-349.

Anversa, P., T. Palackal, E.H. Sonnenblick. 1990a. Myocyte cell loss and myocyte cellular hyperplasia in the hypertrophied aging rat heart. *Circ Res.* 67:871-885.

Anversa, P., T. Palackal, E.H. Sonnenblick, G. Olivetti. 1990b. Hypertensive cardiomyopathy: myocyte nuclei hyperplasia in the mammalian heart. *J Clin Invest.* 85:994-997.

Anversa, P., R. Ricci, G. Olivetti. 1986. Quantitative structural analysis of the myocardium during physiologic growth and induced cardiac hypertrophy: a review. *J Am Coll Cardiol.* 7:1140-1149.

Arends, M.J., A.H. Wyllie. 1991. Apoptosis: mechanisms and roles in pathology. *In: Int Rev Exp Pathol.* 32:223-254.

Arendshorst, W.J. 1979. Autoregulation of renal blood flow in spontaneously hypertensive rats. *Circ Res.* 44.

Arima, S., Y. Endo, H. Yaoita, K. Omata, S. Ogawa, K. Tsunoda, M. Abe, K. Takeuchi, K. Abe, S. Ito. 1997. Possible role of P-450 metabolite of arachidonic acid in vasodilator mechanism of angiotensin II type 2 receptor in the isolated microperfused rabbit afferent arteriole. *J Clin Invest.* 100:2816-2823.

Baker, K.M., G.W. Booz, D.E. Dostal. 1992. Cardiac actions of angiotensin II: role of an intracardiac renin-angiotensin system. *Annu Rev Physiol.* 54:227-241.

Bao, G., P. Gohlke, T. Unger. 1992. Role of bradykinin in chronic antihypertensive actions of ramipril in different hypertension models. *J Cardiovasc Pharmacol.* 20:S96-99.

Barrett, J.C., G. Preston. 1994. Apoptosis and cellular senescence: forms of irreversible growth arrest. *In: Tomei LD, Cope FO, eds. Apoptosis II: The molecular basis of apoptosis in disease.* New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press:253-281.

Bates, R.C., A. Buret, D.F. Van Helden, M.A. Horton, G.F. Burns. 1994. Apoptosis induced by inhibition of intercellular contact. *J Cell Biol.* 90:8910-8914.

Bauer, J.H., G.P. Reams, S.M. Lal. 1987. Renal protective effect of strict blood pressure control with enalapril therapy. *Arch Intern Med.* 147:1397-1400.

- Bayly, A.C., R.A. Roberts, C. Dive.** 1994. Suppression of liver cell apoptosis in vitro by the non-genotoxic hepatocarcinogen and peroxisome proliferator nafenopin. *J Cell Biol.* 125:197-203.
- Bell, L., J. Madri.** 1990. Influence of the angiotensin system on endothelial and smooth muscle cell migration. *Am J Pathol.* 137:7-12.
- Bennett, M., K. Macdonald, S.W. Chan, J.P. Luzio, R. Simari, P. Weissberg.** 1998. Cell surface trafficking of Fas: a rapid mechanism of p53-mediated apoptosis. *Science.* 282:290-293.
- Bennett, M.R., G.I. Evan, A.C. Newby.** 1994. Deregulated expression of the c-myc oncogene abolishes inhibition of proliferation of rat vascular smooth muscle cells by serum reduction, interferon-gamma, heparin, and cyclic nucleotide analogues and induces apoptosis. *Circ Res.* 74:525-536.
- Berecek, K.H., U. Schwertsschlag, F. Gross.** 1980. Alterations in renal vascular resistance and reactivity in spontaneous hypertension in rats. *Am J Physiol.* 238.
- Bevan, R.D.** 1976. An autoradiographic and pathological study of cellular proliferation in rabbit arteries correlated with an increase in arterial pressure. *Blood Vessels.* 13:100-128.
- Bevan, R.D., H. Tsuru.** 1981. Functional and structural changes in the rabbit ear artery after sympathetic denervation. *Circ Res.* 49:478-485.
- Bianchi, G., U. Fox, G.F. Difrancesco, A.M. Giovanetti, D. Pagetti.** 1974. Blood pressure changes produced by kidney cross transplantation between spontaneously hypertensive rats and normotensive rats. *Clin Sci Mol Med.* 47:435-448.
- Bianchi, G., E. Niutta, P. Ferrari, P. Salvati, S. Salaridi, D. Cusi, R. Colombo, B. Cesana, G. Tripodi, P. Pati, E. Alberghini.** 1989. A possible primary role for the kidney in essential hypertension. *American Journal of Hypertension.* 2:2S-6S.
- Bing, R.J.** 1972. Reparative processes in heart muscle following myocardial infarction. *Cardiology.* 56:314-324.
- Biron, P., E. Koiw, W. Nowaczynski.** 1961. The effects of intravenous infusions of valine-5 angiotensin II and other pressor agents on urinary electrolytes and corticoids including aldosterone. *J Clin Invest.* 60:338-347.
- Bkaily, G., D. Economos, L. Potvin, JL Ardilouze, C. Marriott, J. Corcos, D. Bonneau, CN Fong.** 1992. Blockade of insulin sensitive steady-state R-type Ca²⁺ channel by PN 200-110 in heart and vascular smooth muscle. *Mol Cell Biochem.* 117(1):93-106.

- Bkaily, G., P. d'Orleans-Juste, R. Naik, J. Perodin, J. Stankova, E. Abdunour, M. Rola-Pleszcynski.** 1993. PAF activation of a voltage-gated R-type Ca²⁺ channel in human and canine aortic endothelial cells. *Br J Pharmacol.* 110(2):519-520.
- Black, J.W., J.S. Stephenson.** 1962. Pharmacology of a new adrenergic beta-adrenoreceptor blocking compound (Nethalide). *Lancet.* 11:311.
- Black, M.J., M.A. Adams, A. Bobik, J.H. Campbell, G.R. Campbell.** 1989. Effect of enalapril on aortic smooth muscle cell polyploidy in the spontaneously hypertensive rat. *Journal of Hypertension.* 7:997-1003.
- Bonnefoy-Berard, N., L. Genestier, M. Flacher, J.P. Remillard.** 1994. The phosphoprotein phosphatase calcineurin controls calcium-dependent apoptosis in B cell lines. *Eur J Immunol.* 24:325-329.
- Booz, G.W., K.M. Baker.** 1996. Role of type 1 and type 2 angiotensin receptors in angiotensin II-induced cardiomyocyte hypertrophy. *Hypertension.* 28:635-640.
- Bortner, C.D., N. Oldenburg, J. Cidlowski.** 1995. The role of DNA fragmentation in apoptosis. *Trends in Cell Biology.* 5:21-26.
- Brater, D.C.** 2000. Pharmacology of diuretics. *Am J Med.* 319:38-50.
- Braun-Menendez, E., J.C. Fasciolo, L.F. Leloir, J.N. Munoz.** 1940. The substance causing renal hypertension. *J Physiol.* 98:283-298.
- Brilla, C.G., J.S. Janicki, K.T. Weber.** 1991. Cardioreparative effects of lisinopril in rats with genetic hypertension and left ventricular hypertrophy. *Circulation.* 83:1771-1779.
- Brilla, C.G., R. Pick, L.B. Tan, J.S. Janicki, K.T. Weber.** 1990. Remodeling of the rat right and left ventricle in experimental hypertension. *Circ Res.* 67:1355-1364.
- Bristow, M.R., R. Ginsburg, V. Umans, M. Fowler, W. Minobe, R. Rasmussen.** 1986. B1 and B2-adrenergic-receptor subpopulations in nonfailing and failing human ventricular myocardium: coupling of both receptor subtypes to muscle contraction and selective B1-receptor down-regulation in heart failure. *Circ Res.* 59:297-309.
- Brown, N.J., D.E. Vaughan.** 1998. Angiotensin-converting enzyme inhibitors. *Circ.* 97:1411-1420.
- Brunner, H.R., H. Gavras, J.H. Laragh, R. Keenan.** 1973. Angiotensin II blockade in man by Sarl-ala8-angiotensin II for understanding and treatment of high blood pressure. *Lancet.* ii:1045-1048.

Brunner, H.R., J.D. Kirshman, J.E. Sealey, J.H. Laragh. 1971. Hypertension of renal origin: evidence for two different mechanisms. *Science*. 174:1344-1346.

Bruno, L., S. Agar, D. Weller. 1979. Absence of a prehypertensive stage in post-natal Kyoto hypertensive rats. *Jpn Heart J*. 20:90-92.

Buhler, F.R., J.H. Laragh, L. Baer, E.D. Vaughan, H.R. Brunner. 1972. Propranolol inhibition of renin secretion. *N Engl J Med*. 287:1209-1214.

Burgess, M.L., W.E. Carver, L. Terrcio, S.P. Wilson, M.A. Wilson. 1994. Integrin-mediated collagen gel concentration by cardiac fibroblasts. *Circ Res*. 74:291-298.

Burt, D.W., L.J. Beecroft, J.J. Mullins, D. Pioli, H. George, J. Brooks. 1985. Mouse renin gene structure, evolution and function. *Kostka V. ed. Aspartic proteinases and their inhibitors. Berlin: Walter de Gruyter*. 355-377.

Cadilhac, M., J.F. Giudicelli. 1986. Myocardial and vascular effects of perindopril, a new converting enzyme inhibitor, during hypertension development in spontaneously hypertensive rats. *Arch Int Pharmacodyn Ther*. 284:114-126.

Cambien, F., O. Poirier, L. Lecerf, A. Evans, J.P. Cambou, D. Arveiler. 1992. Deletion polymorphism in the gene for angiotensin-converting enzyme is a potent risk factor for myocardial infarction. *Nature*. 359:641-644.

Campbell, D.J., J.F. Habener. 1986. Angiotensinogen gene is expressed and differentially regulated in multiple tissues of the rat. *J Clin Invest*. 78:31-39.

Campbell, D.J., A. Kladis, A.J. Valentijn. 1995. Effects of losartan on angiotensin and bradykinin peptides and angiotensin-converting enzyme. *J Cardiovasc Pharmacol*. 26:233-240.

Campbell, J.H., G. Tachas, M.J. Black, G. Cockerill, G.R. Campbell. 1991. Molecular biology of vascular hypertrophy. *Basic Res Cardiol*. 86:3-13.

Capasso, J.M., T. Palackal, G. Olivetti, P. Anversa. 1990. Left ventricular failure - induced by long-term hypertension in rats. *Circ Res*. 66:1400-1412.

Cascieri, M.A., H.G. Bull, R.A. Mumford, A.A. Patchett, N.A. Thornberry, T. Liang. 1984. Carboxy-terminal tripeptidyl hydrolysis of substance P by purified rabbit lung angiotensin-converting enzyme and the potentiation of substance P activity in vivo by captopril and MK-422. *Mol Pharmacol*. 25:287-293.

Caulfield, J.B. 1983. Alterations in cardiac collagen with hypertrophy. In: *Tarazi RC, Dunbar JB. eds. Perspectives in cardiovascular research.* Vol. 8. New York: Raven Press:49-57.

Chalmers, J., P. Pilowski. 1991. Brainstem and bulbospinal neurotransmitter systems in the control of blood pressure. *J Hypertens.* 9:675-694.

Cheitlin, M.D., M. Rubinowitz, H. McAllister, J.I.E. Hoffmann, S. Bharati, M. Levy. 1980. The distribution of fibrosis in the left ventricle in congenital aortic stenosis and coarctation of the aorta. *Circulation.* 62:823-830.

Chinnaiyan, A.M., D. Chaudhary, K. O'Rourke, E.V. Koorin, V.M. Dixit. 1997. Role of CED-4 in the activation of CED-3. *Nature.* 388:728-729.

Chiu, A.T., W.F. Herblin, D.E. McCall, R.J. Ardecky, D.J. Carini, J.V. Duncia. 1989. Identification of angiotensin II receptor subtypes. *Biochem Biophys Res Commun.* 165:196-203.

Cho, A., L. Mitchell, D. Koopmans, B.L. Langille. 1997. Effects of changes in blood flow rate on cell death and cell proliferation in carotid arteries of immature rabbits. *Circ Res* 81(3):328-37

Christensen, K.L., L.T. Jespersen, M.J. Mulvany. 1989. Development of blood pressure in spontaneously hypertensive rats after withdrawal of long-term treatment related to vascular structure. *J Hypertens.* 17:141-150.

Christensson, B., I. Nordenvelt, H. Westling, T. White. 1969. Haemodynamic effects of nitroglycerine in normal subjects during supine and sitting exercise. *Br Heart J.* 31:80-82.

Chung, O., M. Stoll, T. Unger. 1996. Physiologic and pharmacologic implications of AT1 versus AT2 receptors. *Blood Pressure.* 5:47-52.

Churchill, P.C., M.C. Churchill, A.K. Bidani, K.A. Griffin, M. Picken, M. Pravenec, V. Kren, E. St Lezin, J.M. Wang, N. Wang, T.W. Kurtz. 1997. Genetic susceptibility to hypertension-induced renal damage in the rat. Evidence based on kidney-specific genome transfer. *J Clin Invest* 100(6):1373-82

Clarke, A., S. Gledhill, M. Hooper, C. Bird, A. Wyllie. 1994. p53 dependence of early apoptotic and proliferative responses within the mouse intestinal epithelium following gamma-irradiation. *Oncogene.* 9:1767-1773.

