

**Direction des bibliothèques**

**AVIS**

Ce document a été numérisé par la Division de la gestion des documents et des archives de l'Université de Montréal.

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

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

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

**NOTICE**

This document was digitized by the Records Management & Archives Division of Université de Montréal.

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

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

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

Université de Montréal

**L'EFFET ANTIPROLIFÉRATIF,  
ANTIHYPERTROPHIQUE ET ANTIAPOPTOTIQUE  
DE LA MOXONIDINE CHEZ LES FIBROBLASTES ET  
LES CARDIOMYOCYTES EN CULTURE**

Par

Bentaiebi Safa

Département des Sciences biomédicales

Faculté de Médecine

Thèse présentée à la Faculté des études supérieures

en vue de l'obtention du grade de Maîtrise

en Sciences biomédicales

Avril 2007

© Bentaiebi Safa, 2007



Université de Montréal

Faculté des études supérieures

Cette thèse intitulée :

**L'EFFET ANTIPROLIFÉRATIF,  
ANTIHYPERTROPHIQUE ET ANTIAPOPTOTIQUE  
DE LA MOXONIDINE CHEZ LES FIBROBLASTES ET  
LES CARDIOMYOCYTES EN CULTURE**

Présentée par :

Bentaiebi Safa

a été évaluée par un jury composé des personnes suivantes :

Gaétan Thibault, président-rapporteur

Suhayla Mukaddam-Daher, directeur de recherche

Angelo Calderone, membre du jury

## Résumé

Notre laboratoire a démontré que le traitement chronique des rats SHRs avec la moxonidine régresse l'HVG en diminuant la synthèse d'ADN et augmentant la fragmentation d'ADN du ventricule gauche. Notre laboratoire a aussi démontré que le cœur exprime les récepteurs aux imidazolines I<sub>1</sub>. Toutefois, les cellules cardiaques ciblées par la moxonidine restent inconnues.

L'objectif de cette étude est l'élucidation des mécanismes d'action de la moxonidine chez les cardiocytes des rats néonataux et adultes, spécifiquement pendant la croissance et la mort cellulaire induites par la norépinéphrine, pour simuler les effets du SNS.

Le présent travail a permis de localiser les récepteurs Nischarin (récepteurs aux imidazolines murines) aux niveaux membranaire et cytosolique des cardiomyocytes et des fibroblastes de rats nouveau-nés. L'incubation avec la norépinéphrine ou la moxonidine augmente de 7 et 3 fois, respectivement leur expression. La co-incubation avec la moxonidine inhibe partiellement l'effet de la norépinéphrine. Nos résultats démontrent que la moxonidine inhibe l'effet prolifératif et hypertrophique de la NE chez les cardiocytes. Ces effets sont régulés par la synthèse et la fragmentation d'ADN et impliquent la stimulation de Bcl2.

La moxonidine s'oppose donc aux effets de la norépinéphrine chez les fibroblastes et les myocytes en empêchant l'hypertrophie et la prolifération cellulaire et en inhibant la fragmentation d'ADN prévenant ainsi la perte des cellules cardiaques qui mène le cœur hypertensif à la défaillance cardiaque.

**Mots-clés :** cardiomyocytes, fibroblastes, récepteurs aux imidazolines, prolifération, hypertrophie, norépinéphrine, moxonidine, fragmentation d'ADN.

## Abstract

Our laboratory has shown that chronic in vivo moxonidine treatment of SHR results in regression of LVH, associated with decreased left ventricular DNA synthesis and increased DNA fragmentation. Our laboratory has also shown that the heart exhibits imidazoline I<sub>1</sub>-receptors, but the cellular target of moxonidine in the heart is not known.

The aim of the present studies was to localize I<sub>1</sub>-receptor to specific cardiac cells and to investigate the implication of cardiac I<sub>1</sub>-receptors/moxonidine in death or growth of cardiac cells.

This is the first study that localizes I<sub>1</sub>-receptors in neonatal cardiomyocytes to cytosol and membrane fractions using nischarin (murine I<sub>1</sub>-receptor) antibody.

These results demonstrate that moxonidine inhibits the proliferative and the hypertrophic effects of NE in fibroblasts and cardiomyocytes. These effects are mediated by regulation of DNA synthesis and DNA fragmentation and involve stimulation of Bcl2. These antihypertrophic, antiproliferative and anti-apoptotic effects of imidazoline receptors could have therapeutic application in the hypertensive hypertrophied heart.

**Keywords:** cardiomyocytes, fibroblasts, imidazolines receptors, proliferation, hypertrophy, DNA fragmentation, norepinephrine, moxonidine.

## Table des matières

<i>Résumé</i> .....	<i>III</i>
<i>Abstract</i> .....	<i>IV</i>
<i>Table des matières</i> .....	<i>V</i>
<i>Liste des abréviations</i> .....	<i>X</i>
<i>Remerciements</i> .....	<i>XIII</i>
<b>CHAPITRE 1: INTRODUCTION</b> .....	<b>1</b>
<b>1. LES RÉCEPTEURS AUX IMIDAZOLINES :</b> .....	<b>2</b>
<b>1.1. Historique :</b> .....	<b>2</b>
<b>1.2. Classification des récepteurs aux imidazolines :</b> .....	<b>5</b>
1.2.1. Les récepteurs I <sub>2</sub> :.....	6
1.2.2. Les récepteurs I <sub>3</sub> :.....	6
1.2.3. Les récepteurs I <sub>1</sub> :.....	7
<b>1.3. Ligands endogènes des récepteurs I<sub>1</sub> :</b> .....	<b>8</b>
<b>1.4. Les agonistes et les antagonistes des récepteurs I<sub>1</sub>:</b> .....	<b>11</b>
1.4.1. Les agonistes des récepteurs I <sub>1</sub> : .....	11
1.4.2. Les antagonistes des récepteurs I <sub>1</sub> :.....	17
<b>1.5. Les systèmes de transduction couplés aux récepteurs I<sub>1</sub> :</b> .....	<b>18</b>
<b>1.6. Fonctions et mécanismes d'action des récepteurs I<sub>1</sub> :</b> .....	<b>23</b>
1.6.1. Effet central : .....	23
1.6.2. Effet périphérique : .....	23

<b>2. LES RECEPTEURS AUX IMIDAZOLINES I<sub>1</sub> AU NIVEAU CARDIAQUE :</b>	<b>24</b>
<b>2.1. Identification des récepteurs I<sub>1</sub> dans le cœur :</b>	<b>24</b>
2.1.1. Les études aiguës in vivo :	24
<b>3. L'HYPERTROPHIE CARDIAQUE :</b>	<b>28</b>
<b>3.1. Cœur :</b>	<b>28</b>
3.1.1. Structure cardiaque :	28
3.1.2. Physiopathologie de l'hypertension artérielle :	29
3.1.3. Le remodelage cardiaque:	31
<b>3.2. Les systèmes impliqués dans le développement de l'HVG :</b>	<b>33</b>
3.2.1. L'étirement mécanique :	33
3.2.2. Le rôle du système rénine – angiotensine :	34
3.2.3. Le rôle du système sympathique :	34
3.2.4. Les facteurs de croissance :	35
<b>4. L'APOPTOSE.....</b>	<b>38</b>
<b>5. BUT :</b>	<b>40</b>
<b>CHAPITRE II : MATÉRIELS ET MÉTHODES.....</b>	<b>41</b>
<b>1. LA CULTURE CELLULAIRE :</b>	<b>42</b>
1.1. Mise en culture primaire des cardiomyocytes ventriculaires des rats néonataux :....	42
1.2. Mise en culture des cardiomyocytes ventriculaires des rats adultes :.....	45
<b>2. VIABILITÉ CELLULAIRE:</b>	<b>46</b>
<b>3. L'INCORPORATION DE LA THYMIDINE ET DE LA LEUCINE TRITIÉES:</b>	<b>47</b>
<b>4. WESTERN BLOT :</b>	<b>49</b>
4.1. Préparation du lysat cellulaire :	49
4.2. Dosage des protéines par la méthode de Bradford :	50

4.3. Préparation des échantillons et migration sur gel :.....	50
4.4. Incubation avec les anticorps :.....	51
4.5. Réaction de chimioluminescence :.....	52
4.6. Le fractionnement subcellulaire pour l'expression protéique de Nischarin :.....	52
5. DOSAGE DE LA FRAGMENTATION D'ADN PAR ELISA :.....	53
6. ANALYSES STATISTIQUES :.....	55
<b>CHAPITRE III : RÉSULTATS</b> .....	<b>56</b>
1. LOCALISATION SUBCELLULAIRE DES RÉCEPTEURS AUX IMIDAZOLINES/NISCHARINS DANS LE CŒUR : .....	57
2. L'EFFET DE LA NORÉPINÉPHRINE ET DE LA MOXONIDINE SUR LA VIABILITÉ DES CARDIOMYOCYTES NÉONATAUX : .....	58
3. PROLIFÉRATION ET HYPERTROPHIE DES CARDIOCYTES VENTRICULAIRES NÉONATAUX ET ADULTES:.....	60
3.1. L'effet dose-dépendant de la norépinéphrine et de la moxonidine sur l'incorporation de <sup>3</sup> H-thymidine chez les cardiocytes néonataux : .....	60
3.2. Effet de la moxonidine sur l'incorporation de <sup>3</sup> H-thymidine induite par la norépinéphrine chez les fibroblastes néonataux et adultes:.....	63
3.3. Effet de la moxonidine sur l'incorporation de la leucine tritiée induite par la norépinéphrine chez les cardiomyocytes néonataux et adultes: .....	64
4. EFFET DE LA MOXONIDINE SUR L'APOPTOSE INDUITE PAR LA NORÉPINÉPHRINE CHEZ LES CARDIOCYTES VENTRICULAIRES NÉONATUX ET ADULTES:.....	67
<b>CHAPITRE IV : DISCUSSION ET CONCLUSION</b> .....	<b>72</b>
<b>Bibliographie</b> .....	<b>81</b>

## Liste des tableaux :

### CHAPITRE I :

<i>Figure 1 : La voie de signalisation des récepteurs aux imidazolines <math>I_1</math> proposée par Ernsberger. Tiré de: Ernsberger et coll. 1999</i> .....	19
<i>Figure 2 : Les voies de signalisation et les effets des récepteurs aux imidazolines <math>I_1</math> dans les cellules PC12 et les cellules surexprimant nischarin.</i> .....	22
<i>Figure 3 : Localisation des récepteurs <math>I_1</math> dans le cœur des hamsters par autoradiographie (liaison de <math>^{125}I</math>-PIC après inhibition irréversible des récepteurs <math>\alpha_2</math>-adrénergiques), et leur régulation en cas de cardiomyopathie. (El-Ayoubi et coll. 2002).</i> .....	25
<i>Figure 4: La masse ventriculaire et le contenu d'ADN au niveau du ventricule gauche des SHR après 4 semaines du traitement avec la moxonidine.</i> .....	27
<i>Figure 5 : Pathogénie de l'hypertrophie cardiaque dans l'hypertension.</i> .....	30
<i>Figure 6 : Voies de signalisation des différents facteurs possiblement impliqués dans le développement de l'hypertrophie cardiaque. D'après Glennon et coll. (1995)</i> .....	37

### CHAPITRE II:

<i>Figure 1 : L'expression des récepteurs Nischarin/<math>\beta</math>-actine Cytosol vs. Membrane (100%) chez les cardiomyocytes et les fibroblastes des rats néonataux.</i> .....	57
<i>Figure 2 : Les Nischarins chez les fibroblastes ventriculaires néonataux.</i> .....	58
<i>Figure 3: Effet de la norépinéphrine sur la viabilité des cardiomyocytes néonataux.</i> .....	59
<i>Figure 4: Effet de la moxonidine sur la viabilité des cardiomyocytes néonataux.</i>	60
<i>Figure 5: Incorporation de la <math>^3H</math>-thymidine chez les cardiomyocytes ventriculaires des rats néonataux pendant 24 h.</i> .....	61

<i>Figure 6 : Incorporation de <sup>3</sup>H-thymidine chez les fibroblastes ventriculaires néonataux.</i>	62
<i>Figure 7: L'effet de la norépinéphrine en absence et en présence de la moxonidine sur l'incorporation de <sup>3</sup>H-thymidine chez les fibroblastes ventriculaires néonataux.</i>	63
<i>Figure 8 : Incorporation de la <sup>3</sup>H-thymidine chez les fibroblastes adultes.</i>	64
<i>Figure 9 : Effet de la moxonidine sur l'incorporation de la <sup>3</sup>H-leucine induite par la norépinéphrine 10<sup>-7</sup> M chez les cardiomyocytes ventriculaires néonataux.</i>	65
<i>Figure 10 : Effet de la moxonidine sur l'incorporation de la <sup>3</sup>H-leucine induite par la norépinéphrine 10<sup>-4</sup> M chez les cardiomyocytes néonataux.</i>	66
<i>Figure 11: Incorporation de <sup>3</sup>H-leucine chez les cardiomyocytes des rats adultes.</i>	67
<i>Figure 12: Fragmentation d'ADN chez les fibroblastes ventriculaires néonataux.</i>	68
<i>Figure 13: Fragmentation d'ADN chez les cardiomyocytes ventriculaires néonataux.</i>	69
<i>Figure 14: Expression de Bax chez les cardiomyocytes ventriculaires adultes.</i>	70
<i>Figure 15: L'expression de Bcl2 chez les cardiomyocytes ventriculaires adultes.</i>	70
<i>Figure 16 : Le rapport Bax/Bcl2 chez les cardiomyocytes ventriculaires adultes.</i>	71

## Liste des abréviations

**ADN** : acide désoxyribonucléique

**AMPc**: Adénosine monophosphate cyclique

**ANP** : peptide natriurétique auriculaire

**ARs** : récepteurs adrénérgiques

**Bax**: Bcl-2-associated protein X

**Bcl2**: b-cell lymphoma-2

**BNP** : peptide natriurétique cérébral

**BSA**: sérum albumine bovine

**CDS**: Clonidine Displacing Substance.

**CMF HBSS**: Sterile calcium- and magnesium-free Hank's Balanced Salt Solution

**CNP** : peptide natriurétique de type C

**DAG**: diacylglycérol

**DMEM/F12**: Dulbecco's modified Medium Eagle's

**ELISA**: Enzyme-Linked immunosorbent assay

**ERK**: extracellular signal-regulated kinase

**FBS** : sérum fœtal bovin

**GMPc** : Guanosine monophosphate cyclique

**HTA** : hypertension artérielle

**HVG** : Hypertrophie ventriculaire gauche

**IAA-RP** : acide imidazole-acétique ribotide

**JNK**: c-jun kinase

**MAO** : enzyme monoamine-oxydase

**MAPK**: mitogen-activated protein kinases

**Moxo**: moxonidine

**NE** : Norépinéphrine

**NRL/RVLM** : région ventrobulbaire du noyau réticulaire latéral

**PA** : pression artérielle.

**PC12** : les cellules phéochromocytomes

**PC-PLC**: phosphatidylcholine sélective phospholipase C

**PGE2**: prostaglandine II

**SD** : rats normotendus Sprague-Dawley

**SHR**: Spontaneous hypertensive rat

**SNC** : système nerveux central

**SNP** : système nerveux périphérique

**SNS** : système nerveux sympathique

**TA** : température ambiante

**WB** : western blot

**IGF** : facteur de croissance homologue à l'insuline, (Insulin-like growth factor)

**TGF**: facteur transformant de croissance, (Transforming Growth Factor)

**FGF** : facteur de croissance du fibroblaste, (Fibroblast growth factor)

*A mon époux dont l'amour me comble.  
Pour ta tendresse, ton amour, ton amitié,  
ta patience, ta confiance en moi, pour tout ce  
que tu m'apportes dans notre quotidien  
et tout le reste.*

