

2M11-2826.9

Université de Montréal

Rôle de l'endothéline dans les changements microvasculaires et la fibrose au niveau
du coeur du rat hypertendu DOCA-sel.

par
Isabelle Larouche

Département de sciences biomédicales
Faculté de médecine

Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures
en vue de l'obtention du grade de
Maître ès sciences (M.Sc.)
en sciences biomédicales

août 2000

©Isabelle Larouche, 2000



W
4

W58

2001

N. 017

Université de Montréal
Faculté des études supérieures

Ce mémoire intitulé:

Rôle de l'endothéline dans les changements microvasculaires et la fibrose au niveau
du coeur du rat hypertendu DOCA-sel.

présenté par:
Isabelle Larouche

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes:

Président-rapporteur:
Timothy L. Reudelhuber, Ph.D.

Directeur de recherche:
Ernesto L. Schiffrin, M.D., Ph.D., FRCPC

Membre du jury:
Gaétan Thibault, Ph.D.

Évaluateur externe:
Jocelyn Dupuis, M.D., Ph.D.

Mémoire accepté le:

SOMMAIRE

L'hypertension artérielle est associée à diverses altérations cardiaques comprenant l'hypertrophie du ventricule gauche, ainsi que des changements dans la microvasculature et la matrice extracellulaire. Toutes ces modifications peuvent engendrer, à leur tour, des complications cardiovasculaires. Plusieurs peptides vasoactifs participent dans la pathogénèse et la pathophysiologie de l'hypertension artérielle. De ces peptides, la famille des endothélines (ET), particulièrement l'endothéline-1 (ET-1), semble jouer un rôle important dans l'élévation de la pression artérielle et ses complications cardiovasculaires dans plusieurs modèles expérimentaux. La participation potentielle de l'ET-1 dans quelques modèles d'hypertension expérimentale, tels que celui induit par l'administration de l'acétate de déoxycorticostérone (DOCA) et du sel, a été suggérée suite à la découverte de l'expression vasculaire accrue de ce peptide dans ce modèle. De plus, l'ET-1 amène une variété d'effets biologiques dont la contraction et la croissance des cellules musculaires lisses. Les effets sur ces cellules sont médiés majoritairement via le récepteur ET_A et touchent entre autres les petites artères, qui peuvent présenter alors des altérations significatives. Également, l'ET-1 est impliquée dans l'hypertrophie des cardiomyocytes, ainsi que dans l'induction de la synthèse du collagène par les fibroblastes cardiaques et, de ce fait, a une influence sur le développement de l'hypertrophie ventriculaire gauche. Cette hypertrophie engendre le remodelage cardiaque qui est principalement caractérisée par une augmentation du volume des cardiomyocytes accompagnée de changements dans la matrice extracellulaire, particulièrement du dépôt de collagène. La fibrose cardiaque, à son tour, en augmentant la rigidité et en diminuant l'efficacité de la contraction du muscle cardiaque, peut conduire à l'insuffisance cardiaque. Afin de vérifier l'hypothèse de la

contribution de l'ET-1 aux changements dans la microvasculature ainsi que dans la fibrose cardiaque via le récepteur ET_A, nous avons utilisé un modèle de rat hypertendu DOCA-sel chez lequel l'endothéline semble impliquée dans l'hypertension. Le but de l'étude était principalement de démontrer l'efficacité d'un traitement à l'aide d'un antagoniste du récepteur ET_A de l'endothéline, le A-127722, dans la prévention de certaines modifications cardiovasculaires engendrées par l'hypertension chez ce modèle de rat hypertendu. Parmi les changements vasculaires relatifs à l'hypertension, les altérations significatives se retrouvent principalement au niveau des petites artères, des artérioles et des capillaires. Ainsi, les artérioles coronaires (diamètre de la lumière <20µm), qui jouent un rôle important dans la résistance au flot sanguin, et les capillaires (diamètre de la lumière <8µm), qui sont impliqués dans l'approvisionnement de l'oxygène et des nutriments aux tissus, ont été étudiés. Pour ce faire, une méthode immunohistochimique spécifique à chaque vaisseau a été utilisée. Nous avons donc fait l'étude de ces vaisseaux, puisque des anomalies dans la distribution, la densité, la longueur et la tortuosité de ceux-ci peuvent affecter la résistance vasculaire coronaire et contribuer à l'ischémie myocardique. Dans la seconde partie, nous avons fait l'étude de la fibrose cardiaque, et ce, par la quantification du collagène dans diverses régions du ventricule gauche. Pour ce faire, nous avons effectué une méthode colorimétrique, utilisant le Sirius Red F3BA, suivie d'imagerie microscopique. Comme la déposition de collagène peut être attribuée à une augmentation de la synthèse de procollagène I et III suite, en partie, à une augmentation du TGFβ₁, un facteur de croissance stimulant cette synthèse, l'analyse de ces derniers a été effectuée par RT-PCR et par Western blot respectivement.

Les résultats de notre étude démontrent que, chez le modèle hypertendu DOCA-sel, la densité des artérioles et des capillaires sont altérés significativement

dans la région du myocarde sous-endocardique du ventricule gauche. En fait, une augmentation de la densité artériolaire et une diminution de la densité des capillaires ont été observées dans cette région du myocarde. L'administration de l'antagoniste du récepteur ET_A de l'endothéline, le A-127722, a semblé prévenir partiellement ces modifications microvasculaires. Dans la seconde partie de l'étude, nous avons pu observer une augmentation significative de collagène cardiaque périvasculaire et interstitiel, dans les régions sous-endocardique et mid-myocardique des rats DOCA-sel. Toutefois, dans la région sous-épicardique, l'accumulation de collagène s'est effectuée majoritairement autour des vaisseaux. D'après les résultats obtenus, la déposition accrue de collagène dans ces régions pourrait être, en partie, attribuée à une augmentation de la synthèse de procollagène I et III, et ce, suite à l'augmentation du TGFβ₁. Donc, tous nos résultats suggèrent un rôle pour l'ET-1 dans les changements microvasculaires, ainsi que dans la déposition de collagène cardiaque, spécifiquement de type I et III, dans l'hypertension minéralocorticoïde. Ces changements peuvent avoir des implications pharmacologiques et physiopathologiques dans l'hypertension artérielle.

TABLE DES MATIÈRES

Sommaire	iii
Table des matières	vi
Liste des Tableaux	ix
Liste des Figures	x
Liste des Abréviations	xii
Dédicace	xiii
Remerciements	xiv
<u>Chapitre 1: Introduction</u>	
<u>1. Hypertension artérielle</u>	1
<u>2. Système cardio-vasculaire</u>	2
2.1 Le coeur	2
2.1.1 Composition du myocarde	3
2.1.2 Hypertrophie cardiaque	7
2.1.3 Collagène	8
2.1.4 TGF β_1	10
2.2 Les vaisseaux sanguins	11
2.2.1 Structure des vaisseaux	12
2.2.2 Les artères	13
2.2.3 Les artérioles	13
2.2.4 Les capillaires	14
<u>3. Physiologie de la circulation</u>	15

<u>4. Peptide Vasoactif: L'endothéline</u>	16
4.1 Récepteurs et antagonistes des récepteurs de l'endothéline	18
4.2 Actions de l'endothéline sur le muscle lisse vasculaire	20
<u>5. Études microvasculaires</u>	21
5.1 Angiogénèse	21
5.2 Raréfaction	22
5.3 Méthodes	23
<u>6. Hypothèse de travail</u>	24

Chapitre 2: Article

"Cardiac Microvasculature in DOCA-Salt Hypertensive Rats:
Effect of Endothelin ET_A Receptor Antagonism."

- ABSTRACT	30
- INTRODUCTION	31
- METHODS	33
- RESULTS	36
- DISCUSSION	38
- ACKNOWLEDGMENTS	43
- REFERENCES	44
- FIGURE LEGENDS	49

Chapitre 3: Article

"Myocardial Fibrosis in DOCA-salt Hypertensive Rats: Effect
of Endothelin ET_A Receptor Antagonism."

- ABSTRACT	57
- CONDENSED ABSTRACT	58

- INTRODUCTION	59
- METHODS	60
- RESULTS	63
- DISCUSSION	64
- ACKNOWLEDGMENTS	69
- REFERENCES	70
- FIGURE LEGENDS	76
<u>Chapitre 4: Discussion et Conclusion</u>	84
<u>Chapitre 5: Bibliographie</u>	97

LISTE DES TABLEAUX

À l'intérieur de la revue bibliographique:

Tableau I. Composantes de la matrice extracellulaire cardiaque.

Tableau II. Résistances relatives du lit vasculaire systémique.

Tableau III. Comparaison de la pharmacocinétique du A-127722 chez le rat, le chien et le singe.

À l'intérieur de l'article " Cardiac microvasculature in DOCA-salt hypertensive rats: Effect of endothelin ET_A Receptor Antagonism":

Tableau 1. Pression sanguine, poids du coeur et poids corporel des rats UniNx, DOCA-sel et DOCA-sel traités à l'antagoniste du récepteur ET_A de l'endothéline, le A-127722.

Tableau 2. Tortuosité des artérioles sous-endocardique des rats DOCA-sel traités à l'antagoniste du récepteur ET_A de l'endothéline, le A-127722.

À l'intérieur de l'article "Myocardial Fibrosis in DOCA-salt hypertensive rats: Effect of endothelin ET_A Receptor Antagonism":

Tableau 1. Pression sanguine, poids du coeur et poids corporel des rats UniNx, DOCA-sel et DOCA-sel traités à l'antagoniste du récepteur ET_A de l'endothéline, le A-127722.

Tableau 2. Cinétique de l'ARNm du TGFβ₁ et expression protéique dans le ventricule gauche des rats hypertendus DOCA-sel traités à l'antagoniste du récepteur ET_A de l'endothéline.

LISTE DES FIGURES

À l'intérieur de la revue bibliographique:

Figure 1. A. Différences anatomiques entre le ventricule gauche et le ventricule droit.
B. Différentes parties du ventricule gauche à l'étude: sous-endocardique, mid-myocardique et sous-épicardique.

À l'intérieur de l'article "Cardiac microvasculature in DOCA-salt hypertensive rats: Effect of endothelin ET_A Receptor Antagonism":

Figure 1. Artérioles et capillaires de la région sous-endocardique du myocarde démontrés par immunomarquage des cellules musculaires lisses et de la laminine, suivi de la coloration au Nuclear Fast Red (coloration des noyaux cellulaires).

Figure 2. En haut: Densité moyenne des capillaires et artérioles coronaires dans la région sous-épicardique du myocarde des différents groupes expérimentaux. En bas: Densité moyenne des capillaires et artérioles coronaires dans la région sous-endocardique du myocarde du ventricule gauche chez différents groupes expérimentaux.

Figure 3. Fréquence de distribution des diamètres artériolaires dans la région sous-endocardique du myocarde (vaisseaux <30µm).

Figure 4. Modèle représentant le mécanisme potentiel pour l'augmentation de la densité des artérioles et de la diminution de la densité des capillaires dans la région sous-endocardique du myocarde du ventricule gauche du rat hypertendu DOCA-sel.

À l'intérieur de l'article "Myocardial Fibrosis in DOCA-salt hypertensive rats: Effect of endothelin ET_A Receptor Antagonism"

Figure 1. Déposition du collagène dans le myocarde du ventricule gauche du rat hypertendu DOCA-sel révélé à l'aide de la coloration Sirius Red F3BA. A. Ventricule gauche du rat contrôle unilatéralement néphrectomisé, B. Collagène interstitiel du coeur de rat hypertendu DOCA-sel, C. Collagène périvasculaire du coeur de rat hypertendu DOCA-sel, D. Absence significative de fibrose dans le coeur du rat hypertendu DOCA-sel traité à l'antagoniste du récepteur ET_A de l'endothéline, le A-127722. Grossissement original de X20.

Figure 2. Densité du collagène dans les régions sous-endocardique, mid-myocardique et sous-épicaudique du myocarde du ventricule gauche chez différents groupes expérimentaux.

Figure 3. Expression de l'ARNm du procollagène I et III par RT-PCR exprimé en pourcentage du contrôle UniNx dans le ventricule gauche du rat hypertendu DOCA-sel et l'effet de l'antagoniste ET_A, le A-127722. La figure de gauche représente des gels d'agarose représentatifs. La figure de droite représente les moyennes \pm SEM (n=6).

Figure 4. Expression de l'ARNm du TGF β ₁ par RT-PCR dans le ventricule gauche du rat hypertendu DOCA-sel et l'effet de l'antagoniste ET_A de l'endothéline, le A-127722. La figure de gauche représente les gels d'agarose représentatifs. La figure de droite représente les moyennes \pm SEM (n=3).

Figure 5. Expression de la protéine TGF β ₁ dans le ventricule gauche du rat hypertendu DOCA-sel et l'effet de l'antagoniste ET_A de l'endothéline. La figure du bas représente des immunobuvardages (Western blots). Les résultats de la figure du bas représente les moyennes \pm SEM (n=3).

LISTE DES ABBRÉVIATIONS

A _t	:	Région (Zone) du test
Ang II	:	Angiotensine II
ARNm	:	Acide ribonucléique messager
bFGF	:	<i>Basic fibroblasts growth factor</i>
CD	:	Densité de capillaires
DOCA	:	Déoxycorticostérone
ECM	:	Matrice extracellulaire
ET	:	Endothéline
ET _A	:	Récepteur à l'endothéline de type A
ET _B	:	Récepteur à l'endothéline de type B
FGF	:	<i>Fibroblasts growth factor</i>
HGF	:	<i>Hepatic growth factor</i>
IGF	:	<i>Insulin growth factor</i>
L _v	:	Densité de longueur
mm	:	Millimètre
mmHg	:	Millimètre de mercure
MMP	:	Métalloprotéase de la matrice
N _A	:	Densité numérique
PDGF	:	Facteur de croissance dérivé des plaquettes
RT-PCR	:	<i>Reverse transcriptase polymerase chain reaction</i>
SEM	:	Erreur standard
SHR	:	Souche de rat spontanément hypertendu
TGFβ	:	Facteur de croissance transformant
UniNx	:	Unilatéralement néphrectomisé
VSMC	:	Cellule vasculaire du muscle lisse

DÉDICACE

À ma famille,

qui m'a toujours soutenue et encouragée dans mes réalisations.

En chacune de ces personnes, j'espère puiser le meilleur:

En ma mère: la volonté, la bienveillance et le sens de l'organisation

En mon père: l'intelligence, le dévouement et l'intégrité

En mes soeurs:

Josée: la générosité

Sylvie: l'entraide

En mon frère:

Marc-André: la méthodologie

En Matthew: la joie de vivre, l'amour, la bonté et la vérité

Tout particulièrement, ce mémoire est dédié à ma fille, Alexandra, mon plus grand amour, ma plus grande fierté, ma plus belle réussite...

REMERCIEMENTS

J'aimerais exprimer ma profonde gratitude à mon directeur de recherche, le Dr. Ernesto L. Schiffrin, qui m'a aimablement accueilli dans son laboratoire, mais également pour son appui, son soutien, ses nombreux encouragements et pour l'intérêt qu'il a porté à ma formation scientifique.

Je voudrais également remercier André Turgeon, pour son aide technique précieuse, son enthousiasme et sa contagieuse bonne humeur.

Je désire finalement exprimer ma reconnaissance à Hope Intengan, Mohammed El Mabrouk, Rhian Touyz, Gary Prescott et Fatima Ammarguellat pour leurs précieux conseils, leurs contributions à ma formation et à mon travail et pour leur amitié.

Ce travail a été effectué grâce à l'appui financier du Conseil de Recherches médicales du Canada, de Pfizer Canada et de la Société Canadienne d'hypertension.

CHAPITRE 1: INTRODUCTION

1. L'hypertension artérielle

L'hypertension artérielle est une maladie répandue, atteignant approximativement 20% des adultes. L'élévation de la pression artérielle traduit un accroissement de la résistance périphérique au flot sanguin. Bien que l'hypertension artérielle soit généralement asymptomatique durant de nombreuses années, elle augmente le travail du coeur et endommage les artères. L'hypertension artérielle est un des principaux facteurs de risque de l'insuffisance cardiaque, des maladies vasculaires, de l'insuffisance rénale et des accidents cérébro-vasculaires (He *et al.*, 1999; Zanchetti *et al.*, 1999; Chin *et al.*, 1997; Levy *et al.*, 1996). Comme cette pathologie provoque une résistance accrue à la circulation du sang et que le coeur doit la surmonter, un travail accru constant doit être fourni par celui-ci, ce qui engendre, au fil des ans, son hypertrophie (Glasser, 1998; Strauer *et al.*, 1997, Ganau *et al.*, 1992). L'hypertension artérielle provoque également des altérations dans les vaisseaux coronaires. Chez les humains, l'athérosclérose au niveau des artères coronaires épocardiques est une de ces modifications. Celle-ci conduit éventuellement, dans beaucoup de cas, à l'occlusion partielle ou complète du lumen du vaisseau, avec ou sans rupture de la plaque, accompagnée ou non de thrombose, pouvant conduire à un syndrome coronarien aiguë (Libby, 1998; Libby *et al.*, 1997). En plus de l'athérosclérose, l'hypertension s'accompagne d'une maladie microvasculaire myocardique pouvant provoquer l'angine, et ce, malgré la présence d'artères coronaires épocardiques perméables (Brush *et al.*, 1988). Ainsi, les altérations au niveau des microvaisseaux cardiaques

dans l'hypertension artérielle sont tout aussi importants qu'au niveau de plus grosses artères, puisqu'elles peuvent être responsables de complications cardiovasculaires (Schiffrin, 1998c; Li *et al.*, 1994). Entre autres, deux modifications structurales principales reliées aux microvaisseaux peuvent se produire, soit la raréfaction et l'angiogénèse. Tout d'abord, la raréfaction résulte de la perte avec ou sans fermeture des microvaisseaux, généralement des capillaires, de façon réversible ou permanente et peut être un phénomène d'adaptation à court ou à long terme. Ce dernier phénomène engendre des changements dans la densité des microvaisseaux, amenant ainsi des modifications de la résistance au niveau du tissu vasculaire, dans la distribution du flot circulatoire, ainsi que dans l'apport en oxygène aux tissus (Greene *et al.*, 1989; Lombard *et al.*, 1989; Prewitt *et al.*, 1982). L'angiogénèse est, quant à elle, la formation de nouveaux vaisseaux sanguins et est une composante de nombreux processus biologiques, (Gourley *et al.*, 2000; Griffioen *et al.*, 2000; Michael *et al.*, 2000; Folkman, 1995; Olivetti *et al.*, 1993) dont nous discuterons plus loin.

2. Le système cardio-vasculaire

2.1 Le coeur

Le coeur comprend quatre cavités, deux oreillettes dans sa partie postéro-supérieure et deux ventricules dans sa partie antéro-inférieure. Les oreillettes sont principalement les points d'arrivée du sang, tandis que les ventricules en sont les points de départ. Ces derniers constituent presque toute la masse du coeur. Le ventricule gauche est beaucoup plus imposant que le ventricule droit, puisqu'il s'agit de la pompe de la circulation systémique (Marieb, 1999). Trois tuniques composent la paroi du coeur, soit de l'extérieur vers l'intérieur: l'épicarde, le myocarde et

l'endocarde. Ces trois tuniques sont très riches en vaisseaux sanguins, et ce, afin de répondre aux besoins métaboliques du coeur. L'épicarde, la tunique la plus externe, est composée principalement de la lame viscérale du péricarde séreux, qui facilite le déplacement du coeur dans l'enveloppe péricardique pariétal. Ensuite, le myocarde, que l'on appelle aussi le muscle du coeur, constitue l'essentiel de sa masse. Cette tunique renferme des cellules musculaires cardiaques et est, par conséquent, dotée de la capacité à se contracter. Finalement, l'endocarde, la section la plus interne du coeur, se compose de cellules endothéliales lisses. Celle-ci tapisse l'intérieur du coeur et est en contact avec le sang et en continuité avec l'endothélium des vaisseaux sanguins (Marieb, 1999; Figure 1. d'après Marieb, 1999).

2.1.1 Composition du myocarde

Le myocarde consiste en des fibres musculaires (cardiomyocytes), des vaisseaux sanguins et de la matrice interstitielle. En fait, la majorité de la masse cardiaque est représentée par des cardiomyocytes, qui sont les cellules musculaires sous forme de syncytium multicellulaire, mais les fibroblastes composent, en nombre, la majorité des cellules (Frank *et al.*, 1974; Zak, 1973). À l'intérieur de ce myocarde, toutes les cellules sont rattachées les unes aux autres par des fibres de tissu conjonctif enchevêtrées. Ces dernières comprennent principalement des fibres collagènes et élastiques qui renforcent le myocarde. Les fibres collagènes et élastiques font partie d'un tout que l'on appelle la matrice extracellulaire (ECM). Cette matrice comprend des composantes fibrillaires (collagène, élastine, fibronectine, laminine) et non fibrillaires (protéoglycanes). Ces différentes protéines sont, à leur tour, des composantes de la matrice péricellulaire

(fibronectine et protéoglycanes), de la membrane basale (laminine, collagène), des protéases (collagénases, gélatinases) et des facteurs de croissance (Tableau I, d'après Borg *et al.*, 1996, Ju *et al.*, 1996). Toute cette organisation de la matrice extracellulaire est importante pour la structure et la fonction du coeur et des tissus vasculaires, mais également pour la transmission de l'information provenant de l'environnement (Ju *et al.*, 1996; Borg *et al.*, 1996; Lin *et al.*, 1993).

Figure 1. A. Différences anatomiques entre le ventricule gauche et le ventricule droit.
(D'après Marieb, 1999) B. Différentes parties du ventricule gauche à l'étude; régions sous-endocardique, mid-myocardique et sous-épicaudique du myocarde.

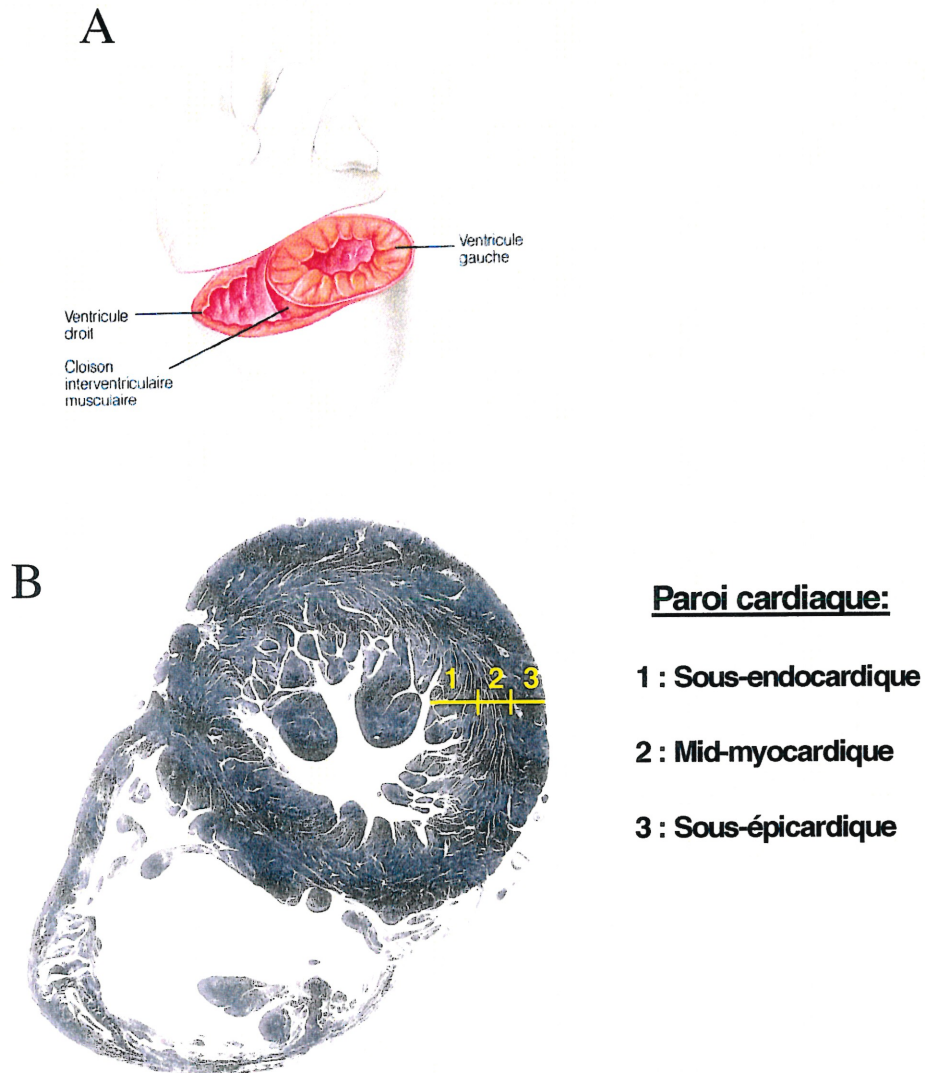


Tableau I. Composantes de la matrice extracellulaire cardiaque.

(D'après Borg *et al.*, 1996)

Familles	Composantes
Collagènes	Collagène fibreux (I et III) Membrane basale (IV) Collagène non fibreux
Glycoprotéines non-collagéniques	Fibronectine Laminine Tenascine Entactine
Protéoglycanes	Sulfate de chondroïtin Sulfate d'héparan Hyaluronate
Facteurs de croissance	IGF-1 bFGF TGF- β PDGF
Protéases	Métalloprotéases de la matrice (MMP-1, 2, 4, 9, 15, MT-MMP, etc.) Protéases à sérine Protéases à cystéine

2.1.2 Hypertrophie cardiaque

Une seconde altération cardiaque majeure, consécutive à l'hypertension, est l'hypertrophie du ventricule gauche. En effet, suite aux stress hémodynamiques que provoquent l'augmentation de la pression artérielle, le cœur ajuste sa masse et sa forme afin de maintenir un débit sanguin adéquat (Booz *et al.*, 1995; Ganau *et al.*, 1992). Cette augmentation de la masse du cœur, spécifiquement du ventricule gauche, peut découler de plusieurs phénomènes comme l'hypertrophie des cardiomyocytes et la prolifération des fibroblastes, le tout pouvant être accompagné ou non d'une accumulation de collagène fibreux dans le milieu extracellulaire (Chapman *et al.*, 1990; Weber *et al.*, 1988). Ce remodelage du myocarde peut provoquer une dysfonction ventriculaire (Rossi, 1998; Weber *et al.*, 1991). En effet, en réponse à l'hypertension, qui produit une augmentation de la pression systolique (reliée à la contraction du muscle cardiaque), les myocytes du cœur s'hypertrophient, tendant ainsi, par un élargissement latéral, à normaliser cette élévation de pression. Toutefois, puisque la masse myocardique augmente, des altérations contractiles apparaissent. Celles-ci comprennent principalement un ralentissement et une prolongation dans du temps de contraction (dysfonction systolique) et un délai dans le temps de relaxation du muscle cardiaque (dysfonction diastolique). Lorsque de tels changements dans la performance du myocarde se jouent au niveau de la fonction ventriculaire, on observe alors les dysfonctionnements ventriculaires, pouvant dégénérer, entre autres, en congestion et oedème pulmonaire, ainsi qu'en tachycardie (Marieb, 2000; Sonnenblick, 1993). En plus de cette surcharge de pression, certains peptides vasoactifs comme l'Ang II et l'ET, ainsi que certains facteurs de croissance, peuvent être impliqués dans l'apparition de l'hypertrophie cardiaque. Également, l'accumulation de matrice

extracellulaire, qui est parfois associée à l'hypertrophie ventriculaire, a été reliée au développement de plusieurs pathologies, dont l'insuffisance cardiaque (Ju *et al.*, 1996). Plusieurs études ont été effectuées sur les causes de ce remodelage, ce qui pourrait apporter de nouvelles opportunités thérapeutiques à cette condition pathologique (Joki *et al.*, 2000; Maisch *et al.*, 1996; Fareh *et al.*, 1996; .Fareh *et al.*, 1995; Kim *et al.*, 1995; Brilla *et al.*, 1994; Burgess *et al.*, 1994; Guarda *et al.*, 1994; Sadoshima *et al.*, 1993).