Clarke, A.R., C.A. Purdie, D.J. Harrison, R.G. Morris, C.C. Bird, M.L. Hooper, A.H. Wyllie. 1993. Thymocyte apoptosis induced by p53-dependent and independent pathways. *Nature.* 362:849-852.

- Clozel, J.-P., H. Kuhn, F. Hefti.** 1989. Decreases of vascular hypertrophy in four different types of arteries in spontaneously hypertensive rats. *Am J Med.* 87:92-95.
- Clozel, J.P., H. Kuhn, F. Hefti.** 1992. Vascular protection with cilazapril in hypertension. *J Cardiovasc Pharmacol.* 19:28-33.
- Cohen, M.K., K.D. Kurz.** 1982. Angiotensin converting enzyme inhibition in tissues from spontaneously hypertensive rats after treatment with captopril or MK-421. *J Pharmacol Exp Ther.* 220:63-69.
- Collier, J.G., R.E. Lorge, B.F. Robinson.** 1978. Comparison of effects of Tolmesozide (RX71107), diazoxide, hydralazine, prazosin, glyceryl trinitrate and sodium nitroprusside on forearm arteries and dorsal hand veins of man. *Br J Clin Pharmacol.* 5:35-44.
- Cowley, A.W.** 1992. Long-term control of arterial blood pressure. *Physiological Reviews.* 72:231-299.
- Cowley, A.W., R.J. Roman.** 1996. The role of the kidney in hypertension. *JAMA.* 275:1581-1589.
- Crawford, D.C., A.V. Chobanian, P. Brecher.** 1994. Angiotensin II induces fibronectin expression associated with cardiac fibrosis in the rat. *Circ Res.* 74:727-739.
- Daemen, M.J.A.P., D.M. Lombardi, F.T. Bosman, S.M. Schwartz.** 1991. Angiotensin II induces smooth muscle cell proliferation in the normal and injured arterial wall. *Circ Res.* 68:450-456.
- Daemen, M.J.A.P., J.F.M. Smits.** 1993. Inhibition of interstitial myocardial DNA synthesis after coronary artery ligation in the rat by the angiotensin subtype 2 receptor antagonist PD123319. *Eur Heart J.* 14:414.
- Dahl, L.K., M. Heine.** 1975. Primary role of renal homografts in setting chronic blood pressure levels in rats. *Circ Res.* 36:692-696.
- Dahlhof, B., K. Pennert, L. Hansson.** 1992. Reversal of left ventricular hypertrophy in hypertensive patients. A meta-analysis of 109 treatment studies. *Am J Hypertens.* 5:95-110.
- Danser, A.H., J.P. van Kats, P.J. Admiraal, F.H. Derkx, J.M. Lamers, P.D. Verdouw, P.R. Saxena, M.A. Schalekamp.** 1994. Cardiac renin and angiotensins: uptake from plasma versus in situ synthesis. *Hypertension.* 24:37-48.
- de Champlain, J.** 1990. Pre- and postsynaptic adrenergic dysfunctions in hypertension. *Journal of Hypertension.* 8 (suppl 7):S77-S85.
- de Champlain, J., M. Karas, C. Toal, R. Nadeau, P. Larochelle.** 1999. Effects of antihypertensive therapies on the sympathetic nervous system. *Can J Cardiol.* 15:8A-14A.

- de Champlain, J., M.R. van Ameringen.** 1972. Regulation of blood pressure by sympathetic nerve fibers and adrenal medulla in normotensive and hypertensive rats. *Circulation Research*. 31:617-628.
- De Leeuw, P.W.** 1982. Renal response to propranolol treatment in hypertensive humans. *Hypertension*. 4:125-131.
- De Leeuw, P.W., W.H. Birkenhager.** 1982. Renal response to propranolol treatment in hypertensive humans. *Hypertension*. 4:125-131.
- De Leeuw, P.W., W.H. Birkenhäger.** 1983. Renal effects of beta blockade in essential hypertension. *Eur Heart J*. 4:13-17.
- De Mey, J.G.R., M.J.A.P. Daemen.** 1991. In vivo DNA synthesis is not uniformly increased in arterial smooth muscle of young spontaneously hypertensive rats. *J Hypertens*. 9:695-701.
- De Mey, J.G.R., M.P. Uitendaal, H.C.M. Boonen, P.M.H. Schiffers, G.E. Fazzi.** 1991. Growth responses in isolated elastic, muscular and resistance-sized arterial segments of the rat. *Blood Vessels*. 28:372-385.
- deBlois, D., J.E. Su, A.W. Clowes, S.M. Schartz.** 1996a. Selective stimulation by angiotensin II of smooth muscle cell proliferation in the neointima of balloon injured rat carotid artery. *Original*.
- deBlois, D., B.S. Tea, T.V. Dam, J. Tremblay, P. Hamet.** 1997. Smooth muscle apoptosis during vascular regression in spontaneously hypertensive rats. *Hypertension*. 29:340-349.
- deBlois, D., M. Viswanathan, J.E. Su, A.W. Clowes, J.M. Saavedra, S.M. Schwartz.** 1996b. Smooth muscle DNA replication in response to angiotensin II is regulated differently in the neointima and media at different times after balloon injury in the rat carotid artery: role of AT1 receptor expression. *Art Thromb Vasc Biol*. 16:1130-1137.
- DeQuattro, V., D.D. Lee.** 1991. Blood pressure reactivity and sympathetic hyperactivity: predictors of hypertension. *American Journal of Hypertension*. 4:624S-628S.
- DeQuattro, V., Y. Miura.** 1973. Neurogenic factors in human hypertension: mechanism or myth? *Am J Med*. 55:362-378.
- Der Sarkissian, S., B.S. Tea, P. Hamet, D. deBlois.** 1999. An AT2 receptor antagonist prevents the anti-proliferative and pro-apoptotic effects of valsartan in non-cardiomyocytes in the SHR heart. *Can. J. Cardiol*. 15; Suppl D: 213D.

- Dilley, J.R., W.J. Arendshorst.** 1984. Enhanced tubulo-glomerular feedback activity in rats developing spontaneous hypertension. *Am J Physiol.* 247:F672-F679.
- Dillon, P.F., M.O. Aksoy, S.P. Driska, R.A. Murphy.** 1981. Myosin phosphorylation and the cross-bridge cycle in arterial smooth muscle. *Science.* 211:495-497.
- Dimmeler, S., V. Rippman, U. Weiland, J. Haendeler, A.M. Zeiher.** 1997. Angiotensin II induces apoptosis of human endothelial cells. Protective effect of nitric oxide. *Circ Res.* 81:970-976.
- Dostal, D.E., K.M. Baker.** 1992. Angiotensin II stimulation of left ventricular hypertrophy in adult rat heart: Mediation by the AT1 receptor. *Am J Hypertens.* 5:276-280.
- Dostal, D.E., G.W. Booz, K.M. Baker.** 1996. Angiotensin II signalling pathways in cardiac fibroblasts: conventional versus novel mechanisms in mediating cardiac growth and function. *Molecular & Cellular Biochemistry.* 157:15-21.
- Dzau, V.J.** 1992. Angiotensin converting enzyme inhibitors and the cardiovascular system. *Journal of Hypertension.* 10 (Suppl 3):S3-S10.
- Dzau, V.J.** 1993a. Tissue renin-angiotensin system in myocardial hypertrophy and failure. *Archive in Internal Medicine.* 153:937-942.
- Dzau, V.J.** 1993b. Vascular renin-angiotensin system and vascular protection. *J Cardiovasc Pharmacol.* 22:S1-9.
- Dzau, V.J., M. Horiuchi.** 1996. Differential expression of angiotensin receptor subtypes in the myocardium: a hypothesis. *Eur Heart J.* 17:978-980.
- Eghbali, M., O.O. Blumenfeld, S. Seiffter, P.M. Buttrick, L.A. Leinwand, T.F. Robinson.** 1989. Localization of types I, III, and IV collagen mRNAs in rat heart cells by in situ hybridization. *J Mol Cell Cardiol.* 21:102-113.
- Ellis, H.M., H.R. Horvitz.** 1986. Genetic control of programmed cell death in the nematode *C. elegans*. *Cell.* 44:817-829.
- Ellis, P.A., I.E. Smith, M. Dowsett.** 1996. Apoptosis: programmed cell death in fetal development. *Cytopathology.* 7:201-203.
- Eng, C., B.J. Weil, E.H. Sonnenblick.** 1993. Effect of captopril on postischemic myocardial expansion. *J Cardiovasc Pharmacol.* 21:560-566.

- Epstein, M.** 1996. Calcium antagonists: still appropriate as first line antihypertensive agents. *Am J Hypertens.* 9:110-121.
- Epstein, M.** 1997. Calcium channel blockers and hypertension: evolving perspective--1996. *Cardiovasc Drugs Ther.* 10:883-891.
- Epstein, M.** 1998. Calcium antagonists and renal protection: emerging perspectives. *J Hypertens.* 16:S17-25.
- Erdös, E.G.** 1975. Angiotensin I converting enzyme. *Circ Res.* 36:247-254.
- Erdös, E.G., R.A. Skidgel.** 1987. The angiotensin I-converting enzyme. *Lab Invest.* 56:345-348.
- Evan, A.P., F.C. Luft, U. Galtone.** 1981. The glomerular filtration barrier in the spontaneously hypertensive rat. *Hypertension.* 3:154-161.
- Evenwel, R.T., C.M. Kasbergen, H.A.J. Struijker Boudier.** 1983. Central and regional hemodynamics and plasma volume distribution during the development of spontaneous hypertension in rats. *Clin Exp Hypertens.* A5:1511-1536.
- Fabris, B., B. Jackson, R. Cubela, F.A.O. Mendelsohn, C.I. Johnston.** 1989. Angiotensin converting enzyme in the rat heart: studies of its inhibition in vitro and ex vivo. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 16:309-313.
- Falk, M.H., L. Hultner, A. Milner, C.D. Gregory, G.W. Bornkamm.** 1993. Irradiated fibroblasts protect Burkitt lymphoma cells from apoptosis by a mechanism independent of bcl-2. *Int J Cancer.* 55:485-491.
- Fleckenstein, A.** 1983. History of calcium antagonists. *Circ Res.* 52:I3-I16.
- Folkow, B.** 1995. Hypertensive structural changes in systemic precapillary resistance vessels: how important are they for in vivo haemodynamics? *J Hypertens* 13(12 Pt 2):1546-5.
- Folkow, B.** 1982. Physiological aspects of primary hypertension. *Physiological Reviews.* 62:347-503.
- Folkow, B.** 1990. "Structural factor" in primary and secondary hypertension. *Hypertension.* 16:89-101.
- Folkow, B., G. Gothberg, S. Lundin, S.E. Ricksten.** 1977. Structural resetting of the renal vascular bed in spontaneously hypertensive rats (SHR). *Acta Physiol Scand.* 100:270-272.
- Folkow, B., M. Hallback, Y. Lundgren, R. Sivertson, L. Ewiss.** 1975. Importance of adaptive changes in vascular design for establishment of primary hypertension studied in man and in spontaneously hypertensive rats. *Circ Res.* 32/33:2-16.

- Folkow, B., B. Johansson, S. Mellander.** 1961. The comparative effects of angiotensin and noradrenaline on consecutive vascular sections. *Acta Physiol Scand.* 53:99-104.
- Ford, E.F.** 1985. Heart size. *Circ Res.* 39:297-303.
- Fraser, A., and G. Evan.** 1996. A licence to kill. *Cell.* 85:781-784.
- Freis, E.D.** 1960. Hemodynamics of hypertension. *Physiol Rev.* 40:27-54.
- Frenzel, H., B. Schwartzkopff, B. Rettig, H. Vogelsang.** 1987. Morphologic criteria of progression and regression of cardiac hypertrophy. *J Cardiovasc Pharmacol.* 10:20-28.
- Freslon, J.J., J.F. Giudicelli.** 1983. Compared myocardial and vascular effects of captopril and dihydralazine during hypertension development in spontaneously hypertensive rats. *Br J Pharmacol.* 80:533-543.
- Frohlich, E.D.** 1983. Haemodynamics and other determinants in development of left ventricular hypertrophy: conflicting factors in its regression. *Fed Proc.* 42:2709-2715.
- Frohlich, E.D.** 1986. Is the spontaneously hypertensive rat model for human hypertension. *J Hypertens.* 4:S15-S19.
- Fronek, K., C.M. Bloor, D. Amiel, M. Chuapril.** 1978. Effect of long-term sympathectomy on the arterial wall in rabbits and rats. *Exp Mol Pathol.* 28:279-289.
- Fujita, M., A. Mikunija, D.P. McUown, D. Franklin.** 1988. Regional myocardial volume alterations induced by brief repeated coronary occlusion in conscious dogs. *J Am Coll Cardiol.* 12:1048-1053.
- Fuller, S.J., J.R. Mynett, P.H. Sugden.** 1992. Stimulation of cardiac protein synthesis by insulin-like growth factors. *Biochem J.* 282:85-90.
- Furberg, C., B. Patsy, J. Meyer.** 1995. Nifedipine: dose-related increase in mortality in patients with coronary heart disease. *Circulation.* 92:1326-1331.
- Furberg, C.D., B.M. Psaty.** 1996. Calcium antagonists: not appropriate as first line antihypertensive agents. *American Journal of Hypertension.* 9:122-125.
- Furuyama, M.** 1962. Histometrical investigations of arteries in reference to arterial hypertension. *Tohoku J Exp Med.* 76:388-414.