*A mon bébé,*

*A ma mère que je ne pourrai jamais assez  
remercier de tout ce qu'elle a fait pour moi.*

*A ma grand-mère,  
A mes sœurs et mon frère,  
A mes neveux et ma nièce,  
A ma tante et mes oncles,  
A mes cousins et cousines,  
A ma belle famille,  
A tous ceux qui me sont chers...*

## Remerciements

*Je tiens à exprimer mes plus sincères remerciements à ma directrice de recherche Dre. Suhayla Mukaddam-Daher, pour ses conseils, sa constante disponibilité, qui m'ont permis de mener à bien ce travail. Je la remercie de m'avoir accordé sa confiance et prodigué son aide durant mon séjour au laboratoire, d'avoir partagé son temps et sa connaissance encyclopédique. Je lui suis particulièrement reconnaissante pour tout le temps qu'elle a consacré à mon mémoire.*

*Je tiens aussi à remercier Dre. Jolanta Gutkowska, de m'avoir accueilli au sein de son laboratoire et pour son investissement dans ce travail.*

*Je remercie également Dr. Marek Jankowski pour sa disponibilité, et sa collaboration.*

*Je remercie profondément Dr. Ahmed pour son aide, ses compétences scientifiques et ses précieux conseils qu'il a toujours partagés, et pour sa gentillesse et sa disponibilité.*

*Mes remerciements très particuliers au Dr. Wang, qui m'a enseigné certaines techniques ainsi que le Dr. Bogdan pour ses conseils et son aide à diverses occasions.*

*Je veux aussi remercier Pierre-Alexandre pour sa gentillesse, sa disponibilité et son aide.*

*Je remercie aussi notre technicienne Valérie pour l'aide apportée dans ce travail, sa gentillesse et sa disponibilité.*

*Une petite ligne à part pour Anna pour sa gentillesse, sa disponibilité, toujours prête à rendre service.*

*De nombreux remerciements s'adressent également au personnel du service des animaleries du CHUM.*

*Je tiens à exprimer mes plus sincères remerciements aux membres du jury qui m'ont fait l'honneur de juger ce travail.*

*Merci aussi à tous les techniciens, les chercheurs, et tous les autres qui à un moment ou à un autre m'ont aidé de quelque façon que ce soit à réaliser ce travail. Mes derniers remerciements s'adressent à toute ma famille. Je les remercie pour leur soutien constant, leur aide et leur réconfort durant toutes ces années, qu'ils trouvent dans ce mémoire le témoignage de toute mon affection et de ma profonde reconnaissance.*

# **CHAPITRE I**

## **INTRODUCTION**

## 1. LES RÉCEPTEURS AUX IMIDAZOLINES :

### 1.1. Historique :

En 1961, la clonidine a été synthétisée pour la première fois afin de développer un agoniste sélectif des récepteurs alpha-adrénergiques pour en faire un agent vasoconstricteur décongestionnant nasal.

Par la suite, lors des études avec la clonidine, il a été montré qu'une injection intraveineuse de la clonidine ou de ses dérivés chez des chats provoquait une augmentation transitoire de la pression artérielle due à la vasoconstriction, puis une baisse prolongée de la pression.

Plus tard, plusieurs observations ont permis de conclure que l'effet hypotenseur de la clonidine était dû à l'inhibition du tonus sympathique d'origine centrale. Parmi ces observations :

- Kobinger et Walland (1967) et Schmitt *et coll.* (1968) ont pu constater que, chez le rat et le chat, l'injection intracisternale des doses inefficaces par voie intraveineuses de la clonidine produit une diminution de la pression artérielle.
- Sattler et Van Zwieten (1967) ont observé que l'injection de la clonidine dans l'artère vertébrale de chat produit une baisse de la pression artérielle de façon dose dépendante.
- Nayler *et coll.* (1969) ont constaté que le traitement préalable des animaux avec la réserpine, afin d'abolir le tonus sympathique, diminue ou supprime l'effet hypotenseur de la clonidine.

Ultérieurement, Il a été montré que l'effet central hypotenseur de la clonidine est originaire du bulbe rachidien et plus exactement au niveau de la région ventrobulbaire du noyau réticulaire latéral (NRL/RVLM) (Bousquet *et coll.* 1980).

Ces travaux ont été confirmés par de nombreuses expériences de micro-injections dans le NRL (noyau réticulaire latéral situé dans la partie rostrale de la face ventrale du bulbe rachidien (RVLM) et assurant la régulation tonique et phasique de la pression artérielle) qui consistaient à y appliquer de petites quantités de drogues et à mesurer l'effet produit sur la pression artérielle (Bousquet *et coll.* 1981; 1984; Gillis *et coll.* 1985; Ernsberger *et coll.* 1988).

De nombreuses études avec la clonidine ont permis par la suite d'étayer la théorie de ses effets adrénergiques :

- La clonidine dispose des analogies structurales avec les catécholamines et particulièrement la noradrénaline (Wermuth et Exinger 1972; Carpy *et coll.* 1982).
- Au niveau périphérique, la clonidine agit comme un agoniste  $\alpha$ -adrénergique et son effet vasoconstricteur périphérique est reproduit par la noradrénaline et bloqué par des  $\alpha$ -bloquants (Greenberg *et coll.* 1980)
- Les substances  $\alpha$ -bloquantes comme la yohimbine et le piperoxan peuvent bloquer les effets centraux de la clonidine (Laubie et Schmitt 1977; Timmermans et Van Zwieten 1980; Van Zwieten 1980).

D'après Cubeddu *et coll.* (1974) et Starke *et coll.* (1977), il existe deux sous-types de récepteurs  $\alpha$ -adrénergiques :

- Les récepteurs  $\alpha_1$ -adrénergiques, localisés au niveau post synaptique, lient la noradrénaline.
- Les récepteurs  $\alpha_2$ -adrénergiques, localisés au niveau présynaptique, inhibent la libération des neurotransmetteurs, particulièrement la noradrénaline.

Selon la théorie adrénergique, la clonidine agit au niveau du bulbe rachidien via les récepteurs  $\alpha_2$ -adrénergiques présynaptiques, réduisant ainsi la libération de la noradrénaline à ce niveau, tandis qu'au niveau périphérique la clonidine agit à la fois via les récepteurs  $\alpha_1$ - et  $\alpha_2$ - adrénergiques. Cependant, la

destruction des terminaisons neuronales noradrénergiques par la 6-hydroxydopamine (Reynoldson *et coll.* 1979; Connor *et coll.* 1981; Bousquet et Schwartz 1983) ou la déplétion des réserves de catécholamines endogènes par traitement à la réserpine (Haeusler 1974) n'entravent pas l'action hypotensive centrale de la clonidine.

De plus, les études de Zandberg *et coll.* (1979) ont montré que l'injection de la noradrénaline ou de l' $\alpha$ -méthylnoradrénaline dans le centre vasodépresseur induit une hypotension artérielle tandis que la clonidine en est incapable. L'injection de la clonidine dans le NRL provoque une hypotension tandis que les catécholamines ne le font pas.

Toutes ces observations ont permis de rejeter la théorie des récepteurs adrénergiques, et ont permis de supposer que l'effet hypotenseur de la clonidine implique d'autres récepteurs que les  $\alpha_2$ -adrénergiques.

L'hypothèse imidazolinique de la clonidine fut alors émise. En effet, suite à des études de relation structure-activité avec la clonidine et d'autres composés, Bousquet *et coll.* (1984) ont remarqué que seuls les composés ayant une structure imidazolinique induisent un effet hypotenseur après injection dans le NRL. D'où est née l'hypothèse suggérant l'existence d'une nouvelle famille de récepteurs, sensibles aux imidazolines mais pas aux catécholamines, responsables de l'effet hypotenseur de la clonidine au niveau du NRL: les récepteurs aux imidazolines.

Plusieurs travaux ont confirmé cette hypothèse qu'est l'existence des sites de liaison des imidazolines:

- Les études de liaison avec des radioligands à structure imidazolinique, comme la clonidine et l'idazoxan, au niveau du NRL ont permis la confirmation de l'existence des sites de liaison spécifiques pour les imidazolines (Ernsberger *et coll.* 1987; Bricca *et coll.* 1988, 1993a; 1993b; Grenney *et coll.* 1994).

- Tolentino-Silva *et coll.* (2000) ont montré que la moxonidine, un agoniste des récepteurs aux imidazolines de type 1 (récepteurs I<sub>1</sub>), diminue la pression artérielle chez des souris transgéniques D79N dépourvues de récepteurs α<sub>2</sub>-adrénergiques et que cet effet est inhibé par l'antagoniste sélectif des récepteurs I<sub>1</sub>, l'efaroxan, mais pas par l'antagoniste sélectif des récepteurs α<sub>2</sub>-adrénergiques, le SKF 86466.

Ces résultats ont été confirmés par Bousquet *et coll.* (2000), qui ont démontré que la stimulation des récepteurs α<sub>2</sub>-adrénergiques n'est pas nécessaire pour entraîner l'effet hypotenseur des imidazolines hybrides des récepteurs I<sub>1</sub> et des récepteurs α<sub>2</sub>-adrénergiques, comme la rilmenidine et la moxonidine.

## 1.2. Classification des récepteurs aux imidazolines :

Plusieurs études de liaison spécifiques des ligands radiomarqués, effectuées sur différents tissus et lignées cellulaires provenant d'espèces variées, ont permis de mettre en évidence l'existence de sites de liaisons spécifiques des imidazolines.

Selon leur affinité pour une série de ligands radiomarqués, ayant une structure imidazole, imidazolidine ou guanidinium, les récepteurs aux imidazolines peuvent être classés en trois groupes :

- Récepteur I<sub>1</sub> : identifié avec la (<sup>3</sup>H)-clonidine et ses dérivés, ou <sup>125</sup>I-paraiodoclonidine (<sup>125</sup>I-PIC).
- Récepteur I<sub>2</sub> : identifié avec le (<sup>3</sup>H)-idazoxan.
- Récepteur I<sub>3</sub> : identifié avec l'efaroxan.

### ***1.2.1. Les récepteurs I<sub>2</sub>:***

Ces récepteurs ont une grande affinité pour <sup>3</sup>H-idazoxan et moins d'affinité pour la clonidine et ses analogues. Les récepteurs aux imidazolines I<sub>2</sub> sont exprimés de façon quasi-ubiquitaire sans spécificité tissulaire (Coupry *et coll.* 1987; 1990) dans le foie (Zonnenchein *et coll.* 1990), les adipocytes (Langin et Lafontan 1989; Langin *et coll.* 1990), les plaquettes (Michel *et coll.* 1989), le placenta (Diamant *et coll.* 1992), le cerveau (Bricca *et coll.* 1993) et l'urètre (Yablonsky et Dausse 1991). Ils sont aussi exprimés chez plusieurs espèces: lapin (Langin et Lafontan 1989), bœuf et rat (Bricca *et coll.* 1989), et chez l'homme (Langin *et coll.* 1990; Diamant *et coll.* 1992; Bricca *et coll.* 1993a).

Les récepteurs I<sub>2</sub> sont principalement exprimés dans un compartiment intracellulaire (Michel *et coll.* 1990) et plus précisément dans la membrane externe des mitochondries (Tesson *et coll.* 1991; Limon *et coll.* 1992; Raddatz *et coll.* 1995; Parini *et coll.* 1996) de manière indépendante des espèces et des tissus testés.

Au niveau fonctionnel, les récepteurs aux imidazolines I<sub>2</sub> sont considérés comme une partie de l'enzyme monoamine-oxydase (Boise *et coll.* 1993; Carpenne *et coll.* 1995; Raddatz *et coll.* 1997). Leur implication dans la régulation de l'activité des MAO permet de réguler à plus grande échelle toutes les activités d'origine centrale médiées par différents neurotransmetteurs comme les catécholamines ou la sérotonine et dans lesquelles les MAO sont impliquées (Fowler *et coll.* 2002).

### ***1.2.2. Les récepteurs I<sub>3</sub>:***

Chan et Morgan (1990), Chan *et coll.* (1993), et Brown *et coll.* (1993) ont démontré que plusieurs composés imidazoliniques, comme l'efaroxan, induisent une sécrétion d'insuline des cellules β des îlots de

Langerhans du pancréas, impliquant la fermeture de canaux potassiques ATP-dépendants. Puisque ces récepteurs ne possédaient aucune, ou une faible affinité, pour la clonidine ou l'idazoxan, ils ont été désignés par la suite comme étant les récepteurs aux imidazolines I<sub>3</sub> (Chan *et coll.* 1994; Eglen *et coll.* 1998).

### **1.2.3. Les récepteurs I<sub>1</sub>:**

Les récepteurs I<sub>1</sub> sont surtout impliqués dans la régulation de la pression artérielle. Les récepteurs I<sub>1</sub> ont une grande affinité pour <sup>3</sup>H-para-aminoclonidine, <sup>3</sup>H-clonidine et <sup>125</sup>I-para-iodoclonidine (Ernsberger *et coll.* 1990). Ces récepteurs sont surtout localisés au niveau de la RVLM (Mallard *et coll.* 1992; Ernsberger *et coll.* 1995; Regunathan et Reis 1996), et plus spécifiquement au niveau de la membrane plasmique des neurones (Heemskerk *et coll.* 1998; Ruggiero *et coll.* 1998). On les retrouve aussi dans l'hypothalamus (Kamisaki *et coll.* 1990), les tubules proximaux des reins (Couprie *et coll.* 1990; Penner et Smyth 1994, 1995), l'œil (Campbell et Potter 1994), la prostate (Felsen *et coll.* 1994), les plaquettes (Michel *et coll.* 1990; Piletz *et coll.* 1991), les cellules chromaffines, la glande médullo-surrénale (Molderings *et coll.* 1993; Ernsberger et Shen 1997), les cellules phéochromocytomes (PC12) (Ernsberger *et coll.* 1995), et depuis récemment dans le cœur (El-Ayoubi *et coll.* 2002; Raasch *et coll.* 2003). (Tableau 1)

Dans cette étude, on focalise plutôt sur les récepteurs I<sub>1</sub> puisqu'ils sont les seuls sous-types impliqués dans la régulation de la pression artérielle et qui répondent à la clonidine et la moxonidine.