2.1.3 Collagène

Un important composant de l'ECM est le collagène, une protéine majoritairement synthétisée par les fibroblastes (Farhadian *et al.*, 1996; Weber, 1995; Hinglais *et al.*, 1994; Weber *et al.*, 1994; Rappaport *et al.*, 1993; Eghbali *et al.*, 1989a; Eghbali *et al.*, 1989b; Eghbali *et al.*, 1988; Borg *et al.*, 1981). Ces fibroblastes, en plus d'être responsables de la sécrétion des macromolécules de l'ECM, synthétisent et relâchent les enzymes responsables de la dégradation et de l'équilibre de l'ensemble des protéines de cette matrice, incluant le collagène (Borg *et al.*, 1996; Laurent, 1987). Dans le tissu cardiaque, spécifiquement, cinq isoformes moléculaires de collagène ont été dénombrés: le collagène de type I, III, IV, V et VI (Bishop *et al.*, 1995). Deux principaux types, soit le type I et III, comptent pour plus de 90% du contenu total en collagène dans le coeur (Pelouch *et al.*, 1993). Le type I forme, en fait, des amas de fibres très épaisses et très rigides, tandis que le type III, quant à lui, est davantage assemblé sous forme de fibres plus minces et élastiques (Weber *et al.*, 1991; Weber *et al.*, 1989). Ces deux sous-groupes de collagène jouent donc un rôle important dans le coeur, principalement dans la résistance et la fermeté de ce dernier. En effet, le collagène permet au

coeur de résister aux pressions continues exercées sur les chambres ventriculaires, et une perte de collagène peut alors entraîner la dilatation des compartiments cardiaques (Ju *et al.*, 1996; Weber *et al.*, 1994). Toutefois, l'événement inverse, c'est-à-dire une augmentation dans la déposition de collagène, peut également entraîner de graves conséquences. En effet, la fibrose cardiaque est une pathologie couramment observée, résultant de l'accumulation de collagène dans le myocarde, principalement de type I et III, et qui augmente la rigidité de cette paroi, empêchant alors le coeur de se contracter adéquatement (Thai *et al.*, 1999; Brilla, 1994; Weber *et al.*, 1990). La fibrose ventriculaire gauche, générée par l'accumulation de ces types de collagène dans l'ECM, semblerait être causée par un déséquilibre entre la dégradation et la synthèse de ces protéines par les fibroblastes interstitiels et périvasculaires, dans le myocarde et autour des artères coronaires (Nicoletti *et al.*, 1995). Divers modèles expérimentaux hypertendus, dont l'hypertension rénovasculaire, suite à la perfusion d'Ang II ou d'aldostérone, ainsi que chez les rats spontanément hypertendus (SHR) ont démontré une accumulation de collagène myocardique (Brilla *et al.*, 1994; Brilla *et al.*, 1990; Conrad *et al.*, 1995; Nicoletti *et al.*, 1995; Eghbali *et al.*, 1989; Eghbali *et al.*, 1988; Hinglais *et al.*, 1994). Toutefois, l'identification des principaux responsables de cette accumulation excessive, qui engendre de nombreuses complications cardiovasculaires, reste à élucider.

Dans l'hypertension génétique et réno-vasculaire, la fibrose cardiaque est un processus progressif (Ju *et al.*, 1996). Il est commun de diviser ces fibroses en deux principaux types, soit la fibrose réparative et la fibrose réactive. La première est principalement interstitiel et apparaît être une réaction consécutive à la perte de matériel myocardique, causée soit par la nécrose ou l'apoptose cellulaire, suite à

une ischémie myocardique ou au vieillissement. La fibrose réactive, quant à elle, est observée en l'absence de perte cellulaire et est plutôt consécutive à une réaction d'inflammation. Cette dernière est principalement périvasculaire, mais peut, toutefois, envahir l'espace interstitiel. Il semble qu'habituellement, dans l'hypertension, ces deux fibroses coexistent (Silver *et al.*, 1990).

2.1.3 TGF β

Un nombre très élevé de facteurs de croissance, incluant IGFs, FGFs, HGF et TGF β ont été trouvés associés aux protéines de la matrice extracellulaire (Taipale *et al.*, 1997). Plus spécifiquement, les isoformes du facteur de croissance transformant- β (TGF β) sont des cytokines multifonctionnelles qui jouent un rôle central dans la cicatrisation et la réparation des tissus. TGF β est ubiquitaire, il est particulièrement abondant dans les os, les reins, les poumons et le placenta (Branton *et al.*, 1999). Ce facteur de croissance semble également impliqué dans le système cardio-vasculaire, particulièrement dans la stimulation de l'expression de certaines protéines de la matrice extracellulaire, dont le collagène, dans la régulation inhibitrice de l'expression de nombreux gènes codant pour des métalloprotéases de la matrice (MMP), des enzymes dégradant, entre autres, le collagène, mais aussi dans le développement cardiaque et dans l'hypertrophie pathologique (White *et al.*, 2000; Li *et al.*, 1997; Engelmann, 1993; Villarreal *et al.*, 1992; Choy *et al.*, 1990; Thompson *et al.*, 1988). Aussi, l'augmentation du dépôt de collagène, particulièrement de type I et III, par les fibroblastes cardiaques, suite à une augmentation de leur ARNm et à une diminution de leur dégradation par les MMP, semble être médiée par le TGF β (White *et al.*, 2000; Butt *et al.*, 1995; Eghbali *et al.*, 1989a; Eghbali *et al.*, 1989b). D'autres études ont d'ailleurs observé

un effet du TGF β sur la stabilité des ARNm des procollagènes (Slack *et al.*, 1993) et ont démontré qu'une élévation du TGF β_1 , particulièrement, pourrait être le médiateur principal dans la fibrose des tissus (Brooks *et al.*, 2000; Sun *et al.*, 2000; Noble *et al.*, 1997; Eghbali *et al.*, 1991). Ainsi, il est important de faire l'étude de ce facteur de croissance dans les cas de fibrose cardiaque puisqu'il permet de mieux comprendre certains phénomènes de stimulation de la synthèse et du dépôt de collagène dans les tissus.

2.2 Les vaisseaux sanguins

Les vaisseaux sanguins forment deux réseaux, un systémique et un pulmonaire, qui commencent et terminent au coeur. Ces structures dynamiques se contractent, se relâchent et, même, prolifèrent suivant les besoins de l'organisme. Cette section porte donc sur la structure et la fonction de ces importantes voies de circulation du niveau systémique, ainsi que sur les divers changements structuraux qui s'y rattachent, puisqu'ils sont un des sujets principaux de notre étude. Tout d'abord, les vaisseaux sanguins se divisent en trois catégories: les artères, les capillaires et les veines. On peut différencier ces vaisseaux par leur diamètre, leur longueur, mais aussi par l'épaisseur et la composition de leurs parois. Les contractions du coeur chassent le sang dans les grosses artères issues des ventricules. Le sang parcourt ensuite les ramifications des artères, jusqu'aux plus petites, les artérioles. Il aboutit ensuite dans les lits capillaires des organes et des tissus, où il y exerce ses fonctions principales, soit l'approvisionnement en oxygène et nutriments. À sa sortie des capillaires, le sang emprunte les veinules, les veines et, enfin, les grosses veines qui convergent vers l'oreillette droite du coeur. Ainsi, les artères et les veines servent simplement de conduits pour le sang et seuls les

capillaires sont en contact étroit avec les cellules et font partie du tissu qu'elles desservent. En effet, leurs parois extrêmement fines permettent les échanges entre le sang et le liquide interstitiel dans lequel baignent les cellules (Marieb, 1999; Anversa *et al.*, 1973).

2.1.1 Structure des vaisseaux

Les parois des artères et des veines sont composées de trois couches ou tuniques qui entourent un espace central rempli de sang, la lumière. La tunique interne (intima) est composée de cellules endothéliales (endothélium). Cette dernière est un épithélium pavimenteux simple qui tapisse la lumière de tous les vaisseaux. Ce sont des cellules plates qui s'immiscent les unes dans les autres et qui forment une surface lisse, et ce, afin de réduire au minimum la friction entre le sang et la surface interne des vaisseaux. Cette dernière tunique était considérée autrefois comme une simple membrane inerte. Toutefois, nous savons aujourd'hui qu'elle produit et métabolise de multiples médiateurs biologiquement très importants agissant tant sur le paroi vasculaire que sur les éléments circulants. Ensuite, la tunique moyenne (média) comprend principalement des cellules musculaires lisses en forme d'anneaux, ainsi que des fibres élastiques. L'activité contractile du muscle lisse vasculaire est modulée par les neurofibres vasomotrices du système nerveux sympathique, ainsi que par différents peptides et autres médiateurs locaux ou à distance (tels que l'Ang, l'ET, la vasopressine, le monoxyde d'azote, etc.). En effet, suivant les besoins de l'organisme, ces neurofibres peuvent causer la vasoconstriction (une réduction du calibre due à la contraction du muscle lisse) ou la vasodilatation (une augmentation du calibre due au relâchement du muscle lisse). Puisque de légères variations du diamètre des vaisseaux sanguins

provoquent des effets marqués sur la résistance à la circulation du sang et en conséquence sur le débit et la pression du sang, la tunique moyenne joue un rôle prépondérant dans la régulation de la circulation. En règle générale, la tunique moyenne est la couche la plus épaisse des artères. La tunique externe (externa ou adventice) se compose, quant à elle, principalement de fibres de collagène lâchement entrelacées. Ces fibres protègent les vaisseaux et forme un lien avec les structures environnantes. La tunique externe est parcourue de neurofibres et de vaisseaux lymphatiques (Marieb, 1999).

2.1.2 Les artères

Les artères se divisent en trois groupes selon leur taille et leur fonction: les artères élastiques, les artères musculaires et les artérioles. Étant donné que les artérioles sont un des principaux déterminants de la résistance périphérique et que l'hypertension est à l'étude, elles feront donc l'objet d'une approche plus approfondie.

2.1.3 Les artérioles

Les artérioles sont les plus petites artères. Les plus petites artérioles, qui se jettent dans les lits capillaires, ne sont constituées que d'une couche de cellules musculaires lisses enroulées en spirale autour de l'endothélium. Les artérioles jouent un rôle important dans la régulation de la pression du sang entre le coeur et les tissus. En effet, en amont de ces derniers, une pression relativement haute doit être maintenue afin d'assurer un apport sanguin suffisant aux tissus. En aval, toutefois, le sang doit pénétrer le réseau capillaire sous faible pression, afin d'en protéger la paroi relativement mince qui permet les échanges. Ces phénomènes

sont donc contrôlés par les artérioles. En effet, la haute pression sous laquelle le sang atteint ces vaisseaux est associée avec la présence de tissus dans la paroi artériolaire capable d'une contraction active (les cellules musculaires lisses) et de tension élastique (la lamina élastique interne). L'écoulement du sang dans les lits capillaires est donc déterminé par des variations du diamètre de ces artérioles (vasomotricité) (Simionescu *et al.*, 1983). Ces variations font suite à des stimulus nerveux et à des influences hormonales et chimiques locales sur les muscles lisses de leur paroi. Lorsque les artérioles se contractent (vasoconstriction), le sang contourne les tissus qu'elles desservent. Mais lorsqu'elles se dilatent (vasodilatation), le débit sanguin augmente de façon marquée dans les capillaires locaux. Le diamètre des artérioles peut varier considérablement. Les plus petites, ne possédant qu'une seule couche de cellules musculaires lisses, possèdent un diamètre luminal de moins de 20 μ m. La partie terminale de ces artérioles peut avoir une structure ressemblant à un sphincter musculaire et la lumière de l'artériole à ce niveau peut être réduite d'environ 5 μ m. Cette région est communément appelée le méta-artériole ou la région du sphincter pré-capillaire (Rhodin, 1968).

2.1.4 Les capillaires

Les capillaires sont les plus petits vaisseaux sanguins. Leurs parois, extrêmement minces, ne sont formées que de cellules endothéliales. Dans la majorité des cas, une seule cellule endothéliale constitue l'entière circonférence de la paroi. La limite entre l'artériole et le capillaire est alors nettement marquée par la disparition des cellules musculaires lisses (Simionescu *et al.*, 1978a; Simionescu *et al.*, 1978b). Les capillaires mesurent en moyenne 1 mm de long et leur diamètre luminal est d'environ 4 à 10 μ m, (Kaley, 1977; Fawcett, 1963) soit juste ce qu'il faut

pour laisser passer les globules rouges à la file. La densité des capillaires dans un tissu donné est variable et est reliée à l'ampleur du métabolisme, spécifiquement au taux de consommation d'oxygène (Hoppeler *et al.*, 1998). L'ampleur des échanges par le capillaire est largement dépendant de l'étendue de la surface endothéliale disponible, lequel est une fonction de la géométrie générale du lit vasculaire (Renkin *et al.*, 1984).

3. Physiologie de la circulation

Dans la physiologie de la circulation sanguine, trois facteurs doivent être bien définis, car ils sont fréquemment employés. Il s'agit du débit sanguin, de la pression sanguine et de la résistance. Tout d'abord, le débit sanguin est le volume de sang qui s'écoule dans un vaisseau, dans un organe ou dans le système vasculaire entier en une période donnée. À l'échelle du système vasculaire, le débit sanguin équivaut au débit cardiaque et il est relativement constant au repos. À tout instant, néanmoins, le débit sanguin dans un organe déterminé peut varier largement, suivant les besoins immédiats. Ensuite, la pression sanguine est la force par unité de surface que le sang exerce sur la paroi d'un vaisseau. Grâce aux différences de pression dans le système vasculaire, il est possible de fournir la force propulsive nécessaire à la circulation du sang dans tout l'organisme. La pression sanguine s'exprime en millimètres de mercure (mmHg) (Marieb, 1999).

La résistance est, quant à elle, la force qui s'oppose à l'écoulement du sang. Elle résulte de la friction du sang sur la paroi des vaisseaux. Trois facteurs principaux peuvent influencer sur la résistance, soit la viscosité du sang, la longueur des vaisseaux et le diamètre des vaisseaux. Tout d'abord, la viscosité est la résistance propre d'un liquide à l'écoulement et varie donc selon que le liquide

est fluide ou visqueux. Plus le frottement entre les molécules est important, plus la viscosité est grande, et plus le déplacement du liquide est difficile à amorcer et à maintenir. Ensuite, entre la longueur des vaisseaux et la résistance, la relation est fort simple, en effet, plus le vaisseau est long, plus la résistance (frottement sur la paroi) est grande. Finalement, le facteur capital de la résistance est le diamètre des vaisseaux sanguins puisque celui-ci change fréquemment. En fait, le flot est proportionnel à la quatrième puissance du rayon de la lumière (Loi de Poiseuille), ce qui amplifie l'impact des changements du diamètre de la lumière et l'effet de la constriction artériolaire. Près des parois d'un tube ou d'un conduit, l'écoulement des liquides est ralenti par la friction tandis qu'au centre, l'écoulement est beaucoup plus libre et rapide. Également, la friction est plus forte dans un petit conduit que dans un gros, car la proportion de liquide en contact avec les parois est plus grande (Loi de Poiseuille) (Schwartz *et al.*, 1988). Étant donné que les artérioles ont un petit diamètre et qu'elles peuvent se dilater ou se contracter en réaction à des mécanismes de régulation neuro-humorales, elles sont donc l'un des principaux déterminants de la résistance périphérique (Marieb, 1999).

4. Peptide Vasoactif : L'endothéline

Plusieurs peptides vasoactifs sont impliqués dans l'hypertension. La famille des endothélines (ET), particulièrement l'endothéline-1 (ET-1), joue un rôle particulièrement important dans différentes physiopathologies cardiovasculaires. Cette famille consiste en trois isoformes principales, soit ET-1, ET-2 et ET-3. Les gènes des trois endothélines ont été clonés (Inoue *et al.*, 1989). Ces trois formes d'isopeptides actifs contiennent 21 résidus d'acides aminés avec deux ponts disulfures internes (Haynes *et al.*, 1993; Luscher *et al.*, 1992). Ces endothélines

sont produites par différents tissus, entre autres dans l'endothélium des vaisseaux sanguins où l'ET-1 a été découverte (Yanagisawa *et al.*, 1988). L'ET-1 est l'endothéline majeure sécrétée par cet endothélium et agit de manière paracrine (i.e. sur les cellules musculaires lisses) ou autocrine (i.e. sur les cellules endothéliales) (Schiffrin, 1998b). Afin d'effectuer notre étude sur l'endothéline, le modèle de rat DOCA-sel a été utilisé. Ce dernier est un modèle d'hypertension sensible au sel qui surexprime l'ET-1 dans l'endothélium vasculaire et qui répond aux différents antagonistes de l'endothéline par une diminution de la pression sanguine (Larivière *et al.*, 1993). Il est certain que des variations physiologiques peuvent être observées dans les différentes données recueillies entre le modèle de rat utilisé et l'humain. Toutefois les récepteurs ETA et ETB de l'endothéline, qui ont été clonés et caractérisés, ont une très forte homologie entre ces deux espèces (environ 90% entre le rat et l'humain) (voir paragraphe suivant). Ceci nous permet donc d'extrapoler et de prévoir certains fonctionnements et physiopathologies qui peuvent se retrouver également chez l'humain et qui pourront éventuellement être vérifiés. Chez l'être humain hypertendu, normalement, les niveaux plasmatiques sont normaux (Schiffrin *et al.*, 1991; Davenport *et al.*, 1990; Kohno *et al.*, 1990). Toutefois, l'immunoréactivité de l'endothéline plasmatique peut être élevée chez certains patients sévèrement hypertendus, ainsi que les Américains-Africains, chez lesquels l'hypertension est souvent très sévère et dépendante du sel (Ergul *et al.*, 1996). Ainsi, ces données chez l'humain hypertendu semblent être en accord avec l'activation du système de l'endothéline dans le modèle expérimental utilisé qui démontre également un sévère hypertension sensible au sel. D'autres formes d'hypertension humaines chez lesquelles l'endothéline semble jouer un rôle important, comme dans le cas de la défaillance rénale chronique (Takahashi *et al.*,

1994), du phéochromocytome (Oishi *et al.*, 1994) et de l'hypertension induite par la grossesse (Wang *et al.*, 1994) justifient également l'étude du modèle utilisé.

4.1 Récepteurs et antagonistes des récepteurs de l'endothéline

Après la découverte de l'endothéline en 1988 (Yanagisawa *et al.*, 1988), la caractérisation fonctionnelles des isoformes de l'ET a démontré l'existence d'au moins deux sous-types de récepteurs. Un premier qui lie l'ET-1 et ET-2 avec davantage d'affinité que l'ET-3, et un autre reconnaissant les trois isoformes de façon équivalente. Ces deux récepteurs sont donc l'ET_A et l'ET_B respectivement. Ces deux sous-types de récepteurs ont été bien identifiés et clonés (Arai *et al.*, 1990; Sakurai *et al.*, 1990). Les récepteurs ET_A et ET_B humains ont également été clonés et ont démontrés environ 90% d'homologie avec les récepteurs de bovin et de rat (Arai *et al.*, 1993; Elshourbagy *et al.*, 1993; Hosoda *et al.*, 1991). La liaison de l'ET à ces récepteurs sur les cellules intactes initie une cascade de transduction de signal (Simonson, 1993). Un avancement majeur qui a été effectué dans le domaine relié à l'endothéline fût le développement d'antagonistes des récepteurs de l'ET. En particulier, le BQ-123 (Ihara *et al.*, 1991) et le FR139317 (Sogabe *et al.*, 1993) ont été d'importants outils pour l'investigation des physiopathologies reliées à l'ET. Les deux antagonistes précédents sont sélectifs au récepteur ET_A, mais sont toutefois des composés peptidiques qui possèdent une faible pharmacocinétique (faible biodisponibilité), ce qui limite grandement leur utilisation à des fins d'agents thérapeutiques. Plus récemment, de nombreuses études ont mis au point un certain nombre d'antagonistes non-peptidiques sélectifs à l'ET_A, dont la pharmacocinétique est grandement améliorée: LU135252 (Riechers *et al.*, 1996), SB234551 (Ohlstein *et al.*, 1998), PD156707 (Maguire *et al.*, 1997), FR139317

(Maguire *et al.*, 1995), BQ123 (Maguire *et al.*, 1995). Les antagonistes du récepteur ET_A, particulièrement, font présentement partie très nombreuses recherches. En effet, l'évaluation fonctionnelle d'un certain nombre de vaisseaux humains indique que l'isoforme vasculaire naturel, ET-1, active ses réponses contractiles seulement *via* le récepteur ET_A (Maguire *et al.*, 1995). De plus, le blocage des récepteurs ET_B pourraient provoquer certains effets indésirables, comme de bloquer l'effet inhibiteur de l'ET-1 sur l'aggrégation plaquettaire, par exemple (McMurdo *et al.*, 1993). Suite à ces études, il est donc avantageux de supporter le développement d'agents sélectifs au récepteur ET_A de l'ET, et ce, particulièrement pour le développement clinique d'antagonistes destinés au traitement de l'hypertension. Dans notre étude, nous avons utilisé tout particulièrement le A-127722 comme antagoniste du récepteur ET_A de l'endothéline. Le A-127722 (*trans-trans*-2-(4-méthoxyphényl)-4-(1,3-benzodioxol-5-yl)-1-([N,N-dibutylamino]carbonylméthyl)pyrrolidine-3-carboxylate) est un antagoniste non-peptidique sélectif du récepteur ET_A, et qui pourrait être un bon candidat au développement clinique étant donné sa biodisponibilité orale élevée, son efficacité *in vivo* et sa longue durée d'action. Le A-127722 est également un inhibiteur compétitif très sélectif pour le récepteur ET_A, qui possède une très forte affinité de liaison avec ce dernier, et non pour le récepteur ET_B, comme en témoigne les valeurs de K_i respectifs, soit de 0.069 ± 0.012 nM et 138.6 ± 41.9 nM (Opgenorth *et al.*, 1996). La pharmacocinétique de cet antagoniste a également été étudié récemment chez le rat, le chien et le singe (Tableau III, d'après Opgenorth *et al.*, 1996).

Tableau III.

Comparaison de la pharmacocinétique du A-127722 chez le rat, le chien et le singe. A-127722 a été administré à 5mg/kg i.v. et p.o. chez chaque espèce.

(D'après Opgenorth *et al.*, 1996)

espèce	t _{1/2} i.v.	Vc	Clp	Cmax	F
	hr	l/kg	l/hr/kg	µg/ml	%
Rat	3.5	0.26	0.72	1.10	35.4
Chien	1.6	0.13	0.68	4.67	43.7
Singe	2.5	0.09	0.73	0.32	21.7

Abbreviations: t_{1/2}, demi-vie d'élimination plasmatique; Vc, Volume apparent de distribution; Clp, Clairance plasmatique; Cmax, Concentration plasmatique maximum suite à l'administration de la dose p.o.; F(%), Biodisponibilité apparente.

4.2 Actions de l'endothéline sur le muscle lisse vasculaire

L'endothéline possède une action contractile sur les cellules musculaires lisses (Yanagisawa *et al.*, 1988). Mais il est intéressant de noter qu'elle produit également des réponses mitogéniques sur ces cellules musculaires par l'activation de la protéine kinase C et l'expression subséquente de gènes précoces, c'est à dire c-fos et c-myc (Tadashi, 1993). Il a également été démontré que l'ET-1 semble spécifiquement promouvoir la croissance des cardiomyocytes *in vitro* (Mulder *et al.*, 1997; Yamazaki *et al.*, 1996; Ito *et al.*, 1993; Neyses *et al.*, 1993) et induit la synthèse de collagène par les fibroblastes cardiaques (Mulder *et al.*, 1997; Guarda *et al.*, 1994). Aussi, l'influence de l'ET-1 dans le développement de l'hypertrophie du ventricule gauche a été observée (Stasch *et al.*, 1995; Kaddoura *et al.*, 1996).

5. Études microvasculaires

5.1 Angiogénèse

La prolifération des vaisseaux sanguins (angiogénèse) est une composante de nombreux processus biologiques. Ces processus comprennent, entre autres, la vascularisation des tissus dans l'embryogenèse, la régénération des vaisseaux sanguins dans la cicatrisation, l'inflammation, la vascularisation de tumeurs, ainsi que les rétinopathies prolifératives (Gourley *et al.*, 2000; Griffioen *et al.*, 2000; Michael *et al.*, 2000; Folkman, 1995). Des études sur la croissance des vaisseaux sanguins sont apparues très tôt dans la littérature. Celles-ci impliquent des observations continues du développement embryogénique de l'endothélium vasculaire dans un organisme vivant. La larve amphibienne, qui possède une queue transparente fut un très bon modèle pour éclaircir les études sur la croissance vasculaire (Clark *et al.*, 1935). L'insertion d'une chambre transparente à l'intérieur de l'oreille du lapin a aussi permis l'observation microscopique de la formation du capillaire (Sandison, 1928). Plusieurs études utilisant ces systèmes ont conduit, en 1935, à une importante conclusion par Clark et Clark:

« Il apparaît que le système vasculaire sanguin se différencie, acquérant ainsi une force de croissance par embranchement conduisant à la formation d'un système primitif d'artères, de veines et de capillaires. Ceci résulte de facteurs héréditaires, mais ce réseau devient très rapidement dépendant de l'action de facteurs externes qui réguleront la formation complète de ce même système circulatoire. »

Donc, la croissance de nouveaux vaisseaux semble être effectuée par embranchement d'un tronc, c'est-à-dire par formation de rameaux secondaires à celui-ci. Schoefl (Schoefl, 1963) a également noté qu'une élongation de la boucle (loop) pourrait aussi expandre le lit vasculaire, comme l'a aussi suggéré Chalkley *et*

al (Chalkley *et al.*, 1946). L'insertion de nouvelles cellules à l'intérieur de vaisseaux préexistants semblerait être le mécanisme impliqué dans ce processus. Schoefl a également constaté que l'embranchement et l'élongation de boucles sont deux patrons d'élongation possible pour les vaisseaux et reflètent chacun des vitesses de croissances différentes (Schoefl, 1963). Des études plus récentes sur le sujet ont d'ailleurs affirmées ces résultats et ont démontrées différents modes de régulation, stimulus et de modes d'invasion pour les cellules endothéliales dans les microvaisseaux. Folkman *et al.* ont été les premiers à identifier un facteur soluble purifié à partir de néoplasmes humain et animal qui était capable d'induire la formation de nouveaux capillaires (Folkman, 1974). Depuis, une vaste quantité de facteurs angiogéniques pour ces vaisseaux ont été identifiés, et ce, dans une variété de tissus et de cellules (Renkin *et al.*, 1984). L'angiogénèse a aussi été observée pour les artérioles. Toutefois, ce processus est plus récent et est donc moins connu, mais il semble se produire selon un mécanisme d'élongation, suite à une invasion des cellules musculaires lisses de l'artériole sur les capillaires existants (Buschmann *et al.*, 2000; Hungerford *et al.*, 1999; Price *et al.*, 1994). Cependant, les mécanismes précis induisant ce processus demeurent inconnus.

5.2 Raréfaction

La diminution de la densité des microvaisseaux, particulièrement de capillaires, est communément appelée la "raréfaction". Cette dernière est décrite comme un processus en deux étapes. Tout d'abord, la première est un stade de raréfaction fonctionnelle réversible qui est principalement causé par des spasmes artériolaires, résultant alors en la diversion du flux sanguin vers des endroits stratégiques et loin de certains capillaires. Ainsi, le sang serait dirigé aux endroits

nécessitant un apport momentané plus grand en oxygène et en nutriments. Ensuite, la deuxième étape, suivant cette raréfaction fonctionnelle, résulte en la fermeture définitive de certains capillaires, que l'on appelle raréfaction anatomique. (Hansen-Smith *et al.*, 1990; Greene *et al.*, 1989; Lombard *et al.*, 1989; Prewitt *et al.*, 1982). La diminution de la densité des capillaires résultant probablement de la raréfaction a été décrit dans différents lits vasculaires et chez différents modèles d'hypertension, (Hansen-Smith *et al.*, 1996; Hernandez *et al.*, 1992), ainsi que sous des effets d'infusion *in vivo* d'Ang II (Sabri *et al.*, 1998). Plusieurs autres études sur la densité des capillaires et la raréfaction ont également été effectuées au niveau des coeurs hypertrophiés de rat et de chien (Gerdes *et al.*, 1980; Rakusan *et al.*, 1980; Gerdes *et al.*, 1979; Wiener *et al.*, 1979; Dowell, 1977).

5.3 Méthodes

Plusieurs méthodes peuvent être utilisées pour l'étude de la densité des microvaisseaux, c'est-à-dire de l'angiogénèse et de la raréfaction. À part les observations directes de l'embranchement des capillaires et de l'augmentation du marquage des cellules endothéliales à l'aide de la thymidine radioactive, la donnée la plus indicative de la croissance des microvaisseaux est basée sur leur nombre. Ceci peut être exprimé en terme de nombre de capillaires par région, c'est-à-dire la densité de capillaires (CD) (nombre de capillaires/mm² de tissu), du rapport de capillaires par fibre (C/F), ou encore la longueur capillaire par volume de tissu (mm/mm³) (Rakusan, 1971).