Gattone, V.H., A.P. Evan, L.R. Willis, F.C. Luft. 1983. Renal afferent arteriole in the spontaneously hypertensive rat. *Hypertension*. 5:8-16.

Gavras, H., H.R. Brunner, E.D. Vaughan, J.H. Laragh. 1973. Angiotensin-sodium interaction in blood pressure maintenance of renal hypertensive and normotensive rats. *Science*. 180:1369-1372.

Gebremedhin, D., F.J. Fenoy, D.R. Harder, R.J. Roman. 1990. Enhanced vascular tone in young spontaneously hypertensive rats. *Hypertension*. 16:648-654.

Geisterfer, A.A.T., M.J. Peach, G.K. Owens. 1988. Angiotensin II induces hypertrophy, not hyperplasia, of cultured rat aortic smooth muscle cells. *Circ. Res.* 62:749-756.

Gibbons, G.H. 1998. The pathophysiology of hypertension: the importance of angiotensin II in cardiovascular remodeling. *Am J Hypert.* 11:177S-181S.

Gibbons, G.H., R.E. Pratt, V.J. Dzau. 1992. Vascular smooth muscle cell hypertrophy vs hyperplasia. *Journal of Clinical Investigation*. 90:456-461.

Girard, B. 1989. Angiotensin II induced c-fos mRNA in aortic smooth muscle. *J Biol Chem*. 264:526-530.

Glennon, P.E., P.H. Sugden, P.A. Poole-Wilson. 1995. Cellular mechanisms of cardiac hypertrophy. *Br Heart J*. 73:496-499.

Gohlke, P., W. Linz, B.A. Scholkens, I. Kuwer, S. Bartenbach, A. Schnell, T. Unger. 1994. Angiotensin-converting enzyme inhibition improves cardiac function. Role of bradykinin. *Hypertension*. 23:411-418.

Gohlke, P., C. Pees, T. Unger. 1998. AT2 receptor stimulation increases aortic cyclic GMP in SHRSP by a kinin-dependent mechanism. *Hypertension*. 31[part 2]:349-355.

Goldblatt, H. 1947. The renal origin of hypertension. *Physiol Rev*. 27:120-165.

Golf, S., R. Lovstad, V. Hansson. 1985. Beta-adrenoreceptor density and relative number of beta-adrenoreceptor subtypes in biopsies from human right atrial, left ventricular, and right ventricular myocardium. *Cardiovasc Res*. 19:636-641.

Goto, M., M. Mukoyama, S. Suga, T. Matsumoto, M. Nakagawa, R. Ishibashi, M. Kasahara, A. Sugawara, I. Tanaka. 1997. Growth-dependent induction of angiotensin II type 2 receptor in rat mesangial cells. *Hypertension*. 30:358-362.

- Gray, G.A., M. Clozel, J.P. Clozel, H.R. Baumgartner.** 1993. Effects of calcium channel blockade on the aortic intima in spontaneously hypertensive rats. *Hypertension*. 22:569-576.
- Gray, S.D.** 1984. Pressure profiles in neonatal spontaneously hypertensive rats. *Biol Neonate*. 45:25-32.
- Grossmann, W., D. Jones, L.P. McLaurin.** 1975. Wall stress and patterns of hypertrophy in the human left ventricle. *J Clin Invest*. 56:56-64.
- Gueydan, C., E. Coessens.** 1997. Avancées et perspectives de la recherche sur le facteur de nécrose tumorale (TNF). *Med Sci*. 13:83-88.
- Hackenthal, E., M. Paul, D. Ganten, R. Taugner.** 1990. Morphology, physiology, and molecular biology of renin secretion. *Physiol Rev*. 70:1067-1116.
- Hadrava, V., J. Tremblay, R.P. Sekaly, P. Hamet.** 1992. Accelerated entry of aortic smooth muscle cells from spontaneously hypertensive rats into the S phase of the cell cycle. *Biochem. Cell Biol*. 70:599-604.
- Hai, C.M., R.A. Murphy.** 1989. Calcium, cross-bridge phosphorylation, and contraction. *Annu Rev Physiol*. 51:285-298.
- Hamet, P.** 1995. Proliferation and apoptosis of vascular smooth muscle in hypertension. *Current Opinion in Nephrology and Hypertension*. 4:1-7.
- Hamet, P., V. Hadrava, U. Kruppa, J. Tremblay.** 1988. Vascular smooth muscle cell hyper-responsiveness to growth factors in hypertension. *J Hypertens*. 6:S36-S39.
- Hamet, P., Z. Pausova, P. Dumas, Y.L. Sun, J. Tremblay, M. Pravenec, J. Kunes, D. Krenova, V. Kren.** 1998. Newborn and adult recombinant inbred strains: A tool to search for genetic determinants of target organ damage in hypertension. *Kidney Intern*. 53.
- Hamet, P., L. Richard, T.V. Dam, E. Teiger, S.N. Orlov, L. Gaboury, F. Gossard, J. Tremblay.** 1995. Apoptosis in target organs of hypertension. *Hypertension*. 26:642-648.
- Hamet, P., V. Hadrava, U. Kruppa, J. Tremblay.** 1991. Transforming growth factor beta 1 expression and effect in aortic smooth muscle cells from spontaneously hypertensive rats. *J Hypertension* 17(6 Pt 2):896-901.
- Hayashida, W., M. Horiuchi, J. Grandchamp, V.J. Dzau.** 1996. Antagonistic action of angiotensin II type-1 and type-2 receptors on apoptosis in cultured neonatal rat ventricular myocytes. *Hypertension*. 28:535.

Haywood, G.A., L. Gullestad, T. Katsuya, H.G. Hutchinson, R.E. Pratt, M. Horiuchi, M.B. Fowler. 1997. AT1 and AT2 receptor gene expression in human heart failure. *Circulation*. 95:1201-1206.

Heagerty, A.M., C. Aalkjaer, S.J. Bund, N. Korsgaard, M.J. Mulvany. 1993a. Small artery structure in hypertension. Dual processes of remodeling and growth. *Hypertension*. 21:391-397.

Heagerty, A.M., C. Aalkjaer, S.J. Bund, N. Korsgaard, M.J. Mulvany. 1993b. Small artery structure in hypertension: Dual process of remodelling and growth. *Hypertension*. 21:391-397.

Hein, L., G.S. Barsh, R.E. Pratt, V.J. Dzau, B.K. Kobilka. 1995. Behavioural and cardiovascular effects of disrupting the angiotensin II type-2 receptor in mice. *Nature*. 377:744-747.

Henderson, R.J., R.W. Cranswick, S.N. Hunyor. 1994. Structural adaptation of the heart in borderline hypertensives in response to blood pressure lowering with captopril. *J Hypertens*. 12:65-72.

Hockenberry, D.M., Z.N. Oitvai, X.M. Yin, C.L. Milliman, S.J. Korsmeyer. 1993. Bcl-2 functions in an antioxidant pathway to prevent apoptosis. *Cell*. 75:241-251.

Hotz, M.A., J. Gong, F. Traganos, Z. Darzynkiewicz. 1994. Flow cytometric detection of apoptosis: comparison of the assays of in situ DNA degradation and chromatin changes. *Cytometry*. 15:237-244.

Huckle, W.R., H.S. Earp. 1994. Regulation of cell proliferation and growth by angiotensin II. *Prog Growth Factor Res*. 5:15-21.

Huysman, J.A.N., H.W. Vliegen, A. Van der Laarse, F. Eulerink. 1989. Changes in nonmyocyte tissue composition associated with pressure overload of hypertrophic human hearts. *Pathol Res Pract*. 184:577-581.

Ichiki, T., P.A. Labosky, C. Shiota, S. Okuyama, Y. Imagawa, A. Fogo, F. Niimura, I. Ichikawa, B.L. Hogan, T. Inagami. 1995. Effects of blood pressure and explanatory behaviour of mice lacking angiotensin II type-2 receptor. *Nature*. 377.

Imig, J.D., J.R. Falck, D. Gebremedhin, R.J. Roman. 1993. Elevated renal vascular tone in young spontaneously hypertensive rats: role of cytochrome P450. *Hypertension*. 22:357-364.

Ito, K., Y.Z. Zhu, Y.C. Zhu, P. Gohlke, T. Unger. 1997. Contribution of bradykinin to the cardioprotective action of angiotensin converting enzyme inhibition in hypertension and after myocardial infarction. *Jpn J Pharmacol*. 75:311-318.

- Ito, M., D.J. Hartshorne.** 1990. Phosphorylation of myosin as a regulatory mechanism in smooth muscle. *Prog Clin Biol Res.* 327:57-72.
- Itoh, H.** 1989. Vascular connective tissue changes in hypertension. *In: Lee R., ed. Blood vessel changes in hypertension: structure and function.* Boca Raton, Florida: CRC Press.:99-123.
- Itoh, H., M. Mukoyama, R.E. Pratt, G.H. Gibbons, V.J. Dzau.** 1993. Multiple autocrine growth factors modulate vascular smooth muscle cell growth response to angiotensin II. *JCI.* 91:2268-2274.
- Itoh, H., R.E. Pratt, V.J. Dzau.** 1991. Interaction of atrial natriuretic peptide and angiotensin II on proto-oncogene expression and vascular cell growth. *Biochem Biophys Res Commun.* 176:1601-1609.
- Itoh, H., R.E. Pratt, G.H. Gibbons, V.J. Dzau.** 1990. Angiotensin II modulates proliferation of vascular smooth muscle cells (VSMC) via dual autocrine loops of TGF- β and bFGF. *Hypertension.* 18:396-401.
- Jackson, C.L., S.M. Schwartz.** 1992. Pharmacology of smooth muscle cell replication. *Hypertension.* 20:713-736.
- James, T.** 1977. Small arteries of the heart. *Circulation.* 56:2-16.
- Jespersen, L.T., N.C.B. Nyborg, O.L. Pederson, O. Mikkelsen, M.J. Mulvany.** 1985. Cardiac mass and peripheral vascular structure in hydralazine-treated spontaneously hypertensive rats. *Hypertension.* 7:734-741.
- Jeunemaitre, X., F. Soubrier, Y.V. Kotelevtsev, R.P. Lifton, C.S. Williams, A. Charru.** 1992. Molecular basis of human hypertension: role of angiotensinogen. *Cell.* 71:169-180.
- Jin, X.H., Z.Q. Wang, H.M. Siragy, R.L. Guerrant, R.M. Carey.** 1998. Regulation of jejunal sodium and water absorption by angiotensin subtype receptors. *Am J Physiol.* 275:R515-R523.
- Joffres, M.R., P. Ghadirian, J.G. Fodor, A. Petrasovits, A. Chockalingam, P. Hamet.** 1997. Awareness, treatment, and control of hypertension in Canada. *Am J Hypertens* 10(10 Pt 1):1097-102
- Jula, A.M., H.M. Karanko.** 1994. Effects of left ventricular hypertrophy of long-term nonpharmacological treatment with sodium restriction in mild-to-moderate essential hypertension. *Circulation.* 89:1023-1031.
- Kajstura, J., E. Cigola, A. Malhotra, P. Li, W. Cheng, L.G. Meggs, P. Anversa.** 1997a. Angiotensin II induces apoptosis of adult ventricular myocytes in vitro. *Journal of Molecular & Cellular Cardiology.* 29:859-870.

Kajstura, J., E. Cigola, A. Malhotra, P. Li, W. Cheng, L.G. Meggs, P. Anversa. 1997b. Angiotensin II induces apoptosis of adult ventricular myocytes in vitro. *J Mol Cell Cardiol.* 29:859-870.

Kannel, W.B., T.R. Drawber. 1981. Left ventricular hypertrophy in hypertension: prognostic and pathogenic implications - The Framingham Study. In: *Strauer BE, ed. The heart in hypertension. Berlin: Springer:223-242.*

Katz, A. 1990. Cardiomyopathy of overload. A major determinant of prognosis in congestive heart failure. *N Engl J Med.* 322:100-110.

Kerr, J.F.R., A.H. Wyllie, A.R. Currie. 1972. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide ranging implications in tissue kinetics. *Br. J. Cancer.* 26:238-257.

Kim, K.W., D.C. Kim, Y.H. Kim, Y.A. Eun, H.I. Kim, K.P. Cho. 1995. Ca²⁺-dependent and - independent mechanisms of ischaemia-evoked release of [3H]-dopamine from rat striatal slices. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 22:301-302.

Kim, S., H. Iwao. 2000. Molecular and cellular mechanisms of angiotensin II-mediated cardiovascular and renal diseases. *Pharmacol Rev.* 52:11-34.

King, B.D., D. Sack, M.R. Kichuk, T.H. Hintze. 1987. Related Articles Absence of hypertension despite chronic marked elevations in plasma norepinephrine in conscious dogs. *Hypertension.* 9:582-590.

King, P.R., A.L. Gundlach, B. Jarrott, W.J. Louis. 1992. Nature of rimentidine binding to membranes of rat cerebral cortex. *Am J Hypertens.* 5:64S-68S.