	<b>Bœuf</b>	<b>Lapin</b>	<b>Homme</b>	<b>Rat</b>
<b>Central</b>	Bulbe rachidien (Ernsberger <i>et coll.</i> 1990)	Bulbe rachidien (Bricca <i>et coll.</i> 1993)		Striatum et hippocampe (Kamisaki <i>et coll.</i> 1990)
<b>Périphérique</b>	Cellules chromaffines (Ernsberger <i>et coll.</i> 1993 Molderings <i>et coll.</i> 1993)	Cellules épithéliale de la trachée (Leidke <i>et coll.</i> 1993)	Plaquettes, (Piletz <i>et coll.</i> 1991, 1993, 1996)  Cœur (El-Ayoubi 2002)	Rein, Lignée cellulaire PC12 (Ernsberger <i>et coll.</i> 1990, 1995, Greney <i>et coll.</i> 2000)  Cœur (El-Ayoubi 2002)

**Tableau 1: Distribution des récepteurs I<sub>1</sub> dans les principaux tissus et espèces.**

### 1.3. Ligands endogènes des récepteurs I<sub>1</sub>:

Depuis la découverte des récepteurs aux imidazolines I<sub>1</sub>, plusieurs questions ont été soulevées sur l'existence d'éventuels ligands endogènes, leurs localisations et leurs fonctions.

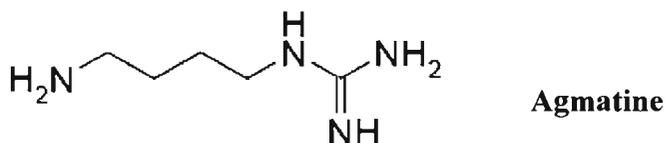
En effet, au début des années 80, plusieurs observations ont permis d'évoquer l'existence d'un ligand endogène des sites spécifiques imidazoliniques de la <sup>3</sup>H-clonidine différents de celui des catécholamines et des phényléthylamines sur les récepteurs α<sub>2</sub>-adrénergiques. Ainsi, en utilisant le cerveau de veau, Atlas (1994) a réussi à purifier partiellement une substance capable de déplacer, avec une très grande affinité, la liaison

spécifique de  $^3\text{H}$ -clonidine sur le cortex cérébral de rat. Cette substance a été désignée « CDS » pour Clonidine Displacing Substance.

Plusieurs CDS ont été décelées dans le sérum de différents tissus, mais leur structure chimique reste mal connue. Ce n'est qu'en 1994 que Li *et coll.* ont réussi à identifier à partir du cerveau de rat, une substance parmi d'autres ayant les propriétés de CDS, il s'agit d'une arginine décarboxylée: l'agmatine.

• **Agmatine:**

Agmatine, ou 1-amino-4-guanidinobutane, est la première substance identifiée comme CDS. Elle possède un groupement guanidine ressemblant au groupement amino-imidazoline de la clonidine.



L'agmatine est largement distribuée dans les plantes, les bactéries et les formes de vie primitive. Il s'agit d'un intermédiaire dans la biosynthèse des polyamines, issu de la décarboxylation de L-arginine sous l'action de l'arginine décarboxylase puis métabolisé sous l'action de diamine oxydase.

Regunathan et Reis (1996) ont identifié la présence d'agmatine pour la première fois chez les mammifères. L'agmatine est maintenant identifiée dans les organes de différents mammifères à différentes concentrations, on la retrouve dans l'estomac, l'intestin, le cœur, le cerveau et le plasma. On la retrouve aussi au niveau des cellules chromaffines (Wang *et coll.* 1995), les

cellules gliales (Regunathan *et coll.* 1995) et elle se lie, comme la clonidine, aux récepteurs  $\alpha_2$ -adrénergiques et aux récepteurs aux imidazolines  $I_1$ .

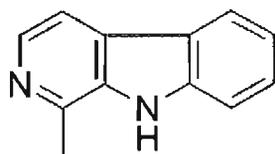
L'agmatine est localisée dans le cerveau et dans de nombreuses voies neuronales aux mêmes concentrations que les neurotransmetteurs, laissant suggérer que l'agmatine peut être un neurotransmetteur non peptidique.

D'autres études ont montré que l'agmatine peut avoir une activité neuroendocrinienne (Kalra *et coll.* 1995) et analgésique dans le SNC (Kolesnikov *et coll.* 1996) et peut aussi réguler la sécrétion des acides dans l'estomac (Glavin *et coll.* 1995). Récemment, Regunathan *et coll.* (2006) ont démontré que l'agmatine peut augmenter l'effet analgésique de la morphine et réduire les symptômes du retrait.

Plus tard, d'autres ligands endogènes aux récepteurs  $I_1$  ont été identifiés, parmi eux on cite:

• **Harmane:**

Il s'agit de l'alcaloïde  $\beta$ -carboline harmane résultant de la condensation des indoles amines comme tryptamine et d'une courte chaîne d'acide carboxylique comme l'acide pyruvique ou d'un aldéhyde comme l'acétaldéhyde.



**Harmane**

Récemment l'harmane a été identifiée dans des tissus humains (Hudson *et coll.* 1999; Musgrave et Badoer 2000). Elle possède des effets

centraux sur la pression artérielle, une grande affinité pour les récepteurs  $I_1$  et dépourvue de liaison sur les récepteurs  $\alpha_2$ -adrénergiques. L'harmane, lorsque administrée directement dans le NRL de rat, entraîne un effet hypotenseur, effet sensible à l'efaroxan, un antagoniste sélectif des récepteurs  $I_1$  (Musgrave et Badoer 2000).

Vues sa forte affinité et sa sélectivité, ainsi que son effet pharmacologique sur les récepteurs  $I_1$ , l'harmane est le ligand endogène pour les récepteurs  $I_1$  le plus convaincant.

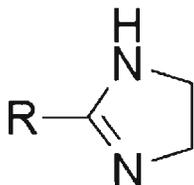
Récemment Prell *et coll.* (2004) ont identifié l'acide imidazole-acétique ribotide (l'IAA-RP) comme un nouveau ligand endogène des récepteurs  $I_1$ .

#### **1.4. Les agonistes et les antagonistes des récepteurs $I_1$ :**

##### ***1.4.1. Les agonistes des récepteurs $I_1$ :***

Les agonistes des récepteurs aux imidazolines  $I_1$  ont été synthétisés dans le but de développer une nouvelle génération d'antihypertenseurs ayant moins d'effets sur les récepteurs  $\alpha_2$ -adrénergiques, provoquant ainsi moins d'effets secondaires comme la bouche sèche, somnolence, et sédation qui résultent principalement de l'activation des récepteurs  $\alpha_2$ -adrénergiques. Ces agonistes permettent de mieux étudier ces récepteurs afin de mieux les caractériser et d'élucider leurs effets pharmacologiques.

Ces composés renferment tous un groupe imidazolinique, ce qui leur confère une affinité aux récepteurs  $I_1$ , une telle affinité qui change en fonction du groupement R.

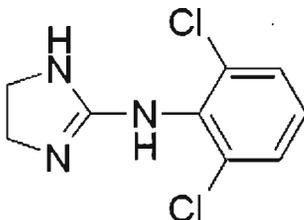


**Groupement imidazolinique**

Selon leur structure chimique, les agonistes aux récepteurs  $I_1$  peuvent être classifiés comme suit:

**a. Les dérivés de 2-aminoimidazoline:**

- *La clonidine:*



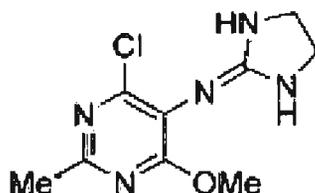
**Clonidine**

La clonidine est la première substance qui a permis l'identification des récepteurs  $I_1$  dans différents tissus. Elle se lie, avec une forte affinité (de l'ordre du nanomolaire) et de manière saturable, aux récepteurs  $I_1$  mais malheureusement elle n'est pas sélective par rapport aux récepteurs  $\alpha_2$ -adrénergiques. La clonidine possède une affinité aux récepteurs  $I_1$ :  $\alpha_2$ -adrénergique de 1:1.

- *La moxonidine :*

La moxonidine est un antihypertenseur imidazolinique d'action centrale de la 2<sup>ème</sup> génération. La moxonidine est obtenue suite à la substitution de l'anneau phényle de la clonidine par un anneau pyrimidine,

ainsi que l'introduction d'un atome Cl et des groupements méthyles, ce qui a rendu le produit plus sélectif pour les récepteurs I<sub>1</sub>.



**Moxonidine**

La moxonidine possède une haute affinité pour les récepteurs I<sub>1</sub> et une faible affinité pour les récepteurs  $\alpha_2$ -adrénergiques (30:1), d'où l'absence d'effets secondaires liés à la stimulation des récepteurs  $\alpha_2$ -adrénergiques, comme la sédation ou la bouche sèche.

Au niveau central, surtout au niveau de RVLM, la moxonidine diminue la pression artérielle en inhibant le tonus sympathique et diminuant les résistances périphériques.

Des études cliniques chez des patients hypertendus ont montré qu'une dose journalière de la moxonidine de 0,2-0,6 mg diminue significativement la pression artérielle et qu'il n'y a aucun effet rebond après l'arrêt du traitement (Schwarz et Kandziora 1990). À long terme, la moxonidine s'est avérée sécuritaire et bien tolérée, avec une moindre incidence d'effets secondaires que la clonidine et elle peut être administrée à des patients souffrant d'autres maladies concomitantes.

Chez des patients (Ollivier et Christen 1994) ainsi que chez des rats hypertendus (Mall *et coll.* 1991; Menaouar *et coll.* 2002; Paquette *et coll.* 2007), la moxonidine diminue significativement l'hypertrophie cardiaque tout en protégeant la structure du myocarde. D'autres études chez des patients hypertendus atteints d'une hypertrophie ventriculaire gauche ont aussi montré, qu'un traitement de 6 mois avec la moxonidine, réduit

significativement la masse du ventricule gauche et l'épaisseur du septum (Bousquet et Feldman 1999).

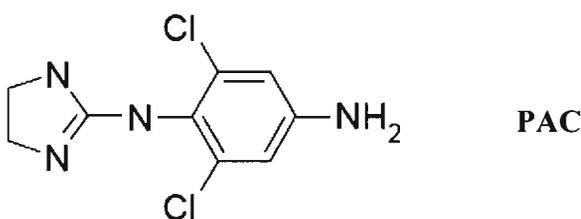
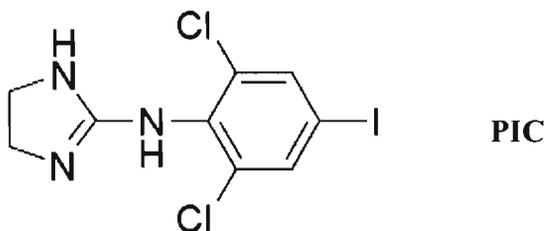
***b. Les dérivés de 2-aminoimidazoline:***

- *La para-iodo-clonidine (PIC):*

La PIC est obtenue suite à l'introduction d'un atome d'iode à la position para- sur le cycle aromatique, ce qui augmente l'affinité de PIC vis-à-vis des récepteurs I<sub>1</sub> et la rend plus spécifique. Cet agoniste a permis d'identifier les récepteurs I<sub>1</sub> pour la première fois dans les plaquettes humaines (Piletz *et coll.* 1991; Piletz et Sletten 1993).

- *La para-amino-clonidine (PAC):*

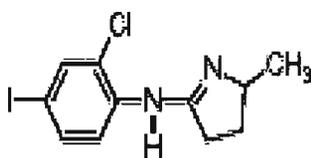
Ce composé est obtenu suite à la fixation d'un groupement aminé (NH<sub>2</sub>) en position para sur le cycle aromatique. Il a la même affinité pour les récepteurs I<sub>1</sub> que la clonidine mais moins sélectif.



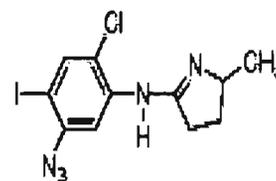
- *LNP 911* :

Il s'agit de 2-(2-chloro-4-iodo-phénylamino)-5-méthyle-pyrroline, synthétisé par Urosevic *et coll.* (2004) considéré comme le premier agoniste sélectif à haute affinité pour les récepteurs I<sub>1</sub> et ne possédant aucune affinité pour les récepteurs I<sub>2</sub> et récepteurs α<sub>2</sub>-adrénergiques.

À partir de LNP 911, Urosevic *et coll.* (2004) ont réussi à synthétiser un nouvel agoniste, LNP 906, possédant une fonction photo-activable lui permettant de se lier aux récepteurs I<sub>1</sub> de façon irréversible, afin de mieux étudier la caractérisation moléculaire des récepteurs I<sub>1</sub>.

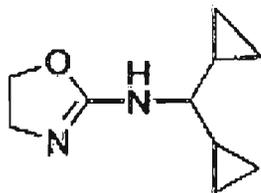


LNP 911



LNP 906

c. *Rilmenidine et ses analogues:*



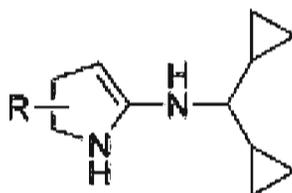
Rilmenidine

La rilmenidine est le fruit de plusieurs études cherchant des hypotenseurs plus sélectifs pour les récepteurs I<sub>1</sub>. En effet, la rilmenidine

possède une forte affinité et une bonne sélectivité pour les récepteurs  $\alpha_1$  vs.  $\alpha_2$ -adrénergiques (3:1).

La rilmenidine réduit la pression artérielle en réduisant l'activité du système sympathique, de plus elle agit au niveau périphérique en diminuant le taux d'adrénaline au niveau de la paroi des artères et au niveau rénal en inhibant l'échangeur Na/H. Son efficacité et sa tolérance ont été bien démontrées dans des études cliniques ce qui la rend prioritaire pour le traitement de première attention.

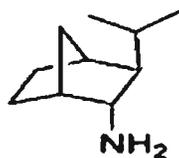
Même si la rilmenidine possède une grande sélectivité pour les récepteurs  $I_1$ , elle se lie toujours aux récepteurs  $I_2$ , ce qui a ouvert la voie pour développer d'autres dérivés encore plus sélectifs. Tel est l'exemple de la famille des aminopyrolines où l'anneau d'oxazoline est remplacé par un anneau pyroline avec différents substituants, ce qui a permis de donner naissance à différents agonistes afin de mieux caractériser les récepteurs  $I_1$  et mieux étudier les effets hypotenseurs des agonistes récepteurs  $I_1$ .