Pour la densité des capillaires dans le coeur (Rakusan, 1971) et pour le muscle squelettique (Hudlitcha, 1973), plusieurs données quantitatives sont disponibles. La plupart étant obtenues suite à l'injection de spécimens à l'aide

d'encre de Chine ou de colorants. Toutefois, ces méthodes reposent uniquement sur la capacité de "remplissage" des capillaires, ce qui est sujet à plusieurs incertitudes. En effet, cette méthode donne des résultats pouvant varier selon la pression de perfusion utilisée lors de l'injection du matériel colorant ou si une accumulation d'amas d'encre conduisant à un remplissage incomplet et irrégulier s'est produit. Il n'est donc pas surprenant de voir alors, dû à ces différents paramètres, des données de CD extrêmement variables dans les tissus comme le coeur et le muscle squelettique (Rakusan, 1971). Ainsi, la visualisation directe, à l'aide d'un anticorps, du vaisseau à l'étude et son dénombrement par surface de tissu est, à mon avis, une des meilleures approches, puisqu'elle permet d'observer tous les vaisseaux présents. De plus, les incertitudes sont moins nombreuses et découlent, en majorité, que de l'observateur.

6. Hypothèse de travail

Étude de l'effet de l'antagoniste du récepteur ET_A de l'endothéline chez les rats DOCA-sel sur les changements microvasculaires et la fibrose au niveau du coeur.

La participation potentielle de l'ET-1 dans quelques modèles d'hypertension expérimentale, tels que celui induit par l'acétate de déoxycorticostérone (DOCA) et le sel suite à une néphrectomie unilatérale, a été suggérée par l'expression vasculaire accrue de ce peptide (Day *et al.*, 1995; Larivière *et al.*, 1993). En effet, une expression élevée de l'ET-1 chez les rats hypertendus DOCA-sel se produit dans les vaisseaux sanguins de différents organes, dont le coeur. Particulièrement, dans ce modèle de rat DOCA-sel, l'ET-1 a été mis en évidence au niveau du coeur dans l'endothélium des vaisseaux sanguins épicaudiques et intramyocardiques,

ainsi que dans l'endocarde (Larivière *et al.*, 1995). L'ET-1 a été impliquée comme médiateur de l'élévation de la tension artérielle et dans l'induction de la croissance du muscle lisse vasculaire, via le récepteur ET_A (Schiffrin, 1995; Li *et al.*, 1994; Bobik *et al.*, 1990). Il semble également que ce peptide induit l'hypertrophie des cardiomyocytes *in vitro* et la synthèse du collagène par les fibroblastes cardiaques (Mulder *et al.*, 1997; Guarda *et al.*, 1994), ayant ainsi une influence sur le développement de l'hypertrophie ventriculaire gauche (Stasch *et al.*, 1995; Kaddoura *et al.*, 1996).

L'hypertension artérielle est souvent associée à des complications cardiaques. Les anomalies dans les vaisseaux coronaires, ainsi que le remodelage cardiaque sont souvent aggravées par cette pathologie. L'arbre pré-capillaire vasculaire coronaire comprend les petites artères coronaires et les artérioles. Ces vaisseaux sont souvent ceux présentant le plus d'altérations dans l'hypertension, étant donné la haute pression sous laquelle le sang atteint ces vaisseaux. Ainsi, comme il a été démontré chez différents modèles hypertendus, les petites artères présentent des altérations significatives dans l'hypertension (Li *et al.*, 1995). De plus, étant donné l'efficacité des traitements effectués, il a été suggéré que l'ET-1 soit impliquée dans ces changements pathologiques (Li *et al.*, 1998; Li *et al.*, 1994).

Les artérioles coronaires de diamètre luminal inférieur à 20 μ m, et les capillaires de diamètre luminal inférieur à 8 μ m, sont impliqués respectivement dans la résistance au flot sanguin et dans l'apport de l'oxygène et des nutriments au myocardium (Anversa *et al.*, 1991; Breisch *et al.*, 1986). Il est certain que des changements dans la distribution, la densité, la longueur et la tortuosité de ces microvaisseaux peuvent affecter la résistance vasculaire coronaire et contribuer à l'ischémie myocardique (Noon *et al.*, 1997; Hansen-Smith *et al.*, 1996; Hernandez

et al., 1992; Rakusan *et al.*, 1992). Étant donné que les petits vaisseaux sont particulièrement susceptibles aux changements de la pression artérielle dans l'hypertension et que des altérations ont déjà été constatées dans les petites artères, les artérioles et les capillaires ont fait l'objet de notre étude. Également, comme l'ET-1 a été impliquée dans les changements vasculaires de précédentes études, son implication possible dans l'étude sur les artérioles et les capillaires a été étudiée.

Dans un deuxième temps, l'implication de la matrice extracellulaire dans le remodelage vasculaire et dans les changements microvasculaires a déjà été soulevée. Ainsi, comme la déposition de collagène de type I et III par les fibroblastes a été observée chez différents modèles d'hypertension (Brilla *et al.*, 1990; Conrad *et al.*, 1995; Nicoletti *et al.*, 1995) et que l'activité des fibroblastes cardiaques semblent être régulée par plusieurs facteurs hémodynamiques et humoraux, dont l'aldostérone et l'Ang II, (Brilla *et al.*, 1992; Crawford *et al.*, 1994; Nicoletti *et al.*, 1996) nous avons soulevé l'hypothèse que l'ET-1 pourrait possiblement être impliqué dans la déposition de collagène chez le modèle de rat DOCA-sel, chez lequel l'ET-1 participe à l'élévation de la tension artérielle et au remodelage vasculaire.

Notre hypothèse de travail était donc de vérifier si une modification dans la densité des microvaisseaux (particulièrement au niveau des capillaires et des artérioles, qui sont les vaisseaux les plus susceptibles aux changements de pression) est présente chez le rat DOCA-sel, un modèle dépendant de l'endothéline. Nous croyons que des changements dans les densités des microvaisseaux pourraient être observés chez ce modèle, puisque des changements vasculaires ont déjà été soulevés chez d'autres modèles de rats

hypertendus et parce que ces vaisseaux sont très fortement touchés par la pression sanguine périphérique. Par le fait même, nous voulons également vérifier, et ce, si des changements microvasculaires ont lieu, la région du myocarde qui est atteinte par ces modifications. Nous supposons que la région sous-endocardique pourrait être particulièrement touchée par des changements microvasculaires, puisque la vulnérabilité à l'hypoxie (directement relié à l'apport en oxygène par les capillaires, qui est un des microvaisseau à l'étude) est plus grande dans cette région. Également, nous savons que la matrice extracellulaire joue un rôle important dans le remodelage cardiaque, et que l'hypertrophie ventriculaire est observée chez le rat DOCA-sel. Ainsi, par notre étude, nous voulons vérifier l'hypothèse que cette hypertrophie pourrait être causée, entre autres, par une accumulation de collagène particulièrement, puisque cette protéine est fréquemment observée dans la fibrose cardiaque, une des complications de l'hypertension artérielle.

Donc, afin de vérifier le rôle potentiel de l'ET-1 dans les changements microvasculaires et dans la déposition de collagène interstitiel et périvasculaire via les récepteurs ET_A, nous avons étudié: 1) les effets de l'hypertension DOCA-sel sur la densité des artérioles et des capillaires cardiaques chez le rat, ainsi que sur la déposition de collagène cardiaque, et 2) l'effet de l'antagoniste du récepteur ET_A de l'endothéline, le A-127722, sur ces changements, et ce, toujours dans le modèle DOCA-sel chez lequel l'ET-1 semble jouer un rôle important (Schiffrin, 1995). Pour ce faire, une méthode immunohistochimique, utilisant des anticorps dirigés contre des composantes spécifiques des microvaisseaux, a permis l'étude de la densité des artérioles et des capillaires dans différentes régions du myocarde. Pour ce faire, l'anti- α -actine du muscle lisse, pour la détermination de l'emplacement des

artérioles et l'anti-laminine, suivi du "Nuclear Fast Red", un colorant des noyaux des cellules endothéliales, pour la détermination de l'emplacement des capillaires, ont été utilisés. L'anti- α -actine du muscle lisse est un anticorps spécifique aux cellules musculaires lisses vasculaires (VSMCs). Étant donné que les capillaires ne possèdent pas de VSMCs, cet anticorps permet l'étude spécifique des artérioles. Ensuite, un anticorps dirigé contre la laminine a été utilisé pour délimiter la matrice extracellulaire, permettant donc de visualiser le "squelette" du tissu. Par la suite, l'utilisation du contre-colorant "Nuclear Fast Red", qui colore l'ensemble des noyaux des cellules, permet de déterminer l'endroit spécifique des capillaires de par leur unique cellule endothéliale (un seul noyau).

Le but de l'étude était donc de démontrer l'implication de l'ET-1, chez les rats DOCA-sel, dans les modifications de la microvasculature, particulièrement dans les vaisseaux de plus faible diamètre, comme les artérioles et les capillaires, qui subissent de façon importante l'augmentation de la pression artérielle et chez lesquels des changements de diverses natures pourraient amener de nombreuses complications cardiaques. La deuxième partie de cette étude était de vérifier la présence de fibrose cardiaque chez les rats DOCA-sel et d'analyser l'effet de l'antagoniste du récepteur ET_A de l'endothéline, le A-127722, dans la prévention de ce remodelage cardiaque. Ensuite, de par son emplacement dans le myocarde, sa relation possible avec les changements microvasculaires observés pourrait être déterminée.

CHAPITRE 2.

ARTICLE :

Cardiac microvasculature in DOCA-salt hypertensive rats : effect of endothelin ET_A receptor antagonism.

PUBLIÉ SOUS:

Larouche I*, Schiffrin EL*. Cardiac microvasculature in DOCA-salt hypertensive rats : effect of endothelin ET_A receptor antagonism. Hypertension. 1999 Oct;34(4 Pt2):795-801.

**Institut de Recherches Cliniques de Montréal*

110, Avenue des Pins Ouest

Montréal, Québec, Canada

H2W 1R7

Received june 1999

Key Words: Microcirculation, arterioles, growth, capillary rarefaction, hypertension, myocardium, ischemia.

ABSTRACT

The cardiac abnormalities associated with hypertension include left ventricular hypertrophy and vascular changes. The latter may affect the cardiac microvasculature and predispose to myocardial ischemia. To test the hypothesis that endothelin-1 contributes to changes in the microcirculation of the heart, we studied cardiac microvessels of the deoxycorticosterone acetate-salt model of hypertension in the rat (DOCA-salt), in which the endothelin system is activated, and the effect of the ET_A-selective endothelin receptor antagonist, A-127722. A-127722 was administered (30 mg/kg per day) for 4 weeks. Arterioles (20 μm or less in lumen diameter) were identified in the myocardium using immunolabeling with an anti-smooth muscle α-actin antibody, and capillaries using an anti-laminin antibody with nuclear counterstaining by nuclear fast red. Systolic blood pressure was 103±1.6 mmHg in unilaterally nephrectomized rats (UniNx), 202±3.2 mmHg in DOCA-salt (p<0.01 vs UniNx) and 182±3.1 mmHg in ET_A-treated DOCA-salt (p<0.01 vs DOCA-salt or UniNx). Arteriolar and capillary density were altered significantly in the subendocardial myocardium but not in the subepicardial myocardium of the left ventricle. Arteriolar density per mm² was 18.1±1.48 in UniNx, 31.9±3.26 in DOCA-salt (p<0.01 vs UniNx) and 24.2±1.36 in ET_A-treated DOCA-salt (p<0.05 vs DOCA-salt or UniNx). Capillary density per mm² was 2395±148 in UniNx, 1576±107 in DOCA-salt (p<0.01 vs UniNx) and 1982±31 in ET_A-treated DOCA-salt (p<0.01 vs DOCA-salt or UniNx). In conclusion, in DOCA-salt hypertensive rats, subendocardial arteriolar growth and capillary rarefaction were observed in the left ventricular myocardium, and both were corrected partially by ET_A receptor antagonism. This suggests a role for endothelin-1 in cardiac arteriolar growth and capillary rarefaction, which may have pathophysiological implications by

contributing to myocardial ischemia in hypertension.

INTRODUCTION

Endothelin-1 (ET-1), a potent 21-aminoacid vasoconstrictor peptide produced by the endothelium of blood vessels, has been implicated as a mediator of blood pressure elevation [1] and in the induction of vascular smooth muscle growth [2,3]. These effects of ET-1 are mediated by the endothelin-A (ET_A) subtype of endothelin receptor on vascular smooth muscle cells. The potential involvement of ET-1 in some models of experimental hypertension such as deoxycorticosterone acetate (DOCA)-salt hypertension have been suggested by the vascular overexpression of ET-1 [4,5]. Overexpression of ET-1 occurs in DOCA-salt hypertensive rats in blood vessels of different organs including the heart, in which enhanced expression was found in the endothelium of epicardial and intramyocardial blood vessels and in the endocardium [6].

Hypertension is often associated with cardiac complications. The major cardiac alteration is left ventricular hypertrophy, which may be implicated in the development of coronary insufficiency and arrhythmia, and may lead to congestive heart failure [7]. In addition, abnormalities that occur in coronary vessels are aggravated by hypertension. In humans, atherosclerosis at the level of epicardial coronary arteries is accelerated by hypertension and is often complicated by partial or complete occlusion of the vessel lumen, and/or plaque rupture with or without thrombosis, leading to myocardial infarction. As well, microvascular disease typically occurs in the heart in hypertension, and may cause angina even in the presence of normal epicardial coronary arteries [8].

The intramyocardial pre-capillary coronary vascular tree comprises small coronary arteries and arterioles. Small arteries present significant alterations in

hypertension as demonstrated in different hypertensive models: decreased lumen, increased media-to-lumen ratio, sometimes increased media cross-section [9,10]. We previously showed that small intramyocardial arteries of DOCA-salt hypertensive rats present significant growth, that is, hypertrophic remodeling, with decreased lumen, increased media-to-lumen ratio and increased media cross-section. ET-1 is involved pathogenically in these changes as shown by their reversal by treatment with endothelin antagonists [3,10]. Coronary arterioles (lumen diameter $<20\mu\text{m}$) play an important role in resistance to blood flow, and capillaries (lumen diameter $<8\mu\text{m}$) are involved in oxygen/nutrient delivery to the myocardium [11-15]. Abnormalities of the distribution, density, length and tortuosity of these small vessels in hypertension may affect coronary vascular resistance and contribute to myocardial ischemia [16-19].

The major aim of this study was to investigate: 1) the effects of DOCA-salt hypertension on the density of coronary arterioles and capillaries in rat, and 2) the effect of the ET_A -selective endothelin receptor antagonist, A-127722, on coronary arterioles and capillaries, in this model in which ET-1 has been shown to be involved [1]. Specifically, we tested the hypothesis that ET-1 plays a role in myocardial microvascular abnormalities in DOCA-salt hypertensive rats via activation of ET_A -receptors.

METHODS

Animal Experiments

The study was approved by the Animal Care Committee of the Clinical Research Institute of Montreal and conducted in accordance with the recommendations of the Canadian Council of Animal Care. DOCA-salt hypertension was induced by the method of Ormsbee and Ryan [20]. Briefly, male Sprague-Dawley rats (Charles River, St Constant, Québec, Canada) weighing 200 g were unilaterally nephrectomized under sodium pentobarbital anesthesia (40 mg/kg). Silicone rubber impregnated with DOCA (Sigma Chemical Co., St-Louis, MO) (200 mg per rat) was implanted subcutaneously, and rats were offered 1% saline to drink. Control rats (UniNx) were also uninephrectomized but received a silicone rubber implant without DOCA and tap water to drink. The ET_A-endothelin receptor antagonist, A-127722, was administered to DOCA-salt rats in the drinking water (30 mg/kg/d) for four weeks. After rats were warmed, systolic blood pressure was measured weekly by the tail-cuff method under slight restraint. Readings were recorded on a model 7 polygraph fitted with a 7-P8 preamplifier and PCPB photoelectric pulse sensor (Grass Instruments Co, Cambridge, MA). The average of 3 pressure readings was obtained. Rats were sacrificed by decapitation at the end of the experiment, and the heart was fixed in Bouin solution.

Immunohistochemistry

To study arterioles and capillaries in the myocardium, the histochemical approach to identify these described by Sabri et al. [21] was modified as follows. The antibodies used were a mouse monoclonal antibody against smooth muscle α -actin (Sigma) and rabbit polyclonal antibody directed against laminin (Sigma). The hearts fixed in Bouin solution were processed for paraffin embedding in an

automated system (SHANDON Citadel tissue processor, Pittsburgh, PA). Serial sections (5 μ m) of the median part of the left ventricle were obtained. The tissue sections were de-waxed with ethanol, and then blocked with 10% normal goat serum or 10% normal sheep serum, for anti-laminin and anti-smooth muscle α -actin antibodies respectively, for 1 hour at room temperature to reduce nonspecific binding. Three sections of the left ventricle from each rat were incubated with anti-laminin IgG (1:500) or anti-smooth muscle α -actin IgG (1:300) for 16h at 4°C. The sections were washed thoroughly three times with PBS and incubated with secondary biotinylated antibodies (1:100) for 1 hour at room temperature, goat anti-rabbit IgG (VECTASTAIN® ABC KIT, Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) for laminin and sheep anti-mouse IgG (Amersham, Buckinghamshire, UK) for smooth muscle α -actin. The tissue sections were rinsed with PBS and incubated with streptavidin-horseradish peroxidase complex (VECTASTAIN® ABC KIT, Vector Laboratories) at 1:100 for 1 hour at room temperature. After three washes with PBS, the sections were developed with 3,3'-diaminobenzidine in Tris-HCl-H₂O₂. Sections labeled with anti-laminin IgG were also counterstained with Nuclear Fast Red (ICN, Costa Mesa, CA) for 5 minutes.

Determination of arteriolar and capillary density

In every heart, microscopic analysis of arteriolar and capillary density with a video imaging program (Northern Eclipse 5.0, EMPIX Imaging Inc., Mississauga, ON, Canada) was performed on 3 nonconsecutive serial sections (which allowed convergence of results) of the median part of the ventricle. Vessel density was evaluated throughout the inner third (subendocardial myocardium) and the outer third (subepicardial myocardium) of the circumference of the left ventricle. From each section, 15 to 35 fields (magnification X100 and X20, for capillaries and

arterioles respectively) were recorded. Quantitative analyses were performed by a blinded observer. Capillary density was determined in sections labeled with laminin antibody counterstained with Nuclear Fast Red and based on the quantification of positively labeled structures with $<8\mu\text{m}$ lumen size and with one nucleus (endothelial cell). Arterioles were quantified in sections that were immunolabeled with smooth muscle α -actin antibody. Only small blood vessels with a lumen diameter of less than $20\mu\text{m}$ surrounded by one smooth muscle layer which stained positively, were counted.

Data Analysis

Data per heart were the means of the density of vessels from 3 sections. Data are expressed as mean \pm SEM. Statistical significance was assessed using one-way ANOVA followed by a Student Newman-Keuls test, or in the case of proportions by χ^2 test. $p < 0.05$ was considered significant.

To evaluate tortuosity of arterioles, the mathematical model proposed by Adair et al. [22] was used. The relationship between sampling probability and sine of the orientation angle is the basis of the method: $1/\sin\alpha$ is used as a weighting factor (W) to correct for the decreased sampling incidence caused by orientation of vessels. Vessels are modeled as cylindrical tubes and their profile treated as the elliptic intersection of the vessel with the section plane. As a result, $W = a/b$ (where a = major axis of the ellipse, and b = minor axis of the ellipse). Only vessels where $a/b < 2.5$ were used for the calculation, to eliminate the arterioles sectioned along their longitudinal axis [21,22]. Therefore, L_v (length density) can be calculated as: $L_v = \Sigma a/b / \Sigma A_t$, where A_t is the test area. A series of individual sections are treated as one large representative section, and test areas and individual W values are summated. Tortuosity was assessed quantitatively using an anisotropy coefficient

calculated as L_v/N_a , where N_a =numerical density (number of profiles per cross-sectional area). An anisotropy coefficient of 1.0 indicates a total absence of tortuosity, i.e., all vessels are parallel to each other, whereas an anisotropy coefficient of 2.0 indicates maximum tortuosity, i.e., the orientation of the vessels is entirely random.

RESULTS

Blood pressure, body and heart weight of rats

The systolic blood pressure of DOCA-salt hypertensive rats was significantly elevated relative to that of unilaterally nephrectomized control rats after 4 weeks (Table 1). Treatment with the endothelin antagonist A-127722 resulted in slight but significantly lower blood pressure in DOCA-salt hypertensive rats compared to untreated DOCA-salt rats. Body weight of DOCA-salt hypertensive rats was significantly lower than that of normotensive control rats. Relative heart weight was similar in treated and untreated DOCA-salt hypertensive rats, and higher than that of normotensive rats, indicating that the endothelin antagonist had no effect on cardiac hypertrophy.

Characterization of the microvasculature in subendocardial and subepicardial myocardium of the left rat ventricle

Figure 1 shows the two types of small vessels that were characterized using immunohistochemical techniques. Laminin staining delineated cardiomyocytes and blood vessels, and subsequent Nuclear Fast Red counterstaining revealed the endothelial cell layer in capillaries, as indicated by the presence of only one nucleus per vessel. Smooth muscle α -actin labelling distinguished arterioles from capillaries, since the latter do not express smooth muscle α -actin.

Arteriolar and capillary density in DOCA-salt subendocardial and subepicardial myocardium: effect of A-127722.

Arteriolar and capillary density were not significantly different in the subepicardial myocardium of the left ventricle of DOCA-salt hypertensive rats compared to hearts from unilaterally nephrectomized controls (Fig. 2, top panels). In contrast, in the subendocardial myocardium, arteriolar density was higher and capillary density was lower in DOCA-salt compared with that in hearts of unilaterally nephrectomized control rats (Fig. 2, bottom panels). A-127722 partially attenuated the changes in subendocardial density of capillaries and arterioles in the DOCA-salt rat. To determine whether changes in arteriolar density could be attributable to a shift in the diameter of arterioles to greater number of vessels under 20 μ m in DOCA-salt hearts, which would have artifactually increased the density of vessels counted, the frequency distribution of diameters of arterioles smaller than 30 μ m was evaluated (Fig. 3). There were some significant minor differences in distribution (more arterioles of <10 μ m in DOCA-salt rat hearts, less of 15 μ m) but a χ^2 test showed that proportions of vessels < or >20 μ m were similar in the 3 groups, either for lumen diameters of 15-20 μ m vs 20-25 μ m, or 10-20 μ m vs. 20-30 μ m. The increase in arteriolar density in DOCA-salt rat hearts could therefore not be attributed to increased numbers of arterioles <20 μ m. Thus we indeed detected arteriolar growth and capillary rarefaction in the left ventricular subendocardial myocardium of the DOCA-salt hypertensive rat, and both were partially corrected by administration of the ET_A receptor antagonist A-127722.

Analysis of tortuosity of arterioles in the subendocardial region of the myocardium, where the density of arterioles was significantly increased, did not

show any significant differences in the anisotropy coefficient between groups (Table 2).

DISCUSSION

The present study investigated the microvasculature of the subendocardial and subepicardial myocardium of DOCA-salt hypertensive rats, and the potential role that endothelin may play in the changes found in relation to normotensive Uni-NX control rats. DOCA-salt hypertensive rats exhibited increased arteriolar density and decreased capillary density in the subendocardial layer of the myocardium, but not in the subepicardial myocardium, and ET_A -receptor antagonism partially corrected these microvascular abnormalities. As demonstrated by data in fig. 3, arteriolar density changes could not be attributed to a shift in diameter of arterioles to greater number of vessels under $20\mu\text{m}$ in DOCA-salt hearts, which would have resulted in greater number of arterioles counted, since distribution of arteriolar sizes $<$ or $>20\mu\text{m}$ was similar in the 3 groups for lumen diameters of $15\text{-}20\mu\text{m}$ vs $20\text{-}25\mu\text{m}$, or $10\text{-}20\mu\text{m}$ vs. $20\text{-}30\mu\text{m}$.

The site of origin of new arterioles within the microvascular network remains unknown. Although it is widely accepted that capillaries grow by sprouting into the interstitium [23,24] an angiogenic sprouting process has not been observed in arterioles. The current hypothesis for arteriolar development is that certain capillaries, selected by presently unknown mechanisms, become invaded with vascular smooth muscle cells and are therefore transformed into arterioles, a process denoted as arterialization [25]. Arterialization may occur by several possible mechanisms. Nelhs and Drenckhahn [24] have suggested that pericytes surrounding capillaries may be dormant smooth muscle precursors. These cells may differentiate to smooth muscle cells, resulting in the formation of "meta-

arterioles". Alternatively, vascular smooth muscle cells in pre-existing arterioles may migrate downstream to arterialize capillaries. The precise stimuli that initiate the process of arterialization are as yet unclear. Hypoxia, hemodynamic stresses and hormonal stimuli may participate to different degrees in the stimulation of arteriolar development. Analysis of the tortuosity of arterioles in the subendocardial region of the myocardium, where the density of arterioles was significantly increased, using the mathematical approach proposed by Adair et al. [22], did not show any significant differences in the anisotropy coefficient between groups. Thus, increases in subendocardial arteriolar density, although probably associated with lengthening of arterioles as a result of arterialization of capillaries, did not result in more tortuous vessels probably because of the cardiac hypertrophy occurring in DOCA-salt hypertensive rats.

ET-1 elicits a variety of biological effects that include vascular smooth muscle cell contraction [26] and growth [2,3]. ET-1 has also been shown to induce smooth muscle cell migration in the presence of low concentrations of platelet-derived growth factor (PDGF) or angiotensin II (Ang II) [27]. The potentiation of vascular smooth muscle cell migration by ET peptides was inhibited by the ET_A receptor antagonist BQ-123 in a concentration-dependent manner. These results suggest that the endothelin family of peptides, especially ET-1, can induce human coronary artery smooth muscle cell migration in combination with PDGF or Ang II, probably via the ET_A receptor [26]. The partial correction of abnormal arteriolar density by ET_A receptor antagonism in the present study implicates ET_A receptors as mediators of effects of ET-1 in the arterialization process that occurs in the hearts of DOCA-salt hypertensive rats.

Decreased capillary density or rarefaction has been described in many vascular beds and different models of hypertension [16,17] and under the effects of *in vivo* angiotensin II infusion [21]. Rarefaction is considered to proceed through a stage of functional rarefaction (reversible) caused by arteriolar spasm and diversion of blood flow away from some capillaries. This may be followed by anatomic rarefaction, with definitive closure of capillaries. One can envisage that the potent vasoconstrictor effect of ET-1 may result in constriction and closure of meta-arterioles resulting in diversion of blood flow and capillary collapse. This phenomenon may be compounded by the increased resistance to flow resulting from the lengthening of the high resistance arteriolar tree as a result of the arterialization of capillaries. The end result will be anatomic rarefaction. Blockade of ET_A receptors appears to successfully revert this process at least in part, suggesting that to some degree the rarefaction may be functional rather than anatomic at the stage that intervention with the ET_A antagonist was initiated. A potential model for the increased density of arterioles and decreased density of capillaries in the subendocardial myocardium is depicted in Fig. 4.

A decrease in capillary density may compromise oxygen and nutrient supply to cardiac myocytes by shortening and reduction of the numbers of capillaries and therefore time capacity of diffusion. Vulnerability to hypoxia is greater in the subendocardial myocardium of the left ventricle compared with the subepicardial myocardium [28,29]. Interestingly, microvascular abnormalities were localized specifically to the subendocardial region, the more vulnerable area of the myocardium. Moreover, the increase in arteriolar density could lead to an increase in coronary vascular resistance through increase in the length of the arteriolar segment of the vascular tree (see model in Fig. 4), thus contributing to hypoxic

events. The localization of the growth (arterioles) and rarefaction process (capillaries) to the subendocardial, more vulnerable region, may suggest that the process is multifactorial. Hemodynamic (including pressure) and metabolic variables probably contribute together with ET-1 and presumably other hormonal stimuli to the vascular growth and rarefaction process found in this region of the heart of DOCA-salt hypertensive rats.