Kiowski, W., F.R. Buhler, M.O. Fadayomi, P. Erne, F.B. Muller, U.L. Hulthen, P. Bolli. 1985. Age, raised blood pressure and renin: predictors for antihypertensive treatment with calcium antagonists. *Am J Cardiol.* 56:81H-85H.

Kline, R.L., F. Liu. 1994. Modification of pressure-natriuresis by long-term losartan in spontaneously hypertensive rats. *Hypertension.* 24:467-473.

Ko, Y., G. Totzke, G.H. Craack, F.J. Heidgen, M.K. Meyer. 1993. Action of dihydropyridine calcium antagonists on early growth response gene expression and cell growth in vascular smooth muscle cells. *J Hypertens.* 11:1171-1178.

Koch-Weser, J. 1974. Vasodilator drugs in the treatment of hypertension. *Arch Intern Med.* 133:1017-1027.

- Kojima, M., I. Shiojima, T. Yamazaki, I. Komuro, Z. Yunzeng.** 1994. Angiotensin II receptor antagonist TCV-116 induces regression of hypertensive left ventricular hypertrophy in vivo and inhibits the intracellular signaling pathway of stretch-mediated cardiomyocyte hypertrophy in vitro. *Circulation*. 89:2204-2211.
- Konstam, M.A., M.F. Rousseau, M.W. Kronenberg, J.E. Udelson, J. Melin.** 1992. Effects of the angiotensin-converting enzyme inhibitor enalapril on the long-term progression of left ventricular dysfunction in patients with heart failure. *Circulation*. 86:431-438.
- Korner, P.I., J.A. Angus.** 1992. Structural determinants of vascular resistance properties in hypertension: hemodynamic and model analysis. *J Vasc Res*. 29:293-312.
- Korsgaard, N., M.J. Mulvany.** 1988. Cellular hypertrophy in mesenteric resistance vessels from renal hypertensive rats. *Hypertension*. 12:162-167.
- Krauss, X.H., M.A.D.H. Schalekamp, G. Kolsters, G.A. Zaal, W.H. Birkenhäger.** 1972. Effects of chronic beta-adrenergic blockade on systemic and renal haemodynamic responses to hyperosmotic saline in hypertensive patients. *Clin Sci*. 43:385-391.
- Kromer, E.P., G.A. Riegger.** 1988. Effects of long-term angiotensin converting enzyme inhibition on myocardial hypertrophy in experimental aortic stenosis in the rat. *Am J Cardiol*. 62:161-163.
- Kuga, T., S. Kobayashi, Y. Hirakawa, H. Kanaide, A. Takeshita.** 1996. Cell cycle--dependent expression of L- and T-type Ca²⁺ currents in rat aortic smooth muscle cells in primary culture. *Circulation Research*. 79:14-19.
- Labouesse, M.C.** 1994. C. elegans, les promesses d'un petit animal intelligent: "small is beautiful". *Med Sci*. 10:337-341.
- Laks, M.N.** 1976. Norepinephrine - the myocardial hypertrophy hormone ? *Am Heart J*. 91:674-675.
- Lands, A.M., A. Arnold, J.P. McAuliff, F.P. Luduena, T.G. Brown.** 1967. Differentiation of receptor systems activated by sympathomimetic amines. *Nature*. 214:597-598.
- Lane, D.P.** 1992. p53, guardian of the genome. *Nature*. 358:15-16.
- Lang, F.** 1987. Physiology of diuretic action. *Renal Physiol*. 10:135-220.
- Langille, B.J.** 1993. Remodeling of developing and mature arteries: endothelium, smooth muscle and matrix. *J Cardiovasc Pharmacol*. 21:11-17.

- Lant, A.** 1985. Diuretics. Clinical pharmacology and therapeutic use. *Drugs*. 29:57-87, 162-188.
- Lee, R.M.K.W.** 1987. Structural alterations of blood vessels in hypertensive rats. *Can J Physiol Pharmacol*. 65:1528-1536.
- Lee, R.M.K.W.** 1989. Structural and functional consequence of antihypertensive treatments on blood vessels. In: *Lee R, ed. Blood vessel changes in hypertension: structure and function*. Boca Raton, Florida: CRC Press:163-190.
- Lee, R.M.K.W., K.H. Berecek, J. Tsoporis, R. McKenzie, C.R. Triggle.** 1991. Prevention of hypertension and vascular changes by captopril treatment. *Hypertension*. 17:141-150.
- Lee, R.M.K.W., D.J. Gzik.** 1991. Sympatholytic interventions and vascular remodeling. *Basic Res Cardiol*. 86:55-65.
- Lee, R.M.K.W., G.K. Owens, T. Scott-Burden, R.J. Head, M.J. Mulvany, E.L. Schiffrin.** 1995. Pathophysiology of smooth muscle in hypertension. *Can. J. Physiol. Pharmacol*. 73:574-584.
- Lehtonen J.Y., M. Horiuchi, L. Daviet, M. Akishita, V.J. Dzau.** 1999. Activation of the de novo biosynthesis of sphingolipids mediates angiotensin II type 2 receptor-induced apoptosis. *J Biol Chem* 74(24):16901-6
- Lery, A., P.P. Claudio, Q. Li, X. Wang, K. Reiss, S. Wang, A. Malhotra, J. Kajstura, P. Anversa.** 1998. Stretch-mediated release of angiotensin II induces myocyte apoptosis by activating p53 that enhances the local renin-angiotensin system and decreases the Bcl-2-to-Bax protein ratio in the cell. *J Clin Invest*. 101:1326-1342.
- Levine, A.J.** 1997. p53, the cellular gatekeeper for growth and division. *Cell*. 88:323-332.
- Levine, A.J., J. Momand, C.A. Finlay.** 1991. The p53 tumour suppressor gene. *Nature*. 351:453-457.
- Levy, B.I., J. Benessiano, D. Henrion, L. Caputo, C. Heymes, M. Duriez, P. Poitevin, J.L. Samuel.** 1996. Chronic blockade of AT2-subtype receptors prevents the effect of angiotensin II on the rat vascular structure. *J. Clin. Invest*. 98:418-425.
- Levy, D., R.J. Garrison, D.D. Savage, W.B. Kannel, W.P. Castelli.** 1990. Prognostic implications of echocardiographically determined left ventricular mass in the Framingham Heart Study. *New Engl J Med*. 322:1561-1566.

Lichtlen, R.L., P. Hugenholtz, W. Rafflenbeul, S. Jost, J.W. Deckers. 1990. Retardation of angiographic progression of coronary artery disease by nifedipine. *Lancet*. 1:1109-1113.

Lin, M.S., J.L. McNay, A.M.M. Shepherd, G.E. Musgrave, T.K. Keeton. 1983. Increased plasma norepinephrine accompanies persistent tachycardia after hydralazine. *Hypertension*. 5:257-263.

Linz, W., G. Wiemer, J. Schaper, R. Zimmermann, K. Nagasawa, P. Gohlke, T. Unger, B.A. Scholkens. 1995. Angiotensin converting enzyme inhibitors, left ventricular hypertrophy and fibrosis. *Mol Cell Biochem*. 147:89-97.

Linzbach, A.J. 1960. Heart failure from the point of view of quantitative anatomy. *Am J Cardiol*. 5:370-382.

Liu, K.L., D. Benzoni, J. Sassard. 1994. Prostaglandin H₂-thromboxane A₂ and renal function in Lyon hypertensive rat. *Am J Physiol*. 266:R1530-R1536.

Liu, Y.H., X.P. Yang, V.G. Sharov, O. Nass, H.N. Sabbah, E. Peterson, O.A. Carretero. 1997. Differential distribution of angiotensin AT₂ receptors in the normal and failing human heart. *J Pharmacol Exp Ther*. 284:323-336.

Lopez, J.J., B.H. Lorell, J.R. Ingelfinger, E.O. Weinberg. 1994. Distribution and function of cardiac angiotensin AT₁- and AT₂-receptor subtypes in hypertrophied rat hearts. *Heart Circ. Physiol*. 36:H844-H852.

Lotem, J., L. Sachs. 1993. Hematopoietic cells from mice deficient in wild-type p53 are more resistant to induction of apoptosis by some agents. *Blood*. 82:1092-1096.

Lowe, S.W., H.E. Ruely, T. Jacks, D.E. Housman. 1993a. p53-dependent apoptosis modulates the cytotoxicity of anticancer agents. *Cell*. 74:957-967.

Lowe, S.W., E.M. Schmitt, S.W. Smith, B.A. Osborne, T. Jacks. 1993b. p53 is required for radiation-induced apoptosis in mouse thymocytes. *Nature*. 362:847-849.

Madrid, M.I., M. Garci-Salom, J. Tornel, M. De Gasparo, F.J. Fenoy. 1997. Effect of interactions between nitric oxide and angiotensin II on pressure diuresis and natriuresis. *Am J Physiol*. 273:R1676-R1682.

Majewski, M.W., M.J.A.P. Daemen, S.M. Schwartz. 1990. Alpha-one adrenergic stimulation of platelet-derived growth factor A chain (PDGF-A) gene expression in rat aorta. *J Biol Chem*. 265:1082-1088.

- Man in't Veld, A.J., G.J. Wenting, F. Boomsma, R.P. Verhoeven, M.A.D.H. Schalekamp.** 1980. Sympathetic and parasympathetic components of reflex cardiostimulation during vasodilator treatment of hypertension. *Br J Clin Pharmacol.* 9:547-551.
- Mangiarua, E.I., R.M.K.W. Lee.** 1992. Morphometric study of cerebral arteries from spontaneously hypertensive and stroke-prone spontaneously hypertensive rats. *J Hypertens.* 10:1183-1190.
- Marceau, F.** 1995. **Kinin B1 receptors: a review.** *Immunopharmacology.* 30:1-26.
- Marceau, F.** 1997. Is there a role for bradykinin in the therapeutic and side effects of angiotensin-converting enzyme inhibitors? *Can J Cardiol.* 13:187-194.
- Martin, S.J.** 1993. Apoptosis: suicide, execution or murder ? *Trends Cell Biol.* 3:141-144.
- Matsubara, H.** 1998. Pathophysiological role of angiotensin II type 2 receptor in cardiovascular and renal diseases. *Circ Res.* 83:1182-1191.
- McCarthy, S.A., H.S. Symonds, T. Van Dyke.** 1994. Regulation of apoptosis in transgenic mice by simian virus 40 T antigen-mediated inactivation of p53. *Proc Natl Acad Sci USA.* 91:3979-3983.
- McLenachan, J.M., E. Henderson, K.L. Morris, H.J. Dargie.** 1987. Ventricular arrhythmias in patients with hypertensive LVH. *N Engl J Med.* 317:787-792.
- Merritt, A., C. Potten, C. Kemp, J. Hickman, A. Balmain, D. Lane, P. Hall.** 1994. The role of p53 in spontaneous and radiation-induced apoptosis in the gastrointestinal tract of normal and p53-deficient mice. *Cancer Res.* 54:614-617.
- Metsärinne, K.P., M. Stoll, M. Falkenhahn, P. Gohlke, T. Unger.** 1994. Inhibiting the effects of angiotensin on cardiovascular hypertrophy. In: *Saavedra JM, Timmermans, PBMWM, eds. Angiotensin receptors. New York: Plenum Press.*
- Mimran, A., J. Ribstein, G. DuCailar.** 1999. Angiotensin II receptor antagonists and hypertension. *Clin Exp Hypertens.* 21:847-858.
- Mira, M.L., M.M. Silva, C.F. Manso.** 1994. The scavenging of oxygen free radicals by angiotensin converting enzyme inhibitors: the importance of the sulfhydryl group in the chemical structure of the compounds. *Ann N Y Acad Sci.* 723:439-441.
- Morgan, T., A. Anderson, D. Wilson, J. Myers, J. Murphy, C. Nowson.** 1986. Paradoxical effect of sodium restriction on blood pressure in people on slow channel calcium blocking drugs. *Lancet.* i:793.

- Morton, J.J.** 1993. Biochemical aspects of the angiotensins. *The renin-angiotensin system.* (J.I.S. Robertson and M.G. Nicholls). Raven Press, New York:9.1-9.12.
- Mulvany, M.** 1990. Structure and function of small arteries in hypertension. *Journal of Hypertension.* 8:S225-S232.
- Mulvany, M.J.** 1992. The development and regression of vascular hypertrophy. *Journal of Cardiovascular Pharmacology.* 19:S22-S27.
- Mulvany, M.J.** 1993. Resistance vessel structure and the pathogenesis of hypertension. *J Hypertens Suppl* 5:S7-12
- Mulvany, M.J.** 1995. Resistance vessel growth and remodelling: cause or consequence in cardiovascular disease. *J Hum Hypertens* 9(6):479-85
- Munro, E., M. Patel, L. Betteridge, K. Callagher, M. Schacter.** 1994. Effect of calcium channel blockers on the growth of human vascular smooth muscle cells derived from saphenous vein and vascular graft stenoses. *J Cardiovasc Pharmacol.* 23:779-784.
- Munzenmaier, D.H., A.S. Greene.** 1996. Opposing actions of angiotensin II on microvascular growth and arterial blood pressure. *Hypertension.* 27[part2]:760-765.
- Murgia, M., P. Pizzo, D. Sandona, P. Zanovello, R. Rizzuto, F. Di Virgilio, P. Pizzo, D. Sandona, P. Zanovello, R. Rizzuto, F. Di Virgilio.** 1992. Mitochondrial DNA is not fragmented during apoptosis. *J Biol Chem.* 267:10939-10941.
- Myers, M.G., J. De Champlain.** 1983. Effects of atenolol and hydrochlorothiazide on blood pressure and plasma catecholamines in essential hypertension. *Hypertension.* 5:591-596.
- Naftilan, A.J., G.K. Gilliland, C.S. Eldridge, A.S. Kraft.** 1990. Induction of the protooncogene c-jun by angiotensin II. *Mol Cell Biol.* 10:5536-5540.
- Naftilan, A.J., R.E. Pratt, V.J. Dzau.** 1989. Induction of platelet-derived growth factor A-chain and c-myc gene expressions by angiotensin II in cultured rat vascular smooth muscle cells. *J Clin Invest.* 83:1419-1424.
- Nagata, S.** 1997. Apoptosis by death factor. *Cell.* 88:355-366.
- Nakajima, M., H.G. Hutchinson, M. Fujinaga, W. Hayashida, R. Morishita, L. Zhang, M. Horiuchi, R.E. Pratt, V.J. Dzau.** 1995a. The angiotensin II type 2 (AT2) receptor antagonizes the growth effects of the AT1 receptor: Gain-of-function study using gene transfer. *PNAS.* 92:10663-10667.