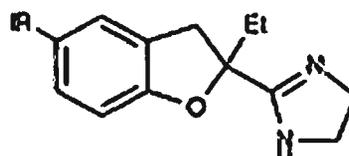
**Aminopyroline**

### 1.4.2. Les antagonistes des récepteurs I<sub>1</sub>:

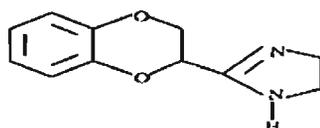
Il existe plusieurs antagonistes des récepteurs I<sub>1</sub>, à savoir:



AGN



Efaroxan, R=H



Idazoxan

Le tableau suivant compare l'affinité des différents composés imidazoliques vis-à-vis des récepteurs I<sub>1</sub> et des récepteurs α<sub>2</sub>-adrénergiques.

	Les récepteurs I <sub>1</sub> Ki (Kirchberger <i>et coll.</i> 1988)	Les récepteurs α <sub>2</sub> - adrénergiquesKi (Kirchberger <i>et coll.</i> 1988)
<b>Moxonidine</b>	2	75
<b>Rilmenidine</b>	6	180
<b>Clonidine</b>	1	4
<b>Efaroxan</b>	0,15	6
<b>Idazoxan</b>	186	4

**Tableau 2: Affinité de différents agonistes et antagonistes des récepteurs I<sub>1</sub>.**  
(Ernsberger *et coll.* 1993)

### 1.5. Les systèmes de transduction couplés aux récepteurs I<sub>1</sub>:

Plusieurs résultats démontrent que les récepteurs I<sub>1</sub> sont couplés aux différents systèmes de transduction.

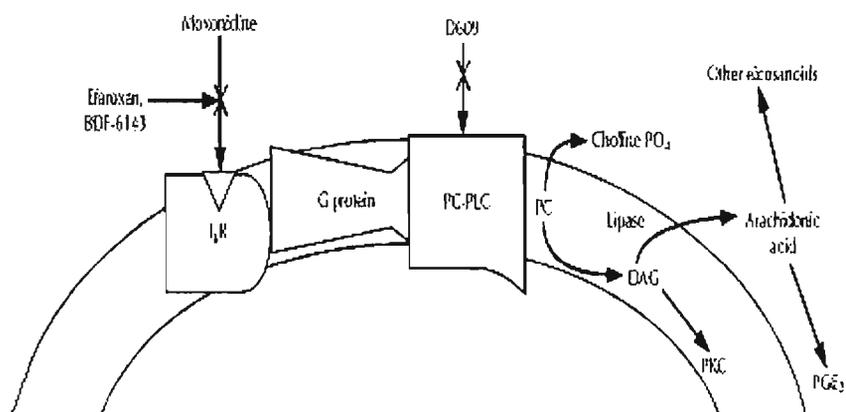
Afin d'élucider les voies de signalisation possibles pour les agonistes aux imidazolines, les cellules phéochromocytomes (PC12) se sont avérées comme un modèle idéal. En effet, il s'agit d'une lignée de cellules cancéreuses isolée de la glande surrénale et qui exprime les récepteurs I<sub>1</sub>, au niveau de la membrane plasmique, et non pas les récepteurs α<sub>2</sub>-adrénergiques. La réponse aux agonistes des récepteurs I<sub>1</sub> peut être ainsi étudiée sans avoir recours à un blocage des récepteurs α<sub>2</sub>-adrénergiques (Ernsberger *et coll.* 1995; Separovic *et coll.* 1996).

La réponse cellulaire aux agonistes aux récepteurs I<sub>1</sub> comprend :

- L'inhibition de l'entrée des ions Na<sup>+</sup> et Ca<sup>+</sup> induite par la nicotine (Musgrave *et coll.* 1995).
- La proportion de la forme active d'ERK augmente de 150 % et l'activité de JNK est presque doublée chez les cellules PC12 (Edwards *et coll.* 2001)
- L'hydrolyse de la phosphatidylcholine en diacylglyceride et phosphocholine (Separovic *et coll.* 1996; Zhang *et coll.* 2001).
- La libération de l'acide arachidonique et de la prostaglandine E<sub>2</sub> (Ernsberger 1999; Prell *et coll.* 2004).
- L'activation du bII et de l'isoforme f de la protéine kinase C (PKC) (Edwards *et coll.* 2001; Edwards et Ernsberger 2003).
- La conversion des kinases ERK1, ERK2 et c-jun kinase en leurs formes actives (Edwards *et coll.* 2001; Zhang *et coll.* 2001; Prell *et coll.* 2004).

- La modification de l'expression des gènes (Prell *et coll.* 2004) et l'augmentation de l'expression de la phenyléthanolamine-N-méthyle transférase (Evinger *et coll.* 1995).
- L'augmentation du nombre des cellules PC12 en cultures (Edwards *et coll.* 2001), probablement en empêchant l'apoptose et en prolongeant la survie (Dontenwill *et coll.* 2003a; 2003b; Dupuy *et coll.* 2004)

Bidet *et coll.* (1990) ont suggéré qu'au niveau rénal, les récepteurs  $I_1$  sont couplés à l'échangeur  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ . Tandis que Greney *et coll.* (2000) ont démontré que les récepteurs  $I_1$  sont couplés à la voie de l'adénylate cyclase. Après la stimulation avec forskoline, la bénazoline, agoniste sélectif des récepteurs  $I_1$ , et la moxonidine sont capables de diminuer le taux d'AMPc dans les cellules PC12, mais pas dans les cellules HT29 dépourvues des récepteurs  $I_1$ .



**Figure 1 : La voie de signalisation des récepteurs aux imidazolines  $I_1$  proposée par Ernsberger. Tiré de: Ernsberger 1999**

D'autre part Ernsberger (1999) ont démontré que la liaison de la moxonidine à ses récepteurs dans les PC12 active phosphatidyl - choline - phospholipase C (PC-PLC), qui utilise la phosphatidylcholine comme substrat pour générer le diacylglycérol (DAG) et la phosphocholine, qui vont être relâchés dans le milieu extracellulaire. Le DAG, sous l'action de la DAG lipase et de la monoglycéride lipase, libère l'acide arachidonique qui est métabolisé à son tour en prostaglandine II (PGE2) et autres métabolites.

Il est connu que l'activité de cPKCbII est régulée par le DAG cellulaire et que la stimulation des R I<sub>1</sub> avec la moxonidine augmente la masse cellulaire totale de DAG (Separovic *et coll.* 1996) donc l'activation de cPKCbII par moxonidine est le simple résultat de l'augmentation de DAG.

En 2000, Alahari *et coll.* clonent un récepteur I<sub>1</sub> de souris qu'ils nomment Nischarin.

Au cours de la même année, Piletz *et coll.* parviennent à isoler une protéine, human imidazoline receptor antisera-selected protein (IRAS) de 167 kDa à partir d'une banque d'ADNc d'hippocampe humain possédant des caractéristiques pharmacologiques semblables aux récepteurs I<sub>1</sub> (Ivanov *et coll.* 1998).

IRAS possède une région structurale commune aux récepteurs I<sub>1</sub>, cette région riche en acides aminés lui permet de procurer les propriétés de liaison sur le site de haute affinité sur les récepteurs I<sub>1</sub> pour la moxonidine et la rilménidine.

Ainsi, possédant 80% d'homologie avec Nischarin de souris, IRAS est considéré comme un bon candidat pour représenter le récepteur I<sub>1</sub>.

IRAS/Nischarin est capable d'interagir spécifiquement avec la sous-unité  $\alpha 5$  de l'intégrine  $\alpha 5\beta 1$  ayant comme effet l'inhibition de la migration cellulaire (Alahari *et coll.* 2000). Cet effet sur la migration est principalement

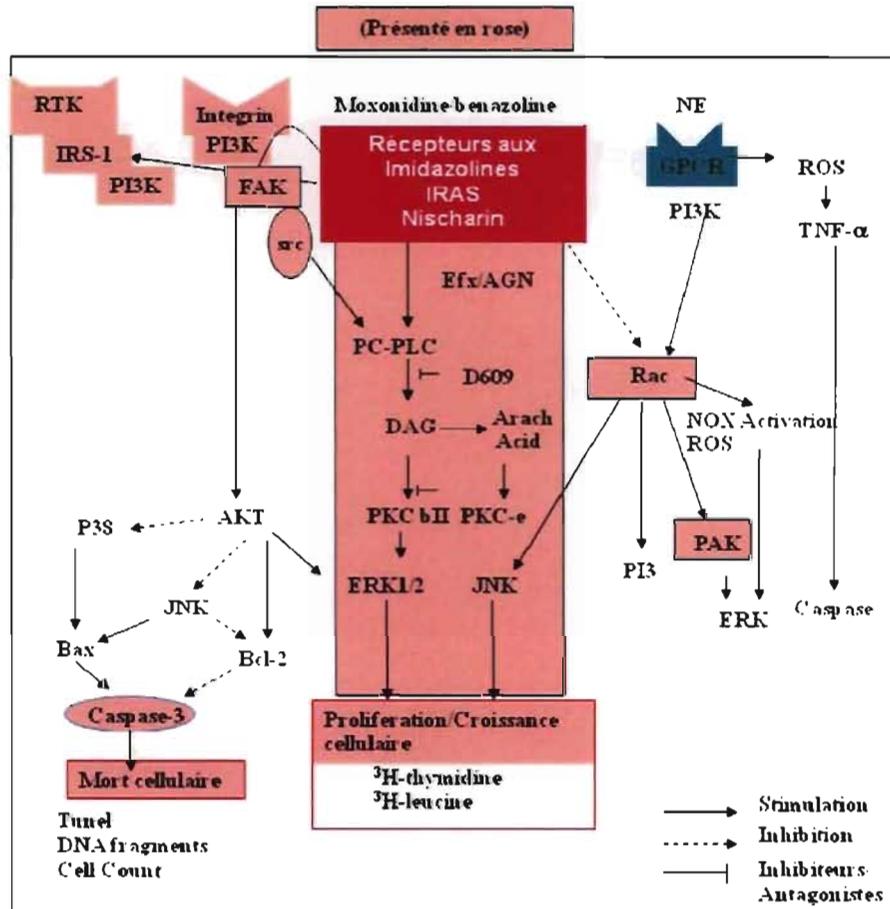
medié par l'inhibition de la protéine kinase PAK (Alahari *et coll.* 2004). Les intégrines sont des récepteurs transmembranaires hétérodimériques (sous-unités  $\alpha$  et  $\beta$ ) permettant des interconnexions cellule-cellule et cellule-protéines de la matrice extracellulaire (ECM) (Aplin *et coll.* 1998; Giancotti et Ruoslahti 1999). La fonction cellulaire de ces récepteurs semble assez vaste puisqu'ils seraient impliqués dans la prolifération, la croissance, la migration et la différenciation. Les intégrines sont impliquées dans le remodelage du tissu cardiaque.

L'intégrine  $\alpha 5 \beta 1$  joue un rôle prééminent dans l'adhésion des cellules à la fibronectine, la migration, la différenciation et la survie des cellules c'est-à-dire la balance prolifération/apoptose. Cette intégrine semble inhiber la migration cellulaire et permet une survie plus longue dans des conditions de stress pro-apoptotique.

Récemment, il a été prouvé que IRAS protège les cellules PC12 transfectées contre l'apoptose (Dontenwill *et coll.* 2003a; 2003b) en modulant l'expression des protéines antiapoptotique Bcl2 et en activant la voie de PI3kinase / AKT (Matter et Ruoslahti 2001).

Le schéma suivant montre la voie de signalisation et les effets des récepteurs aux imidazolines  $I_1$  dans les cellules PC12 et les cellules surexprimant les Nischarins.

**La voie de signalisation et les effets des récepteurs- $I_1$**   
**antérieurement reportés dans les cellules PC12 et les cellules**  
**surexprimant Nischarin.**



**Figure 2 : Les voies de signalisation et les effets des récepteurs aux imidazolines  $I_1$**   
**dans les cellules PC12 et les cellules surexprimant Nischarin.**

## **1.6. Fonctions et mécanismes d'action des récepteurs I<sub>1</sub> :**

Plusieurs travaux ont démontré que les récepteurs I<sub>1</sub> sont impliqués dans différents effets physiologiques. Leur effet le plus important est la régulation de la pression artérielle, en agissant tant au niveau central pour inhiber l'activité du SNS qu'au niveau périphérique.

### ***1.6.1. Effet central :***

La micro-injection de rilmenidine ou de moxonidine dans la RVLM produit une réduction de la pression artérielle comparable à celle provoquée par la clonidine (Bousquet *et coll.* 1984; Ernsberger *et coll.* 1990).

En effet, les agonistes aux récepteurs I<sub>1</sub> modulent l'activité sympathique d'origine centrale, et par conséquent le tonus vasomoteur (Chan et Head 1996). Chez des animaux et des humains hypertendus, l'administration de la moxonidine ou de la rilmenidine inhibe, de façon dose dépendante, le tonus sympathique. Cette inhibition du tonus se traduit par une vasodilatation qui réduit la résistance périphérique (Chan et Head 1996), une réduction de la fréquence cardiaque, une diminution du niveau circulant de l'épinephrine et de la norépinéphrine (Gothert et Molderings 1991; Gothert *et coll.* 1995), une diminution de l'activité de la rénine plasmatique donc la réduction de la concentration de l'angiotensine II (Michel *et coll.* 1990) ce qui prévient la rétention du sodium et de l'eau. Tous ces mécanismes mènent à une baisse de la pression artérielle de façon aigüe et à long terme.

### ***1.6.2. Effet périphérique :***

Les récepteurs I<sub>1</sub> périphériques sont localisés au niveau des tubules proximaux des reins. Leur stimulation se traduit par une diminution de l'activité du nerf sympathique rénal (Kline et Cechetto 1993), une augmentation du débit rénal, de la clairance osmotique (Kline et Cechetto 1993; Smyth et Penner

1995), de diurèse et de natriurèse (Hohage *et coll.* 1997; Mukaddam-Daher et Gutkowska 1999; 2000; El-Ayoubi *et coll.* 2005) ce qui contribue à une régulation de la pression artérielle à long terme.

## **2. LES RECEPTEURS AUX IMIDAZOLINES I<sub>1</sub> AU NIVEAU CARDIAQUE:**

### **2.1. Identification des récepteurs I<sub>1</sub> dans le cœur:**

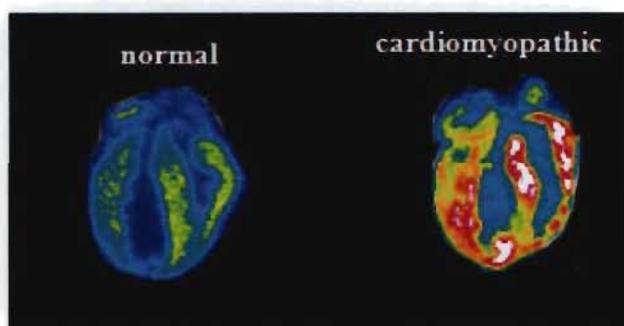
#### ***2.1.1. Les études aiguës in vivo:***

Dans des études *in vivo* chez des rats normotendus Sprague-Dawley (SD), la moxonidine utilisée à des doses dépourvues d'effets hypotenseurs, stimule de façon dose dépendante l'excrétion d'eau et de sodium une heure après l'injection. Ces travaux ont été confirmés chez les rats Wistar Kyoto (WKY) et des rats hypertendus (SHRs) (Jalil *et coll.* 1989; Mukaddam-Daher et Gutkowska 1999, 2000; El-Ayoubi *et coll.* 2005). Ces études ont aussi démontré que la moxonidine augmente le taux plasmatique d'ANP et de son marqueur d'activité, le GMPc urinaire. Cet effet est totalement inhibé par l'anantin, un antagoniste d'ANP, confirmant ainsi, pour la première fois, que l'ANP est directement impliqué dans les effets rénaux de la moxonidine (El-Ayoubi *et coll.* 2005).