There is some evidence that ET-1 may induce growth of the heart and contribute to left ventricular hypertrophy [30] and collagen deposition [31]. Cardiac hypertrophy could therefore have a confounding effect on the arteriolar and capillary changes found after endothelin antagonist treatment in DOCA-salt hypertensive rats, since this hypertensive model presents rather severe left ventricular hypertrophy. In this and previous studies we found that although ET-1 is overexpressed in the heart of DOCA-salt hypertensive rats [6], treatment with either balanced ET_A/ET_B [3] or selective ET_A endothelin receptor antagonists [10] was not associated with improvement of cardiac hypertrophy. This may be explained in part by the fact that in the DOCA-salt hypertensive rat the increase in ET-1 gene expression occurs in the endothelium of coronary arteries and endocardium rather than the myocardium or interstitium [6]. Moreover, blood pressure is lowered only moderately in the endothelin antagonist-treated rats, and more effective blood pressure lowering may be necessary for endothelin antagonism to have a clinically evident effect on cardiac hypertrophy. Consequently, in the absence of differences in cardiac hypertrophy between treated and untreated DOCA-salt hypertensive rats, the microvascular changes found, characterized by increased density of arterioles and decreased density of capillaries in the subendocardial region of the left ventricle cannot be attributed to cardiac hypertrophy. A limitation of the study is that

differences in cellular composition and collagen deposition were not examined, and could potentially contribute to the changes found. Remodeling of the heart, apoptosis that is enhanced in this model particularly after treatment with endothelin antagonists [32], and fibrosis could result in alterations in vascular density. Although this cannot be excluded, it would be unlikely that increased arteriolar density and decreased capillary density limited to the subendocardium in the untreated DOCA-salt hypertensive rats would be corrected in part as a result of a combination of these phenomena in the endothelin antagonist-treated rats. Systolic blood pressure rise was moderately reduced by 20mmHg in DOCA-salt hypertensive rats by treatment with the ET_A antagonist. Although the possibility of a role of lower blood pressure affecting arteriolar growth and capillary rarefaction in the heart cannot be eliminated, [13,16,17,21] this seems improbable considering that cardiac hypertrophy was unaffected by the lower blood pressure.

In conclusion, in DOCA-salt hypertensive rats, subendocardial arteriolar growth and capillary rarefaction were observed in the left ventricular myocardium, and both were corrected partially by ET_A receptor antagonism. This suggests a role for ET-1 in cardiac arteriolar growth and capillary rarefaction in the heart of DOCA-salt hypertensive rats, which may have pathophysiological implications in hypertension by contributing to myocardial ischemia [33]. Together with previous data suggesting that ET_A antagonism improves vascular reactivity in the coronary circulation, [34] the present study suggests that blockade of the endothelin system at the level of ET_A receptors exerts beneficial cardiac effects in forms of hypertension such as the DOCA-salt rat in which the endothelin system is activated.

ACKNOWLEDGMENTS

This study was supported by a group grant from the Medical Research Council of Canada to the Multidisciplinary Research Group on Hypertension. The authors are grateful to André Turgeon for his excellent technical assistance.

REFERENCES

- 1) Schiffrin EL. Endothelin: Potential role in hypertension and vascular hypertrophy. Brief review. *Hypertension* 1995;25:1135-1143.
- 2) Bobik A, Grooms A, Millar JA, Mitchell A, Grinpukel S. Growth factor activity of endothelin on vascular smooth muscle. *Am J Physiol (Cell Physiol)* 1990;258: C408-C415.
- 3) Li JS, Larivière R, Schiffrin EL. Effect of a nonselective endothelin antagonist on vascular remodeling in deoxycorticosterone acetate-salt hypertensive rats. Evidence for a role of endothelin in vascular hypertrophy. *Hypertension* 1994;24:183-188.
- 4) Larivière R, Thibault G, Schiffrin EL. Increased endothelin-1 content in blood vessels of deoxycorticosterone acetate-salt hypertensive but not in spontaneously hypertensive rats. *Hypertension* 1993;21:294-300.
- 5) Day R, Larivière R, Schiffrin EL. In situ hybridization shows increased endothelin-1 mRNA levels in endothelial cells of blood vessels of deoxycorticosterone acetate-salt hypertensive rats. *Am J Hypertens* 1995;8: 294-300.
- 6) Larivière R, Deng LY, Day R, Sventek P, Thibault G, Schiffrin EL. Increased endothelin-1 gene expression in the endothelium of coronary arteries and endocardium in the DOCA-salt hypertensive rat. *J Mol Cell Cardiol* 1995;27:2123-2131.

- 7) Levy D, Larson MG, Vasan R, Kannel WB, Ho KKL. The progression from hypertension to congestive heart failure. *J Am Med Assoc* 1996;275:1557-1562.
- 8) Brush JE, Cannon RO, Schenke WH, Bonow RO, Leon MB, Maron BJ, Epstein SE. Angina due to coronary microvascular disease in hypertensive patients without left ventricular hypertrophy. *N Engl J Med* 1988; 319:1302-07.
- 9) Li JS, Schiffrin EL. Effect of chronic treatment of adult spontaneously hypertensive rats with an endothelin receptor antagonist. *Hypertension* 1995;25[Part 1]:495-500.
- 10) Li JS, Turgeon A, Schiffrin EL. Effect of chronic treatment with two different ETA-selective endothelin receptor antagonists on blood pressure and small artery structure of DOCA-salt hypertensive rats. *Amer J Hypertens* 1998;11:554-562.
- 11) Anversa P, Capasso JM. Loss of intermediate-sized coronary arteries and capillary proliferation after left ventricular failure in rats. *Am J Physiol (Heart Circ Physiol)* 1991;260:H1552-H1560.
- 12) Anversa P, Li P, Sonnenblick EH, Olivetti G. Effect of aging on quantitative structural properties of coronary vasculature and microvasculature in rats. *Am J Physiol (Heart Circ Physiol)* 1994;267:H1062-H1073.

- 13) Breisch EA, White FC, Nimmo LE, Bloor CM. Cardiac vasculature and flow during pressure-overload hypertrophy. *Am J Physiol (Heart Circ Physiol)* 1986;251:H1031-H1037.
- 14) Green AS, Tonellato PJ, Zhang Z, Lombard JH, Cowley Jr AW. Effect of microvascular rarefaction on tissue oxygen delivery in hypertension. *Am J Physiol (Heart Circ Physiol)*- 1992;262:H1486-H1493.
- 15) Rakusan K. Quantitative morphology of capillaries of the heart. *Meth Achievm Exp. Path* 1971;5:272-286.
- 16) Hansen-Smith FM, Morris LW, Green AS, Lombard JH. Rapid microvessel rarefaction with elevated salt intake and reduced renal mass hypertension in rats. *Circ Res* 1996;79:324-330.
- 17) Hernandez I, Cowley Jr AW, Lombard JH, Green AS. Salt intake and angiotensin II alter microvessel density in the cremaster muscle of normal rats. *Am J Physiol (Heart Circ Physiol)* 1992;263:H664-H667.
- 18) Noon JP, Walker BR, Webb DJ, Shore AC, Holton DW, Edward HV. Impaired microvascular dilation and capillary rarefaction in young adults with a predisposition to high blood pressure. *J Clin Invest* 1997;99:1873-1879.
- 19) Rakusan K, Flanagan MF, Geva T, Southern J, Van Praagh R. Morphometry of human coronary capillaries during normal growth and the effect of age in left ventricular pressure overload hypertrophy. *Circulation* 1992;86:38-46.

- 20) Ormsbee HS, Ryan CF. Production of hypertension with deoxycorticosterone acetate-impregnated silicone rubber implants. *J Pharmacol Sci* 1973;62:255-257.
- 21) Sabri A, Samuel JL, Marotte F, Poitevin P, Rappaport L, Levy BI. Microvasculature in angiotensin II-dependent cardiac hypertrophy in the rat. *Hypertension* 1998;32:371-375.
- 22) Adair TH, Wells ML, Hang J, Montani J-P. A stereological method for estimating length density of the arterial vascular system. *Amer J Physiol (Heart Circ Physiol)* 1994;266:H1434-H1438.
- 23) Folkman J. Angiogenesis: what makes blood vessels grow? *News Physiol Sci* 1986;1:199-202.
- 24) Nehls V, Denzer K, Drenckhahn D. Pericyte involvement in capillary sprouting during angiogenesis in situ. *Cell Tissue Res* 1992;270:469-474.
- 25) Price RJ, Owens GK, Skalak TC. Immunohistochemical identification of arteriolar development using markers of smooth muscle differentiation: Evidence that capillary arterialization proceeds from terminal arterioles. *Circ Res* 1994;75:520-527.
- 26) Yanagisawa M, Kurihara H, Kimura S, Tomobe Y, Kobayashi M, Mitsui Y, Yazaki Y, Goto K, Masaki T. A novel potent vasoconstrictor peptide produced by vascular endothelial cells. *Nature* 1988;332:411-415.
- 27) Kohno M, Yokokawa K, Yasunari K, Kano H, Minami M, Yoshikawa J. Effect of the endothelin family of peptides on human coronary artery smooth-muscle cell migration. *J Cardiovasc Pharmacol* 1998;31:S84-S89.

- 28) Lee JT, Ideker RE, Reimer KA. Myocardial infarct size and location in relation to the coronary vascular bed at risk in man. *Circulation* 1981;64:526-534.
- 29) Hittinger L, Shannon RP, Bishop SP, Gelpi RJ, Vatner SF. Subendomyocardial exhaustion of blood flow reserve and increased fibrosis in conscious dogs with heart failure. *Circ Res* 1989;65:971-980.
- 30) Kaddoura S, Firth JD, Boheler KR, Sugden PH, Poole-Wilson PA. Endothelin-1 is involved in norepinephrine-induced ventricular hypertrophy in vivo. Acute effects of bosentan, an orally active, mixed endothelin ET_A and ET_B receptor antagonist. *Circulation* 1996; 93:2068-2079.
- 31) Thauraux P-L, Chatziantoniou C, Casellas D, Fouassier L, Ardaillou R, Dussaule J-C. Vascular endothelin-1 gene expression and synthesis and effect on renal type I collagen synthesis and nephroangiosclerosis during nitric oxide synthase inhibition in rats. *Circulation* 1999;99:2185-2191.
- 32) Sharifi AM, Schiffrin EL. Apoptosis in aorta of DOCA-salt hypertensive rats: effect of endothelin receptor antagonism. *J Hypertens* 1997;15:1441-1448.
- 33) Schiffrin EL, Intengan HD, Thibault G, Touyz RM. Clinical significance of endothelin in cardiovascular disease. *Curr Opin Cardiol* 1997;12:354-367.
- 34) Giulumian AD, Pollock DM, Clarke N, Fuchs LC. Coronary vascular reactivity is improved by endothelin A receptor blockade in DOCA-salt hypertensive rats. *Am J Physiol (Regul Integr Comp Physiol)* 1998;274:R1613-R1618.

Figure Legends

Figure 1. Arterioles and capillaries in subendocardial myocardium demonstrated by immunolabeling of smooth muscle cells and laminin. Left ventricular sections were immunolabeled with anti-smooth muscle α -actin and with anti-laminin, and counterstained with Nuclear Fast Red, for detection of arterioles and capillaries, respectively. UniNx = unilaterally nephrectomized control rats.

Figure 2. Top panels: Mean density of coronary capillaries and arterioles in the subepicardial myocardium of the left ventricle in the different experimental groups. Bottom panels: Mean density of coronary capillaries and arterioles in the subendocardial myocardium of the left ventricle in the different experimental groups. Values are mean \pm SEM. *P<0.05 vs. control; **P<0.01 vs. unilaterally nephrectomized rats (UniNx); +P<0.05 vs. DOCA-salt; ++P<0.01 vs. DOCA-salt.

Figure 3. Frequency distribution of arteriolar diameters in subendocardial myocardium (vessels <30 μ m). *P<0.05 vs. unilaterally nephrectomized rats (UniNx). The proportion of vessels in 3 groups < vs. >20 μ m was not significantly different (χ^2 -test) for ranges 15-20 μ m vs 20-25 μ m, or 10-20 μ m vs. 20-30 μ m.

Figure 4. Representation of potential model for the increased density of arterioles and decreased density of capillaries in the subendocardial myocardium of the left ventricle of DOCA-salt hypertensive rats.

Figure 1.

ARTERIOLES

CAPILLARIES

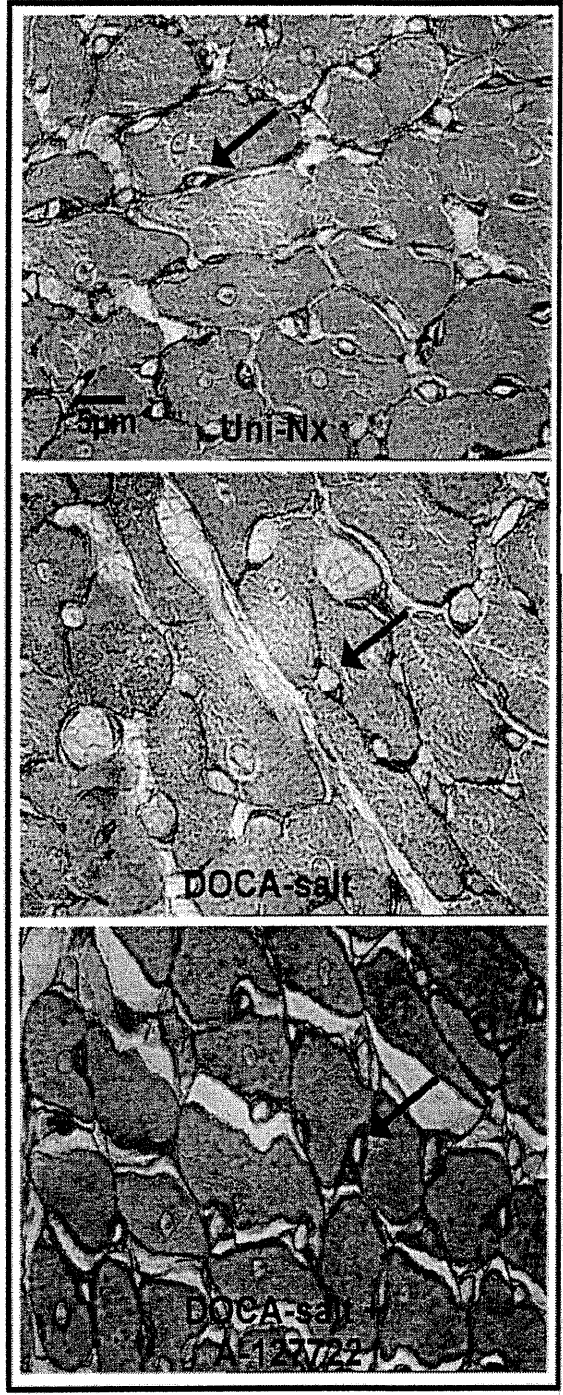
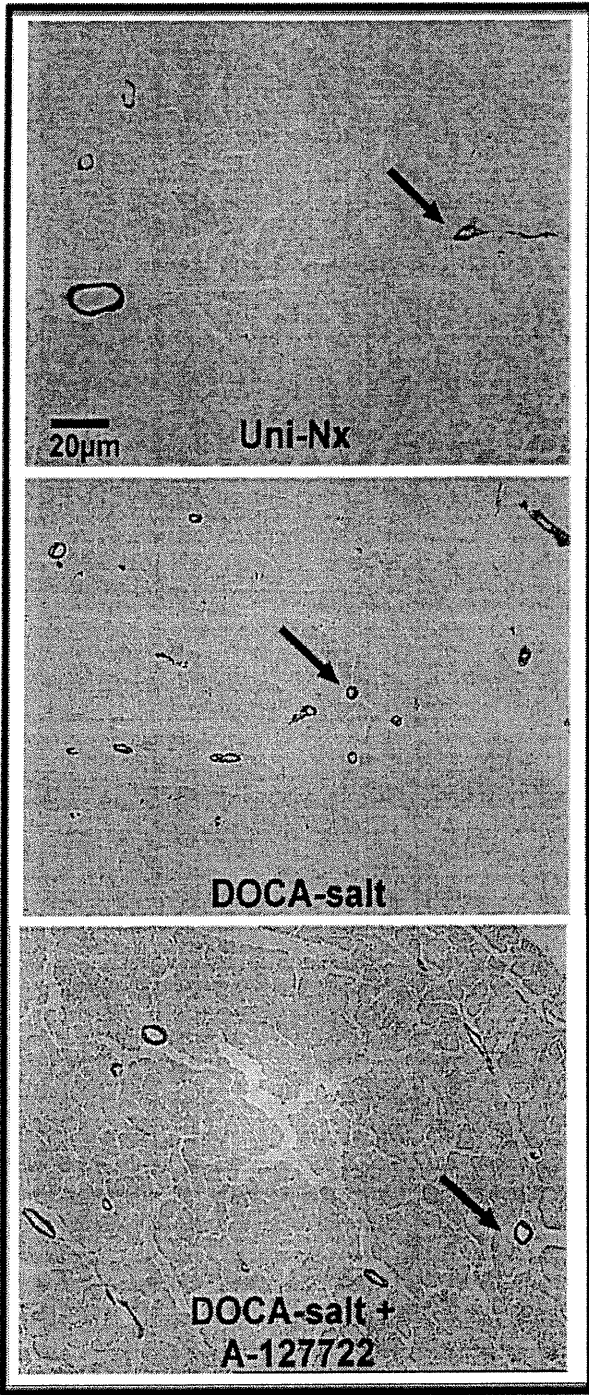
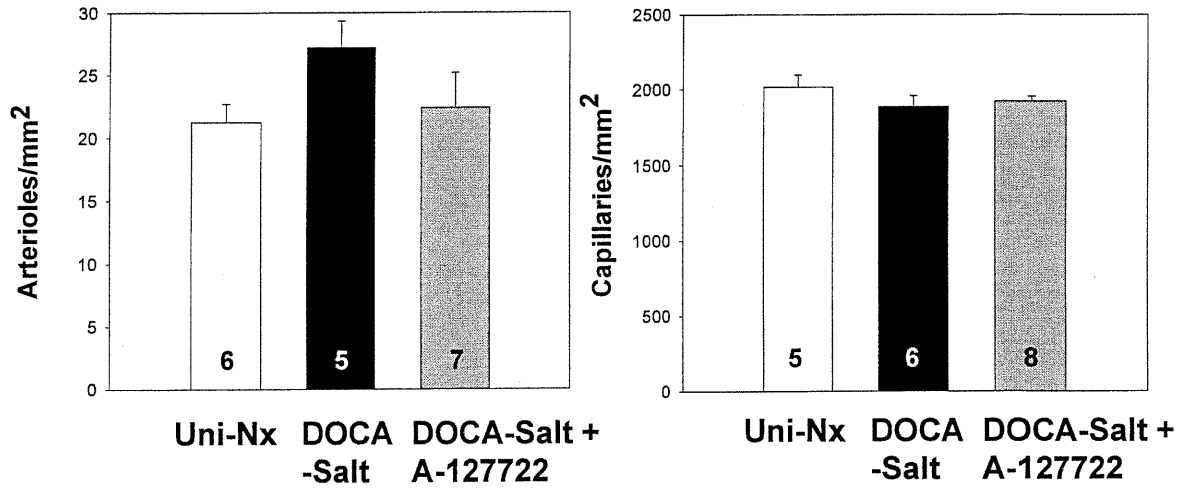


Figure 2.

SUBEPICARDIAL



SUBENDOCARDIAL

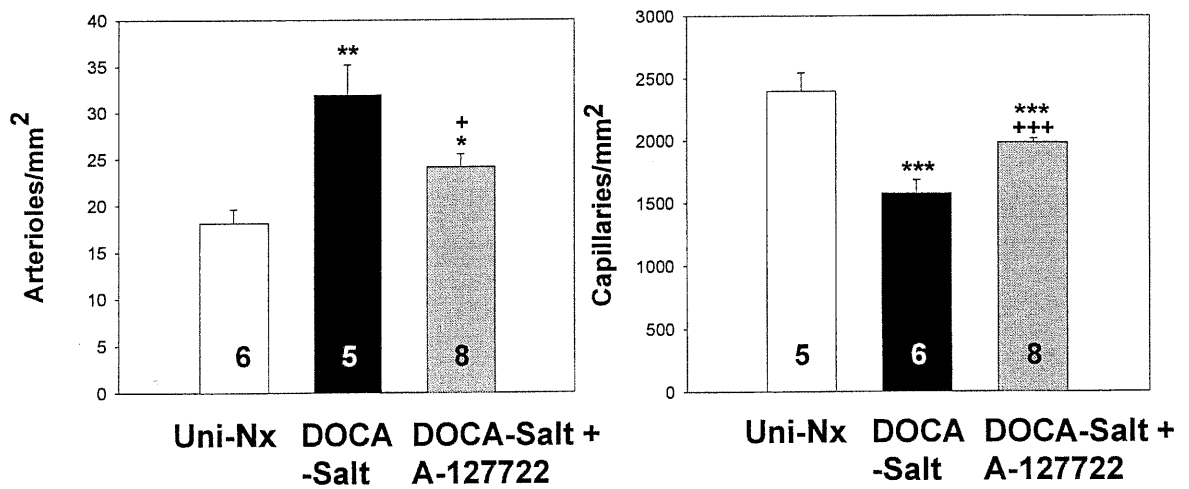


Figure 3.

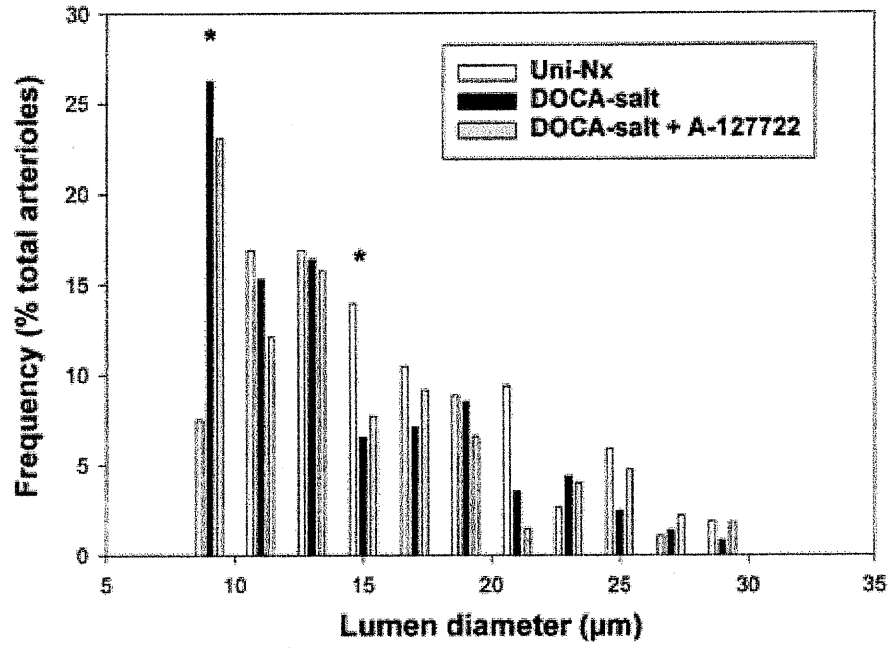


Figure 4.

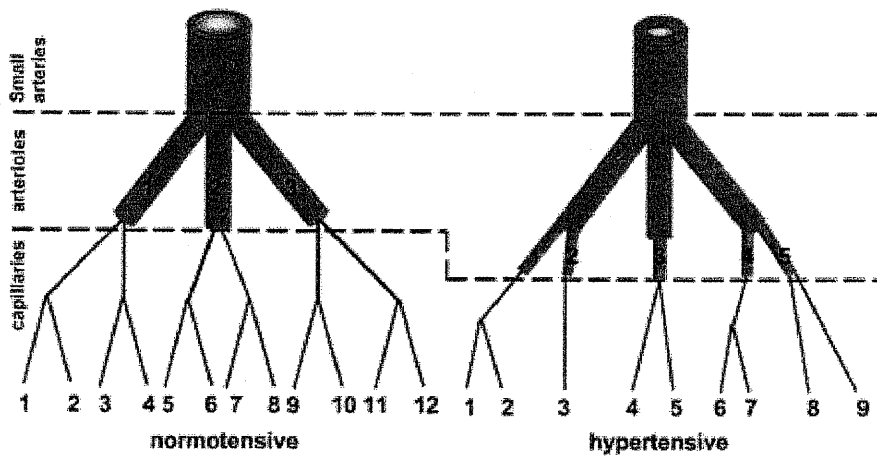


Table 1

Blood pressure, body and heart weight of DOCA-salt rats treated with the ET_A-selective endothelin receptor antagonist A-127722

Parameter	Unilaterally nephrectomized	DOCA-salt hypertensive	DOCA-salt+ A-127722
Number	6	6	8
Systolic BP (mmHg)	103 ± 1.6	202 ± 3.2**	182 ± 3.1**++
Body weight (g)	348.5 ± 3.66	250.8 ± 10.98**	271.8 ± 9.23**
Heart weight (g)	1.16 ± 0.04	1.13 ± 0.04	1.25 ± 0.05
HW (g)/ 100g BW	0.333 ± 0.01	0.451 ± 0.01**	0.460 ± 0.01**

DOCA-salt = DOCA-salt hypertensive rats; BP = blood pressure; BW = body weight; HW = heart weight.

** P < 0.01 vs. unilaterally nephrectomized rats; ++ P < 0.01 vs. DOCA -salt hypertensive rats.

Table 2

Tortuosity of subendocardial arterioles of DOCA-salt
rats treated with the ET_A-selective endothelin receptor
antagonist A-127722

Parameter	Unilaterally nephrectomized	DOCA-salt hypertensive	DOCA-salt+ A-127722
Anisotropy coefficient	1.80±0.04	1.76±0.06	1.71±0.08

CHAPITRE 3.

ARTICLE :

Myocardial Fibrosis in DOCA-salt hypertensive rats: Effect of endothelin ET_A
Receptor Antagonism

ARTICLE ACCEPTÉ SOUS:

Ammarguella F*, Larouche I*, Schiffrin EL*. Myocardial Fibrosis in DOCA-salt hypertensive rats: Effect of endothelin ET_A Receptor Antagonism.

Dans le journal « Circulation » du *American Heart Association*

Juillet 2000

* *Institut de Recherches Cliniques de Montréal*

110, avenue des Pins Ouest

Montréal, Québec, Canada

H2W 1R7

CONTRIBUTIONS PERSONNELLES :

- Mise au point de la méthode colorimétrique et microscopique
- Préparation des colorants
- Préparation des coupes histologiques
- Rédaction de l'introduction et du matériel et méthode (partie animal et collagène)

ABSTRACT

Background: To test the hypothesis that endothelin-1 contributes to cardiac fibrosis, cardiac collagen deposition was studied in deoxycorticosterone acetate-salt (DOCA-salt) hypertensive rats, in which the endothelin system is activated. The effects of the ET_A-selective endothelin receptor antagonist A-127722 were evaluated. **Methods and Results:** A-127722 (30 mg/kg per day) was administered for 4 weeks. Myocardial fibrosis was evaluated after Sirius Red F3BA staining. Systolic blood pressure was 103±1.6 mmHg in unilaterally nephrectomized rats (UniNx), 202±3.2 mmHg in DOCA-salt ($p < 0.01$ vs UniNx) and 182±3.1 mmHg in ET_A antagonist-treated DOCA-salt rats ($p < 0.01$ vs DOCA-salt or UniNx). In DOCA-salt, interstitial and perivascular collagen density was increased in the subendocardial and midmyocardial regions of the left ventricle (3-4-fold, $P < 0.05$) whereas in subepicardial myocardium the increase was predominantly perivascular. The ET_A antagonist prevented cardiac fibrosis in DOCA-salt rats. Procollagen I and III mRNA, increased in hearts of DOCA-salt rats, were normalized by ET_A antagonist treatment. TGFβ₁ mRNA and TGFβ₁ protein increased at 1 week in DOCA-salt rats, and were lowered in ET_A antagonist-treated rats. **Conclusions:** ET_A receptor-mediated collagen deposition in hearts of DOCA-salt rats results from increased procollagen synthesis associated with an initial increment in expression of TGFβ₁. These results support the hypothesis of a role for endothelin-1 in cardiac collagen deposition in mineralocorticoid hypertension, which may have pathophysiological and pharmacological implications in hypertensive heart disease. **Key Words:** Collagen, myocardium, TGFβ₁

CONDENSED ABSTRACT

DOCA-salt hypertensive rats were treated with the ET_A-selective endothelin antagonist A-127722. Interstitial and perivascular cardiac collagen density was significantly increased in DOCA-salt rats. This was prevented by treatment with the ET_A antagonist, although blood pressure was only slightly lower and cardiac hypertrophy was unaffected. Increased collagen deposition could be attributed to increased synthesis of procollagens I and III, in part in response to increased TGFβ₁. Thus, ET-1 plays a role in cardiac collagen deposition in mineralocorticoid hypertension, which may have pathophysiological and pharmacological implications in hypertensive heart disease.