Nakajima, M., H.G. Hutchinson, M. Fujinaga, W. Hayashida, R. Morishita, L. Zhang, M. Horiuchi, R.E. Pratt, V.J. Dzau. 1995b. The angiotensin II type 2 (AT2) receptor antagonizes the growth effects of the AT1 receptor: gain-of-function study using gene transfer. *Proc Natl Acad Sci USA.* 92:10663-10667.

Nakashima, Y., F.M. Fouad, R.C. Tarazi. 1984. Regression of left ventricular hypertrophy from systemic hypertension by enalapril. *Am J Cardiol.* 53:1044-1049.

Navar, L.G. 1997. The kidney in blood pressure regulation and development of hypertension. *Med Clin North Am.* 81:1165-1198.

Neyses, L., J. Nouskas, J. Luyken, S. Fronhoffs, S. Oberdorf. 1993. Induction of immediate-early genes by angiotensin II and endothelin-1 in adult rat cardiomyocytes. *J Hypertens.* 11:927-934.

Nicholson, D.W., A. Ali, N.A. Thornberry. 1995. Identification and inhibition of the ICE/CED-3 protease necessary for mammalian apoptosis. *Nature.* 376:37-43.

Nicholson, J.P., L.M. Resnick, J.H. Laragh. 1987. The antihypertensive effect of verapamil at extremes of dietary sodium intake. *Ann Intern Med.* 107:329-334.

Nio, Y., H. Matsubara, Y. Nozawa, Y. Mori, S. Murasawa, K. Kijima, K. Maruyama, H. Masaki, Y. Tsutumi, Y. Shibazaki, T. Iwasaka, M. Inada. 1997. Angiotensin type 2 receptors are reexpressed by cardiac fibroblasts from failing myopathic hamster hearts and inhibit cell growth and fibrillar collagen metabolism. *Circulation.* 96:3954-3962.

Norrelund, H., K.L. Christensen, N.J. Samani, P. Kimber, M.J. Mulvany, N. Korsgaard. 1994. Early narrowed afferent arteriole is a contributor to the development of hypertension. *Hypertension.* 24:301-308.

Nyborg, N.C.B., and M.J. Mulvany. 1985. Lack of effect of antihypertensive treatment with felodipine on cardiovascular structure of young spontaneously hypertensive rats. *J Cardiovasc Pharmacol.* 19:528-536.

O'Malley, M.K., E.W.M. McDermott, D. Mehigan, W.J. Higgins. 1989. Role of prazosin in reducing the development of rabbit intimal hyperplasia after endothelial denudation. *Br J Surg.* 7:936-939.

Ohkubo, H., K. Nakayama, T. Tanaka, S. Nakanishi. 1986. Tissue distribution of rat angiotensinogen mRNA and structural analysis of its heterogeneity. *J Biol Chem.* 261:319-323.

Ohkubo, N., H. Matsubara, Y. Nozawa, Y. Mori, S. Murasawa, K. Kijima, K. Marayama, H. Masaki, Y. Tsutumi, Y. Shibazaki, T. Iwasaka, M. Inada. 1997. Angiotensin type 2 receptors are reexpressed by cardiac fibroblasts from failing myopathic hamster hearts and inhibit cell growth and fibrillar collagen metabolism. *Circulation.* 96:3954-3962.

- Okamoto, K., K. Aoki.** 1963. Development of a strain of spontaneously hypertensive rats. *Japanese Circulation Research.* 27:282-293.
- Oparil, S., Y. Chen, K. Berecek, D. Calhoun, J. Wyss.** 1995. The role of central nervous system in hypertension. *Hypertension, Pathophysiology, Diagnosis, and Management.* Second Edition:713-740.
- Östman-Smith, I.** 1981. Cardiac sympathetic nerves as the final common pathway in the induction of adaptive cardiac hypertrophy. *Clin Sci.* 61:265-272.
- Otsuka, S., M. Sugano, N. Makino, S. Sawada, T. Hata, Y. Niho.** 1998. Interaction of mRNAs for angiotensin type 1 and type 2 receptors to vascular remodeling in spontaneously hypertensive rats. *Hypertension.* 32:467-472.
- Owens, G.** 1989a. Control of hypertrophic versus hyperplastic growth of vascular smooth muscle cells. *Am J. Pathol.* 257:H1755-H1765.
- Owens, G.** 1989b. Control of hypertrophic versus hyperplastic growth of vascular smooth muscle cells. *Am J Physiol.* 257:H1755-H1765.
- Owens, G.** 1989c. Control of hypertrophic versus hyperplastic growth of vascular smooth muscle cells. *Am J Physiol.* 257:H1755-H1765.
- Owens, G.K.** 1990. Growth responses to aortic smooth muscle cells in hypertension. *In: Lee R, ed. Blood vessel changes in hypertension: structure and function.* Boca Raton, Florida: CRC Press.:45-63.
- Oyaizu, N., T.W. McCloskey, M. Coronese, N. Chirmule, V.S. Kalyanaraman, S. Pahwa.** 1993. Accelerated apoptosis in peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) from human immunodeficiency virus type-1 infected and in CD4 cross-linked PBMCs from normal individuals. *Blood.* 82:3392-3400.
- Ozono, R., Z.Q. Wang, A.F. Moore, T. Inagami, H.M. Siragy, R.M. Carey.** 1997. Expression of the subtype 2 angiotensin (AT₂) receptor protein in rat kidney. *Hypertension.* 30:1238-1246.
- Padfield, P.L., J.J. Morton.** 1977. Effects of angiotensin II on arginine-vasopressin in physiological and pathological situations in man. *J Clin Endocrinol.* 74:251-259.
- Page, I.H., O.M. Helmer.** 1940. A crystalline pressor substance (angiotonin) resulting from the action between renin and renin-activator. *Journal of Experimental Medecine.* 71:29-42.

Panizo-Santos, A., J.J. Sola, F.J. Pardo-Mindan, M. Hernandez, E. Cenarruzabeitia, J. Diez. 1995. Angiotensin converting enzyme inhibition prevents polyploidization of cardiomyocytes in spontaneously hypertensive rats with left ventricular hypertrophy. *Journal of Pathology*. 177:431-7.

Paquet, J., M. Baudoin-Legros, P. Marche, P. Meyer. 1989. Enhanced proliferating activity of cultured smooth muscle cells from SHR. *Am. J. Hypertens*. 2:108-110.

Pecker, M.S. 1990. Pathophysiologic effects and strategies for long-term diuretic treatment of hypertension. In: *Laragh JH, Brenner BM, eds. Hypertension: pathophysiology, diagnosis and management*. New York: Raven Press:2143-2167.

Pfeffer, M.A., E. Braunwald, L.A. Moye. 1992. Effect of captopril on mortality and morbidity in patients with left ventricular dysfunction after myocardial infarction. The SAVE Investigators. *N Engl J Med*. 327:669-677.

Pierzchalski, P., K. Reiss, W. Cheng, C. Cirielli, J. Kajstura, J.A. Nitahara, M. Rizk, M. Capogrossi, P. Anversa. 1997. p53 induces myocyte apoptosis via the activation of the renin-angiotensin system. *Experimental Cell Research*. 234:57-65.

Pitt, B., R. Segal, F.A. Martinez, G. Meurers, A.J. Cowley, I. Thomas, P.C. Deedwania, D.E. Ney, D.B. Snively, P.I. Chang. 1997. Randomised trial of losartan versus captopril in patients over 65 with heart failure (Evaluation of Losartan in the Elderly Study, ELITE). *Lancet*. 349:747-752.

Pitt, B., P.A. Poole-Wilson, R. Segal, F.A. Martinez, K. Dickstein, A.J. Camm, M.A. Konstam, G. Riegger, G.H. Klinger, J. Neaton, D. Sharma, B. Thiyagarajan. 2000. Effect of losartan compared with captopril on mortality in patients with symptomatic heart failure: randomised trial--the Losartan Heart Failure Survival Study ELITE II. *Lancet* 355(9215):1582-7.

Pitt, B., F. Zannad, W.J. Remme, R. Cody, A. Castaigne, A. Perez, J. Palensky, J. Wittes. 1999. The effect of spironolactone on morbidity and mortality in patients with severe heart failure. *NJEM*. 341:709-717.

Pollman, M., Y. Takehiko, M. Horiuchi, G. Gibbons. 1996. Vasoactive substances regulate vascular smooth muscle cell apoptosis: Countervailing influences of nitric oxide and angiotensin II. *Circ Res*. 79:748-756.

Pouleur, H., M.F. Rousseau, C. van Eyll, L. Stoleru, W. Hayashida. 1993. Effects of long-term enalapril therapy on left ventricular diastolic properties in patients with depressed ejection fraction. *Circulation*. 88:481-491.

- Pratt, R.E., V.J. Dzau.** 1993. Molecular and cellular biology of the angiotensin-mediated growth of the cardiovascular system. In: *Raizada MK, Phillips MI, Summers C., eds. Cellular and Molecular Biology of the Renin-Angiotensin System. Boca Raton: CRC Press Inc.;*471-483.
- Prichard, B.N.C., P.M.S. Gillam.** 1964. Use of propranolol (Inderal) in the treatment of hypertension. *BMJ.* 2:725-727.
- Proud, D., A.P. Kaplan.** 1988. Kinin formation: mechanisms and role in inflammatory disorders. *Annu Rev Immunol.* 6:49-83.
- Raff, M.C.** 1992. Social controls on cell survival and cell death. *Nature.* 356:397-400.
- Ramsay, L.E.** 1999. Thiazide diuretics in hypertension. *Clin Exp Hypertens.* 21:805-814.
- Redon, J., J. Abellan-Aleman, P. Aranda-Lara, M. Figuerou-von Wichman, M. Luque-Otero, L. Rodicio-Diaz.** 1993. Anti-hypertensive activity of verapamil: impact of dietary sodium. *J Hypertens.* 11:665-671.
- Reed, J.C.** 1994. Bcl-2 and the regulation of programmed cell death. *J Cell Biol.* 124:1-6.
- Regoli, D., J. Barabe.** 1980. Pharmacology of bradykinin and related kinins. *Pharmacol Rev.* 32:1-46.
- Reid, J.L.** 1986. Alpha-adrenergic receptors and blood pressure control. *Am J Cardiol.* 57:6E-12E.
- Reiss, K., J. Kajstura, J.M. Capasso, T.A. Marino, P. Anversa.** 1993. Impairment of myocyte contractility following coronary artery narrowing is associated with activation of the myocyte IGF1 autocrine system, enhanced expression of late growth related genes, DNA synthesis, and myocyte nuclear mitotic division in rats. *Exp Cell Res.* 207:348-360.
- Rettig, R., C. Folberth, G. Strauss, D. Kopf, R. Waldherr, T. Unger.** 1990. Role of the kidney in primary hypertension: a renal transplantation study in rats. *Am J Physiol.* 258:F606-F611.
- Rettig, R., T. Unger.** 1991. The role of the kidney in the aetiology of hypertension: renal transplantation studies in rats. *Trends Pharmacol Sci.* 12:243-245.
- Richards, A.M., M.G. Nicholls, E.A. Espiner, H. Ikram, M. Cullens, D. Hinton.** 1986. Diurnal patterns of blood pressure, heart rate and vasoactive hormones in normal man. *Clin Exp Theory Practice.* A8:153-166.
- Roman, R.J.** 1987. Altered pressure-natriuresis relationship in young spontaneously hypertensive rats. *Hypertension.* 9:130-136.