La relation entre la moxonidine et les peptides natriurétiques a soulevé la possibilité de la présence des récepteurs I<sub>1</sub> dans le cœur. Ainsi, le groupe de Mukaddam-Daher (El-Ayoubi *et coll.* 2002) a démontré, pour la première fois, l'existence des récepteurs I<sub>1</sub> dans le tissu cardiaque. Les études ont été réalisées en utilisant des anticorps spécifiques, qui reconnaissent les récepteurs I<sub>1</sub> et les récepteurs I<sub>2</sub> mais pas les récepteurs  $\alpha$ 2-adrénérgiques. De plus, les expériences de liaisons membranaires et d'autoradiographie en utilisant du dérivé radiomarqué de la clonidine (<sup>125</sup>I-

PIC), qui se lie aux récepteurs  $I_1$  et aux récepteurs  $\alpha_2$ -adrénergiques ont été réalisées après inhibition irréversible des récepteurs  $\alpha_2$ -adrénergiques. Ces études ont permis d'identifier les récepteurs  $I_1$  au niveau des oreillettes et des ventricules cardiaques de différentes espèces (El-Ayoubi *et coll.* 2002) (Figure 3).

De plus, les récepteurs aux imidazolines cardiaques sont régulés dans les pathologies cardiovasculaires. Les récepteurs  $I_1$  sont augmentés dans les oreillettes cardiaques chez les SHR, et au niveau ventriculaire chez les hamsters cardiomyopathiques et les humains avec défaillance cardiaque.



**Figure 3 : Localisation des récepteurs  $I_1$  dans le cœur des hamsters par autoradiographie (liaison de  $^{125}\text{I}$ -PIC après inhibition irréversible des récepteurs  $\alpha_2$ -adrénergiques), et leur régulation en cas de cardiomyopathie (El-Ayoubi *et coll.* 2002).**

In vivo, l'exposition chronique de rats SHR à un agoniste des récepteurs  $I_1$  (la moxonidine) pendant un mois est associée avec une normalisation des récepteurs  $I_1$  cardiaques (El-Ayoubi *et coll.* 2003). Ces résultats suggèrent que les récepteurs  $I_1$  cardiaques sont fonctionnels et ils sont sensibles aux changements du milieu cardiovasculaire.

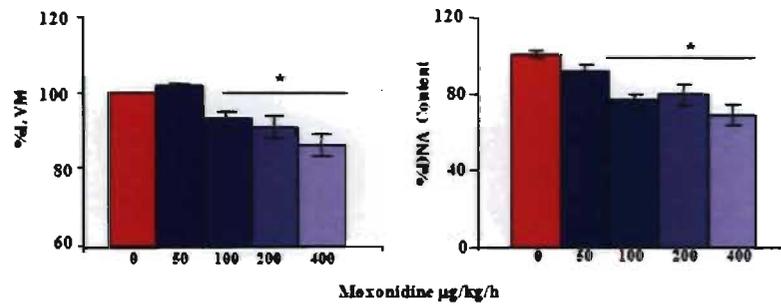
En utilisant la technique de perfusion selon Langendorff, Mukaddam-Daher *et coll.* (2006) ont démontré que la perfusion des cœurs isolés de rats avec la moxonidine stimule la libération d'ANP. Ces résultats montrent que la moxonidine peut agir directement sur les récepteurs cardiaques sans la participation du SNC. Donc, les récepteurs I<sub>1</sub> au niveau cardiaque sont fonctionnels.

Menaouar *et coll.* (2002), Fowler *et coll.* (2002) et Paquette *et coll.* (2007) ont aussi démontré, que le traitement chronique avec la moxonidine, chez des rats hypertendus, en plus de diminuer l'HTA régresse l'hypertrophie ventriculaire gauche (HVG). Les mécanismes impliqués dans la régression de l'HVG avec la moxonidine ont été étudiés en utilisant des rats SHR, et en analysant l'effet dose et temps dépendant du traitement chronique (4 semaines). Dans cette étude, le traitement a diminué la masse du ventricule gauche de manière dose et temps dépendant (Figure 4). La moxonidine a diminué le contenu d'ADN dans le ventricule gauche et a inhibé la synthèse d'ADN. Elle a augmenté la fragmentation d'ADN et l'expression de la protéine caspase-3 de façon transitoire après une semaine du traitement, les effets ont été normalisés après 4 semaines.

Chez des rats, après l'infarctus cardiaque, le traitement avec la moxonidine abolit l'activation sympathique, prévenant ainsi le développement de l'hypertrophie cardiaque et ramène le contenu en collagène interstitiel à l'état basal (Van Kerckhoven *et coll.* 2002).

La moxonidine a diminué significativement Bax, une protéine mitochondriale apoptotique et a stimulé Bcl-2, une protéine antiapoptotique. Cette étude implique la modulation d'ADN cardiaque dans le contrôle de la masse du ventricule gauche avec la moxonidine.

### L'effet antihypertrophique de la moxonidine



**Figure 4: La masse ventriculaire et le contenu d'ADN au niveau du ventricule gauche des SHR après 4 semaines du traitement avec la moxonidine. \*p<0,01. Paquette *et coll.* (2007)**

### 3. L'HYPERTROPHIE CARDIAQUE :

Le développement normal du cœur est basé sur l'équilibre de plusieurs processus cellulaires et mécaniques. Un débalancement de l'équilibre, qui maintient la structure cardiovasculaire normale, entraîne un remodelage impliquant un changement de la réponse de divers types tels que la cellulaire, l'hypertrophie et l'hyperplasie cellulaire, la production, le dépôt et la dégradation exagérée des composantes de la matrice extracellulaire.

L'hypertrophie ventriculaire s'accompagne d'un remodelage profond au sein de la structure cardiaque impliquant divers facteurs. Le cœur s'adapte par croissance tissulaire qui se manifeste par une prolifération des fibroblastes, responsables de l'apparition des lésions irréversibles de fibrose myocardique (Weber *et coll.* 1989a). En plus, la mort des cardiomyocytes, qui représente la perte du muscle contractile, est responsable à la fois d'une hypertrophie compensatrice des cardiomyocytes restants et d'une fibrose de remplacement (Swynghedauw 2002).

#### 3.1. Cœur :

##### 3.1.1. Structure cardiaque :

Le cœur se compose essentiellement des cardiomyocytes, cellules contractiles occupant environ 75% de l'espace structurel, et des cellules non cardiomyocytes, représentées principalement par les fibroblastes. Les fibroblastes constituent plus de 90% des cellules non myocytes dans le cœur, elles sont à l'origine de la matrice protéique extracellulaire (synthèse et dépôt des fibres de collagène) et le remodelage de cette matrice constitue le facteur le plus important dans le développement de l'HVG.

Le compartiment de cardiomyocytes est formé des cellules contractiles, volumineuses représentant 30% du nombre cellulaire total (Zak 1973).

Le compartiment de non-myocytes est composé de :

- a. fibroblastes constituant la majorité des cellules en terme de nombre dans le cœur. Les fibroblastes sont responsables de la production des protéines structurales de la matrice interstitielle dont le du collagène et l'élastine,
- b. cellules musculaires lisses retrouvées dans les artères et les artérioles coronaires intramyocardiques,
- c. cellules endothéliales,
- d. cellules mésothéliales du péricarde,
- e. macrophages et les mastocytes faisant partie du système immunitaire local.

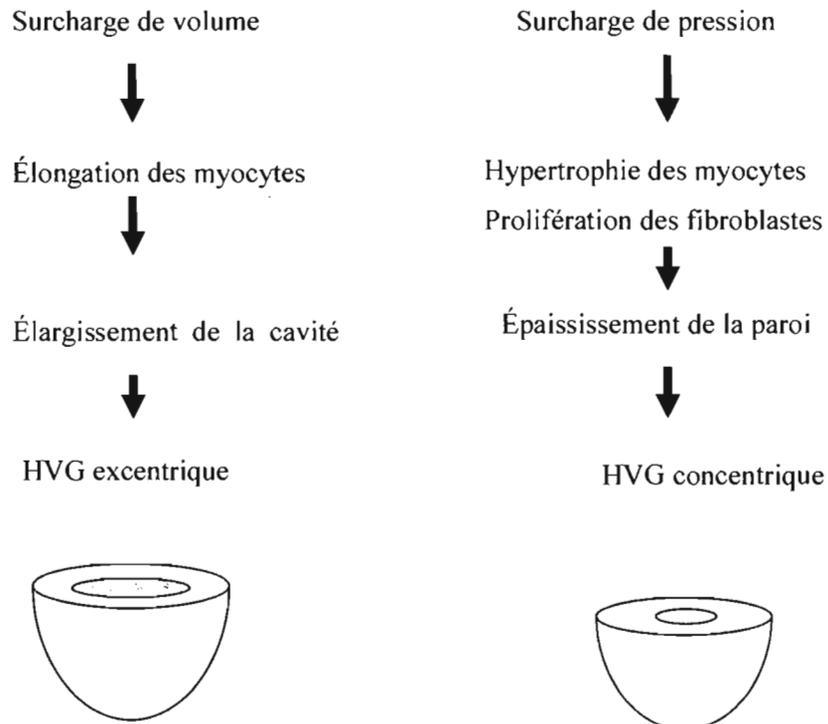
L'hypertrophie pathologique due à la surcharge de pression et plusieurs facteurs vasoactifs, est caractérisée par un déséquilibre de l'homéostasie entre ces deux compartiments cellulaires.

### ***3.1.2. Physiopathologie de l'hypertension artérielle :***

L'hypertension artérielle constitue la cause la plus fréquente de la surcharge pressive et mécanique du ventricule gauche. Au stade initial, cette surcharge provoque une hypertrophie dite compensée. Cette forme est caractérisée par un épaississement de la paroi et du septum ventriculaire et un volume de la chambre interne du ventricule normal, c'est-à-dire le ratio masse/volume ventriculaire interne élevé. Avec la persistance de l'hypertension, l'hypertrophie devient décompensée, les ventricules deviennent donc plus larges avec un volume diastolique élevé, le ratio masse/volume est donc réduit. Cet état évolue pour aboutir à une défaillance cardiaque.

L'hypertrophie ventriculaire est d'origine multifactorielle. En effet, plusieurs facteurs régulent son développement, comme la durée de la charge de pression, le rythme et la contractilité cardiaque, les facteurs génétiques ainsi que les influences hormonales. D'un point de vue physiologique,

l'hypertrophie ventriculaire peut être divisée en deux hypertrophies, concentrique et excentrique.



**Figure 5 : Pathogénie de l'hypertrophie cardiaque dans l'hypertension.**

Afin de réduire le stress exercé sur la paroi durant l'HTA, le cœur s'adapte en allongeant les myocytes existants et en augmentant les dimensions internes du ventricule gauche. Ainsi, durant la surcharge de pression, due principalement à l'HTA, le cœur s'adapte en augmentant la prolifération myocytaire et entraîne donc une augmentation de l'épaisseur de la paroi ventriculaire, tout en préservant le volume de la chambre du ventricule

gauche, et une diminution de la taille de la lumière (hypertrophie concentrique, Figure 5). À l'inverse, la surcharge de volume entraîne une dilatation du ventricule gauche qui s'accompagne d'un épaissement de la paroi et d'un élargissement de la cavité, tout en ayant un rapport normal entre l'épaisseur de la paroi ventriculaire et le diamètre interne (hypertrophie excentrique, Figure 5).

Ces réponses d'adaptation à la surcharge de pression et de volume sont essentiellement bénéfiques. Mais à plus long terme, ces réponses d'adaptation, qui peuvent être initialement réversibles, peuvent conduire à un déficit énergétique chronique des myocytes et à la mort cellulaire (Katz 1990).

### ***3.1.3. Le remodelage cardiaque:***

Au début, l'HVG est une réponse adaptative bénéfique qui permet au ventricule gauche de maintenir sa capacité contractile face aux changements de pression et de débit auxquels il est soumis. L'HTA constitue un risque majeur de l'HVG.

D'un point de vue anatomique, l'HVG est définie par une augmentation de la masse totale du cœur relative à la surface corporelle. Sur le plan histologique, l'HVG implique en général l'augmentation de la taille des cardiomyocytes (hypertrophie) sans hyperplasie (sans prolifération) et l'hyperplasie des non-cardiomyocytes, principalement les fibroblastes.

À long terme, les capacités d'adaptation du ventricule gauche sont dépassées et ces changements peuvent dégénérer en une défaillance cardiaque caractérisée par l'apoptose des cardiomyocytes et la fibrose cardiaque (phase de décompensation).

#### ***a. Implication des cardiomyocytes:***

En réponse à des surcharges de volume ou de pression, le cœur s'adapte par une augmentation de la masse ventriculaire qui se manifeste

par une augmentation de la taille des cardiomyocytes suite à l'apparition de nouveaux sarcomères.

***b. Implication des non-cardiomyocytes :***

À cause de la prolifération et/ou l'augmentation de l'activité synthétique des cellules endothéliales des vaisseaux coronariens et les fibroblastes interstitiels, les changements les plus importants observés au niveau du compartiment non-myocytaire sont la perte de microvaisseaux coronariens et la production excessive de la matrice extracellulaire et du collagène du type-I (Weber *et coll.* 1987). Cette accumulation du collagène dans le ventricule hypertrophié est responsable de l'apparition des lésions irréversibles de fibrose myocardique (Weber *et coll.* 1989b).

***c. La fibrose du myocarde :***

Les différents types d'HVG s'accompagnent aussi d'une fibrose dont le type et la distribution sont variables selon le mécanisme physiopathologique qui est responsable (Weber et Brilla 1991).

La fibrose cardiaque joue un rôle majeur dans le développement de l'insuffisance cardiaque. En effet, les fibroblastes interstitiels sont considérés comme un type cellulaire réactif contribuant, autant dans des conditions physiologiques que pathologiques, à l'organisation de la paroi par des changements dans leur nombre et dans la synthèse de matériaux matriciels.