INTRODUCTION

Cardiac remodeling in hypertension is characterized by increased cardiomyocyte volume and collagen deposition.^{1,2} Deposition of collagen (specifically types I and III) in the myocardial interstitium and around coronary arteries has been demonstrated in renovascular hypertension, after angiotensin II or aldosterone infusion, and in aging spontaneously hypertensive rats (SHR).³⁻⁶ Collagens I and III are synthesized by interstitial and pericoronary fibroblasts.⁷ Cardiac fibroblast activity is regulated by various factors, including hemodynamic (coronary perfusion, ventricular overload) and humoral factors (aldosterone and angiotensin II).^{4,8,9}

Involvement of endothelin-1 (ET-1) in hypertensive models such as deoxycorticosterone acetate (DOCA)-salt hypertension has been suggested by vascular overexpression of ET-1^{10,11} and blood pressure reduction in response to endothelin antagonists.¹² ET-1 promotes growth of cardiomyocytes *in vitro*,¹³⁻¹⁶ induces collagen synthesis by cardiac fibroblasts,^{16,17} and has been shown to influence development of left ventricular hypertrophy.^{18,19} In DOCA-salt hypertension, ET-1 is overexpressed in the heart, although overexpression appears to be limited to endothelial cells and the endocardium.²⁰

The aim of this study was to analyze: 1) effects of DOCA-salt hypertension on cardiac collagen deposition, and 2) effects of the ET_A-selective endothelin antagonist A-127722 on collagen density in this model in which ET-1 plays a role.²¹ We tested the hypothesis that ET-1 stimulates myocardial collagen deposition in DOCA-salt hypertensive rats via the activation of ET_A-receptors. We also evaluated whether changes of collagen deposition reflects changes in collagen synthesis, and the potential role of TGFβ₁ in our findings. The blood pressure and vascular effects

of A-127722 in these DOCA-salt rats were previously published by us,²² and will only be briefly mentioned.

METHODS

Animal Experiments

The study was approved by the Animal Care Committee of the Clinical Research Institute of Montreal and conducted in accordance with recommendations of the Canadian Council of Animal Care. DOCA-salt hypertension was induced by the method of Ormsbee and Ryan,²³ as already described.²¹ Male Sprague-Dawley rats (Charles River, St Constant, Québec, Canada) weighing 200 g were unilaterally nephrectomized under sodium pentobarbital anesthesia (40 mg/kg). Silicone rubber impregnated with DOCA (Sigma Chemical Co., St-Louis, MO) (200 mg per rat) was implanted subcutaneously, and rats were offered 1% saline to drink. Control rats (UniNx) also underwent unilateral nephrectomy, but received a silicone rubber implant without DOCA, and tap water to drink. The ET_A-endothelin receptor antagonist A-127722 was administered in the drinking water (30 mg/kg/d) for four weeks. Systolic blood pressure was measured weekly by the tail-cuff method under slight restraint after warming the rats. Readings were recorded on a model 7 polygraph fitted with a 7-P8 preamplifier and PCPB photoelectric pulse sensor (all from Grass Instruments Co, Cambridge, MA). The average of 3 pressure readings was obtained. Rats were sacrificed by decapitation at the end of the experiment, and the heart was fixed in Bouin's solution. In order to study the time-course of some of the changes, additional groups of DOCA-salt and ET_A antagonist-treated DOCA-salt rats were investigated at 1 and 2 weeks of DOCA and salt administration.

Collagen quantification

The hearts fixed in Bouin's solution were processed for paraffin embedding in an automated system. (SHANDON Citadel tissue processor, Pittsburgh, PA). Serial sections (5 μ m) of the median part of the left ventricle were obtained. Tissue sections were de-waxed with ethanol, and stained with Sirius red F3BA (0.5% in saturated aqueous picric acid) (Aldrich Chemical Company, Inc., Milwaukee, WI). Collagen density was evaluated throughout the inner third (subendocardial myocardium), the middle third (mid-myocardium) and the outer third (subepicardial myocardium) of the circumference of the left ventricle. From each of 3 nonconsecutive serial sections (which allowed convergence of results), 10 fields in each region of the heart (magnification X20) were recorded. The severity of cardiac fibrosis was evaluated after Sirius Red staining with the use of an image analysis system (Northern Eclipse 5.0, EMPIX Imaging Inc., Mississauga, ON, Canada). A single investigator blinded to the experimental groups performed the analysis.

Reverse transcription–polymerase chain reaction (RT-PCR) analysis of procollagen I and III mRNA

Total RNA was extracted from the left ventricle using Trizol reagent (Gibco-BRL). mRNA (0.5 μ g) was reverse transcribed in a final volume of 20 μ l using MMLV reverse transcriptase (Gibco-BRL) and 1 μ g oligo(dt) primer. Four μ l of single-stranded cDNA were used for PCR to amplify a 405bp fragment of pro α 1(I)collagen (procollagen I) cDNA using the complementary anti-sense primer GTTTACAGGAAGCAGACAGG and the sense primer CGATGGATTCCAGTTCGAGTA at an annealing temperature 56°C. For a 447bp fragment of pro α 1(III)collagen (procollagen III) cDNA, the anti-sense primer was CCATCCTCTAGAACTGTGTAAGTG, the sense primer

CCACCCTGAACTCAAGAGTGG, and the annealing temperature 58°C. For a 290 bp fragment of TGF β ₁ cDNA, the antisense primer was CAACGCCATCTATGAGAAAACC, the sense primer AAGCCCTGTATTCCGTCTCC, the annealing temperature 52°C. For a 192bp fragment of the housekeeping gene glyceraldehyde phosphate dehydrogenase (GAPDH) cDNA, the anti-sense primer was ATGTCGTTGTCCCACCAC, the sense primer TATGATGACATCAAGAAGGTGG, the annealing temperature 56°C. PCR was performed using Taq polymerase (Gibco-BRL) for 22 cycles for procollagens and 30 cycles for TGF β ₁ and GAPDH. RT-PCR products were subjected to electrophoresis on a 1.5% agarose gel, and ethidium bromide-stained bands were analyzed densitometrically.

Western blot analysis of TGF β ₁ protein

Protein was extracted from frozen tissue in lysis buffer containing: PBS, sodium deoxycholate 0.5%, SDS 0.1%, sodium orthovanadate 1 mmol/L, phenylmethylsulfonylfluoride 1.0 mmol/L, Nonidet-P40 1% and aprotinin 1 μ g/mL. Protein concentration was determined using the BioRad protein assay (Bio-Rad Laboratories Inc., Mississauga, Ontario). TGF β ₁ was immunoprecipitated from 2 mg protein with a specific antibody (Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz, CA) at a dilution of 1:200. Samples were electrophoresed in a 10% SDS-polyacrylamide gel at 60 V for 2 h and transferred onto a PVDF membrane at 100 V for 1 hour. Membranes were incubated with the specific antibodies to TGF β ₁ at a dilution of 1:1000 overnight at 4°C. Horseradish peroxidase-conjugated rabbit IgG (1/5000, from Santa Cruz Biotechnology Inc.) was used as second antibody. Bands were visualized by chemiluminescence (kit from Boehringer Mannheim) and quantified by densitometry.

Statistical analysis

The means of collagen density from 3 sections of each area of each heart were evaluated. Results are expressed as means \pm SEM. Statistical significance was assessed by one-way ANOVA followed by a Student Newman-Keuls test. Differences were considered significant at $P<0.05$.

RESULTS

Blood pressure, body and heart weight of rats

As already reported,²² systolic blood pressure of DOCA-salt hypertensive rats was significantly elevated after 4 weeks (Table 1). Treatment with A-127722 resulted in slight but significantly lower blood pressure in DOCA-salt hypertensive rats compared to untreated DOCA-salt rats. Body weight of DOCA-salt hypertensive rats was significantly lower than that of normotensive control rats as we have found in previous studies.^{10,12} Relative heart weights were similar in treated and untreated DOCA-salt hypertensive rats, and higher than in normotensive rats.

Effects of endothelin antagonist on collagen deposition

There was a dramatic increase in interstitial and perivascular myocardial collagen in the subendocardial and midmyocardial regions of the left ventricle of DOCA-salt rats compared to unilaterally nephrectomized controls (Fig.1 and 2). In contrast, in the subepicardial myocardium, collagen density was increased predominantly around blood vessels. Treatment with A-127722 prevented collagen deposition in the left ventricle of DOCA-salt rats.

Expression of procollagen type I and III mRNA, and TGF β ₁ mRNA and protein

Figure 3 shows that in DOCA-salt rats levels of procollagen type I and III mRNA in the left ventricle were 1.6 fold higher than in unilaterally nephrectomized rats ($P<0.01$). In DOCA-salt rats treated with the ET_A-receptor antagonist levels of procollagen I and III mRNA were similar to basal levels.

There was a trend to an increase in TGF β_1 mRNA at 1 week in DOCA-salt rats, that did not achieve significance, whereas in ET $_A$ antagonist-treated rats there was a significant decrease compared to DOCA-salt rats ($p < 0.05$, figure 4). No change in TGF β_1 mRNA levels could be demonstrated in the heart of any of the groups investigated at 2 and 4 weeks (table 2). TGF β_1 protein was expressed in the left ventricle as the 55kD full length precursor, as previously shown by others.²⁴ In hearts of DOCA-salt rats after one week of hypertension TGF β_1 protein levels were 2.5 fold higher than in hearts of control rats (figure 4). In ET $_A$ antagonist-treated rats, cardiac TGF β_1 protein was significantly lower than in DOCA-salt rats. In the 2nd and 4th weeks of hypertension, no statistically significant elevation was detectable in DOCA-salt hypertensive rats (table 2).

DISCUSSION

The present study investigated collagen deposition and its mechanism in the heart of DOCA-salt hypertensive rats, and the role that ET-1 may play in cardiac fibrosis in this model of hypertension. In this model, that has an endothelin-dependent component,^{10-12,21,22} collagen deposition was dramatically increased interstitially and perivascularly in subendocardial and midmyocardial areas of the left ventricle, but predominantly around blood vessels in the subepicardium. Although development of left ventricular hypertrophy was unaffected by the ET $_A$ -selective antagonist A-127722, cardiac collagen deposition was dramatically reduced. Associated with this, procollagen I and III mRNA were increased in DOCA-salt rat hearts, rise that was abrogated by the ET $_A$ antagonist. In the 1st. week, cardiac TGF β_1 expression was increased in DOCA-salt rats, and was significantly decreased by the ET $_A$ antagonist. These data suggest a critical role of the activated

endothelin system in cardiac fibrosis in mineralocorticoid hypertension, resulting from increased collagen synthesis via an ET-1-induced TGF β ₁-dependent component.

Effect of ET-1 on cardiac collagen vs. left ventricular hypertrophy

The potential involvement of ET-1 in some models of experimental hypertension such as deoxycorticosterone acetate (DOCA)-salt hypertension has been well demonstrated.^{10-12,21,22} In the heart, ET-1 overexpression occurred mainly in endothelium of blood vessels in DOCA-salt hypertensive rats.²⁰ ET-1 produced in blood vessels of the heart may stimulate interstitial fibroblasts to produce collagen,^{16,17} but could conceivably have only minor effects on cardiomyocytes. Blood pressure was lowered only moderately in endothelin antagonist-treated rats. More effective blood pressure lowering may be necessary to have a significant effect on cardiac hypertrophy, as discussed below. Alternatively, development of left ventricular hypertrophy and cardiac fibrosis may obey different determinants. Whereas blood pressure elevation may be critical for development of cardiac hypertrophy, it may have less influence on collagen deposition. Cardiac fibrosis may result in this experimental paradigm mainly from stimulation of cardiac interstitial fibroblasts by ET-1 whereas left ventricular hypertrophy may develop in the absence of ET-1 stimulation if blood pressure remains elevated, as it did in spite of ET_A antagonism in the present study. Similar findings have been reported recently in this same model when treated with inhibitors of the renin-angiotensin system: reversal of cardiac fibrosis without change in cardiac hypertrophy.²⁵

Relationship of cardiac fibrosis and left ventricular hypertrophy

Cardiac hypertrophy does not necessarily translate into increased collagen deposition. Collagen content is increased in pressure-induced hypertrophy in animal

models^{26,27} and in humans.²⁸ However, volume overload in rats²⁹ or humans³⁰ induces hypertrophy in the absence of changes in collagen deposition. Pathophysiological conditions causing synthesis and accumulation of collagen can thus be dissociated from conditions activating cardiomyocyte hypertrophy. Indeed, in the present study we found that endothelin antagonism completely abrogated the increase in collagen content in the hearts of DOCA-salt rats but did not significantly affect cardiac hypertrophy. Cardiac hypertrophy in DOCA-salt rats may have a component associated with collagen deposition via endothelin-mediated mechanisms,^{16,17} and one independent of both collagen deposition and ET-1 stimulation.

Localization of collagen deposition in the heart

ET-1-dependent fibrosis occurred in DOCA-salt hypertensive rats predominantly interstitially and perivascularly in the midmyocardial and subendocardial regions of the left ventricle, and predominantly perivascularly in the subepicardium. The distribution of increased interstitial collagen is strikingly similar to localization of changes in arterioles and capillaries in the DOCA-salt hypertensive rat as an expression of ET-1-mediated effects. Increased density of small arterioles 20 μ m in lumen diameter and capillary rarefaction were found mainly in the subendocardial myocardium of DOCA-salt hypertensive rats that was corrected by treatment with an ET_A antagonist.³¹ There may be a common mechanism for cardiac fibrosis and vascular abnormalities in DOCA-salt rats: They both appear to be a consequence of vascular overproduction of ET-1. Increased arteriolar density could lead to increased coronary resistance through lengthening of arteriolar segments. Decreased capillary density together with fibrosis may compromise oxygen and nutrient supply to cardiac myocytes, contributing to hypoxia in this more

vulnerable area of the myocardium.^{32,33} Hemodynamic (including pressure) and metabolic variables probably participate together with ET-1 and presumably other hormonal stimuli to induce vascular growth and rarefaction in this region of the heart of DOCA-salt hypertensive rats, whereas ET-1 appears to play a fundamental role in fibrosis as shown by its prevention under ET_A receptor blockade.

Synthesis of collagen explains increased collagen deposition in DOCA-salt rats

Expression of procollagen I and III mRNA in the heart of DOCA-salt rats was increased compared to control rats, indicating enhanced collagen synthesis. ET_A-receptor antagonist treatment blunted collagen overexpression, suggesting that increased collagen synthesis was mediated via activation of ET_A receptors on cardiac fibroblasts. ET-1 activates the procollagen I promoter,³⁴ reflected in this study by the increased collagen deposition. TGFβ₁ protein levels were increased in the heart of DOCA-salt rats in the initial week, returning to normal thereafter. ET_A antagonism prevented the elevation of TGFβ₁, implicating TGFβ₁ in the fibrotic response. Not surprisingly, no increase of TGFβ₁ was found on the 2nd and 4th week of hypertension. Indeed, a significant rise of the TGFβ₁ 55kD precursor has been documented only in the initial week of pressure overload.²⁴ After cardiac irradiation, TGFβ₁ mRNA rose only acutely in the first week, and returned to normal later.³⁵ Interestingly, there was no correlation between TGFβ₁ protein and mRNA.³⁴ Together, these data demonstrate an ET-1-induced TGFβ₁-dependent increase in cardiac collagen deposition in the heart of DOCA-salt rats. Preliminary data (not shown) demonstrate absence of significant change in collagen-degrading activity (matrix metalloproteinase-2 [MMP-2]) in DOCA-salt rats or under ET_A antagonism,

in agreement with previously demonstrated absence of significant changes of cardiac MMP expression in this hypertensive model.³⁶

Cardiac fibrosis in DOCA-salt hypertensive rats, relationship with other endocrine systems

The mechanism for increased ET-1 production in DOCA-salt hypertension remains unclear. Recent studies have suggested that vasopressin, the levels and effects of which are enhanced in DOCA-salt hypertension,^{37,38} may play a role in stimulation of ET-1 expression. A V₁-vasopressin antagonist reduced blood pressure and vascular remodeling of DOCA-salt hypertensive rats³⁹ similarly to effects of ET_A antagonists.^{12,40} This was associated with abrogation of vascular overexpression of ET-1 mRNA. Genetically vasopressin-deficient Brattleboro rats do not develop DOCA-salt hypertension, and are unable to up-regulate ET-1 expression.⁴¹ The mechanism for vasopressin increase in DOCA-salt rats may be related to changes in serum osmolality and action on the hypothalamus. This may require the effect or presence of high salt and mineralocorticoids. Alternatively, mineralocorticoids may potentiate effects of vasopressin on ET-1 expression in blood vessels and heart. Mineralocorticoids, particularly aldosterone, induce cardiac hypertrophy and fibrosis in rats.⁴² Whether aldosterone exerts its effects via ET-1, as DOCA does in the DOCA-salt rat, remains to be determined. It is of interest to note the recently concluded RALES study⁴³ where blockade of aldosterone by spironolactone improved cardiac mortality in heart failure patients, which could be mediated in part via blunting of ET-1 effects on the heart.⁴⁴

In conclusion, in DOCA-salt hypertensive rats, significantly increased interstitial and perivascular collagen deposition was observed in the left ventricular myocardium, which was prevented if rats were treated with an ET_A receptor

antagonist. These results suggest a role for ET-1 in increased procollagen I and III synthesis leading to cardiac fibrosis in DOCA-salt hypertensive rats, which may have pathophysiological implications in hypertension by contributing to myocardial stiffness and contractile dysfunction.^{45,46} Associated with this response there is an initial increase in TGF β ₁, that may play an adjuvant role in the ET_A receptor-induced cardiac fibrosis. Blockade of ET_A receptors may exert beneficial cardiac effects in forms of hypertension such as the DOCA-salt rat in which the endothelin system is activated, and perhaps in other forms of cardiac disease, by blunting cardiac fibrosis and remodeling.

ACKNOWLEDGMENTS

This study was supported by a Group Grant from the Medical Research Council of Canada to the Multidisciplinary Research Group on Hypertension. I.L. received a Canadian Hypertension Society-Pfizer Canada-Medical Research Council of Canada Studentship award. The authors are grateful to André Turgeon for his excellent technical assistance.

REFERENCES

1. Thai HM, Van HT, Gaballa MA, Goldman S, Raya TE. Effects of AT₁ receptor blockade after myocardial infarct on myocardial fibrosis, stiffness, and contractility. *Am J Physiol.* 1999;276:H873-80.
2. Weber KT, Janicki JS, Pick R, Capasso J, Anversa P. Myocardial fibrosis and pathologic hypertrophy in the rat with renovascular hypertension. *Am J Cardiol.* 1990;65:1G-7G.
3. Brilla CG, Pick R, Tan LB, Janicki JS, Weber KT. Remodeling of the rat right and left ventricles in experimental hypertension. *Circ Res.* 1990;67:1355-1364.
4. Weber KT, Brilla CG. Pathological hypertrophy and cardiac interstitium. Fibrosis and renin-angiotensin-aldosterone system. *Circulation.* 1991;83:1849-65.
5. Conrad CH, Brooks WW, Hayes JA, Sen S, Robinson KG, Bing OH. Myocardial fibrosis and stiffness with hypertrophy and heart failure in the spontaneously hypertensive rat. *Circulation.* 1995;91:161-170.
6. Nicoletti A, Heudes D, Hinglais N, Appay MD, Philippe M, Sassy-Prigent C, Bariéty J, Michel JB. Left ventricular fibrosis in renovascular hypertensive rats: effect of losartan and spironolactone. *Hypertension.* 1995;26:101-111.
7. Eghbali M, Blumenfeld OO, Seifter S, Buttrick PM, Leinwand LA, Robinson TF, Zern MA, Gimbrone MA. Localization of types I, III, IV collagen mRNAs in rat heart cells by *in situ* hybridization. *J Mol Cell Cardiol.* 1989;21:103-113.
8. Brilla CG, Weber KT. Reactive and reparative myocardial fibrosis in arterial hypertension in the rat. *Cardiovasc Res.* 1992;26:671-7.
9. Crawford DC, Chobanian AV, Brecher P. Angiotensin II induces fibronectin expression associated with cardiac fibrosis in the rat. *Circ Res.* 1994;74:727-39.

10. Larivière R, Thibault G, Schiffrin EL. Increased endothelin-1 content in blood vessels of deoxycorticosterone acetate-salt hypertensive but not in spontaneously hypertensive rats. *Hypertension* 1993;21:294-300.
11. Day R, Larivière R, Schiffrin EL. In situ hybridization shows increased endothelin-1 mRNA levels in endothelial cells of blood vessels of deoxycorticosterone acetate-salt hypertensive rats. *Am J Hypertens* 1995;8:294-300.
12. Li JS, Lariviere R, Schiffrin EL. Effect of a nonselective endothelin antagonist on vascular remodeling in deoxycorticosterone acetate-salt hypertensive rats. Evidence for a role of endothelin in vascular hypertrophy. *Hypertension* 1994;24:183-8.
13. Yamazaki T, Konuro I, Kudoh S, Zou Y, Shiojima I, Hiroi Y, Mizuno T, Maemura K, Kurihara H, Aikawa R, Takano H, Yazaki Y. Endothelin-1 is involved in mechanical stress-induced cardiomyocyte hypertrophy. *J Biol Chem*. 1996;271:3221-3228.
14. Ito H, Hirata Y, Adachi S, Tanaka M, Tsujino M, Koike A, Nogami A, Murumo F, Hiroe M. Endothelin-1 is an autocrine/paracrine factor in the mechanism of angiotensin II-induced hypertrophy in cultured rat cardiomyocytes. *J Clin Invest*. 1993;92:398-403.
15. Neyses L, Nouskas J, Luyken J, Fronhoffs S, Oberdorf S, Pfeifer U, Williams RS, Sukhatme VP, Vetter H. Induction of immediate-early genes by angiotensin II and endothelin-1 in adult rat cardiomyocytes. *J Hypertens*. 1993;11:927-34.
16. Mulder P, Rochard V, Derumeaux G, Hogie M, Henry JP, Lallemand F, Compagnon P, Mace B, Comoy E, Letac B, Thuillez C. Role of endogenous endothelin in chronic heart failure: effect of long-term treatment with an

- endothelin antagonist on survival, hemodynamics, and cardiac remodeling. *Circulation*. 1997;96:1976-1982.
17. Guarda E, Katwa LC, Myers PR, Tyagi SC, Weber KT. Effects of endothelins on collagen turnover in cardiac fibroblasts. *Cardiovasc Res*. 1993;27:2130-2134.
 18. Stasch JP, Hirth-Dietrich C, Frobel K, Wegner M. Prolonged endothelin blockade prevents hypertension and cardiac hypertrophy in stroke-prone spontaneously hypertensive rats. *Am J Hypertens* 1995;8:1128-1134.
 19. Kaddoura S, Firth JD, Boheler KR, Sugden PH, Poole-Wilson PA. Endothelin-1 is involved in norepinephrine-induced ventricular hypertrophy in vivo. Acute effects of bosentan, an orally active, mixed endothelin ET_A and ET_B receptor antagonist. *Circulation* 1996,93:2068-2079.
 20. Larivière R, Deng LY, Day R, Sventek P, Thibault G, Schiffrin EL. Increased endothelin-1 gene expression in the endothelium of coronary arteries and endocardium in the DOCA-salt hypertensive rat. *J Mol Cell Cardiol* 1995;27:2123-2131.
 21. Schiffrin EL. Endothelin: Potential role in hypertension and vascular hypertrophy. Brief review. *Hypertension* 1995;25:1135-1143.
 22. Li JS, Turgeon A, Schiffrin EL. Effect of chronic treatment with two different ET_A-selective endothelin receptor antagonists on blood pressure and small artery structure of DOCA-salt hypertensive rats. *Amer J Hypertens* 1998;11:554-562.
 23. Ormsbee HS, Ryan CF. Production of hypertension with deoxycorticosterone acetate-impregnated silicone rubber implants. *J Pharmacol Sci* 1973;62:255-257.

24. Li J-M, Brooks G. Differential protein expression and subcellular distribution of TGF β 1, β 2 and β 3 in cardiomyocytes during pressure overload-induced hypertrophy. *J Mol Cell Cardiol* 1997;29:2213-2224.
25. Brown L, Duce B, Miric G, Sernia C. Reversal of cardiac fibrosis in deoxycorticosterone acetate-salt hypertensive rats by inhibition of the renin-angiotensin system. *J Am Soc Nephrol* 1999;10 (Suppl 11):S143-148.
26. Chapman D, Weber KT, Eghbali M. Regulation of fibrillar collagen types I and III and basement membrane type IV collagen gene expression in pressure overloaded rat myocardium. *Circ Res.* 1990;67:787-94.
27. Contard F, Koteliensky V, Marotte F, Dubus I, Rappaport L, Samuel JL. Specific alterations in the distribution of extracellular matrix components within rat myocardium during the development of pressure overload. *Lab Invest.* 1991;64:65-75.
28. Rossi MA. Pathologic fibrosis and connective tissue matrix in left ventricular hypertrophy due to chronic arterial hypertension in humans. *J Hypertens.* 1998;16:1031-41.
29. Michel JB, Salzmann JL, Ossondo Nlom M, Bruneval P, Barres D, Camilleri JP. Morphometric analysis of collagen network and plasma perfused capillary bed in the myocardium of rats during evolution of cardiac hypertrophy. *Basic Res Cardiol.* 1986;81:142-54.
30. Schwartz SM, Gordon D, Mosca RS, Bove EL, Heidelberger KP, Kulik TJ. Collagen content in normal, pressure, and pressure-volume overloaded developing human hearts. *Am J Cardiol.* 1996;77:734-8.

31. Larouche I, Schiffrin EL. Cardiac microvasculature in DOCA-salt hypertensive rats: effect of endothelin ET_A receptor antagonism. *Hypertension* 1999; 34[part 2]:795-801.
32. Lee JT, Ideker RE, Reimer KA. Myocardial infarct size and location in relation to the coronary vascular bed at risk in man. *Circulation* 1981;64:526-534.
33. Hittinger L, Shannon RP, Bishop SP, Gelpi RJ, Vatner SF. Subendomyocardial exhaustion of blood flow reserve and increased fibrosis in conscious dogs with heart failure. *Circ Res* 1989;65:971-980.
34. Chatziantoniou C, Boffa JJ, Ardaillou R, Dussaule JC. Nitric oxide inhibition induces early activation of type I collagen gene in renal resistance vessels and glomeruli in transgenic mice - Role of endothelin. *J Clin Invest* 1998;101:2780-2789.
35. Krüse JJCM, Bart CI, Visser A, Wondergem J. Changes in transforming growth factor - β (TGF- β 1), procollagen types I and III mRNA in the rat heart after irradiation. *Intl J Radiation Biol* 1999;75:1429-1436.
36. Robert V, Besse S, Sabri A, Silvestre J-S, Assayag P, Thiem NV, Swynghedauw B, Delcayre C: Differential regulation of matrix metalloproteinases associated with aging and hypertension in the rat heart. *Lab Invest* 1997;76:729-738.
37. Crofton JT, Share L, Shade RE, Lee-Kwon WJ, Manning M, Sawyer WH. The importance of vasopressin in the development and maintenance of DOCA-salt hypertension in the rat. *Hypertension* 1979;1:31-38.
38. Lariviere R, St-Louis J, Schiffrin EL. Vascular binding sites and biological activity of vasopressin in DOCA-salt hypertensive rats. *J Hypertens* 1988;6:211-217.
39. Intengan HD, He G, Schiffrin EL. Effect of vasopressin antagonism on structure and mechanics of small arteries and vascular expression of endothelin-1 in

- deoxycorticosterone acetate salt hypertensive rats. *Hypertension* 1998;32:770-7.
40. Schiffrin EL, Turgeon A, Deng LY. Effect of chronic ET_A-selective endothelin receptor antagonism on blood pressure in experimental and genetic hypertension in rats. *Br J Pharmacol* 1997;121:935-40.
41. Intengan HD, Park JB, Schiffrin EL. Blood pressure and small arteries in DOCA-salt-treated genetically AVP-deficient rats: role of endothelin. *Hypertension* 1999;34[part 2]:907-913.
42. Brilla CG, Matsubara LS, Weber KT. Anti-aldosterone treatment and the prevention of myocardial fibrosis in primary and secondary hyperaldosteronism. *J Mol Cell Cardiol* 1993;25:563-75.
43. Pitt B, Zannad F, Remme WJ, Cody R, Castaigne A, Perez A, Palensky J, Wittes J, for the Randomized Aldactone Evaluation Study Investigators. The Effect of Spironolactone on Morbidity and Mortality in Patients with Severe Heart Failure. *N Engl J Med* 1999;341:709-17.
44. Sutsch G, Kiowski W, Yan XW, Hunziker P, Christen S, Strobel W, Kim JH, Rickenbacher P, Bertel O. Short-term oral endothelin-receptor antagonist therapy in conventionally treated patients with symptomatic severe chronic heart failure. *Circulation* 1998;98:2262-8.
45. Bishop JE, Greenbaum R, Gibson DG, Yacoub M, Laurent GJ. Enhanced deposition of predominantly type I collagen in myocardial disease. *J Mol Cell Cardiol*. 1990;22:1157-65.
46. Litwin SE, Litwin CM, Raya TE, Warner AL, Goldman S. Contractility and stiffness of noninfarcted myocardium after coronary ligation in rats. Effects of chronic angiotensin converting enzyme inhibition. *Circulation*. 1991;83:1028-37.