- Roth, M., O. Eickelberg, E. Kohler, P. Erne, L.H. Block.** 1996. Ca²⁺ channel blockers modulate metabolism of collagens within the extracellular matrix. *Proc Natl Acad Sci.* 93:5478-5482.
- Sadoshima, J., S. Izumo.** 1993. Molecular characterization of angiotensin II-induced hypertrophy of cardiac myocytes and hyperplasia of cardiac fibroblasts. Critical role of the AT1 receptor subtype. *Circ Res.* 73:413-423.
- Sadoshima, J., S. Izumo.** 1994. Molecular characterization of angiotensin II-induced hypertrophy of cardiac myocytes and hyperplasia of cardiac fibroblasts. Critical role of angiotensin II. *Circ Res.* 73:413-423.
- Sadoshima, J., Z. Qiu, J. Morgan, S. Izumo.** 1995. Angiotensin II and other hypertrophic stimuli mediated by G protein-coupled receptors activated tyrosine kinase, mitogen-activated protein-kinase, and 90-kD S6 kinase in cardiac myocytes: The critical role of Ca²⁺ dependent signaling. *Circ. Res.* 16:1-15.
- Safar, M.E.** 1993. Behaviour of conduit arteries in hypertension. *Clin Exp Hypertens.* 15:1033-1045.
- Safar, M.E., S. Laurent.** 1993. Behaviour of conduit arteries in hypertension. *Clin Exp Hypertens.* 15:1033-1045.
- Sakaguchi, K., S.Y. Chai, B. Jackson, C.I. Johnston, F.A.O. Mendelsohn.** 1988. Inhibition of tissue angiotensin converting enzyme: quantitation by autoradiography. *Hypertension.* 11:230-238.
- Salvetti, A.** 1990. Newer ACE inhibitors. A look at the future. *Drugs.* 40:800-828.
- Sau, F., C. Seguro, G. Merano, A. Cherchi.** 1986. Atenolol but not acebutolol reverses left ventricular hypertrophy secondary to arterial hypertension. *J Hypertens.* 3:S39-44.
- Schachter, M.** 1991. Drug-induced modification of vascular structure: effects of antihypertensive drugs. *Am Heart J.* 122:316-323.
- Schelling, P., H. Fisher, D. Ganten.** 1991. Angiotensin and cell growth: a link to cardiovascular hypertrophy? *Journal of Hypertension.* 9:3-15.
- Shenoy, U.V., E.M. Richards, X.C. Huang, C. Summers.** 1999. Angiotensin II type 2 receptor-mediated apoptosis of cultured neurons from newborn rat brain. *Endocrinology* 140(1):500-9
- Schieffer, B., A. Winger, M. Meybrunn, S. Seitz, J. Holtz, U.N. Riede, H. Drexler.** 1994. Comparative effects of chronic angiotensin-converting enzyme inhibition and angiotensin II type 1 receptor blockade on cardiac remodeling after myocardial infarction in the rat. *Circulation.* 89:2273-2282.

- Schiffers, P.M.H., H.A.J. Struijker Boudier, J.G.R. De Mey.** 1991. Effects of angiotensin II and ACE-inhibitors on contractile and growth responses in isolated carotid arteries of the rat. *Basic Res Cardiol.* 86:83-91.
- Schlueter, W.A., D.C. Batlle.** 1989. Renal effects of antihypertensive drugs. *Drugs.* 37:900-925.
- Schoemaker, R.G., J.J.M. Debets, H.A.J. Struijker Boudier, J.F.M. Smits.** 1991. Delayed, but not immediate captopril therapy improves cardiac function in conscious rats following myocardial infarction. *Am J Cell Cardiol.* 23:187-197.
- Schulman, S.P., J.L. Weiss, L.C. Becker, S.O. Gottlieb, K.M. Woodruff, M.L. Weisfeldt, G. Gertenblith.** 1990. The effects of antihypertensive therapy on left ventricular mass in elderly patients. *N Engl J Med.* 322:1350-1356.
- Schunkert, H., V.J. Dzau, S.S. Tang, A.T. Hirsch, C.S. Apskin, B.H. Lorell.** 1990. Increased rat cardiac angiotensin converting enzyme, activity and mRNA expression in pressure overload left ventricular hypertrophy. *J Clin Invest.* 86:1913-1920.
- Schwartz, K., L. Carrier, J.J. Mercadier, A.M. Lompre, K.R. Boheler.** 1993. Molecular phenotype of the hypertrophied and failing myocardium. *Circulation.* 87:VII-5-VII-10.
- Schwartz, S.M., R.L. Heinmark, M.W. Majesky.** 1990. Developmental mechanisms underlying pathologies of arteries. *Physiol Rev.* 70:1177-1209.
- Schwartz, S.M., E.R. O'Brien, D. deBlois, C.M. Giachelli.** 1996. Relevance of smooth muscle replication and development to vascular disease. In: *Schwartz SM, Mecham RP. Vascular Smooth Muscle Cell: Molecular and Biological Responses to the Extracellular Matrix.* Eds. Academic Press.
- Schwartzkopff, B., H. Frenzel, J. Dieckerhoff, P. Betz, M. Flasshove, H.D. Schulte.** 1992. Morphometric investigation of human myocardium in arterial hypertension and valvular aortic stenosis. *Eur Heart J. Suppl* D:17-20.
- Sealey, J.E., J.H. Laragh.** 1990. The renin-angiotensin-aldosterone system for normal regulation of blood pressure and sodium and potassium homeostasis. In: *Laragh JH, Brenner BM, eds. Hypertension: Pathophysiology, Diagnosis, and Management.* New York, NY: Raven Press Ltd.:1287-1317.
- Seyedi, N., X. Xu, A. Nasjelli, T.H. Hintze.** 1995. Coronary kinin generation mediates nitric oxide release after angiotensin receptor stimulation. *Hypertension.* 26:164-170.

- Shabb, J.B., B.D. Buzzeo, L. Ng, J.D. Corbin.** 1991. Related Articles Mutating protein kinase cAMP-binding sites into cGMP-binding sites. Mechanism of cGMP selectivity. *J Biol Chem.* 266:24320-24326.
- Shanmugam, S., P. Corvol, J.-M. Gasc.** 1996. Angiotensin II type 2 receptor mRNA expression in the developing cardiopulmonary system of the rat. *Hypertension.* 28:91-97.
- Shapiro, R., J.F. Riordan.** 1984. Inhibition of angiotensin converting enzyme: dependence of chloride. *Biochemistry.* 23:5234-5240.
- Shapiro, R., J.F. Riordan.** 1984. Inhibition of angiotensin converting enzyme: mechanism and substrate dependence. *Biochemistry.* 28:5225-5233.
- Sharifi, A.M., E.L. Schiffrin.** 1997. Apoptosis in aorta of deoxycorticosterone acetate-salt hypertensive rats: effect of endothelin receptor antagonism. *J Hypertens* 15(12 Pt 1):1441-8.
- Sharpe, N., J. Murphy, H. Smith, S. Hannan.** 1988. Treatment of patients with symptomless left ventricular dysfunction after myocardial infarction. *Lancet.* 1:255-259.
- Shaw, P., R. Bovey, S. Tardy, R. Sahli, B. Sordat, J. Costa.** 1992. Induction of apoptosis by wild-type p53 in a human colon tumor-derived cell line. *Proc Natl Acad Sci USA.* 89:4495-4499.
- Sheps, S.G.** 1999. Overview of JNC VI: new directions in the management of hypertension and cardiovascular risk. *Am J Hypertens* 12(8 Pt 2):65S-72S
- Simpson, P.** 1985. Stimulation of hypertrophy of cultured neonatal rat heart cells through an alpha 1-adrenergic receptor and induction of beating through an alpha 1- and beta 1-adrenergic receptor interaction. Evidence for independent regulation of growth and beating. *Circ Res.* 56:884-894.
- Siragy, H.M., R.M. Carey.** 1996. The subtype-2 (AT₂) angiotensin receptor regulates renal cyclic guanosine 3', 5'-monophosphate and AT₁ receptor-mediated prostaglandin E₂ production in conscious rats. *J Clin Invest.* 97:1978-1982.
- Siragy, H.M., R.M. Carey.** 1997. The subtype 2 (AT₂) angiotensin receptor mediates renal production of nitric oxide in conscious rats. *J Clin Invest.* 100:264-269.
- Skov, K., M.J. Mulvany, N. Korsgaard.** 1990. Morphology of renal afferent arterioles in spontaneously hypertensive rats. *Hypertension.* 20:821-827.
- Smeda, J.S., R.M. Lee, J.B. Forrest.** 1988. Structural and reactivity alterations of the renal vasculature of spontaneously hypertensive rats prior to and during established hypertension. *Circ Res.* 63:518-533.

- Smits, J.F., H.A. Struyker-Boudier.** 1982. The mechanisms of antihypertensive action of beta-adrenergic receptor blocking drugs. *Clin Exp Hypertens.* 4:71-86.
- Smits, J.F.M., C. van Krimpen, R.G. Schoemaker, J.P.M. Cleutjens, M.J.A.P. Daemen.** 1992. Angiotensin II receptor blockade after myocardial infarction in rats: effects on hemodynamics, myocardial DNA synthesis, and interstitial collagen content. *J Cardiovasc Pharmacol.* 20:772-778.
- Snutch, T.P., P.B. Reiner.** 1992. Ca²⁺ channels: diversity of form and function. *Curr Opin Neurobiol.* 92:256-262.
- Staessen, J., R. Fagard, P. Lijnen, L.J. Verschueren, A. Amery.** 1980. Beta-blockade during captopril treatment for hypertension. *N Engl J Med.* 303:1121-1122.
- Stein, J.H., R.C. Congbalay, D.L. Karsh, R.W. Osgood, T.F. Ferris.** 1972. The effect of bradykinin on proximal tubular sodium reabsorption in the dog: evidence for functional nephron heterogeneity. *J Clin Invest.* 51:1709-1721.
- Stoll, M., M. Steckeling, M. Paul, S.P. Bottari, R. Metzger, T. Unger.** 1995. The angiotensin AT₂-receptor mediates inhibition of cell proliferation in coronary endothelial cells. *Journal of Clinical Investigation.* 95:651-657.
- Strauer, B.E., F. Bayer, H.M. Brecht, W. Motz.** 1985. The influence of sympathetic nervous activity on regression of cardiac hypertrophy. *J Hypertens.* 3:S39-44.
- Strauer, B.E., M.A. Mahmoud, F. Bayer, J. Bohn, W. Motz.** 1984. Reversal of left ventricular hypertrophy and improvement of cardiac function in man by nifedipine. *Eur Heart J.* 5:53-60.
- Stroth, U., T. Unger.** 1999. The renin-angiotensin system and its receptors. *J Cardiovasc Pharmacol.* 33:S21-28.
- Strull, J.T., P.J. Gallagher, B.P. Herring, K.E. Kamm.** 1991. Vascular smooth muscle contractile elements: Cellular regulation. *Hypertension.* 17:723-732.
- Summers, C., W. Tang, B. Zelezna, M.K. Raizada.** 1991. Angiotensin II receptor subtypes are coupled with distinct signal-transduction mechanisms in neurons and astrocytes from the rat brain. *Proc Natl Acad Sci USA.* 88:7567-7571.
- Sutton, M.J., M.A. Pfeffer, T. Plappert, J.L. Rouleau, L.A. Moye.** 1994. Quantitative two-dimensional echocardiographic measurements are major predictors of adverse cardiovascular events after acute myocardial infarction. *Circulation.* 89:68-75.

Swynghedauw, B. 1989. Remodelling of the heart in response to chronic mechanical overload. *Eur Heart J.* 10:935-943.

Taubman, M.B., B.C. Berk, S. Izumo, T. Tsuda, R.W. Alexander, B. Nadal-Ginard. 1989. Angiotensin II induces c-fos mRNA in aortic smooth muscle. *J Biol Chem.* 264:526-530.

Taylor, S.H., K.W. Donald, J.M. Bishop. 1957. Circulatory studies in hypertensive patients at rest and during exercise. *Clin Sci.* 16:351-370.

Tea, B.S., S. Der Sarkissian, R.M. Touyz, P. Hamet, D. deBlois. 2000. Proapoptotic and growth-inhibitory role of angiotensin II type 2 receptor in vascular smooth muscle cells of spontaneously hypertensive rats in vivo. *Hypertension* 35(5):1069-73.

Tea, B.S., T.V. Dam, P. Moreau, P. Hamet, D. deBlois. 1999a. Apoptosis during regression of cardiac hypertrophy in spontaneously hypertensive rats. Temporal regulation and spatial heterogeneity. *Hypertension.* 34:229-235.

Tea, B.S., P. Hamet, D. deBlois. 1999b. An AT2 receptor antagonist prevents the antiproliferative and proapoptotic effect of valsartan in non-cardiomyocytes in the SHR heart. *Can J Cardiol.* 15:213D.

Tenniswood, M., D. Tillefer, J. Lakins. 1994. Control of gene expression during apoptosis in hormone-dependent tissues. In: *Tomei LD, Cope FO, eds. Apoptosis II: The molecular basis of apoptosis in disease.* New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press:283-311.

Thoma, R. 1893. Untersuchungen über die Histogenese und Histomechanik des Gefass systems. *Stuttgart: Enke.*

Thompson, C.B. 1995. Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. *Science.* 267:1456-1462.

Thyberg, J., U. Hedin, M. Sjölund, L. Palmberg, B.A. Bootger. 1990. Regulation of differentiated properties and proliferation of arterial smooth muscle cells. *Artherosclerosis.* 10:966-990.

Tigerstedt, R., P.G. Bergman. 1898. Niere und kreislauf. *Skandinavisches Archiv für Physiologie.* 8:223-271.

Timmermans, P.B.M.B.W.M., P.C. Wong, A.T. Chiu, W.F. Herblin, P. Benfield, D.L. Carini, R.J. Lee, R.R. Wexler, J.A.M. Saye, R.D. Smith. 1993a. Angiotensin II receptors and angiotensin II receptor antagonists. *Pharmacol Rev.* 45:205-251.