Les fibroblastes cardiaques peuvent induire l'expression des collagènes de type I et II (Doering *et coll.* 1988). Ces deux types de collagènes ont la propriété de connecter les myocytes entre eux (Doering *et coll.* 1988; Weber 1989). Ainsi, l'accumulation de collagène, principalement le collagène du type I responsable de la rigidité et la réduction de la distensibilité du myocarde, dans le ventricule gauche hypertrophié induit une fibrose interstitielle.

Cette fibrose est associée à une augmentation de l'épaisseur de la paroi et à une diminution de la compliance du tissu cardiaque (Weber et Brilla 1991). L'augmentation de la matrice extracellulaire au cours de l'HVG a aussi des effets délétères sur la fonction diastolique (Weber *et coll.* 1989b). La fibrose cardiaque peut également restreindre les mouvements myofibrillaires altérant ainsi la fonction cardiaque globale (Jalil *et coll.* 1989). Le résultat net de ces changements pathologiques (remodelage, fibrose et mort cellulaire) est le déclin progressif et continu du débit et de la performance cardiaques.

À long terme, les capacités d'adaptation sont dépassées et ces changements peuvent dégénérer en une défaillance cardiaque caractérisée par l'apoptose des cardiomyocytes qui caractérise la phase de décompensation.

### **3.2. Les systèmes impliqués dans le développement de l'HVG :**

La croissance des cardiomyocytes est un dénominateur commun de l'HVG (Anversa *et coll.* 1979). Le processus hypertrophique est probablement plus que la simple croissance des cardiomyocytes. L'implication de protéines et d'enzymes ainsi que l'expression des gènes doivent être considérées dans ce processus. En plus de l'étirement mécanique, les hormones circulantes telles les hormones de croissance, l'angiotensine II et la norépinéphrine, jouent un rôle majeur dans la régulation de la croissance des cardiomyocytes.

#### **3.2.1. L'étirement mécanique :**

L'hypertension systémique ou pulmonaire induit une hypertrophie ventriculaire droite et gauche respectivement, confirmant ainsi l'importance de la charge locale dans le développement de l'hypertrophie *in vivo*. L'effet de la surcharge de pression est reproduit *in vitro*, par un étirement passif des myocytes ventriculaires sur des membranes distendues, induisant ainsi une

hypertrophie cellulaire quantifiable par la synthèse protéique totale (Komuro *et coll.* 1990, 1991).

### **3.2.2. Le rôle du système rénine – angiotensine :**

Dans l'hypertrophie cardiaque, il y a une augmentation de l'expression génique de l'angiotensine et de l'enzyme de conversion de l'angiotensine, suggérant un rôle potentiel autocrine/paracrine de l'angiotensine II dans le cœur, en plus de son rôle classique dans la régulation de la pression (Dzau 1993). L'angiotensine préformée et stockée dans les myocytes cardiaques est libérée en réponse à un étirement *in vitro* et transmet les réponses hypertrophiques induites par l'étirement par l'intermédiaire du récepteur de type I de l'angiotensine II (Sadoshima et Izumo 1993; Sadoshima *et coll.* 1993).

### **3.2.3. Le rôle du système sympathique :**

L'implication des catécholamines dans le développement de l'hypertrophie cardiaque a été initialement montrée grâce aux études cliniques qui ont été réalisées chez des patients hypertendus. Le traitement des patients avec des agents antihypertenseurs qui réduisent l'activité sympathique engendre une régression de l'hypertrophie cardiaque (Strauer *et coll.* 1985). De nombreuses autres études ont été effectuées pour caractériser les effets directs des catécholamines dans le développement de l'hypertrophie cardiaque. Ainsi King *et coll.* (1987) et Zierhut et Zimmer (1989) ont prouvé que l'infusion de noradrénaline produit une augmentation de la masse myocardique indépendamment des changements de pression sanguine et que la perfusion d'un inhibiteur des récepteurs  $\alpha_1$ -adrénergiques, empêche le développement de l'hypertrophie cardiaque qui est induite par la norépinéphrine.

Les études effectuées sur des myocytes néonataux en culture ont montré que les agents  $\alpha$ 1-adrénergiques induisent l'hypertrophie des myocytes en augmentant la synthèse protéique et le volume cellulaire (Simpson 1985; Colombo *et coll.* 2001).

#### **3.2.4. Les facteurs de croissance :**

La charge seule est insuffisante pour induire complètement l'hypertrophie cardiaque et un certain nombre d'expériences confirment la nécessité de facteurs additionnels dans l'établissement et le maintien du phénotype observé.

Les études ayant décrit que l'ANP est secrété par le myocarde en réponse à la charge, ont fourni la première évidence que le cœur est capable de produire et de sécréter une variété de peptides parmi lesquels nombreux sont ceux qui ont des effets trophiques.

Différentes études ont démontré l'implication des facteurs de croissance dans le développement de l'hypertrophie cardiaque.

##### **a. IGF-1 :**

Les récepteurs du facteur de croissance homologue à l'insuline l'IGF-1 (Insulin-like growth factor) sont présents dans le myocarde (Engelmann *et coll.* 1989) et une induction parallèle du facteur de croissance et de son récepteur est observée en réponse à une augmentation de la paroi cardiaque au stress (Reiss *et coll.* 1993).

L'IGF-1 augmente la synthèse protéique (Fuller *et coll.* 1992) et l'expression de gènes musculaires spécifiques dans le myocarde (Ito *et coll.* 1993). L'IGF-1 stimule aussi le développement des myofibrilles des myocytes adultes (Donath *et coll.* 1994).

*b. TGF- $\beta$ :*

L'expression génique du facteur transformant de croissance TGF- $\beta$  (Transforming Growth Factor) augmente dans les conditions de surcharge de pression chez le rat (Villarreal et Dillmann 1992). Dans les myocytes cardiaques, les agonistes qui induisent une hypertrophie cardiaque telles l'angiotensine II et la norépinéphrine entraînent une augmentation de l'expression du gène du TGF- $\beta$ 1 (Bhambi et Eghbali 1991; Sadoshima et Izumo 1993).

De nombreux autres facteurs sont capables de promouvoir ou d'inhiber l'hypertrophie cardiaque. L'endothéline, le bFGF et la myotrophine (Sen *et coll.* 1990) semblent aussi jouer un rôle important dans le développement de l'hypertrophie cardiaque. Par contre, de nombreux autres facteurs tels que l'oxyde nitrique (Matsuoka *et coll.* 1996), les prostaglandines (Hara *et coll.* 2005) ou l'ANP (Hayashi *et coll.* 2004) ont la capacité d'inhiber l'hypertrophie des myocytes. Ainsi le myocarde est sous l'influence de facteurs inhibiteurs et stimulateurs, et un déséquilibre en faveur de l'un ou de l'autre de ces facteurs peut induire une augmentation ou une régression de l'hypertrophie cardiaque.

La pathogénie de l'hypertrophie cardiaque semble donc être multifactorielle comme l'illustre le schéma suivant (Figure 6).

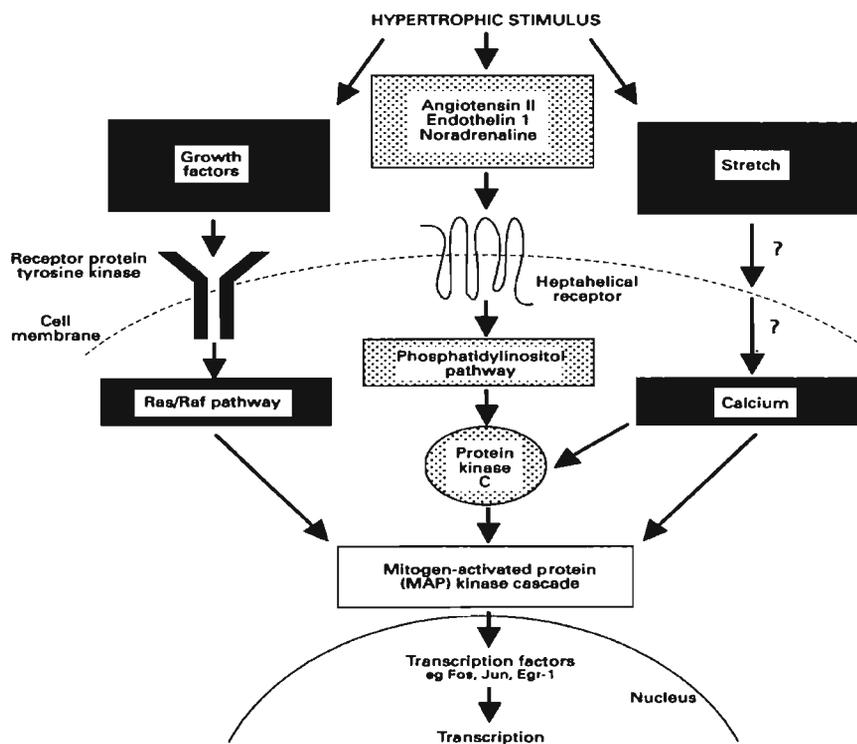


Figure 6 : Voies de signalisation des différents facteurs possiblement impliqués dans le développement de l'hypertrophie cardiaque. D'après Glennon *et coll.* (1995)

#### 4. L'APOPTOSE

La mort cellulaire programmée fait partie intégrante de la physiologie normale d'un organisme : ce phénomène de mort cellulaire intervient dans l'élimination des cellules âgées ou endommagées, dans la dégénérescence des cellules surnuméraires, en particulier lors du développement embryonnaire ou le fonctionnement et l'homéostasie du système immunitaire. Il est cependant crucial à la survie de l'organisme que cette mort cellulaire soit étroitement régulée : une mort inappropriée va être aussi délétère pour l'organisme qu'une prolifération excessive. Un dérèglement de l'apoptose ou de son contrôle est un effet impliqué dans de nombreuses pathologies humaines. D'une part, l'inhibition de l'apoptose, aboutissant à la prolifération incontrôlée d'une population cellulaire, joue un rôle fondamental à différentes étapes du développement de l'HVG. D'autre part, une stimulation anormale de l'apoptose, conduisant à une perte cellulaire, est observée dans certaines maladies cardiovasculaires (défaillance cardiaque).

Les protéines de la famille de Bcl-2 sont les principales actrices de la régulation du processus apoptotique. Depuis sa mise en évidence, Bcl-2 s'est révélée faire partie d'une famille sans cesse croissante de protéines régulatrice de l'apoptose. Si on se réfère à leur fonction biologique, les protéines de la famille de Bcl-2 peuvent être classées en deux sous familles : des protéines anti-apoptotiques, telle que Bcl-2 (Hockenbery *et coll.* 1990), Bcl-XL (Boise *et coll.* 1993), et Bcl-W (Gibson *et coll.* 1996) et des protéines pro-apoptotiques telles que Bax (Oltvai *et coll.* 1993), Bcl-XC (Boise *et coll.* 1993), Bad (Yang *et coll.* 1995), et Bid (Wang *et coll.* 1996).

Une des caractéristiques importantes des protéines de la famille de Bcl-2 est de pouvoir former des homo- ou des hétérodimères. Il semble en fait que l'équilibre entre la vie ou la mort soit influencé par le type et la proportion de dimères anti- ou pro-apoptotique (Oltvai *et coll.* 1993). Ainsi,

la formation majoritaire de dimères anti-apoptotique préserve la vie cellulaire, alors que la présence accrue de dimères pro-apoptotique conduit à la mort cellulaire. La proportion de chaque type de dimère dépend de l'expression de ces protéines, de leur niveau de phosphorylation ou encore de clivages protéolytiques.

La balance locale entre pro-apoptotique Bax et anti-apoptotique Bcl2 décide donc de la survie ou de la mort de chaque cellule individuellement. Une augmentation du rapport Bax/Bcl2 a été associée à l'augmentation d'apoptose des cellules.

## 5. BUT :

Notre groupe a démontré que le traitement chronique avec la moxonidine, chez des rats hypertendus régresse l'HVG en inhibant la synthèse d'ADN et en provoquant une apoptose transitoire (Menaouar *et coll.* 2002; Paquette *et coll.* 2007). Cet effet peut être médié localement, étant donné la présence des récepteurs aux imidazolines I<sub>1</sub> au niveau cardiaque.

Les récepteurs aux imidazolines I<sub>1</sub> ont été détectés dans le tissu cardiaque entier, incluant les fibroblastes, les cardiomyocytes, les vaisseaux sanguins et les neurones, mais la cible cellulaire de la moxonidine dans le cœur n'est pas connue.

L'activation des récepteurs aux imidazolines I<sub>1</sub> au niveau des fibroblastes peut avoir des effets différents de ceux au niveau des myocytes.

Le but de cette étude est l'élucidation des mécanismes d'action de la moxonidine dans les cardiocytes des rats néonataux et adultes, spécifiquement pendant la croissance et la mort cellulaire induites par la norépinéphrine, pour simuler les effets du SNS.

Ce travail se consacrera donc à :

- a.** Identifier la localisation cellulaire et subcellulaire des récepteurs aux imidazolines I<sub>1</sub> dans le cœur, et leur régulation par la norépinéphrine.
- b.** Déterminer l'effet de la moxonidine sur la prolifération et l'hypertrophie induite par la norépinéphrine chez les cellules cardiaque des rats néonataux et adultes.
- c.** Évaluer l'effet de la moxonidine sur l'apoptose induite par la norépinéphrine chez les cardiocytes des rats néonataux et adultes; et les mécanismes impliqués, incluant l'expression des protéines Bcl-2 et Bax.

## **CHAPITRE II**

**MATÉRIELS**

**ET**

**MÉTHODES**

## 1. LA CULTURE CELLULAIRE :

### 1.1. Mise en culture primaire des cardiomyocytes ventriculaires des rats néonataux :

Le kit de Worthington Neonatal Cardiomyocyte Isolation System (Worthington Biochemical Corp.) a été utilisé pour l'isolation des cardiocytes néonataux. Le kit est composé de:

- 1 litre de Leibovitz L-15.
- Fiole 1: contient la solution CMF HBSS, solution saline équilibrée de Hanks dépourvue de  $\text{Ca}^{2+}$  et de  $\text{Mg}^{2+}$  utilisée pour la reconstitution des autres fioles, et pour la dissociation cellulaire.
- Fiole 2 : contient 1000  $\mu\text{g}$  de la trypsine, dissoute dans 2 mL de HBSS.
- Fiole 3 : contient 2000  $\mu\text{g}$  d'inhibiteur de trypsine, dissoute dans 1 mL de HBSS.
- Fiole 4 : 1500 unités de collagénase, dissoute dans 5 mL de milieu L-15.

Les cardiocytes proviennent des rats nouveau-nés âgés de 1-3 jours. La procédure est répartie sur deux jours :

Jours 1 : les bébés rats (environ 14 par portée) sont sacrifiés et les cœurs sont prélevés dans des conditions stériles et sont placés dans un tube conique contenant 40 mL de la solution HBSS sur la glace.