Figure legends

Figure 1. Collagen deposition in the left ventricular myocardium of DOCA-salt hypertensive rats demonstrated by Sirius Red F3BA staining. Panel A: left ventricle from unilaterally nephrectomized control rat; panel B: interstitial collagen in DOCA-salt hypertensive rat heart; panel C: perivascular collagen in heart of DOCA-salt hypertensive rat; panel D: absence of significant fibrosis in heart of DOCA-salt hypertensive rat treated with A-1227722. Original magnification x20.

Figure 2. Collagen density in the subendocardial, midmyocardial, subepicardial regions of the left ventricular myocardium in the different experimental groups. Results are expressed as means \pm SEM (n=6-8). *P<0.05 vs. unilaterally nephrectomized rats (UniNx control); **P<0.01 vs. control; +P<0.05 vs. DOCA-salt; ++P<0.01 vs. DOCA-salt. ET_AA= ET_A antagonist.

Figure 3. Expression of procollagen type I and III mRNA in the left ventricle of DOCA-salt hypertensive rats, and effect of ET_A antagonist A-127722 both expressed as percent of Uni-Nx controls. Reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) was performed and mRNA levels normalized to the GAPDH internal control. The upper panel shows representative blots. Results in the lower panel are means \pm SEM (n = 6). *, P<0.01 vs. other groups.

Figure 4. Expression of TGF β ₁ mRNA in the left ventricle of DOCA-salt hypertensive rats, and effect of ET_A antagonism. Reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) was performed and mRNA levels normalized to the GAPDH internal control. The upper panel shows representative blots. Results in the lower panel are means \pm SEM (n=3). *, P<0.05 vs. DOCA-salt + ET_A antagonist.

Figure 5. Expression of TGF β ₁ protein in the left ventricle of DOCA-salt hypertensive rats, and effect of ET_A antagonism. The upper panel shows representative Western blots. Results in the lower panel are means \pm SEM (n=3). *, P<0.05 vs. DOCA-salt + ET_A antagonist; **, P<0.01 vs. Uni-Nx.

Figure 1.

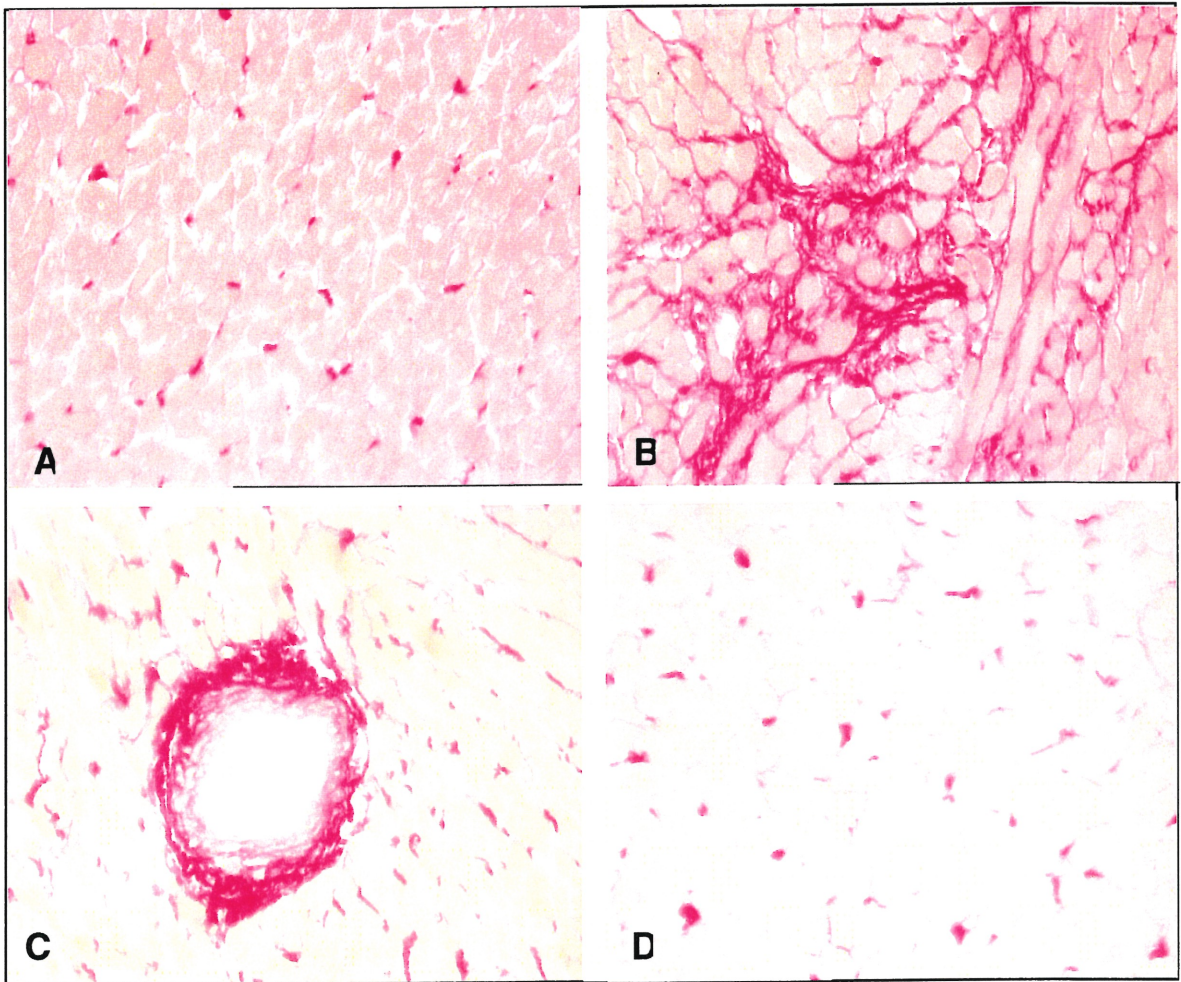


Figure 2.

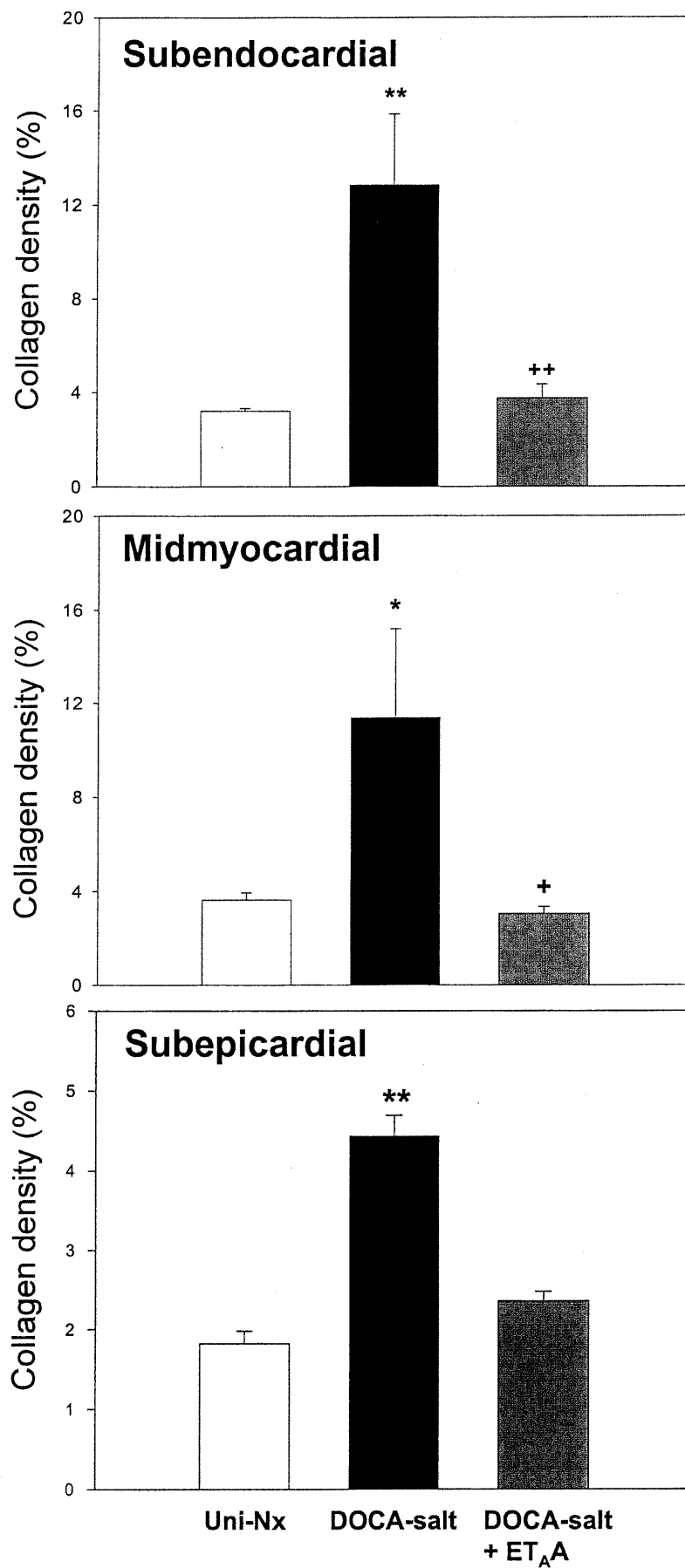


Figure 3.

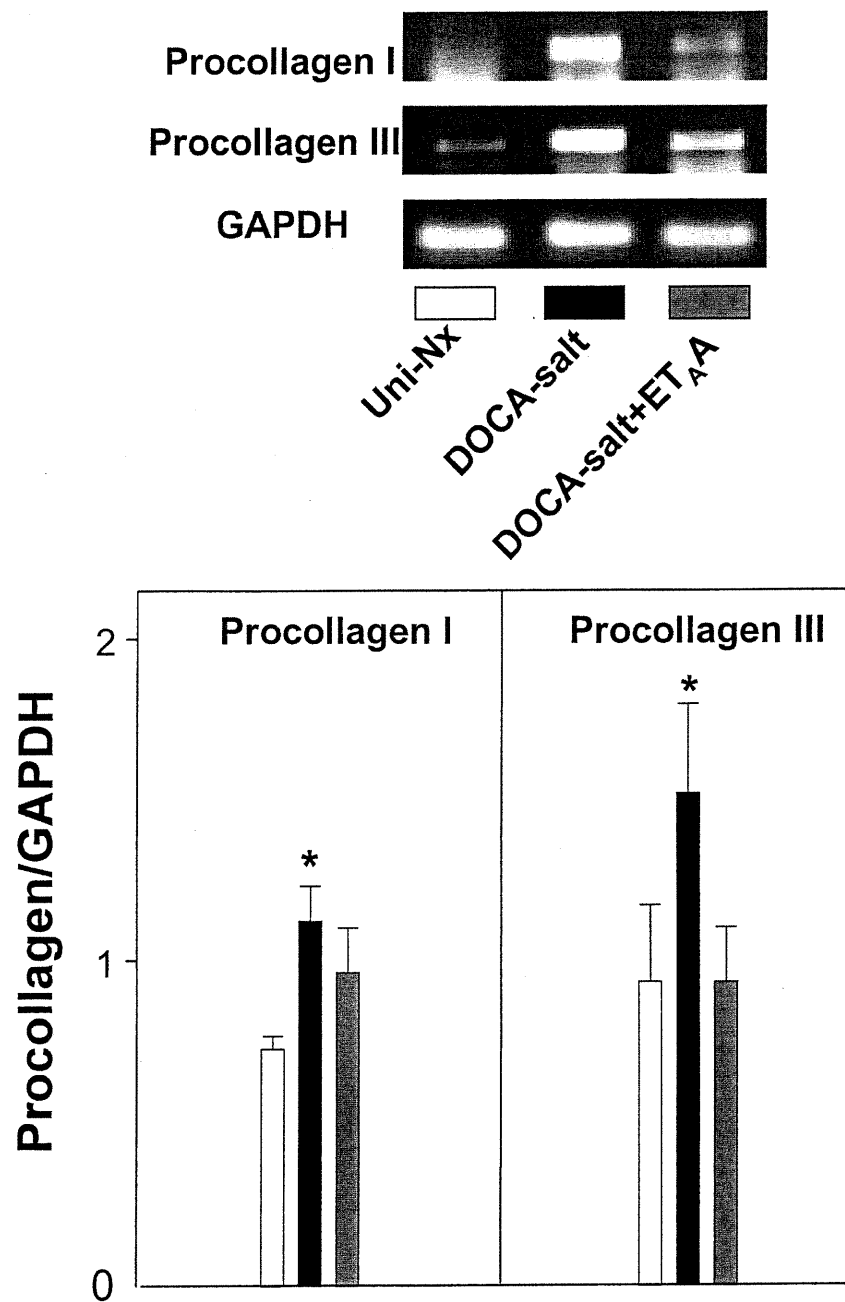


Figure 4.

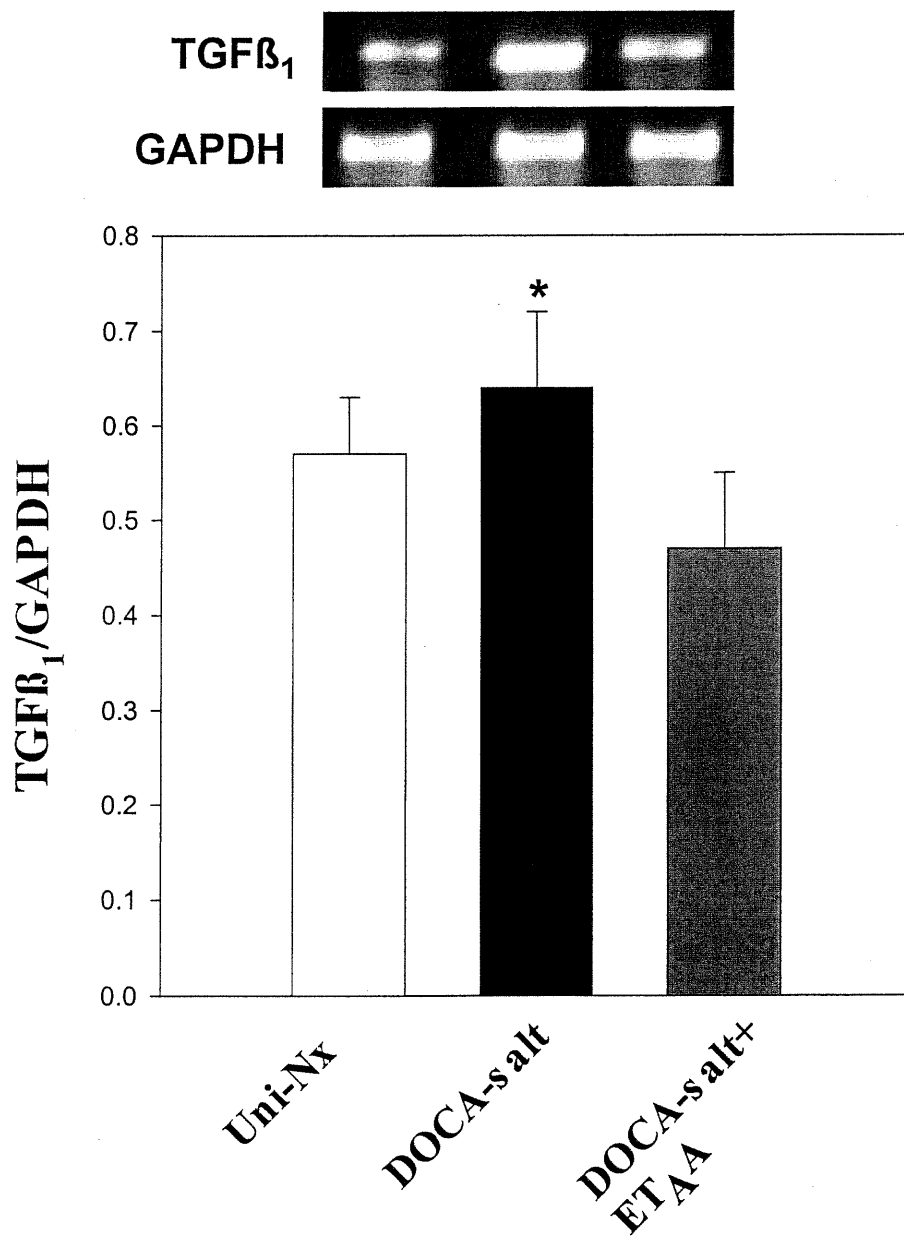


Figure 5.

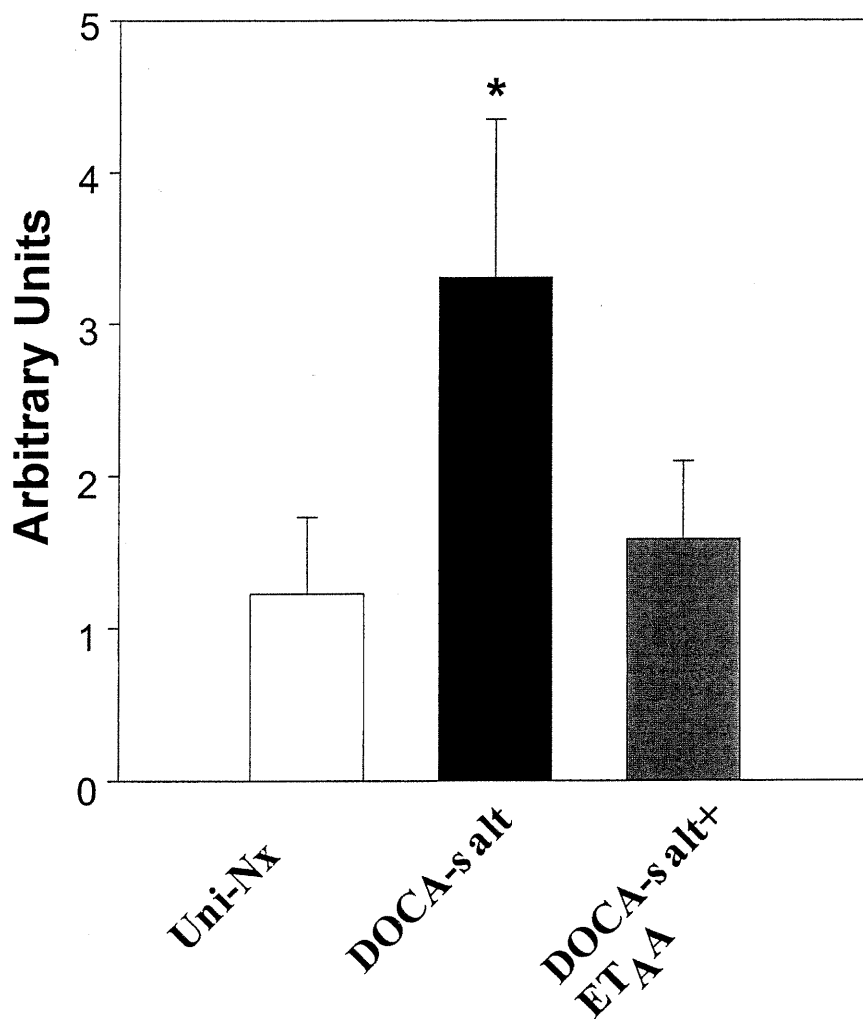
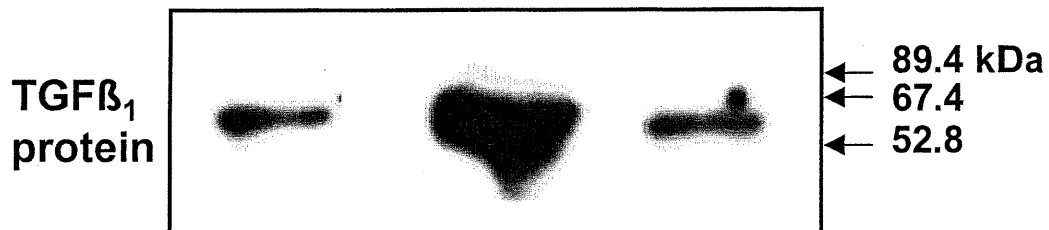


Table 1
Blood pressure, body and heart weight of DOCA-salt
rats treated with the ET_A-selective endothelin receptor
antagonist A-127722

Parameter	Unilaterally nephrectomized	DOCA-salt hypertensive	DOCA-salt + A-127722
Number	4	5	8
Systolic BP (mmHg)	103 ± 1.6	202 ± 3.2**	182 ± 3.1**
Body weight (g)	348.5 ± 3.66	250.8 ± 10.98**	271.8 ± 9.23**
Heart weight (g)	1.16 ± 0.04	1.13 ± 0.04	1.25 ± 0.05
HW (g)/ 100g BW	0.333 ± 0.01	0.451 ± 0.01**	0.460 ± 0.01**

DOCA-salt = DOCA-salt hypertensive rats; BP = blood pressure; BW = body weight; HW = heart weight.

** P < 0.01 vs. other groups.

Table 2

Time-course of TGF β_1 mRNA and protein expression in the left ventricle of DOCA-salt hypertensive rats treated with ET_A-selective endothelin receptor antagonism

Time	Unilaterally nephrectomized	DOCA-salt hypertensive	DOCA-salt + A-127722
<i>TGFβ_1 mRNA/GAPDH</i>			
Week 1	0.57 ± 0.06	0.64 ± 0.08	0.47 ± 0.08 *
Week 2	1.20 ± 0.12	1.14 ± 0.13	1.14 ± 0.15
Week 4	0.87 ± 0.10	0.77 ± 0.11	1.14 ± 0.08
<i>TGFβ_1 protein (arbitrary units)</i>			
Week 1	2.5 ± 1.0	6.6 ± 2.1 +	3.2 ± 1.0
Week 2	1.1 ± 0.2	1.1 ± 0.1	1.3 ± 0.3
Week 4	6.0 ± 1.7	8.1 ± 0.6	7.0 ± 0.6

GAPDH= glyceraldehyde phosphate dehydrogenase.

* P < 0.05 vs. DOCA -salt hypertensive rats; + P < 0.01 vs. other groups.

CHAPITRE 4: DISCUSSION ET CONCLUSION

Plusieurs complications cardiaques sont consécutives aux altérations des microvaisseaux dans l'hypertension artérielle. En effet, de nombreux changements peuvent apparaître dans la microcirculation durant le développement de l'hypertension artérielle et, une fois que ces derniers apparaissent, ils peuvent limiter l'efficacité des stratégies thérapeutiques. Comme la résistance périphérique est plus grande dans un petit conduit que dans un gros, puisque la proportion de liquide en contact avec les parois est plus grande, l'augmentation de la résistance dans l'hypertension essentielle apparaît donc majoritairement dans les microvaisseaux de diamètre luminal inférieur à 100 μ m, plus spécifiquement au niveau des artérioles et des capillaires (Noon *et al.*, 1997, Tableau II d'après Burton, 1965).

Tableau II. Résistances relatives du lit vasculaire systémique.

D'après Burton, 1965

Aorte	4%
Grosses artères	5%
Branches artérielles moyennes	10%
Branches terminales	6%
Artérioles	41%
Capillaires	27%
Résistances artérielles et capillaires	= 93%
Résistances veineuses résiduelles	= 7%

Ces derniers sont donc particulièrement touchés par des élévations de la pression sanguine et peuvent subir de nombreuses modifications de structure pour s'adapter à ces changements. Il a déjà été démontré, par de nombreuses études, que les petites artères et les capillaires présentaient des modifications en nombre et en structure afin de s'adapter à une situation pathologique d'hypertension (Intengan *et al.*, 1999; Intengan *et al.*, 1998; Sabri *et al.*, 1998; Sharifi *et al.*, 1998a; Sharifi *et al.*, 1998b). L'administration de certains traitements antihypertenseurs a également été étudiée, et ce, afin de prévenir ces changements vasculaires (Sabri *et al.*, 1998; Schachter, 1991).

Les endothélines (ET) sont des peptides vasoconstricteurs puissants et semblent impliqués dans l'hypertension artérielle. Ces peptides sont produits par différents tissus, particulièrement par l'endothélium des vaisseaux sanguins. L'ET-1 est l'endothéline principale sécrétée par cet endothélium, et agit de manière paracrine ou autocrine sur les vaisseaux sanguins, par interaction avec les récepteurs ET_A et ET_B des cellules musculaires lisses, et ce, afin de stimuler leur contraction et croissance. L'ET-1 agit également sur les récepteurs ET_B des cellules endothéliales afin d'induire le relâchement de vasorelaxants, comme l'oxyde nitrique et les prostaglandines (Schiffrin, 1998a). Cette endothéline est surexprimée dans les parois des vaisseaux de plusieurs modèles d'hypertension dépendant du sel, dont les rats hypertendus DOCA-sel (Sharifi *et al.*, 1998; Doucet *et al.*, 1996; Sventek *et al.*, 1996; Schiffrin *et al.*, 1995; Larivière *et al.*, 1993). L'effet vasoconstricteur et promoteur de croissance de l'ET-1 pourraient contribuer, respectivement, à l'élévation de la pression artérielle et à l'hypertrophie vasculaire chez les modèles hypertendus qui surexpriment ce peptide dans leurs vaisseaux.

(Schiffrin, 1998a) Les modifications vasculaires, engendrées par l'ET-1, ont été bien démontrées par l'efficacité des agents thérapeutiques utilisés (Schiffrin, 1999; Matsumura *et al.*, 1999; Intengan *et al.*, 1998; Li *et al.*, 1994).

Dans la première partie de notre étude, nous avons donc analysé les modifications de la microvasculature des régions sous-épicaudique et sous-endocardique du myocarde, plus susceptibles de devenir ischémiques, ainsi que le rôle potentiel de l'ET-1 dans ces changements chez les rats DOCA-sel (Frohlich, 2000; Hittinger *et al.*, 1989; Lee *et al.*, 1981). En fait, il a déjà été souligné que l'Ang II pouvait amener des modifications dans le nombre d'artéioles et de capillaires chez les rats Wistar traités à l'Ang II, et que l'administration d'un antagoniste des récepteurs de ce peptide pouvait prévenir les changements microvasculaires observés (Sabri *et al.*, 1998). Ainsi, par une méthode similaire, nous avons pu, dans notre étude, constater des modifications dans la densité des microvaisseaux des rats DOCA-sel, comparativement au contrôle unilatéralement néphrectomisé.

Ainsi, une augmentation de la densité des artéioles et une diminution de la densité des capillaires au niveau de la couche sous-endocardique ont été observées. Suite à l'administration d'un antagoniste du récepteur ET_A de l'endothéline, une prévention partielle de ces anomalies microvasculaires a été constatée, signifiant l'action potentielle de ce peptide dans ces modifications vasculaires. Puisqu'une augmentation de la densité des artéioles fut observée, nous avons soulevé l'hypothèse d'une croissance artériolaire dans la région sous-endocardique du myocarde. Jusqu'à maintenant, le site d'origine des nouvelles artéioles à l'intérieur du réseau microvasculaire demeure inconnu. Il est communément accepté que les capillaires croissent par embranchement à

l'intérieur de l'interstitium (Nehls *et al.*, 1992; Folkman, 1986). Par contre, le processus d'angiogénèse par embranchement n'a toujours pas été observé pour les artérioles. Nous avons donc émis l'hypothèse selon laquelle un développement artériolaire pourrait s'effectuer selon un phénomène d'artérialisation.