- Timmermans, P.B.M.W.M., P.C. Wong, A.T. Chiu.** 1993b. Angiotensin II receptors and angiotensin II receptor antagonists. *Pharmacological Reviews*. 45.
- Todd, M.E., B. Gowen.** 1991. Arterial wall and smooth muscle cell development in young Wistar rats and the effects of surgical denervation. *Circ Res*. 69:438-446.
- Tomanek, R.J., P.J. Palmer, G.L. Pfeffer, K.L. Schreiber, C.L. Eastern, M. Marcus.** 1986. Morphometry of canine coronary arteries, arterioles, and capillaries during hypertension and left ventricular hypertrophy. *Circ Res*. 58:38-46.
- Triggle, D.J.** 1996. The classification of calcium antagonists. *J Cardio Pharmacol*. 27:S11-S16.
- Tsien, R.W.** 1996. Molecular biology of calcium channels and structural determinants of key functions. *J Cardio Pharmacol*. 27:S4-S10.
- Tsoporis, J., N. Fields, R.M.K.W. Lee, F.H.H. Leenen.** 1993. Effects of the arterial vasodilator minoxidil on cardiovascular structure and sympathetic activity in spontaneously hypertensive rats. *J Hypertens*. 11:1337-1345.
- Tsuzuki, S., S. Eguchi, T. Inagami.** 1996a. Inhibition of cell proliferation and activation of protein tyrosine phosphatase mediated by angiotensin II type 2 (AT2) receptor in R3T3 cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 228:825-830.
- Tsuzuki, S., T. Matoba, S. Eguchi, T. Inagami.** 1996b. Angiotensin II type 2 receptor inhibits cell proliferation and activates tyrosine phosphatase. *Hypertension*. 28:916-918.
- Unger, T., P. Gohlke, M.G. Gruber.** 1990. Converting enzyme inhibitors. In *Ganten D, Mulrow PJ, eds. Handbook of experimental pharmacology*. 93:377-481.
- Van Brummelen, P., K. Jie, P.A. Van Zwieten.** 1986. Alpha-adrenergic receptors in human blood vessels. *Br J Clin Pharmacol*. 21:33S-39S.
- van Kesteren, C.A., H.A. van Heugten, J.M. Lamers, P.R. Saxena, M.A. Schalekamp, A.H. Danser.** 1997. Angiotensin II-mediated growth and antigrowth effects in cultured neonatal rat cardiac myocytes and fibroblasts. *J Mol Cell Cardiol*. 29:2147-2157.
- Van Krimpen, C., J.F.M. Smits, J.P.M. Cleutjens.** 1991. DNA synthesis in the non-infarcted cardiac interstitium after left coronary artery ligation in the rat: effect of captopril. *J Mol Cell Cardiol*. 23:1245-1253.

- van Zwieten, P.A.** 1984. Vasodilator drugs with direct action on smooth muscle. *In: van Zwieten PA, ed. Handbook of hypertension.* 3:307-346.
- van Zwieten, P.A.** 1999. The renaissance of centrally acting antihypertensive drugs. *J Hypertens.* 17:S15-21.
- van Zwieten, P.A., P.B.M.W.M. Timmermans, P. Van Brummelen.** 1984. Role of alpha adrenoreceptors in hypertension and in antihypertensive drug treatment. *Am J Med.* 77:17-25.
- Vanhoutte, P.M.** 1989. Endothelium and control of vascular function. *Hypertension.* 13:658-667.
- Varnauskas, E.** 1955. Studies in hypertensive cardiovascular disease with special reference to cardiac function. *Scand J Clin Lab Invest.* 7:1-117.
- Vaux, D.L., I.L. Weissman.** 1992. Prevention of programmed cell death in *Caenorhabditis elegans* by human bcl-2. *Science.* 258:1955-1957.
- Villarreal, F.J., N.N. Kim, G.D. Ungab, M.P. Printz, W.H. Dillmann.** 1993. Identification of functional angiotensin II receptors on rat cardiac fibroblasts. *Circulation.* 88:2849-2861.
- Vincent, H.H., A.J. Man in't Veld, F. Boomsma, G.J. Wenting, M.A.D.H. Schalemkamp.** 1982. Elevated plasma noradrenaline in response to beta-adrenoreceptor stimulation in man. *Br J Clin Pharmacol.* 13:717-721.
- Viswanathan, M., K. Tsutsumi, F.M.A. Correa, J.M. Saavedra.** 1991. Changes in expression of angiotensin receptor subtypes in the rat aorta during development. *Biochem Biophys Res Commun.* 179:1361-1367.
- Walsh, R.A., G.W. Dorn II.** 1998. Growth and hypertrophy of the heart and blood vessels. *New-York: McGraw-Hill:*155-168.
- Walter, S.V., P. Hamet.** 1986. Enhanced DNA synthesis in heart and kidney of newborn spontaneously hypertensive rats. *Hypertension.* 8:520-525.
- Weber, K.T.** 1989. Cardiac interstitium in health and disease: the fibrillar collagen network. *J Am Coll Cardiol.* 13:1637-1652.
- Weber, K.T., C.G. Brilla, J.S. Janicki.** 1993. Myocardial fibrosis: functional significance and regulatory factors. *Cardiovasc Res.* 27:341-348.

- Weber, K.T., W.A. Clark, J.S. Janicki, S.G. Shroff.** 1987. Physiologic versus pathologic hypertrophy and the pressure-overloaded myocardium. *J Cardiovasc Pharmacol.* 10:37-49.
- Weber, T.K., C.G. Brilla.** 1991. Pathological hypertrophy and cardiac interstitium fibrosis and renin-angiotensin-aldosterone system. *Circulation.* 83:1849-1865.
- Weir, M.R.** 1998. The rationale for combination versus single-entity therapy in hypertension. *Am J Hypertens.* 11:163S-169S.
- Werkö, L., H. Lagerlöf.** 1949. Studies on the circulation in man. IV. Cardiac output and blood pressure in the right auricle, right ventricle and pulmonary artery in patients with hypertensive cardiovascular disease. *Acta Med Scand:*133-427.
- Wharton, J., K. Morgan, R.A. Rutherford, J.D. Catravas, A. Chester, B.F. Whitehead, M.R. De Leval, M.H. Yacoub, J.M. Polak.** 1998. Differential distribution of angiotensin AT2 receptors in the normal and failing human heart. *J Pharmacol Exp Ther.* 284:323-336.
- White, E.** 1996. Life, death, and the pursuit of apoptosis. *Genes and development.* 10:1-15.
- Wilkinson, R.** 1982. Beta-blockers and renal function. *Drugs.* 23:195-206.
- Williams, G.** 1993. Molecular regulation of apoptosis: genetic controls on cell ceath. *Cell.* 74:777-779.
- Williams, G.T., C.A. Smith, N.J. McCarthy, E.A. Grimes.** 1992. Apoptosis: final control point in cell biology. *Trends Cell Biol.* 2:263-267.
- Wittner, M., A. Di Stefano, P. Wangemann, R. Greger.** 1991. How do loop diuretics act? *Drugs.* 141:1-13.
- Wolf, F., E.G. Neilson.** 1990. Angiotensin II induces cellular hypertrophy in cultured murine proximal tubular cells. *Am J Physiol.* 259:F768-F777.
- Wyllie, A.H.** 1992. Apoptosis and the regulation of cell numbers in normal and neoplastic tissues: an overview. *Cancer Metast Rev.* 11:95-103.
- Wyllie, A.H., J.F.R. Kerr, A.R. Currie.** 1980. Cell death: the significance of apoptosis. *Int Rev Cytol.* 68:251-306.
- Xiang, J., D.T. Chao, S.J. Korsmeyer.** 1996. BAX-induced cell death may not require interleukin 1B-converting enzyme-like proteases. *Proc Natl Acad Sci USA.* 93:14559-14563.

- Yamada, T., M. Akishita, M.J. Pollman, G.H. Gibbons, V.J. Dzau, M. Horiuchi.** 1998. Angiotensin II type 2 receptor mediates vascular smooth muscle cell apoptosis and antagonizes angiotensin II type 1 receptor action: an in vitro gene transfer study. *Life Sci* 63(19):PL289-95
- Yamada, T., M. Horiuchi, V.J. Dzau.** 1996a. Angiotensin II type 2 receptor mediates programmed cell death. *Proc Natl Acad Sci USA.* 93:156-160.
- Yamori, Y.** 1976. Neural and non-neural mechanisms in spontaneous hypertension. *Clin Sci Mol Med.* 51:431S-434S.
- Yamori, Y.** 1983. Physiopathology of various strains of spontaneously hypertensive rats. In: *Genest J, Kuchel O, Hamet P, Cantin M, eds. Hypertension: physiopathology and treatment, 2nd edn. Montreal: McGraw-Hill.*:191-203.
- Yamori, Y., T. Igawa, T. Kanabe, M. Kihara, Y. Nara, R. Horie.** 1981. Mechanisms of structural vascular changes in genetic hypertension: Analyses on cultured vascular smooth muscle cells from spontaneously hypertensive rats. *Clin Sci.* 61:121S-123S.
- Yamori, Y., C. Mori, T. Nishio, A. Ooshima, R. Horie, M. Ohtaka.** 1979. Cardiac hypertrophy in early hypertension. *Am J Cardiol.* 44:964-969.
- Yang, Z., G. Noll, T.F. Lüscher.** 1993. Calcium antagonists differently inhibit proliferation of human coronary smooth muscle cells in response to pulsatile stretch and platelet-derived growth factor. *Circulation Research.* 88:832-838.
- Yin, X.M., Z.N. Oitval, S.J. Korsmeyer.** 1994. BH1 and BH2 domains of Bcl-2 are required for inhibition of apoptosis and heterodimerization with Bax. *Nature.* 369:272-273.
- Yonish-Rouach, E., D. Resnitzky, J. Lotem, L. Sachs, A. Kimchi, M. Oren.** 1991. Wild-type p53 induces apoptosis of myeloid leukaemic cells that is inhibited by interleukin-6. *Nature.* 352:345-347.
- Yuan, J., S. Shaham, S. Ledoux, H.M. Ellis, H.R. Horvitz.** 1993. The *C. elegans* cell death gene *ced-3* encodes a protein similar to mammalian interleukin-1 beta-converting enzyme. *Cell.* 75:641-652.
- Yusuf, S., R. Garg, D. McConachie.** 1993. Effect of angiotensin-converting enzyme inhibitors in left ventricular dysfunction: results of the studies of left ventricular dysfunction in the context of other similar trials. *J Cardiovasc Pharmacol.* 22:S28-S35.
- Zak, R.** 1973. Cell proliferation during cardiac growth. *Am J Cardiol.* 31:211-219.

Zarins, C.K., M.A. Zatina, D.P. Giddens, D.N. Ku, S. Glagov. 1987. Shear stress regulation of artery lumen diameter in experimental atherogenesis. *J Vasc Surg.* 5:413-420.

Zhu, D.L., T. Herembert, D. Caruelle, J.P. Caruelle, P. Marche. 1994. Involvement of calcium channels in fibroblast growth factor-induced activation of arterial cells in spontaneously hypertensive rats. *J Cardiovasc Pharmacol.* 23:395-400.

Zierhut, W., M. Rudin, E. Robertson, H.G. Zerwes, D. Novosel. 1993. Time course of spirapril-induced structural and functional changes after myocardial infarction in rats followed with magnetic resonance imaging. *J Cardiovasc Pharmacol.* 21:937-946.

Zierhut, W., H.G. Zimmer. 1989. Significance of myocardial alpha- and beta-adrenoceptors in catecholamine-induced cardiac hypertrophy. *Circ Res.* 65:1417-1425.

Zimmerman, B.G., E.J. Sybertz, P.C. Wong. 1984. Interaction between sympathetic and renin-angiotensin system. *J Hypertens.* 2:581-587.

Zou, H., W.J. Henzel, X. Liu, A. Lutschg, X. Wang. 1997. Apaf-1, a human protein homologous to *C. elegans* CED-4, participates in cytochrome c-dependent activation of caspase-3. *Cell.* 90:405-413.

Zusman, R.M. 1987. Effects of converting-enzyme inhibitors on the renin-angiotensin-aldosterone, bradykinin, and arachidonic acid-prostaglandin systems: correlation of chemical structure and biologic activity. *Am J Kidney Dis.* 10:13-23.