Les cœurs sont rincés 2-3 fois avec renversement dans la solution HBSS pour éliminer le maximum du sang. La solution est aspirée doucement puis dans un volume minimum de HBSS les cœurs sont émincés avec des ciseaux en petits morceaux pendant quelques minutes. Un mL de trypsine est ajouté par portée (environ 14 cœurs), la concentration finale de trypsine est de 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . Le contenu du tube est transféré dans une boîte de

Pétri de 150 mm et gardé toute la nuit (environ 16-20 heures) à 2-8 °C sur un agitateur.

Jours 2 : Le contenu de chaque boîte de Pétri est transféré dans un tube conique, 1 mL d'inhibiteur de trypsine est rajouté, puis les tubes sont mis dans le bain-marie pendant 10 min, ensuite 5 mL de collagénase sont rajoutés et les tubes sont incubés sur la plateforme rotative pendant 45 min, à 37°C. Le milieu de culture est composé de DMEM/F12 complet (milieu nutritif liquide DMEM/F12 (Dulbecco's modified Medium Eagle's Medium, 1000 mg/mL, Gibco) supplémenté avec la pénicilline (100 U/mL, Gibco), la streptomycine (100 µg/mL, Gibco) et 10 % de sérum bovine foetal (FBS, Gibco).

Par la suite, les cellules sont dispersées par plusieurs triturations (3-4 min), puis filtrées sur un filtre de 100 µm, et mises en culture dans des boîtes de Pétri de 150 mm pendant 45 min - 1 h, à 37 °C, à 10% de CO<sub>2</sub>. Au bout des 45 min, nous obtenons des fibroblastes qui s'attachent au fond des Pétris. Les fibroblastes sont multipliés par traitement à la trypsine (Fareh *et coll.* 1995). Lorsqu'une culture des fibroblastes est confluente, elle est rincée 3 fois avec du PBS à 37°C, puis incubée avec 1 mL d'une solution de trypsine/EDTA 0,25 % pendant 2 min à 37°C. Le détachement des cellules est ensuite suivi au microscope puis la trypsine est inactivée par addition de 5 mL de milieu de culture complet. Les fibroblastes sont récupérés, centrifugés 5 min à 1800 rpm et repris dans 5 mL de milieu de culture complet.

Les fibroblastes sont utilisés après le 2<sup>ème</sup> passage, réensemencés dans des pétris selon nos expériences et incubés en présence de DMEM/F12 à 37°C à 5 % de CO<sub>2</sub> jusqu'à la confluence.

Le surnageant contenant les cardiocytes est récupéré doucement puis centrifugé pendant 5 min à 1800 rpm. Le culot est suspendu dans 10 mL du milieu de culture complet et les cellules sont comptées avec un hématimètre. Les cellules sont par la suite réparties dans des Pétris selon nos expériences et incubées à 37°C à 5 % de CO<sub>2</sub> jusqu'à la confluence.

Afin d'éviter une contamination des cardiomyocytes par les fibroblastes nous avons eu recours à la technique d'adhésion sélective qui consiste à effectuer une préincubation de la suspension cellulaire avant l'ensemencement définitif, en mettant à profit l'adhésion plus rapide des fibroblastes sur le support. La cytosine arabinoside (AraC, antimétabolite, 10 µM) est ajoutée dans le milieu de culture pour prévenir la prolifération des cellules noncardiomyocytes.

Dans ces conditions, la culture de cardiomyocytes est de 85 - 90% de pureté. Le faible pourcentage de fibroblastes (15 - 10%) peut influencer l'incorporation de la thymidine. Mais puisque les résultats sont comparés au contrôle (DMEM) correspondant, cet effet sera négligeable.

Les cardiomyocytes sont ensemencés selon les densités suivantes :

	<b>Cardiomyocytes</b>	<b>Fibroblastes</b>
Plaque à 6 puits	300.000	50.000
Plaque à 12 puits	100.000	30.000
Plaque à 24 puits	50.000	10.000
Boite Pétris 100 mm	1 million	300.000

**Tableau 1 : Le nombre de cellules par puits.**

Trois à quatre jours après la mise en culture, les cardiomyocytes commencent à battre spontanément et forment un tapis cellulaire monocouche qui devient jointif, et à une confluence de 70 - 80 % les cellules sont prêtes pour la stimulation. Le milieu de culture est changé à tous les deux jours.

### **1.2. Mise en culture des cardiomyocytes ventriculaires des rats adultes :**

Les rats Sprague-Dawley (250 – 300 g ou 12 semaines d'âge) sont anesthésiés avec du phénobarbital sodique (60 mg/kg IP), et reçoivent une injection intrapéritonéale d'héparine (500 U). Les cœurs sont rapidement prélevés puis rincés avec une solution saline stérile. L'aorte est ensuite canulée pour connecter le cœur sur le montage de Langendorff pour la perfusion rétrograde.

Brièvement, le cœur est perfusé pendant 5 min (4 mL/min) avec la solution de Krebs-Henseleit (KH) contenant (mmol/L) NaCl 118, KCl 4.7, CaCl<sub>2</sub> 1.25, MgSO<sub>4</sub>•7H<sub>2</sub>O 1.2, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.2, NaHCO<sub>3</sub> 25, et dextrose 11 à 37°C. Afin d'arrêter les battements cardiaques, le cœur est perfusé avec la solution KH sans calcium (KH-Ca<sup>2+</sup>). Le cœur est par la suite perfusé 20 min avec la solution KH contenant 0,05% collagénase (CLS2, Worthington Biochemical Corp) et 0,03% hyaluronidase pour digérer les tissus entourants les cellules cardiaques. Les ventricules, devenus très flasques, sont séparés des oreillettes. Les ventricules sont ensuite émincés en petits morceaux et incubés, 20 min à 37°C, dans la solution KH contenant de la trypsine (0.2 mg/mL) et de la DNase I (0.2 mg/mL). La suspension cellulaire est filtrée et centrifugée 2 min à 1000 g puis le culot est suspendu dans la solution de lavage (milieu de culture M199/KH, 1:1), et laissé décanter 20 min à température ambiante. Cette procédure est répétée 3 fois.

Les cellules sont par la suite diluées dans 10 mL de sérum bovin 6 % afin de séparer les cardiomyocytes des fibroblastes.

Les cardiomyocytes sont comptées avec un l'hématimètre et cultivés dans des boîtes de pétri stériles, prétraités au préalable avec de la laminine, à une densité de  $10^5$  cellules / pétri et incubées à 37°C dans une atmosphère humidifiée contenant 5 % de CO<sub>2</sub> dans l'air.

Le milieu de culture M199, pH 7.4 est complété avec 0.2 % du sérum albumine bovine (BSA),  $10^{-7}$  mol/L d'insuline, 5 mmol/L de créatine, 2 mmol/L de L-carnitine, 5 mmol/L de taurine, 100 IU/mL de pénicilline, et 100 µg/mL de streptomycine avec 10 % FBS.

Les cardiomyocytes adultes commencent à battre spontanément 2- 4 h après la mise en culture et sont prêts à être stimulés.

## **2. VIABILITÉ CELLULAIRE:**

Afin de tester l'effet dose/temps de la norépinéphrine et de la moxonidine sur la viabilité cellulaire, nous avons utilisé la méthode du double marquage avec l'iodure de propidium (IP) et l'orange d'acridine (OA). Ces deux marqueurs permettent de différencier les cellules mortes des cellules vivantes.

L'IP pénètre uniquement dans les cellules dont la perméabilité membranaire est altérée tandis que l'OA s'incorpore dans les cellules vivantes.

Au microscope de fluorescence et sous les rayonnements ultraviolets l'IP et l'OA deviennent fluorescents avec une couleur rouge-orangée (cellule morte) et verte (cellule vivante).

Le taux de survie est calculé selon la formule suivante :

$$\text{Taux de survie} = \frac{\text{nb de cellules vivantes}}{\text{nb de cellules vivantes} + \text{nb de cellules mortes}}$$

Les cellules ont été mises en culture dans des boîtes de pétri de 12 puits à une densité de 100.000 cellules/ puits pour les cardiomyocytes et 50.000 cellules/puits pour les fibroblastes, dans le DMEM/F12 complet additionné de 0,1% d'acide ascorbique à 37 °C et 5 % de CO<sub>2</sub>.

Quatre jours après leur mise en culture les cellules sont stimulées avec différentes concentrations de la norépinéphrine ( $10^{-9}$  -  $10^{-4}$  M) et de la moxonidine ( $10^{-9}$  -  $10^{-4}$  M) à différents temps d'exposition (24 et 48 h). Les cellules sont lavées 2 fois avec du FBS, puis détachés avec la trypsine/EDTA 0,25% pendant 2 minutes dans l'incubateur. La trypsine est neutralisée par le milieu de culture complet, puis le surnageant est centrifugé pendant 5 min à 1800 rpm. Le culot est par la suite suspendu dans du FBS et traité avec un mélange d'IP et d'OA pendant 5 min à température ambiante et à l'abri de la lumière.

Les cellules sont comptées sous un microscope de fluorescence à l'aide d'un hématimètre.

### **3. L'INCORPORATION DE LA THYMIDINE ET DE LA LEUCINE TRITIÉES:**

La thymidine tritiée (un des atomes d'hydrogène est remplacé par un atome de tritium dans la thymidine: <sup>3</sup>H-thymidine) a été utilisée pour mesurer l'activité de l'ADN polymérase, l'enzyme responsable de la réplication de l'ADN. C'est donc une façon indirecte pour mesurer la

division cellulaire. Il a été montré que lors d'une phase spécifique du cycle cellulaire, la phase de synthèse (phase S), les cellules incorporent la radioactivité dans leur ADN.

Afin d'évaluer l'influence du traitement sur la croissance ou la prolifération cellulaire on mesure l'incorporation de la thymidine (méthyl-<sup>3</sup>H) (1mCi / mL, 35 Ci/mM, MP Biomedicals, Inc.) et de la L-leucine (4, 5-<sup>3</sup>H) (0,25 mCi/0,25 mL, 84 Ci/mM, MP Biomedicals, Inc.) par les cellules.

Pour s'y faire, les cellules ont été mises en culture dans des boîtes de pétri de 24 puits à une densité de 50.000 cellules/puits pour les cardiomyocytes et 30.000 cellules/puits pour les fibroblastes, dans le DMEM/F12 complet à 37 °C et 5 % de CO<sub>2</sub> (Calderone *et coll.* 1998).

À 85 % de confluence (4 jours de culture), les cellules sont mises dans du milieu dépourvu du FBS (DMEM/F12, 0,1 % FBS, 1 % Pen/Strep) pour 24 heures ce qui permet de rendre les cellules quiescentes par arrêt de la prolifération cellulaire. Le lendemain, le milieu de culture est changé pour le DMEM/F12 complet avec les différents traitements, et les cellules sont marquées avec l'ajout de 2 µCi/puits <sup>3</sup>H-thymidine les 4 dernières heures de la stimulation et de 2,5 µCi/puits de <sup>3</sup>H-leucine pendant 24h.

Le milieu est retiré et les cellules sont fixées avec 1mL/puits de l'acide trichloroacétique 5 % (TCA). L'excès de radioactivité est lavé à l'eau froide.

Les cellules qui incorporent la <sup>3</sup>H-thymidine ou la <sup>3</sup>H-Leucine sont extraites par un traitement avec 500 µL de NaOH 0.4M/puits, puis transféré dans des fioles contenant 4 mL du liquide à scintillation.

La quantité de radioactivité incorporée pour chaque puits est mesurée en coup par minute (CPM) avec un compteur bêta. La prolifération cellulaire est mesurée par rapport au contrôle (DMEM complet) calculée selon l'équation suivante :

$$\% \text{ variation dans la prolifération cellulaire} = \frac{\text{CPM d'un échantillon}}{\text{CPM du contrôle (DMEM complet)}} \times 100$$

#### **4. WESTERN BLOT :**

##### **4.1. Préparation du lysat cellulaire :**

Les cellules ont été mises en culture dans des boîtes de pétri de 100 mm (P100) à une densité de  $10^6$  cellules/P100 pour les cardiomyocytes et 500 000 cellules/P100 pour les fibroblastes, dans le DMEM/F12 complet à 37 °C et 5 % de CO<sub>2</sub>.

À 85 % de confluence, les cellules sont mises dans du milieu dépourvu du FBS pour 24 heures. Le lendemain, le milieu de culture est changé pour le DMEM/F12 complet additionné de 0,1% d'acide ascorbique avec les différents traitements.

Les cellules sont lavées 2 fois avec le tampon phosphate froid (PBS : Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 60 mM, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 17 mM, NaCl 68 mM, pH 7,4) et lysées avec le tampon de lyse RIPA (50mM Tris HCl pH 8, sodium deoxycholate 0,5% Nonidet P40 1%, SDS 0,1%, NaCl 150 mM, conservé à 4°C). Les cellules sont détachées mécaniquement à l'aide d'un grattoir, le tout fait sur glace, le lysat est récolté dans des tubes Eppendorf, vortexé et déposé 10 minutes sur la glace (4°C).

Les échantillons sont centrifugés à 12000 rpm et 4°C pendant 20 min, et le surnageant contenant les protéines cellulaires totales est récupéré et gardé à -70°C jusqu'au moment d'utilisation.

#### **4.2. Dosage des protéines par la méthode de Bradford :**

La méthode de Bradford est basée sur le changement de coloration du bleu de Coomassie en présence de concentrations variables de protéines. Une fraction aliquote de la solution à doser (100 µL) est mélangée à 2 mL de réactif Bradford. L'absorbance à 595 nm est lue contre un blanc sans protéines à l'aide d'un lecteur spectrophotométrique. La teneur en protéine de l'échantillon est déterminée grâce à une courbe d'étalonnage réalisée avec de l'albumine sérique (0 à 20 µg de protéines) de bœuf dans les mêmes conditions.

Le réactif de Bradford est composé de :

- Bleu de Coomassie                    100 mg
- Éthanol 95%                            50 mL
- Acide O-phosphorique                100 mL
- Eau distillée                            q.s.p 1000 mL

#### **4.3. Préparation des échantillons et migration sur gel :**

Les protéines (un minimum de 4µg de protéines environ 25 µL/puits) sont dénaturées dans le tampon Laemmli (0,0025 % bleu de bromophénol, 5 % SDS, 12,5 % β-mercaptoéthanol, 160 mM Tris et 25 % glycérol), à 100°C pendant 5 min, puis séparées par électrophorèse à l'aide d'un gel d'acrylamide 10 %.

À la fin de la migration, les protéines contenues dans le gel d'acrylamide sont transférées sur une membrane de nitrocellulose (PROTRAN) par électrophorèse pendant 1 h 30 à 150 V sous agitation magnétique.

La membrane est colorée dans une solution de rouge Ponceau afin de vérifier l'efficacité du transfert. Elle est ensuite lavée deux fois 10 min dans le TBS.

Pour éviter les liaisons non spécifiques, la membrane est bloquée dans le Blotto 5 % (5 g de lait en poudre dans 100 mL de TBS) contenant 0.1 % Tween-20 pendant 1 h à température ambiante sous agitation.