Plusieurs explications ont été émises quant aux mécanismes possibles reliés à ce phénomène d'artérialisation. Nelhs et Drenckhahn (Nehls *et al.*, 1992) ont suggéré que des péricytes entourant les capillaires puissent être des précurseurs à la formation de cellules musculaires lisses. Ainsi, lorsque la différenciation des péricytes s'effectue, il y a formation de "méta-artérioles". Une deuxième explication à ce phénomène est que les cellules musculaires lisses, préexistantes au niveau des artérioles, migrent au niveau des capillaires, "artérialisant" alors ces derniers. Ainsi, il est possible, par ces deux mécanismes, que des capillaires puissent avoir été entourés par des cellules musculaires lisses envahissantes, expliquant ainsi l'augmentation de la densité des artérioles par mm^2 de tissu observée. Ensuite, l'augmentation de la résistance au flot sanguin due à cette élongation artériolaire et le spasme des artérioles ont pu alors conduire à une raréfaction fonctionnelle suivi d'une raréfaction anatomique, que nous avons observée sous forme de diminution de la densité des capillaires. Récemment, quelques études ont discuté de ce phénomène et l'ont nommé l'artériogénèse (Buschmann *et al.*, 2000; Hungerford *et al.*, 1999; Price *et al.*, 1994). Il semble, d'après ces études, que ce phénomène se produirait comme discuté ci-haut, c'est-à-dire selon une invasion des cellules musculaires sur des capillaires préexistants, qui servirait ainsi de gabarit de base à leur croissance. Toutefois, les mécanismes et les stimuli précis pouvant initier ce phénomène d'artérialisation ne sont pas bien élucidés. Il semblerait que parmi les stimuli possibles, des processus hormonaux ou

reliés à l'hypoxie ainsi que des stress hémodynamiques pourraient, à différents degrés, initier le développement artériolaire. Aussi, comme l'ET-1 est un peptide engendrant une variété d'effets biologiques, incluant la contraction, la croissance et la migration des cellules musculaires lisses, il serait plausible d'émettre l'hypothèse que ce peptide pourrait être impliqué dans le développement des cellules musculaires artérielles *in vivo* (Li *et al.*, 1994; Bobik *et al.*, 1990; Yanagisawa *et al.*, 1988). De plus, l'ET-1 pourrait induire la migration de ces cellules musculaires lisses, phénomène qui a d'ailleurs déjà été observé en présence de faible concentration de facteur de croissance dérivé des plaquettes (PDGF) ou d'Ang II (Kohno *et al.*, 1998). L'étude de Yanagisawa a également déjà signalé que l'administration d'un antagoniste du récepteur ET_A de l'endothéline, le BQ-123, inhibait cette migration des cellules musculaires lisses d'une manière dose dépendante (Yanagisawa *et al.*, 1988). Nous pouvons donc suggérer, selon ces résultats, que la famille des endothélines, spécifiquement l'ET-1, pourrait induire la croissance et la migration de cellules musculaires en combinaison avec le PDGF ou l'Ang II, et ce, probablement via le récepteur ET_A. Les résultats de notre étude démontrent, en fait, qu'une prévention partielle des modifications observées dans la densité des artérioles et des capillaires est possible par l'administration d'un antagoniste du récepteur ET_A de l'endothéline. Donc, l'ET-1 pourrait agir comme médiateur dans le processus d'artérialisation qui se développe dans le coeur des rats DOCA-sel.

En fait, ces résultats sont importants, puisque les capillaires sont les seuls vaisseaux responsables de l'apport en oxygène et en nutriments aux tissus. Donc, les altérations de ces microvaisseaux dans la maladie microvasculaire, particulièrement, joue un rôle de premier plan dans l'apparition de l'hypoxie

myocardique à laquelle est exposée le coeur dans l'hypertension artérielle. Ainsi, puisque le coeur est un muscle constamment sollicité, l'approvisionnement en oxygène est critique et important. Un raccourcissement de la longueur des capillaires, dû à l'invasion des cellules musculaires lisses des artéioles, et une réduction du nombre de capillaires fonctionnels causée par la fermeture réversible ou permanente de ceux-ci, diminueraient alors la capacité de diffusion de l'oxygène. À ce sujet, il a déjà été signalé que la vulnérabilité à l'hypoxie est particulièrement importante au niveau de la région sous-endocardique du myocarde du ventricule gauche (Lee *et al.*, 1981; Hittinger *et al.*, 1989). Il est alors intéressant de noter que les anomalies microvasculaires de notre étude ont été observées principalement à ce niveau, c'est-à-dire dans la région la plus vulnérable aux événements hypoxiques.

La diminution de la densité des capillaires a été décrite dans de nombreux modèles d'hypertension (Hansen-Smith *et al.*, 1996; Hernandez *et al.*, 1992), et sous perfusion d'Ang II *in vivo* (Sabri *et al.*, 1998). Quelques études concernant la densité des capillaires ont déjà été effectuées chez le rat. Citons ceux de Dowell (Dowell, 1977) qui a observé une très grande diminution de l'activité de la phosphatase alcaline (indicatif de la CD) dans la région sous-endocardique du myocarde comparativement à la région sous-épicardique dans les coeurs de rats hypertrophiés avec une constriction aortique. Des observations similaires ont également été reportées par Gerdes (Gerdes *et al.*, 1979.; Gerdes *et al.*, 1980) chez des rats ayant une hypertrophie cardiaque avec hyperthyroïdie, ainsi que par Wiener et par Rakusan chez des rats ayant une hypertrophie induite par une constriction aortique (Rakusan *et al.*, 1980; Wiener *et al.*, 1979).

Également, un deuxième phénomène, la raréfaction, pourrait être mis en cause dans la diminution de la densité des capillaires observée, en plus de l'invasion des cellules musculaire lisses. Dans notre étude, nous pouvons envisager la possibilité que l'ET-1, par son pouvoir vasoconstricteur, amènerait un processus de raréfaction fonctionnelle, en premier lieu, par la constriction des méta-artérioles qui agissent comme des sphincters, et par le collapse des capillaires en aval. Ce phénomène pourrait être associé à une augmentation de la résistance au flux sanguin, ce qui engendrait l'apparition de facteurs hémodynamiques et hormonaux stimulant l'élongation de l'arbre artériolaire au niveau des capillaires. Le blocage des récepteurs ET_A, qui a remédié en partie à l'apparition de ce phénomène d'artérialisation, suggère le rôle probable de l'ET-1 dans ce phénomène. Ainsi, des variables hémodynamiques (incluant la pression) et métaboliques, probablement, contribueraient ensemble avec l'ET-1, et peut-être même avec d'autres stimuli hormonaux, à la croissance vasculaire et au processus de raréfaction possible observés dans la région sous-endocardique des coeurs des rats hypertendus DOCA-sel.

Ensuite, il y a évidence que l'ET-1 induit la croissance du coeur et contribue à l'hypertrophie ventriculaire ainsi qu'à la déposition de collagène dans la matrice extracellulaire (Thauraux *et al.*, 1999; Kaddoura *et al.*, 1996). Il est certain que l'hypertrophie cardiaque pourrait avoir un effet confondant sur les changements artériolaires et capillaires observés chez le modèle de rat hypertendu DOCA-sel. Cependant, il ne semble pas que l'hypertrophie soit en cause en ce qui concerne les changements observés dans la microvasculature, puisqu'aucune différence n'a été constatée en ce qui concerne l'hypertrophie du groupe DOCA-sel et celui traité à l'antagoniste, contrairement à ce qui se produit avec la densité des

microvaisseaux. Ceci nous amène à suggérer que les changements microvasculaires observés ne soient pas reliés et attribués à l'hypertrophie ventriculaire, mais bien à d'autres facteurs. Ainsi, une des limitations de notre étude était la différence possible dans la composition cellulaire et la déposition de collagène entre les groupes à l'étude, car celles-ci pourraient potentiellement contribuer aux changements de densités observés. En effet, le remodelage du coeur, l'apoptose et la fibrose peuvent résulter en des altérations de la densité vasculaire (Korff *et al.*, 1999). Ainsi, afin d'obtenir davantage d'informations sur ces variables, nous avons effectué une deuxième partie à cette étude qui a consistée, chez le même modèle d'hypertension DOCA-sel, en l'étude du collagène, une protéine principalement reliée à la fibrose et au remodelage cardio-vasculaire.

Donc, une deuxième altération, relativement fréquente et reliée à l'hypertension, qui altère la structure et la fonction du coeur est la fibrose du myocarde. Principalement, cette fibrose est caractérisée par une accumulation excessive de collagène de type I et III dans la matrice extracellulaire. La stimulation de la synthèse de collagène par les fibroblastes est favorisée par des facteurs hormonaux (aldostérone et Ang II) et hémodynamiques, (Nicoletti *et al.*, 1996; Crawford *et al.*, 1994; Brilla *et al.*, 1992) mais aussi par de nombreux facteurs de croissance comme le TGF- β , le bFGF, l'IGF-1 et le PDGF (Fischer *et al.*, 1997; Simm *et al.*, 1997; Sigel *et al.*, 1996; Bastagli *et al.*, 1995; Butt *et al.*, 1995; Kardami *et al.*, 1995; Lee *et al.*, 1995; Lembo *et al.*, 1995; Donohue *et al.*, 1994; Hsu *et al.*, 1994). En fait, les fibroblastes, situés dans l'espace interstitiel cardiaque, sont responsables de la synthèse et de la sécrétion des diverses protéines de la matrice extracellulaire, lesquelles participent activement à maintenir la morphologie cardiaque et agissent comme support tissulaire afin d'optimiser le travail mécanique

du coeur dans des conditions physiologiques normales (Borg *et al.*, 1996). Toutefois, lorsque se produit une élévation de pression intraventriculaire et un volume de remplissage cardiaque important, différents facteurs hormonaux et de croissance peuvent induire une hyperplasie des fibroblastes et une accumulation de protéines dans la matrice extracellulaire, lesquelles induisent alors l'apparition de fibrose cardiaque et de remodelage ventriculaire (Conrad *et al.*, 1995; Weber *et al.*, 1995).

Les résultats de notre étude ont démontré, à ce propos, une accumulation de collagène dans les diverses régions du myocarde du ventricule gauche chez les rats hypertendus DOCA-sel. Particulièrement, les augmentations les plus notables en ce qui concerne la déposition de collagène étaient situées au niveau périvasculaire, dans la région sous-épicaudique du myocarde, et au niveau interstitiel et périvasculaire dans les régions sous-endocardique et mid-myocardique du myocarde. Il est intéressant de noter que, suite au traitement à l'antagoniste du récepteur ET_A de l'endothéline, aucune différence notable au niveau de l'hypertrophie ventriculaire comparativement au rat hypertendu DOCA-sel non traité n'a été observée, mais une diminution drastique du collagène est apparue. Relativement à ces résultats, les niveaux d'ARNm des procollagènes I et III ont augmentés dans les coeurs de rats DOCA-sel, et, toujours suite au traitement à l'antagoniste du récepteur ET_A de l'endothéline, une diminution de ces mêmes procollagènes fut significativement observée. Afin d'élucider ce phénomène, l'étude du TGFβ₁, un facteur de croissance impliqué dans la stimulation de la synthèse du collagène, a été effectuée. Ainsi, nous avons remarqué que, dans la première semaine, l'expression du TGFβ₁ cardiaque a augmenté dans le ventricule gauche chez les rats DOCA-sel et que celle-ci était significativement réduite

consécutivement à l'administration de l'antagoniste à l'étude. Tous ces résultats suggèrent un rôle critique de l'endothéline, particulièrement l'ET-1, en ce qui concerne l'activation de la fibrose cardiaque dans l'hypertension minéralocorticoïde, ceci pouvant être le résultat d'une augmentation de la synthèse du collagène via un composant dépendant du $TGF\beta_1$.

Également, il est intéressant de noter qu'une récente étude (Rothermund *et al.*, 2000) utilisant un rat hypertendu transgénique (rat Ren2), surexprimant l'endothéline-1, a également observé l'apparition de fibrose au niveau du ventricule gauche. Toutefois, l'administration d'un antagoniste du récepteur ET_A de l'endothéline, le Lu-135252, n'a pas semblé diminuer cette accumulation, et ce, malgré l'activation du système ET. Ceci pourrait alors être expliqué par des différences entre les modèles (notre modèle est hypertendu consécutivement à l'administration de minéralocorticoïdes et de sel) utilisés au niveau de l'expression des enzymes de dégradation du collagène. En effet, comme discuté dans l'introduction, l'accumulation (et la diminution, par le fait même) de collagène au niveau de la matrice extracellulaire, résulte d'un équilibre entre la synthèse et la dégradation de cette protéine. Il pourrait alors être intéressant, à ce sujet, de faire l'étude de l'activation des différents systèmes de dégradation des protéines de la matrice, dans le modèle DOCA-sel et transgénique (Ren2), comme par exemple, au niveau des métalloprotéases de la matrice (MMP). Ceci pourraient nous permettre de distinguer et de mettre en évidence le rôle possible des systèmes de dégradation dans l'apparition de la fibrose ventriculaire.

De plus, dans notre étude, comme l'hypertrophie ventriculaire observée chez les rats DOCA-sel n'a pas été corrigée par l'administration de l'antagoniste du récepteur ET_A de l'ET, il semble alors que l'ET-1 stimulerait directement les

fibroblastes interstitiels cardiaques pour la synthèse du collagène. Des résultats semblables ont également été signalés dans un modèle similaire, consécutivement à l'administration d'inhibiteurs du système rénine-angiotensine, c'est-à-dire une diminution de la fibrose cardiaque sans changement au niveau de l'hypertrophie ventriculaire (Brown *et al.*, 1999). En fait, l'hypertrophie cardiaque ne signifie pas nécessairement une augmentation dans la déposition de collagène. Effectivement, il a déjà été observé, par plusieurs études, autant chez les modèles animaux et humains, des conditions d'hypertrophie des cardiomyocytes indépendamment de la synthèse et de l'accumulation du collagène (Schwartz *et al.*, 1996; Michel *et al.*, 1986). Il aurait toutefois été intéressant, lors de notre étude, de mettre en place des mesures des pressions systoliques (+dp/dt), diastolique (-dp/dt) et télédiastolique, particulièrement au niveau du ventricule gauche qui subit l'hypertrophie. En effet, ces mesures auraient permis de constater si la réduction de la fibrose à ce niveau par le traitement antihypertenseur, permet une meilleure fonction diastolique, et ce, malgré une absence de régression de l'hypertrophie gauche. Effectivement, une dysfonction diastolique du ventricule gauche est souvent la cause de nombreuses complications reliées à l'hypertension.

La présence de la fibrose dépendante de l'endothéline chez les rats DOCA-sel est apparue, donc, de façon prédominante au niveau des régions interstitielle et périvasculaire dans la zone sous-endocardique, et périvasculaire majoritairement dans la zone sous-épicardique. Il est intéressant de noter, à ce niveau, la relation entre la déposition de collagène interstitiel et la localisation des changements microvasculaires (artérioles et capillaires) observée dans la première partie de l'étude chez le rat DOCA-sel. Ainsi, il semble qu'un mécanisme commun pourrait relier la fibrose cardiaque et les changements microvasculaires, puisque ces deux

phénomènes apparaissent suite à une production vasculaire accrue d'ET-1. Cependant, la relation existant entre ces deux phénomènes n'est toujours pas résolue, ce qui demeure alors un sujet d'étude ultérieur possible. Nous pouvons toutefois suggérer que le dépôt de collagène interstitiel excessif observé dans le coeur des rats DOCA-sel, consécutivement à l'augmentation du peptide ET-1, pourrait engendrer des modifications dans la structure et la fonction cardiaque responsable des changements microvasculaires observés. Ainsi, divers facteurs hormonaux et de croissance libérés avec l'ET-1 dans ces conditions pathologiques d'hypertension peuvent produire les différents changements observés dans le coeur des rat DOCA-sel.

Ensuite, l'étude de l'expression des ARNm des procollagènes I et III, au niveau des coeurs de rats DOCA-sel, a également été effectuée. Ces procollagènes sont des indicateurs de la synthèse des types de collagène I et III respectivement. Une augmentation dans leur expression a en fait été constatée par RT-PCR dans les coeurs de rats DOCA-sel, comparativement au contrôle. Aussi, l'administration de l'antagoniste du récepteur ET_A de l'endothéline semble diminuer cette surexpression, suggérant l'activation de ce type de récepteur au niveau des fibroblastes dans le phénomène de synthèse des collagènes I et III. D'ailleurs, Thauraux *et al.* avait déjà constaté une activation du promoteur du procollagène I par l'ET-1, ce qui pourrait amener à conclure l'importance du rôle de cette endothéline dans la promotion de la synthèse accrue de collagène, particulièrement de type I.

CONCLUSION

Chez les rats hypertendus DOCA-sel, une augmentation de la densité artériolaire et une diminution de la densité des capillaires, ainsi qu'une accumulation de collagène interstitielle et périvasculaire ont été observées dans le myocarde du ventricule gauche des rats DOCA-sel. L'administration de l'antagoniste du récepteur ET_A de l'endothéline a permis de corriger partiellement les changements microvasculaires et a empêché l'accumulation de collagène observée chez les rats DOCA-sel. Ceci nous a permis de suggérer un rôle pour l'ET-1 dans ces changements microvasculaires et dans le dépôt de collagène. Toutes ces modifications observées peuvent avoir des implications physiopathologiques dans l'hypertension par leur contribution à l'ischémie myocardique et à la fibrose ventriculaire. Ainsi, nos résultats suggèrent que l'administration d'un antagoniste du récepteur ET_A de l'endothéline améliore la circulation coronaire et que le blocage du système de l'endothéline au niveau de ce récepteur ET_A pourrait exercer des effets bénéfiques dans l'hypertension.

CHAPITRE 5: BIBLIOGRAPHIE

1. Anversa P, Capasso JM. Loss of intermediate-sized coronary arteries and capillary proliferation after left ventricular failure in rats. *Am J Physiol (Heart Circ Physiol)* 1991;260:H1552-H1560.
2. Anversa P, Giacomelli F, Wiener J. Regional variation in capillary permeability of ventricular myocardium. *Microvasc Res.* 1973;6:273-285.
3. Arai H, Hori S, Aramori I, Ohkubo H, Nakanishi S. Cloning and expression of a cDNA encoding an endothelin receptor. *Nature.* 1990;20-27;348:730-2.
4. Arai H, Nakao K, Takaya K, Hosoda K, Ogawa Y, Nakanishi S, Imura H. The human endothelin-B receptor gene. Structural organization and chromosomal assignment. *J Biol Chem.* 1993;268:3463-70.
5. Bastagli L, Lazzarotto T, Caldarera CM, Guarnieri C, Ventura C, Pepe G, Puddu P. Presence of basic fibroblast growth factor in cultured rat cardiomyocytes and its release in culture medium. *Ann N Y Acad Sci.* 1995;752:417-21.
6. Bishop JE, Laurent GJ. Collagen turnover and its regulation in the normal and hypertrophying heart. *Eur Heart J.* 1995;16:38-44.
7. Bobik A, Grooms A, Millar JA, Mitchell A, Grinpukel S. Growth factor activity of endothelin on vascular smooth muscle. *Am J Physiol (Cell Physiol).* 1990;258:C408-C415.
8. Booz GW, Baker KM. Molecular signaling mechanism controlling growth and function of cardiac fibroblasts. *Cardiovasc Res.* 1995;30:537-543.

9. Borg TK, Rubin K, Carver W, Samarel A et Terracio L. The cell biology of the cardiac interstitium. *Trends Cardiovasc Med.* 1996;6:65-70.
10. Borg TK, Caulfield JB. The collagen matrix of the heart. *Fed Proc.* 1981;40:2037-2041.
11. Branton MH, Kopp JB. TGF-beta and fibrosis. *Microbes Infect.* 1999;1:1349-65.
12. Breisch EA, White FC, Nimmo LE, Bloor CM. Cardiac vasculature and flow during pressure-overload hypertrophy. *Am J Physiol.* 1986;251:H1031-7.
13. Brilla CG. The cardiac structure-function relationship and the renin-angiotensin-aldosterone system in hypertension and heart failure. *Curr Opin Cardiol.* 1994;9:S2-S10.
14. Brilla CG, Pick R, Tan LB, Janicki JS, Weber KT. Remodeling of the rat right and left ventricles in experimental hypertension. *Circ Res.* 1990;67:1355-1364.
15. Brilla CG, Weber KT. Reactive and reparative myocardial fibrosis in arterial hypertension in the rat. *Cardiovasc Res.* 1992;26:671-7.
16. Brilla CG, Zhou G, Matsubara L, Weber KT. Collagen metabolism on cultured adult rat cardiac fibroblasts: response to angiotensin II and aldosterone. *J Mol Cell cardiol.* 1994;26:809-820.
17. Brooks WW, Conrad CH. Myocardial fibrosis in transforming growth factor beta(1)heterozygous mice. *J Mol Cell Cardiol.* 2000;32:187-95.

18. Brown L, Duce B, Miric G, Sernia C. Reversal of cardiac fibrosis in deoxycorticosterone acetate-salt hypertensive rats by inhibition of the renin-angiotensin system. *J Am Soc Nephrol.* 1999;10:S143-8.
19. Brush JE, Cannon RO, Schenke WH, Bonow RO, Leon MB, Maron BJ, Epstein SE. Angina due to coronary microvascular disease in hypertensive patients without left ventricular hypertrophy. *N Engl J Med.* 1988; 319:1302-07.
20. Burgess ML, Carver WE, Terracio L, Wilson SP, Wilson MA, Borg TK. Integrin-mediated collagen gel contraction by cardiac fibroblasts: effects of angiotensin II. *Circ Res.* 1994;74:291-298.
21. Burton AC. *Physiology and biophysics of the circulation.* Year book Med. Publ., Chicago, 1965.
22. Buschmann I, Schaper W. The pathophysiology of the collateral circulation (arteriogenesis). *J Pathol.* 2000;190:338-42.
23. Butt RP, Laurent GJ, Bishop JE. Mechanical load and polypeptide growth factors stimulate cardiac fibroblast activity. *Ann N Y Acad Sci.* 1995;752:387-93.
24. Chalkley HW, Algive GH, Morris HP. Effect of the level of dietary protein on vascular repair wounds. *J. Natl. Cancer inst.* 1946;6 :363-372.
25. Chapman D, Weber KT, Eghabali M. Regulation of fibrillar collagen type I and III and basement membrane type IV collagen gene expression in pressure overloaded rat myocardium. *Circ Res.* 1990;67:787-794.
26. Chin MH, Goldman L. Factors contributing to the hospitalization of patients with congestive heart failure. *Am J Public Health.* 1997;87:643-8.

27. Choy M, Armstrong MT, Armstrong PB. Regulation of proliferation of embryonic heart mesenchyme: role of transforming growth factor-beta 1 and the interstitial matrix. *Dev Biol.* 1990;141:421-5.
28. Clark ER, Clark EL. Observations on changes in blood vascular endothelium in the living animal. *Am J Anat.* 1935;57:385-438.
29. Conrad CH, Brooks WW, Hayes JA, Sen S, Robinson KG, Bing OH. Myocardial fibrosis and stiffness with hypertrophy and heart failure in the spontaneously hypertensive rat. *Circulation.* 1995;91:161-70.
30. Crawford DC, Chobanian AV, Brecher P. Angiotensin II induces fibronectin expression associated with cardiac fibrosis in the rat. *Circ Res.* 1994;74:727-39.
31. Davenport AP, Ashby MJ, Easton P, Ella S, Bedford J, Dickerson C, Nunez DJ, Capper SJ, Brown MJ. A sensitive radioimmunoassay measuring endothelin-like immunoreactivity in human plasma: comparison of levels in patients with essential hypertension and normotensive control subjects. *Clin Sci (Colch).* 1990;78:261-4.
32. Day R, Larivière R, Schiffrin EL. *In situ* hybridization shows increased endothelin-1 mRNA levels in endothelial cells of blood vessels of deoxycorticosterone acetate-salt hypertensive rats. *Am J Hypertens.* 1995;8:294-300.
33. Donohue TJ, Dworkin LD, Lango MN, Fliegner K, Lango RP, Benstein JA, Slater WR, Catanese VM. Induction of myocardial insulin-like growth factor-I gene expression in left ventricular hypertrophy. *Circulation.* 1994;89:799-809.

34. Doucet J, Gonzalez W, Michel JB. Endothelin antagonists in salt-dependent hypertension associated with renal insufficiency. *J Cardiovasc Pharmacol.* 1996;27:643-51.
35. Dowell RT. Hemodynamic factors and vascular density as potential determinants of blood flow in hypertrophied rat heart. *Proc Soc Exp Biol Med.* 1977;154 :423-426.
36. Eghbali M, Blumenfeld OO, Seifter S, Buttrick PM, Leinwand LA, Robinson TF, Zern MA, Gimbrone MA. Localization of types I, III, IV collagen mRNAs in rat heart cells by *in situ* hybridization. *J Mol Cell Cardiol.* 1989a;21:103-113.
37. Eghbali M, Czaja MJ, Zeydel M, Weiner FR, Zern MA, Seifter S, Blumenfeld OO. Collagen chain mRNAs in isolated heart cells from young and adult rats. *J Mol Cell Cardiol.* 1988;20:267-76.
38. Eghbali M, Eghbali M, Robinson TF, Seifter S, Blumenfeld OO. Collagen accumulation in heart ventricles as a function of growth and aging. *Cardiovasc Res.* 1989b;23:723-9.
39. Eghbali M, Tomek R, Sukhatme VP, Woods C, Bhambi B. Differential effects of transforming growth factor-beta 1 and phorbol myristate acetate on cardiac fibroblasts. Regulation of fibrillar collagen mRNAs and expression of early transcription factors. *Circ Res.* 1991;69:483-90.
40. Elshourbagy NA, Korman DR, Wu HL, Sylvester DR, Lee JA, Nuthalaganti P, Bergsma DJ, Kumar CS, Nambi P. Molecular characterization and regulation of the human endothelin receptors. *J Biol Chem.* 1993;268:3873-9.

41. Engelmann GL. Coordinate gene expression during neonatal rat heart development. A possible role for the myocyte in extracellular matrix biogenesis and capillary angiogenesis. *Cardiovasc Res.* 1993;27:1598-605.
42. Ergul S, Parish DC, Puett D, Ergul A. Racial differences in plasma endothelin-1 concentrations in individuals with essential hypertension. *Hypertension.* 1996;28:652-5.
43. Fareh J, Touyz RM, Schiffrin EL, Thibault G. Endothelin-1 and angiotensin II receptors in cells from rat hypertrophied heart. Receptor regulation and intracellular Ca^{2+} modulation. *Circ Res.* 1996;78:302-11.
44. Fareh J, Touyz RM, Thibault G, Schiffrin EL. Basal and angiotensin II-induced cytosolic free calcium in adult rat cardiomyocytes and fibroblasts after volume overload. *Hypertension.* 1995;26:1149-1153.
45. Farhadian F, Contard F, Sabri A, Samuel J-L, Rappaport L. Fibronectine and basement membrane in cardiovascular organogenesis and disease pathogenesis. *Cardiovasc Res.* 1996;32:433-442.
46. Fawcett, DW. Comparative observations on the fine structure of blood capillaries. In: *the peripheral Blood Vessels*, J.L. Orbison and D. Smith. Baltimore, MD :Williams & Wilkins, 1963, p.17-44.
47. Fischer TA, Ungureanu-Longrois D, Singh K, de Zengotita J, DeUgarte D, Alali A, Gadbut AP, Lee MA, Balligand JL, Kifor I, Smith TW, Kelly RA. Regulation of bFGF expression and Ang II secretion in cardiac myocytes and microvascular endothelial cells. *Am J Physiol.* 1997;272:H958-68.
48. Folkman J. Angiogenesis in cancer, vascular, rheumatoid and other disease. *Nat Med.* 1995;1:27-31.
49. Folkman J. Tumor angiogenesis factor. *Cancer Res.* 1974;34:2109-2113.