ANNEXE

PUBLICATIONS

1. Teiger E., Dam T-V., Richard L., Wisnewsky C., **Tea B-S.**, Gaboury L., Tremblay J., Schwartz K., Hamet P. (1996) Apoptosis in pressure overload-induced heart hypertrophy in the rat. J. Clin. Invest. 97: 2891-2897.
2. Hamet P., deBlois D., Dam T-V., Richard L., Teiger E., **Tea B-S.**, Orlov SN., Tremblay J. Apoptosis and vascular wall remodeling in hypertension. (1996) Can. J. Physiol. Pharmacol. 74: 850-861.
3. Hamet P., Moreau P., Dam T-V., Orlov SN., **Tea B-S.**, deBlois D., Tremblay J. The time windows of apoptosis: a new component in the therapeutic strategy for cardiovascular remodeling. (1996) J. Hypertens. 14 (Suppl 5); S65-S70.
4. deBlois D., **Tea B-S.**, Dam T-V., Tremblay J., Hamet P. Smooth muscle apoptosis during vascular regression in spontaneously hypertensive rats. (1997) Hypertension 29: 340-350.
5. Moreau P., **Tea B-S.**, Dam T-V., Hamet P. Altered balance between cell replication and apoptosis in hearts and kidneys of newborn SHR. (1997) Hypertension 30: 720-724.
6. **Tea B-S.**, Dam T-V., Moreau P., Hamet P, deBlois D. Apoptosis during regression of cardiac hypertrophy in spontaneously hypertensive rats. Temporal regulation and spatial heterogeneity. (1999) Hypertension 34; 229-235.
7. **Tea B-S.**, Der Sarkissian S., Touyz R.M., Hamet P., deBlois L. Proapoptotic and growth-inhibitory role of angiotensin II type 2 receptor in vascular smooth muscle cells of spontaneously hypertensive rats in vivo. (2000) Hypertension 35; 1069-73.
8. **Tea B-S.**, deBlois D., Hamet P. Intermittent treatment with nifedipine induces repeated time windows of apoptosis in the remodeling heart of SHR but not WKY rats. (2000) Cardiovasc Res (in press).
9. Hamet P., Thorin-Trescases N., Moreau P., Dumas P., **Tea B-S.**, deBlois D., Pravenec M., Kren V., Kunes V., Sun Y., Tremblay J. Excess growth and apoptosis: Is hypertension a case of accelerated aging of cardiovascular cells? (2000) Hypertension (in press)
10. **Tea B-S.**, Hamet P, deBlois D. Increased kidney apoptosis during short-term blockade of renin-angiotensin system. (2000) (in preparation)
11. Der Sarkissian S., **Tea B-S.**, Hamet P., deBlois D. Apoptotic and antiproliferative role of angiotensin II receptor subtype 2 in vascular smooth muscle cells of spontaneous hypertensive rats in vivo. (2000) (in preparation)
12. Hamet P, Orlov SN, Dam T-V., **Tea B-S.**, Adarichev VA., Pshezhetsky A., Bennett MR., deBlois D., Tremblay J. Modulation of apoptosis in vascular smooth muscle cells by intracellular calcium: role of Ca⁺⁺-dependent proteases and ATP depletion. (2000) (in preparation).

ABSTRACTS

1. **Tea B-S.**, Hamet P., deBlois D. Pharmacological regulation of apoptosis in target organs of hypertension.

First Annual Meeting of the Department of Pharmacology, Faculty of Medicine Université de Montréal, Montréal (Québec, Canada), April 26th 1996. Proceedings of the meeting (#M21).
2. **Tea B-S.**, Tremblay J., Hamet P., deBlois D. Regulation of apoptosis in target organs of hypertension.

Fifth Annual Meeting of the Hotel-Dieu Research Center, Montreal (Québec, Canada) May 8th 1996. Proceedings of the meeting (#33).
3. deBlois, D., **Tea, B.-S.**, Hamet, P. Enalapril regulates apoptosis differently in the heart thoracic aorta and kidney of spontaneously hypertensive rats. J Vasc Res 33 (Suppl 1): 20 1996.

First Meeting of the NAVBO, Seattle (Washington, USA), September 3-6 1996.
4. deBlois, D., **Tea, B.-S.**, Dam, T.-V., Tremblay, J., Hamet, P. Independent regulation of arterial growth, apoptosis and blood pressure in spontaneously hypertensive rats treated with enalapril, losartan or hydralazine. Hypertension 28(3): 34, 1996.

50th Annual Fall Conference and Scientific Sessions of the Council for High Blood Pressure Research, Chicago (Illinois, USA), September 19-22 1996.
5. **Tea B-S.**, Tremblay J., Hamet P., deBlois D. Pharmacological regulation of apoptosis in target organs of hypertension.

French Canadian Physicians Association Annual Meeting, Montréal (Québec, Canada) October 10th 1996. Oral presentation.
6. deBlois, D., **Tea, B.-S.**, Dam, T.-V., Tremblay, J., Hamet, P. Cardiac growth and apoptosis are regulated independently of blood pressure reduction in spontaneously hypertensive rat treated with enalapril, losartan or hydralazine. Can J Cardiol 12(Suppl E): 104E, 1996.

49th Annual Meeting of the Canadian Cardiovascular Society, Montreal (Québec, Canada) October 29 to November 2, 1996.
7. **Tea B-S.**, Hamet P., Dam T-V., Tremblay J., deBlois D. Smooth muscle apoptosis during vascular regression in spontaneously hypertensive rats. Medicine/Sciences 13 (Suppl 1);23, 1997.

Fifth annual Scientific Meeting of the "Société Québécoise d'Hypertension Artérielle" Québec (Canada), January 16-18 1997.

8. Moreau P., Dam T-V., **Tea B-S.**, Hamet P. Une diminution de l'apoptose explique l'hypertrophie cardiaque du rat nouveau-né génétiquement hypertendu. Medecine/Science 13 (Suppl. 1);20, 1997.
- Fifth annual Scientific Meeting of the "Société Québécoise d'Hypertension Artérielle" Québec (Canada), January 16-18 1997.
9. Moreau P., Dam T-V., **Tea B-S.**, Hamet P. Decreased apoptosis may contribute to neonatal cardiac hyperplasia of rats genetically predisposed to hypertension. Hypertension 29 (3) 886, 1997.
- XIIth Scientific Meeting of the Inter-American Society of Hypertension, Mexico City (Mexico), March 15-18 1997.
10. **Tea B-S.**, Hamet P., deBlois D. Augmentation de l'apoptose des cellules musculaires lisses durant la régression de l'hypertrophie aortique des rats SHR.
- Second Annual Meeting of the Department of Pharmacology, Faculty of Medicine Université de Montréal, Montréal (Québec, Canada), May 23th 1997. Oral Presentation.
11. **Tea B-S.**, deBlois D., Dam T-V., Tremblay J., Hamet P. Cardiac growth and apoptosis are regulated independently of blood pressure in spontaneously hypertensive rats treated with nifedipine, enalapril, losartan, or hydralazine. Journal of Hypertension 15 (Suppl 4); S37 1997.
- XIIIth European Meeting on Hypertension, Milan (Italy), June 13-16, 1997.
12. Moreau P., **Tea B-S.**, deBlois D., Dam T-V., Tremblay J., Hamet P. Selective increase of apoptosis by nifedipine in resistance arteries of spontaneously hypertensive rats. Journal of Hypertension 15 (Suppl 4); S74, 1997.
- XIIIth European Meeting on Hypertension, Milan (Italy), June 13-16, 1997.
13. **Tea B-S.**, deBlois D., Dam T-V., Tremblay J., Hamet P. Cardiac growth and apoptosis are regulated independently of blood pressure in spontaneously hypertensive rats treated with nifedipine, enalapril, losartan, or hydralazine. Clinical and Investigative Medicine 20 (4) S37, 1997.
- 66th Annual Meeting of the Royal College of Physicians and Surgeons of Canada Vancouver (Canada), September 25-28, 1997. Oral Presentation.
14. Moreau P., **Tea B-S.**, deBlois D., Dam T-V., Tremblay J., Hamet P. Modulation of apoptotic activity by antihypertensive treatments in small arteries. Clinical and Investigative Medicine: 20 (4); S37, 1997.
- 66th Annual Meeting of the Royal College of Physicians and Surgeons of Canada Vancouver (Canada), September 25-28, 1997. Oral Presentation.

15. deBlois D., **Tea B-S.**, Moreau P., Tremblay J., Hamet P. Intermittent treatment with nifedipine induces repeated time windows of apoptosis in the remodeling heart of SHR but not WKY rats. Hypertension 30 (3); 485, 1997.
51st Annual Fall Conference and Scientific Sessions of the Council for High Blood Pressure Research, Washington DC (USA), September 16-19, 1997.
16. **Tea B-S.**, deBlois D., Moreau P., Dam T-V., Tremblay J., Hamet P. Cardiac apoptosis during regression of hypertrophy. Médecine/Science 13 (Suppl 2); 24, 1997.
XXIX Clinical Research Club of Québec, Trois-Rivières (Canada), October 16-19, 1997.
17. **Tea B-S.**, deBlois D, Hamet P. Selective induction of apoptosis in the heart but not in the aorta during β -adrenergic blockade in the SHR.
9th International Symposium on SHR and Cardiovascular Genetics, Montréal (Canada) November 13-16, 1997.
18. deBlois D., **Tea B-S.**, Dam T-V., Hamet P. Apoptosis is increased in myocytes and non-myocytes cells of sub-epicardium during cardiac regression induced by antihypertensive therapy in spontaneously hypertensive rats.
9th International Symposium on SHR and Cardiovascular Genetics, Montréal (Canada), November 13-16, 1997. Oral Presentation
19. Der Sarkissian S., **Tea B-S.**, Hamet P., deBlois D. Role of angiotensin II receptor subtype 1 and 2 in regulating apoptosis in the heart of spontaneously hypertensive rats.
9th International Symposium on SHR and Cardiovascular Genetics, Montréal (Canada) November 13-16, 1997.
20. Orlov SN., Dam T-V., **Tea B-S.**, Adararichev VA., deBlois D, Bennett MR., Tremblay J. Hamet P. Chromatin cleavage and DNA degradation in vascular smooth muscle (VSMC) undergoing apoptosis: Effect of E1A adenovirus and Ca^{2+} i.
9th International Symposium on SHR and Cardiovascular Genetics, Montréal (Canada) November 13-16, 1997.
21. **Tea B-S.**, deBlois D., Moreau P., Dam T-V., Tremblay J., Hamet P. Cardiac apoptosis during regression of hypertrophy. Médecine/Science 14 (Suppl 1); 23, 1998.
Sixth annual Scientific Meeting of the "Société Québécoise d'Hypertension Artérielle" Montréal (Canada), January 15-17, 1998.
22. **Tea B-S.**, Hamet P., deBlois D. Spécificité anatomique et temporelle de l'apoptose cardiaque durant la régression de l'hypertrophie des rats SHR.
Third Annual Meeting of the Département of Pharmacology, Faculty of Medicine Université de Montréal, Montréal (Québec, Canada), May 23th 1997.

23. **Tea B-S.**, Dam T-V., Tremblay J., deBlois D., Hamet P. Regulation of renal apoptosis by nifedipine, losartan, enalapril, hydralazine or hydrochlorothiazide in SHR. J. Hypertens 1 (Suppl 2): S65 (1998).
- 17th Scientific Meeting of the International Society of Hypertension, Amsterdam (The Netherlands), June 7-11, 1998.
24. **Tea B-S.**, Der Sarkissian S., Hamet P., deBlois D. Apoptotic and antiproliferative role of angiotensin II receptor subtype 2 in vascular smooth muscle cells of spontaneous hypertensive rats in vivo. Hypertension 32 (3):600 (1998)
- The 52st Annual Fall Conference and Scientific Sessions of the Council for High Blood Pressure Research, Philadelphia (USA), September 15-18, 1998.
25. **Tea B-S.**, Moreau P., Sun YL., Pausova Z., Dumas P., deBlois D., Pravenec M., Kren V., Tremblay J., Hamet P. Identification of quantitative trait loci for cardiac apoptosis in newborn recombinant inbred strains. Hypertension 32 (3):626 (1998)
- The 52st Annual Fall Conference and Scientific Sessions of the Council for High Blood Pressure Research, Philadelphia (USA), September 15-18, 1998.
26. **Tea B-S.**, Der Sarkissian S., Hamet P., deBlois D. Apoptotic and antiproliferative role of angiotensin II receptor subtype 2 in vascular smooth muscle cells of spontaneous hypertensive rats in vivo. Can J Cardiol 14 (Suppl F): 185F (1998).
- The 19th Annual Meeting of The Canadian Hypertension Society, Ottawa (Canada), October 22-25, 1998.
27. **Tea B-S.**, Der Sarkissian S., Hamet P., deBlois D. Apoptotic and antiproliferative role of angiotensin II receptor subtype 2 in the heart of spontaneous hypertensive rats in vivo.
- The 71th Scientific Sessions of The American Heart Association, Dallas (USA), November 8-11, 1998.
28. **Tea B-S.**, Dam T-V., Tremblay J., Hamet P., deBlois D. Renal apoptosis during antihypertensive therapy. Médecine/Science 14 (Suppl 2):33 (1998).
- XL Clinical Research Club of Québec, Mont-Tremblant (Canada), October 15-17, 1998.
29. deBlois D, **Tea B-S.**, Der Sarkissian S., Hamet P. Apoptotic and antiproliferative role of angiotensin II receptor subtype 2 in vascular smooth muscle cells of spontaneous hypertensive rats in vivo Médecine/Science 14 (Suppl 2):32 (1998).
- XL Clinical Research Club of Québec, Mont-Tremblant (Canada), October 15-17, 1998.
30. **Tea B-S.**, Der Sarkissian S, Hamet P, deBlois D. Apoptotic and antiproliferative role of angiotensin II receptor subtype 2 in vascular smooth muscle cells of spontaneous hypertensive rats in vivo Médecine/Science 15 (Suppl 1):22 (1999).
- Seventh annual Scientific Meeting of the "Société Québécoise d'Hypertension Artérielle" Montréal (Canada), January 14-16, 1999.