50. Frank JS, Langer GA. The myocardial interstitium: its structure and its role in ionic exchange. *J Cell Biol.* 1974; 60:586-601.
51. Frohlich ED. Ischemia and fibrosis: the risk mechanisms of hypertensive heart disease. *Braz J Med Biol Res.* 2000;33:693-700.
52. Ganau A, Devereux RB, Roman MJ, de Simone G, Pickering TG, Saba PS, Vargiu P, Simongini I, Laragh JH. Patterns of left ventricular hypertrophy and geometric remodeling in essential hypertension. *J Am Coll Cardiol.* 1992;19:1550-8.
53. Gerdes AM, Callas G, Kasten FH. Differences in regional capillary distribution and myocytes sizes in normal and hypertrophic rat hearts. *Am J anat.* 1979;156:523-531.
54. Gerdes AM, Kasten FH. Morphometric study of endomyocardium and epicardium of the left ventricle in adult dogs. *Am J anat.* 1980;159:389-394.
55. Glasser SP. Hypertension, hypertrophy, hormones, and the heart. *Am Heart J.* 1998;135:S16-20.
56. Gourley M, Williamson JS. Angiogenesis: new targets for the development of anticancer chemotherapies. *Curr Pharm Des.* 2000;6:417-39.
57. Greene AS, Tonellato PJ, Lui J, Lombard JH, Cowley AW Jr. Microvascular rarefaction and tissue vascular resistance in hypertension. *Am J Physiol.* 1989;256:H126-H131.
58. Griffioen AW, Molema G. Angiogenesis: potentials for pharmacologic intervention in the treatment of cancer, cardiovascular diseases, and chronic inflammation. *Pharmacol Rev.* 2000;52:237-68.
59. Guarda E, Katwa LC, Myers PR, Tyagi SC, Weber KT. Effects of endothelins on collagen turnover in cardiac fibroblasts. *Cardiovasc Res.* 1994; 27:2130-2134.

60. Hansen-Smith FM, Greene AS, Cowley AW Jr, Lombard JH. Structural changes during microvascular rarefaction in chronic hypertension. *Hypertension*. 1990;15:922-928.
61. Hansen-Smith FM, Morris LW, Green AS, Lombard JH. Rapid microvessel rarefaction with elevated salt intake and reduced renal mass hypertension in rats. *Circ Res* 1996;79:324-330.
62. Hosoda K, Nakao K, Hiroshi-Arai, Suga S, Ogawa Y, Mukoyama M, Shirakami G, Saito Y, Nakanishi S, Imura H. Cloning and expression of human endothelin-1 receptor cDNA. *FEBS Lett*. 1991;287:23-6.
63. Haynes WG, Webb DJ. The endothelin family of peptides: local hormones with diverse roles in health and disease? *Clin Sci*. 1993;84:485-500.
64. He J, Whelton PK. Elevated systolic blood pressure as a risk factor for cardiovascular and renal disease. *J Hypertens Suppl*. 1999;17:S7-13.
65. Hedin U, Roy J, Tran PK, Lundmark K, Rahman A. Control of smooth muscle cell proliferation--the role of the basement membrane. *Thromb Haemost*. 1999;82:23-6.
66. Hernandez I, Cowley AW Jr, Lombard JH, Green AS. Salt intake and angiotensin II alter microvessel density in the cremaster muscle of normal rats. *Am J Physiol (Heart Circ Physiol)*. 1992;263:H664-H667.
67. Hinglais N, Heudes D, Nicoletti A, Mandet C, Laurent M, Bariéty J, Michel JB. Colocalization of myocardial fibrosis and inflammatory cells in rats. *Lab Invest*. 1994;70:286-94.

68. Hittinger L, Shannon RP, Bishop SP, Gelpi RJ, Vatner SF. Subendomyocardial exhaustion of blood flow reserve and increased fibrosis in conscious dogs with heart failure. *Circ Res.* 1989;65:971-980.
69. Hoppeler H, Weibel ER. Limits for oxygen and substrate transport in mammals. *J Exp Biol.* 1998;201:1051-64.
70. Hsu D, Knudson PE, Zapf A, Rolband GC, Olefsky JM. NPXY motif in the insulin-like growth factor-I receptor is required for efficient ligand-mediated receptor internalization and biological signaling. *Endocrinology.* 1994;134:744-50.
71. Hudlicka O. *Muscle blood flow : its relation to muscle metabolism and function .* Amsterdam :Swets & Zeitlinger, 1973.
72. Hudlicka O. Effect of training on macro- and microcirculation changes in exercise. *Exercise Sport Sci Rev.* 1977;5:181-230.
73. Hungerford JE, Little CD. Developmental biology of the vascular smooth muscle cell: building a multilayered vessel wall. *J Vasc Res.* 1999;36:2-27.
74. Ihara M, Noguchi K, Saeki T, Fukuroda T, Tsuchida S, Kimura S, Fukami T, Ishikawa K, Nishikibe M, Yano M. Biological profiles of highly potent novel endothelin antagonists selective for the ETA receptor. *Life Sci.* 1992;50:247-55.
75. Inoue A, Yanagisawa M, Kimura S, Kasuya Y, Miyachi T, Goto K, Masaki T. The human endothelin family: three structurally and pharmacologically distinct isopeptides predicted by three separate genes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1989;86:2863-7.
76. Intengan HD, He G, Schiffrin EL. Effect of vasopressin antagonism on structure and mechanics of small arteries and vascular expression of endothelin-1 in

- deoxycorticosterone acetate salt hypertensive rats. *Hypertension*. 1998;32:770-7.
77. Intengan HD, Park JB, Schiffrin EL. Blood pressure and small arteries in DOCA-salt-treated genetically AVP-deficient rats: role of endothelin. *Hypertension*. 1999;34:907-13.
78. Intengan HD, Schiffrin EL. Effect of vasopressin antagonism on structure and mechanics of small arteries and vascular expression of endothelin-1 in deoxycorticosterone acetate salt hypertensive rats. *Hypertension*. 1998;32:770-7.
79. Ito H, Hirata Y, Adachi S, Tanaka M, Tsujino M, Koike A, Nogami A, Murumo F, Hiroe M. Endothelin-1 is an autocrine/paracrine factor in the mechanism of angiotensin II-induced hypertrophy in cultured rat cardiomyocytes. *J Clin Invest*. 1993;92:398-403.
80. Joki N, Kaname S, Hirakata M, Hori Y, Yamaguchi T, Fujita T, Katoh T, Kurokawa K. Tyrosine-kinase dependent TGF-beta and extracellular matrix expression by mechanical stretch in vascular smooth muscle cells. *Hypertens Res*. 2000;23:91-9.
81. Ju H, Dixon IM. Extracellular matrix and cardiovascular diseases. *Can J Cardiol*. 1996;12:1259-67.
82. Kaddoura S, Firth JD, Boheler KR, Sugden PH, Poole-Wilson PA. Endothelin-1 is involved in norepinephrine-induced ventricular hypertrophy in vivo. Acute effects of bosentan, an orally active, mixed endothelin ET_A and ET_B receptor antagonist. *Circulation*. 1996;93:2068-79.
83. Kaley, G. *Microcirculation*. Vol.1. BM Altura (editors). Baltimore, MD :University Park, 1977.

84. Kardami E, Liu L, Kishore S, Pasumarthi B, Doble BW, Cattini PA. Regulation of basic fibroblast growth factor (bFGF) and FGF receptors in the heart. *Ann N Y Acad Sci.* 1995;752:353-69.
85. Kim NM, Villareal FJ, Prinzt MP, Lee AA, Dillman WH. Trophic effects of angiotensin II on neonatal rat cardiac myocytes are mediated by cardiac fibroblasts. *Am J Physiol.* 1995;269:E426-E437.
86. Kohno M, Yasunari K, Murakawa K, Yokokawa K, Horio T, Fukui T, Takeda T. Plasma immunoreactive endothelin in essential hypertension. *Am J Med.* 1990;88:614-8.
87. Kohno M, Yokokawa K, Yasunari K, Kano H, Minami M, Yoshikawa J. Effect of the endothelin family of peptides on human coronary artery smooth-muscle cell migration. *J Cardiovasc Pharmacol* 1998;31:S84-S89.
88. Korff T, Augustin HG. Tensional forces in fibrillar extracellular matrices control directional capillary sprouting. *J Cell Sci.* 1999;112:3249-58.
89. Larivière R, Deng LY, Day R, Sventek P, Thibault G, Schiffrin EL. Increased endothelin-1 gene expression in the endothelium of coronary arteries and endocardium in the DOCA-salt hypertensive rat. *J Mol Cell Cardiol.* 1995;27:2123-2131.
90. Larivière R, Thibault G, Schiffrin EL. Increased endothelin-1 content in blood vessels of deoxycorticosterone acetate-salt hypertensive but not in spontaneously hypertensive rats. *Hypertension.* 1993;21:294-300.

91. Laurent GJ. Dynamic state of collagen : pathways of collagen degradation *in vivo* and their possible role in regulation of collagen mass. *Am J Physiol.* 1987;262 :H1012-H1021.
92. Lee JT, Ideker RE, Reimer KA. Myocardial infarct size and location in relation to the coronary vascular bed at risk in man. *Circulation.* 1981;64:526–534.
93. Lee AA, Dillmann WH, McCulloch AD, Villarreal FJ. Angiotensin II stimulates the autocrine production of transforming growth factor-beta 1 in adult rat cardiac fibroblasts. *J Mol Cell Cardiol.* 1995;27:2347-57.
94. Lembo G, Hunter JJ, Chien KR. Signaling pathways for cardiac growth and hypertrophy. Recent advances and prospects for growth factor therapy. *Ann N Y Acad Sci.* 1995;752:115-27.
95. Levy D, Larson MG, Vasan R, Kannel WB, Ho KKL. The progression from hypertension to congestive heart failure. *J Am Med Assoc.* 1996;275:1557-1562.
96. Li JM, Brooks G. Differential protein expression and subcellular distribution of TGFbeta1, beta2 and beta3 in cardiomyocytes during pressure overload-induced hypertrophy. *J Mol Cell Cardiol.* 1997;29:2213-24.
97. Li JS, Larivière R, Schiffrin EL. Effect of a nonselective endothelin antagonist on vascular remodeling in deoxycorticosterone acetate-salt hypertensive rats. Evidence for a role of endothelin in vascular hypertrophy. *Hypertension.* 1994;24:183-8.

98. Li JS, Schiffrin EL. Effect of chronic treatment of adult spontaneously hypertensive rats with an endothelin receptor antagonist. *Hypertension*. 1995;25:495-500.
99. Li JS, Turgeon A, Schiffrin EL. Effect of chronic treatment with two different ET_A-selective endothelin receptor antagonists on blood pressure and small artery structure of DOCA-salt hypertensive rats. *Amer J Hypertens*. 1998;11:554-562.
100. Libby P. The interface of atherosclerosis and thrombosis: basic mechanisms. *Vasc Med*. 1998;3:225-9.
101. Libby P, Sukhova G, Lee RT, Liao JK. Molecular biology of atherosclerosis. *Int J Cardiol*. 1997;62:S23-9.
102. Lin CQ, Bissell MJ. Multi-faceted regulation of cell differentiation by extracellular matrix. *FASEB J*. 1993;7:737-743.
103. Lombard JH, Greene AS, Cowley AW Jr, Liard JF. Microcirculation in rats with volume-expanded hypertension. In: Hansson L, Omae T, eds. *Mechanisms in Hypertension: New Aspects in Hemodynamics*. Raven Press Publishers, New York. 1989, p.11-20.
104. Luscher TF, Boulanger CM, Dohi Y, Yang Z. Endothelium-derived contracting factors. *Hypertension*. 1992;19:117-130.
105. Maguire JJ, Davenport AP. ETA receptor-mediated constrictor responses to endothelin peptides in human blood vessels in vitro. *Br J Pharmacol*. 1995;115:191-7.

106. Maguire JJ, Kuc RE, Davenport AP. Affinity and selectivity of PD156707, a novel nonpeptide endothelin antagonist, for human ET(A) and ET(B) receptors. *J Pharmacol Exp Ther.* 1997;280:1102-8.
107. Maisch B. Ventricular remodeling. *Cardiology.* 1996;87:2-10.
108. Marieb EN. Anatomie et physiologie humaines. 2e édition, édition du renouveau pédagogique, Saint-Laurent. 1999, p.659-665.
109. Matsumura Y, Hashimoto N, Taira S, Kuro T, Kitano R, Ohkita M, Opgenorth TJ, Takaoka M. Different contributions of endothelin-A and endothelin-B receptors in the pathogenesis of deoxycorticosterone acetate-salt-induced hypertension in rats. *Hypertension.* 1999;33:759-65.
110. McMurdo L, Lidbury PS, Thiemermann C, Vane JR. Mediation of endothelin-1-induced inhibition of platelet aggregation via the ETB receptor. *Br J Pharmacol.* 1993;109:530-4.
111. Michael VV, Alisa KE. Cell cycle implications in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Front Biosci.* 2000;5:D594-601.
112. Michel JB, Salzmann JL, Ossondo Nlom M, Bruneval P, Barres D, Camilleri JP. Morphometric analysis of collagen network and plasma perfused capillary bed in the myocardium of rats during evolution of cardiac hypertrophy. *Basic Res Cardiol.* 1986;81:142-54.
113. Mulder P, Richard V, Derumeaux G, Hogie M, Henry JP, Lallemand F, Compagnon P, Mace B, Comoy E, Letac B, Thuillez C. Role of endogenous endothelin in chronic heart failure: effect of long-term treatment with an

- endothelin antagonist on survival, hemodynamics, and cardiac remodeling. *Circulation*. 1997;96:1976-82.
114. Nehls V, Denzer K, Drenckhahn D. Pericyte involvement in capillary sprouting during angiogenesis in situ. *Cell Tissue Res*. 1992;270:469-474.
115. Neyses L, Nouskas J, Luyken J, Fronhoffs S, Oberdorf S, Pfeifer U, Williams RS, Sukhatme VP, Vetter H. Induction of immediate-early genes by angiotensin II and endothelin-1 in adult rat cardiomyocytes. *J Hypertens*. 1993;11:927-34.
116. Nicoletti A, Heudes D, Hinglais N, Appay MD, Philippe M, Sassy-Prigent C, Bariéty J, Michel JB. Left ventricular fibrosis in renovascular hypertensive rats: effect of losartan and spironolactone. *Hypertension*. 1995;26:101-111.
117. Nicoletti A, Heudes D, Mandet C, Hinglais N, Bariéty J, Michel JB. Inflammatory cells and myocardial fibrosis: spatial and temporal distribution in renovascular hypertensive rats. *Cardiovasc Res*. 1996;32:1096-107.
118. Noble NA, Border WA. Angiotensin II in renal fibrosis: should TGF-beta rather than blood pressure be the therapeutic target? *Semin Nephrol*. 1997;17:455-66.
119. Noon JP, Walker BR, Webb DJ, Shore AC, Holton DW, Edward HV. Impaired microvascular dilation and capillary rarefaction in young adults with a predisposition to high blood pressure. *J Clin Invest*. 1997;99:1873-1879.
120. Ohlstein EH, Nambi P, Hay DW, Gellai M, Brooks DP, Luengo J, Xiang JN, Elliott JD. Nonpeptide endothelin receptor antagonists. XI. Pharmacological

characterization of SB 234551, a high-affinity and selective nonpeptide ETA receptor antagonist. *J Pharmacol Exp Ther.* 1998;286:650-6.

121. Oishi S, Sasaki M, Sato T. Elevated immunoreactive endothelin levels in patients with pheochromocytoma. *Am J Hypertens.* 1994;7:717-22.
122. Olivetti G, Cigola E, Lagrasta C, Ricci R, Quaini F, Monopoli A, Ongini E. Spirapril prevents left ventricular hypertrophy, decreases myocardial damage and promotes angiogenesis in spontaneously hypertensive rats. *J Cardiovasc Pharmacol.* 1993;21:362-70.
123. Opgenorth TJ, Adler AL, Calzadilla SV, Chiou WJ, Dayton BD, Dixon DB, Gehrke LJ, Hernandez L, Magnuson SR, Marsh KC, Novosad EI, Von Geldern TW, Wessale JL, Winn M, Wu-Wong JR. Pharmacological characterization of A-127722: an orally active and highly potent ETA-selective receptor antagonist. *J Pharmacol Exp Ther.* 1996;276:473-81.
124. Pelouch V, Dixon IM, Golfman L, Beamish RE, Dhalla NS. Role of extracellular matrix proteins in heart function. *Mol Cell Biochem.* 1993;129:101-20.
125. Prewitt RL, Chen II, Dowell R. Development of microvascular rarefaction in the spontaneously hypertensive rat. *Am J Physiol.* 1982;243:H243-H251.
126. Price RJ, Owens GK, Skalak TC. Immunohistochemical identification of arteriolar development using markers of smooth muscle differentiation: Evidence that capillary arterialization proceeds from terminal arterioles. *Circ Res.* 1994;75:520-527.

127. Rakusan K. Quantitative morphology of capillaries of the heart. Number of capillaries in animal and human hearts under normal and pathological conditions. *Methods Achiev Exp Pathol.* 1971;5:272-86.
128. Rakusan K, Moravec J, Hatt PY. Regional capillary supply in the normal and hypertrophied rat heart. *Microvasc Res.* 1980;20 :319-326.
129. Rakusan K, Flanagan MF, Geva T, Southern J, Van Praagh R. Morphometry of human coronary capillaries during normal growth and the effect of age in left ventricular pressure overload hypertrophy. *Circulation*;1992;86:38-46.
130. Rappaport L, Samuel J-L. Growth factors and the extracellular matrix. In: *growth factors and the cardiovascular system*, P. Cummins, Boston. 1993, p.31-43.
131. Renkin EM, Michel CC, Geiger SR. *Handbook of physiology; The cardiovascular System. Section 2: Microcirculation, part 1. Volume IV.* American Physiological Society, Bethesda, Maryland. 1984, p.41-119.
132. Rhodin JAG. The ultrastructure of mammalian venous capillaries, venules, and small collecting veins. *J. Ultrastruct. Res.* 1968;25 :452-500.
133. Riechers H, Albrecht HP, Amberg W, Baumann E, Bernard H, Bohm HJ, Klinge D, Kling A, Muller S, Raschack M, Unger L, Walker N, Wernet W. Discovery and optimization of a novel class of orally active nonpeptidic endothelin-A receptor antagonists. *J Med Chem.* 1996;39:2123-8.
134. Rossi MA. Pathologic fibrosis and connective tissue matrix in left ventricular hypertrophy due to chronic arterial hypertension in humans. *J Hypertens.* 1998;16:1031-41.
135. Rothermund L, Pinto YM, Hocher B, Vetter R, Leggewie S, Kobetamehl P, Orzechowski HD, Kreutz R, Paul M. Cardiac endothelin system impairs left

- ventricular function in renin-dependent hypertension via decreased sarcoplasmic reticulum Ca(2+) uptake. *Circulation*. 2000;102:1582-8.
136. Sabri A, Samuel JL, Marotte F, Poitevin P, Rappaport L, Levy BI. Microvasculature in angiotensin II-dependent cardiac hypertrophy in the rat. *Hypertension*. 1998;32:371-5.
137. Sadochima J, Izumo S. Molecular characterization of angiotensin II-induced hypertrophy and hyperplasia of cardiac fibroblasts: critical role of the AT₁ receptor subtype. *Circ Res*. 1993;73:413-423.
138. Sakurai T, Yanagisawa M, Takuwa Y, Miyazaki H, Kimura S, Goto K, Masaki T. Cloning of a cDNA encoding a non-isopeptide-selective subtype of the endothelin receptor. *Nature*. 1990;20-27;348:732-5.
139. Sandison JC. Observation on growth of blood vessels as seen in transparent chamber introduced into rabbit's ear. *Am J Anat*. 1928;41:475-496.
140. Schachter M. Drug-induced modification of vascular structure: effects of antihypertensive drugs. *Am Heart J*. 1991;122:316-23.
141. Schiffrin EL. State-of-the-Art lecture. Role of endothelin-1 in hypertension. *Hypertension*. 1999;34:876-81.
142. Schiffrin EL. Endothelin: role in hypertension. *Biol Res*. 1998a;31:199-208.
143. Schiffrin EL. Endothelin and endothelin antagonists in hypertension. *J Hypertens*. 1998b;16:1891-5.
144. Schiffrin EL. Endothelin: Potential role in hypertension and vascular hypertrophy. Brief review. *Hypertension*. 1995;25:1135-1143.
145. Schiffrin EL. Vascular remodeling and endothelial function in hypertensive patients: effects of antihypertensive therapy. *Scand Cardiovasc J Suppl* 1998c;47:15-21.

146. Schiffrin EL, Larivière R, Li JS, Sventek P, Touyz RM. Deoxycorticosterone acetate plus salt induces overexpression of vascular endothelin-1 and severe vascular hypertrophy in spontaneously hypertensive rats. *Hypertension*. 1995;25:769-73.
147. Schiffrin EL, Thibault G. Plasma endothelin in human essential hypertension. *Am J Hypertens*. 1991;4:303-8.
148. Schoefl GI. Studies on inflammation. III. Growing capillaries : their structure and permeability. *Virchows Arch. Pathol. Anat*. 1963;337:97-141.
149. Schwartz J, Spach MO. *Hypertension artérielle*. Masson ed, Paris. 1988, p.4.
150. Schwartz SM, Gordon D, Mosca RS, Bove EL, Heidelberger KP, Kulik TJ. Collagen content in normal, pressure, and pressure-volume overloaded developing human hearts. *Am J Cardiol*. 1996;77:734-8.
151. Sharifi AM, Li JS, Endemann D, Schiffrin EL. Effects of enalapril and amlodipine on small-artery structure and composition, and on endothelial dysfunction in spontaneously hypertensive rats. *J Hypertens*. 1998a;16:457-66.
152. Sharifi AM, He G, Touyz RM, Schiffrin EL. Vascular endothelin-1 expression and effect of an endothelin ET_A antagonist on structure and function of small arteries from stroke-prone spontaneously hypertensive rats. *J Cardiovasc Pharmacol*. 1998b;31:S309-12.
153. Sigel AV, Centrella M, Eghbali-Webb M. Regulation of proliferative response of cardiac fibroblasts by transforming growth factor-beta 1. *J Mol Cell Cardiol*. 1996;28:1921-9.
154. Silver MA, Pick R, Brilla CG, Jalil JE, Janicki JS, Weber KT. Reactive and reparative fibrillar collagen remodelling in the hypertrophied rat left ventricle :

- two experimental models of myocardial fibrosis. *Cardiovasc Res.* 1990;24:741-747.
155. Simionescu N, Simionescu M. The cardiovascular system. In: *Histology* (5th ed.), L. Weiss. ed. Elsevier, New York. 1983, p.371-433.
156. Simionescu N, Simionescu M, Palade GE. Open junctions in the endothelium of the postcapillary venules of the diaphragm. *J Cell Biol.* 1978a;79 :27-46.
157. Simionescu N, Simionescu M, Palade GE. Structural basis of permeability in sequential segments of the microvasculature. II. Pathways followed by microperoxidase across the endothelium, *Microvasc. Res.* 1978b;15 :17-33.
158. Simm A, Nestler M, Hoppe V. PDGF-AA, a potent mitogen for cardiac fibroblasts from adult rats. *J Mol Cell Cardiol.* 1997;29:357-68.
159. Simonson MS. Endothelins: multifunctional renal peptides. *Physiol Rev.* 1993;73:375-411.
160. Slack JL, Liska DJ, Bornstein P. Regulation of expression of the type I collagen genes. *Am J Med Genet.* 1993;45:140-51.
161. Sogabe K, Nirei H, Shoubo M, Nomoto A, Ao S, Notsu Y, Ono T. Pharmacological profile of FR139317, a novel, potent endothelin ETA receptor antagonist. *J Pharmacol Exp Ther.* 1993;264:1040-6.
162. Sonnenblick EH. Congestive heart failure : pathophysiology. Izzo and Black, American Heart Association, Dallas. 1993, p.137-138.
163. Stasch JP, Hirth-Dietrich C, Frobel K, Wegner M. Prolonged endothelin blockade prevents hypertension and cardiac hypertrophy in stroke-prone spontaneously hypertensive rats. *Am J Hypertens.* 1995;8:1128-34.

164. Strauer BE, Schwartzkopff B. Left ventricular hypertrophy and coronary microcirculation in hypertensive heart disease. *Blood Press Suppl.* 1997;2:6-12.
165. Sun Y, Zhang JQ, Zhang J, Lamparter S. Cardiac remodeling by fibrous tissue after infarction in rats. *J Lab Clin Med.* 2000;135:316-23.
166. Sventek P, Turgeon A, Garcia R, Schiffrin EL. Vascular and cardiac overexpression of endothelin-1 gene in one-kidney one clip goldblatt hypertensive rats but only in the late phase of two-kidney one clup goldblatt hypertension. *J Hypertens.* 1996;14:57-64.
167. Tadashi I. Endothelin. American Heart Association. Joseph L. Izzo Jr, Henry R. Black. Dallas, 1993, p.1-20.
168. Taipale J, Keski-Oja J. Growth factors in the extracellular matrix. *FASEB J.* 1997;11:51-9
169. Takahashi K, Totsune K, Mouri T. Endothelin in chronic renal failure. *Nephron.* 1994;66:373-9.
170. Thai HM, Van HT, Gaballa MA, Goldman S, Raya TE. Effects of AT₁ receptor blockade after myocardial infarction on myocardial fibrosis, stiffness, and contractility. *Am J Physiol.* 1999;276:H873-80.
171. Tharaux PL, Chatziantoniou C, Casellas D, Fouassier L, Ardaillou R, Dussaule JC. Vascular endothelin-1 gene expression and synthesis and effect on renal type I collagen synthesis and nephroangiosclerosis during nitric oxide synthase inhibition in rats. *Circulation.* 1999;99:2185-91.
172. Thompson NL, Bazoberry F, Speir EH, Casscells W, Ferrans VJ, Flanders KC, Kondaiah P, Geiser AG, Sporn MB. Transforming growth factor beta-1 in acute myocardial infarction in rats. *Growth Factors.* 1988;1:91-9.

173. Villarreal FJ, Dillmann WH. Cardiac hypertrophy-induced changes in mRNA levels for TGF-beta 1, fibronectin, and collagen. *Am J Physiol.* 1992;262:H1861-6.
174. Wang MX, Brown MA, Buddle ML, Carlton MA, Cario GM, Whitworth JA. Endothelin excretion in hypertensive pregnancy. Relationship to glomerular filtration rate, blood pressure, and sodium excretion. *Am J Hypertens.* 1994;7:308-13.
175. Weber KT. *Wound Healing in cardiovascular Disease.* Armonk, NY: Futura. 1995.
176. Weber KT, Brilla CG. Pathological hypertrophy and cardiac interstitium. *Circulation.* 1991;83:1849-1865.
177. Weber KT, Janicki JS, Pick R, Capasso J, Anversa P. Myocardial fibrosis and pathologic hypertrophy in the rat with renovascular hypertension. *Am J Cardiol.* 1990;65:1G-7G.
178. Weber KT, Janicki JS, Shroff SG, Pick R, Chen RM, Bashey RI. Collagen remodeling of the pressure-overloaded, hypertrophied nonhuman primate myocardium. *Circ Res.* 1988;62:757-65.
179. Weber DR, Stroud ED, Prescott SM. Arachidonate metabolism in cultured fibroblasts derived from normal and infarcted canine heart. *Circ Res.* 1989;65:671-83.
180. Weber KT, Sun Y, Katwa LC, Cleutjens JP, Zhou G. Connective tissue and repair in the heart. Potential regulatory mechanisms. *Ann N Y Acad Sci.* 1995;27;752:286-99.

181. Weber KT, Sun Y, Tyagi SC, Cleutjens JP. Collagen network of the myocardium: function, structural remodeling, and regulatory mechanisms. *J Mol cell Cardiol.* 1994; 26:279-292.
182. White LA, Mitchell TI, Brinckerhoff CE. Transforming growth factor beta inhibitory element in the rabbit matrix metalloproteinase-1 (collagenase-1) gene functions as a repressor of constitutive transcription. *Biochim Biophys Acta.*2000;1490:259-68.
183. Wiener J, Giacomelli G, Loud AV, Anversa P. Morphometric of cardiac hypertrophy induced by experimental renal hypertension. *Am J cardiol.* 1979;44 :919-929.
184. Yamazaki T, Konuro I, Kudoh S, Zou Y, Shiojima I, Hiroi Y, Mizuno T, Maemura K, Kurihara H, Aikawa R, Takano H, Yazaki Y. Endothelin-1 is involved in mechanical stress-induced cardiomyocyte hypertrophy. *J Biol Chem.* 1996;271:3221-3228.
185. Yanagisawa M, Kurihara H, Kimura S, Tomobe Y, Kobayashi M, Mitsui Y, Yazaki Y, Goto K, Masaki T. A novel potent vasoconstrictor peptide produced by vascular endothelial cells. *Nature.* 1988;332:411-5.
186. Zak R. Cell proliferation during cardiac growth. *Am J Cardiol.* 1973; 31:211-219.
187. Zanchetti A, Stella A. Cardiovascular disease and the kidney: an epidemiologic overview. *J Cardiovasc Pharmacol.* 1999;33:S1-6; discussion S41-3.