#### **4.4. Incubation avec les anticorps :**

La membrane est ensuite incubée avec la solution d'anticorps primaire pendant une nuit à 4°C et sous agitation. Le lendemain, la membrane est lavée quatre fois dix minutes avec TBS/Tween-20, pour éliminer les anticorps qui ne se sont pas fixés, puis incubée avec la solution d'anticorps secondaire durant 1h à température ambiante et sous agitation. La membrane est de nouveau lavée 6 fois 10 minutes.

Les anticorps utilisés pour la détection des différentes protéines sont :

##### *Anticorps primaires :*

- L'anticorps anti-Nischarin (260 kDa, BD Pharmingen).
- L'anticorps monoclonal de souris anti-Bcl-2 (29 kDa, Cell Signaling).

- L'anticorps polyclonal de lapin anti-hBax (20kDa, Cell signaling).

*Anticorps Secondaires :*

- L'immunoglobuline de souris IgG de souris et du lapin (Amersham biosciences).

#### **4.5. Réaction de chimioluminescence :**

Les bandes immunoréactives sont révélées par les réactifs de chimioluminescence (ECL, Amersham). La membrane est alors séchée rapidement sur du papier absorbant puis incubée avec la solution de détection 1 min sous agitation. Ensuite, elle est exposée à un film photographique en chambre noire à différents temps selon l'intensité du signal, ce qui permet d'obtenir une image de la protéine spécifiquement révélée par la réaction ECL. L'intensité des bandes est mesurée par un analyseur d'image (Adobe Photoshop 5).

Afin de normaliser, les membranes ont été décapées et révélées à nouveau par un anticorps anti- $\beta$ actine. Nous avons aussi vérifié l'égalité des dépôts de protéine dans les divers puits.

#### **4.6. Le fractionnement subcellulaire pour l'expression protéique de Nischarin :**

Après stimulation des cardiomyocytes et fibroblastes, les cellules sont soumises au fractionnement subcellulaire pour mesurer l'expression protéique de Nischarin par Western Blot, selon le protocole décrit par Alahari *et coll.* (2000).

Les cellules sont lavées une fois avec du PBS 1X froid et lysées dans le tampon de lyse: (0,25 M sucrose, 1 mM EDTA, 5 mM Tris-HCl, pH

7,25), contenant les inhibiteurs de protéases (2 µg d'aprotinin/mL, 0,5 µg de leupeptin/ mL, 0,5 µg de pepstatin/mL, et 0,2 mM PMSF). Les cellules sont soniquées trois fois 8 secondes à 100 W. Les noyaux et les cellules non lysées sont précipités par centrifugation à 1000 g pendant 5 min (1600 rpm – 2 min à 4°C). Les surnageants récupérés dans les tubes spécialement pour ultracentrifugeuse sont centrifugés à 100 000 g (28,700 rpm, avec le rotor SW 55Ti) pendant 30 min à 4°C pour avoir la fraction cytosolique (surnageant).

Le culot est solubilisé dans du tampon (50 mM Tris-HCl, pH 7,5, 150 mM NaCl, 1 mM DTT, 1 mM EDTA, contenant les inhibiteurs de protéase), puis vortexé pendant 30 min. La suspension de culot est centrifugée à 100 000 g pendant 30 min.

Les fractions membranaires et cytosolique sont utilisées pour le dosage des protéines et la détection des récepteurs Nischarins selon la méthode décrite ci-dessus.

## **5. DOSAGE DE LA FRAGMENTATION D'ADN PAR ELISA :**

La fragmentation d'ADN est la conséquence de l'activation des DNAses par les caspases. La génération de gros fragments (20-50 kpb) suivi par une fragmentation en petits fragment, soit des segments de 180 paires de bases nucléiques. Ceci est un phénomène spécifique au processus apoptotique.

La fragmentation d'ADN est mesurée par la méthode d'ELISA en utilisant le Cell Death Detection ELISA Kit (Roche Molecular Biochemicals) selon les instructions du fournisseur.

Au cours du stade final de l'apoptose, l'ADN génomique subit un clivage internucléosomal libérant des oligonucléosomes. Ces derniers sont quantifiés par un dosage immunologique de type sandwich couplé à une détection enzymatique. Pour chaque échantillon, le dosage est réalisé dans un puits enduit à la streptavidine. Cette protéine présente une forte affinité pour la biotine fixée sur l'anticorps anti-histone qui reconnaît la partie protéique de l'oligonucléosome. La partie ADN de l'oligonucléosome est reconnue par l'anticorps anti-ADN couplé à la peroxydase. Après avoir éliminé les anticorps libres, le substrat de la peroxydase (ABTS : 2,2'-azyno-di-(3-éthylbenzthiazoline - sulfonate)) est ajouté ce qui permet de déterminer la quantité d'oligonucléosomes présent dans l'échantillon.

Les cellules ont été mises en culture dans des boîtes de pétri de 100 mm (P100) à une densité de 1 million de cellules/P100 pour les cardiomyocytes et 500 000 cellules/P100 pour les fibroblastes, dans le DMEM/F12 complet à 37 °C et 5 % de CO<sub>2</sub>.

Quatre jours après leur mise en culture, les cellules quiescentes sont stimulées avec les différents traitements pendant 24 heures. Les cellules sont lavées 2 fois avec du FBS puis lysées avec le tampon de lyse fourni dans le kit. Le lysat cellulaire est récolté, vortexé et centrifugé 10 minutes à 12000 rpm à 4°C. La fraction cytosolique contenant les oligonucléosomes (20 µL du surnageant par puit) est déposée dans la plaques de 96 puits enduites de streptavidine puis les 2 anticorps marqués (anti-histone et anti-DNA) sont ajoutés avec le milieu réactionnel (80µL/puits). Les réactions de reconnaissances spécifiques s'effectuent durant une incubation de 2 heures sous une agitation douce (300 rpm, 25°C). Le milieu réactionnel est retiré puis une étape de lavage est réalisée avant d'ajouter la solution contenant l'ABTS. La plaque est incubée encore 15 min à températures ambiante, puis

la densité optique est lue à 405 nm. L'expérience est validée au moyen d'une solution contrôle d'oligonucléosomes, fournie dans le kit, dont l'absorbance corrigée doit être supérieure à 3.

## **6. ANALYSES STATISTIQUES :**

Les résultats représentent les moyennes  $\pm$  l'écart standard à la moyenne (SEM) de  $n$  expériences indépendantes.

Les comparaisons entre les différents groupes ont été effectuées par analyse de la variance à une voie (one way ANOVA), en utilisant le programme PRISM et par le test student  $t$ .

Les résultats ont été jugés statistiquement significatifs si  $p < 0,05$ .

## **CHAPITRE III**

### **RÉSULTATS**

## 1. LOCALISATION SUBCELLULAIRE DES RÉCEPTEURS AUX IMIDAZOLINES/NISCHARIN DANS LE CŒUR:

La distribution des récepteurs I<sub>1</sub>/Nischarin dans les cardiomyocytes et les fibroblastes des rats néonataux en culture est examinée par Western-blot. L'intensité des bandes a été standardisée avec la  $\beta$ -actine. La densité des bandes au niveau cytosolique est exprimée en pourcentage de la fraction membranaire correspondante (100%).

En utilisant un anti-Nischarin, les récepteurs sont détectés dans les myocytes et fibroblastes des rats néonataux, et au niveau subcellulaire dans la membrane et le cytosole (Figure 1).

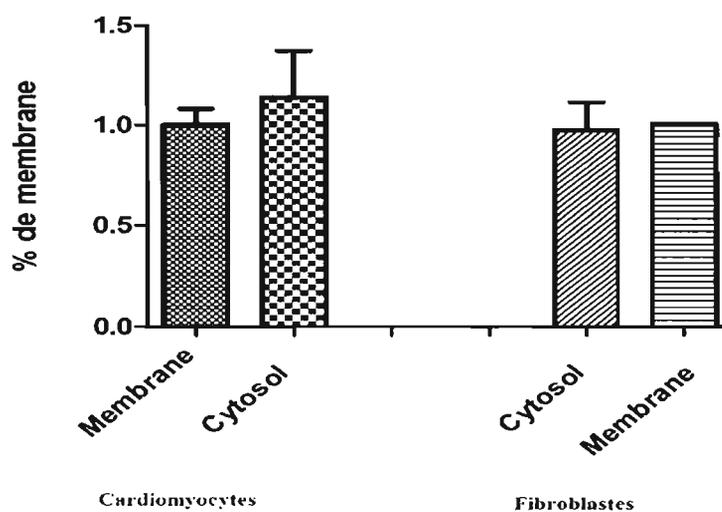
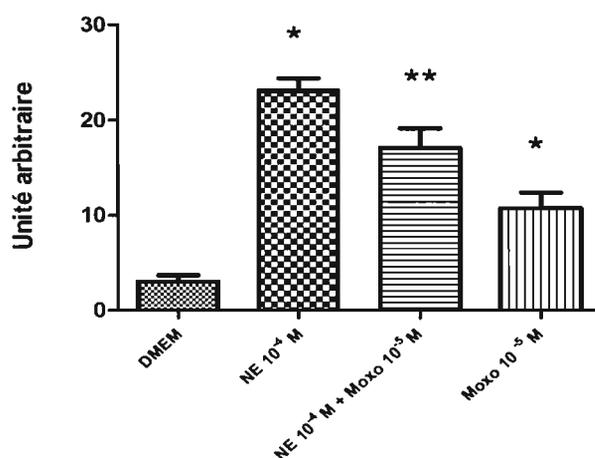


Figure 1: L'expression des récepteurs Nischarin/ $\beta$ -actine, cytosol vs. membrane (100%) chez les cardiomyocytes et les fibroblastes des rats néonataux.

Comparée aux cellules contrôles, l'expression des récepteurs Nischarin augmente d'environ 7 fois après incubation avec la NE  $10^{-4}$  M ( $23 \pm 1$  vs  $3 \pm 1$ ) et de 3 fois après incubation avec la moxonidine  $10^{-5}$  M ( $11 \pm 2$ ) pendant 24 h (Figure 2).

La coincubation avec la moxonidine inhibe partiellement l'effet de la NE ( $17 \pm 2$ ).



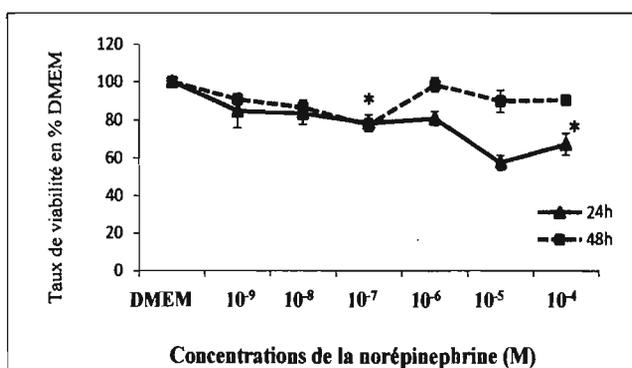
**Figure 2 : Les Nischarins chez les fibroblastes ventriculaires néonataux. N = 4 puits pour chaque traitement provenant de deux expériences indépendantes. \*p < 0,001 vs DMEM; \*\*p < 0,0001 vs NE  $10^{-4}$  M.**

## **2. L'EFFET DE LA NORÉPINÉPHRINE ET DE LA MOXONIDINE SUR LA VIABILITÉ DES CARDIOMYOCYTES NÉONATAUX :**

Afin d'établir la concentration optimale dépourvues d'effets toxiques, nous avons évalué l'effet de différentes concentrations et temps d'incubation de la norépinéphrine et de la moxonidine sur la viabilité des cardiomyocytes néonataux. En utilisant le double marquage avec l'iodure de propidium et l'orange d'acridine. La Figure 3 montre :

- Comparée aux cellules contrôles correspondantes (DMEM 100%), l'exposition des cardiomyocytes néonataux à la norépinéphrine  $10^{-9}$  à  $10^{-4}$  M pendant 24 h, provoque une diminution progressive et de façon significative de la viabilité cellulaire pour atteindre à  $10^{-7}$  M :  $78 \pm 4 \%$  ( $p < 0,0001$ ) et  $67 \pm 6 \%$  ( $p < 0,0001$ ) à  $10^{-4}$  M.

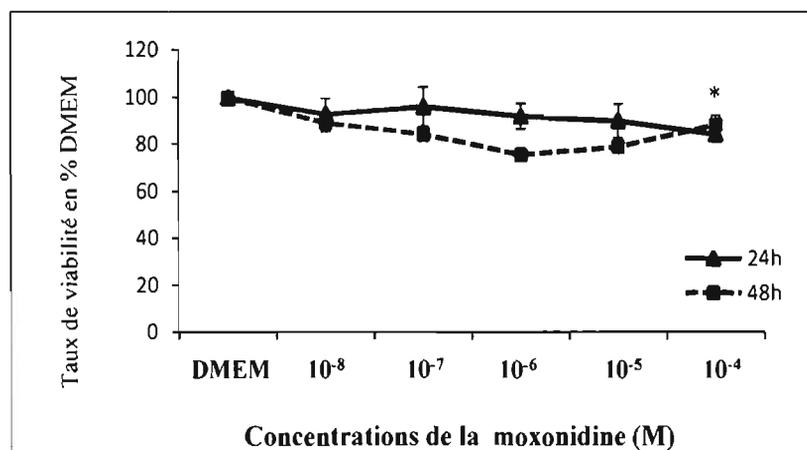
- Après 48 h d'exposition, la norépinéphrine ( $10^{-9}$  à  $10^{-4}$  M) diminue progressivement la viabilité cellulaire pour atteindre  $77 \pm 3 \%$  ( $p < 0,0001$ ) à  $10^{-7}$  M, aucun effet à  $10^{-6}$  M mais une légère diminution à  $10^{-5}$  et  $10^{-4}$  M, pour atteindre  $92 \pm 3 \%$ .



**Figure 3: Effet de la norépinéphrine sur la viabilité des cardiomyocytes néonataux. N = 5 puits pour chaque traitement. \* $p < 0,0001$  vs DMEM.**

Après 24 h d'exposition, la moxonidine ( $10^{-8}$  à  $10^{-5}$  M) n'a aucun effet toxique, mais la concentration  $10^{-4}$  M diminue significativement la viabilité cellulaire ( $84 \pm 2\%$ ,  $p < 0,0001$ ).

Après 48h d'exposition, la moxonidine diminue progressivement la viabilité cellulaire et de façon significative pour atteindre  $88 \pm 4 \%$ ,  $p < 0,0001$  à  $10^{-4}$  M.



**Figure 4: Effet de la moxonidine sur la viabilité des cardiomyocytes néonataux. N = 5 puits pour chaque traitement. \* $p < 0,0001$  vs DMEM.**

### 3. PROLIFÉRATION ET HYPERTROPHIE DES CARDIOCYTES VENTRICULAIRES NÉONATAUX ET ADULTES:

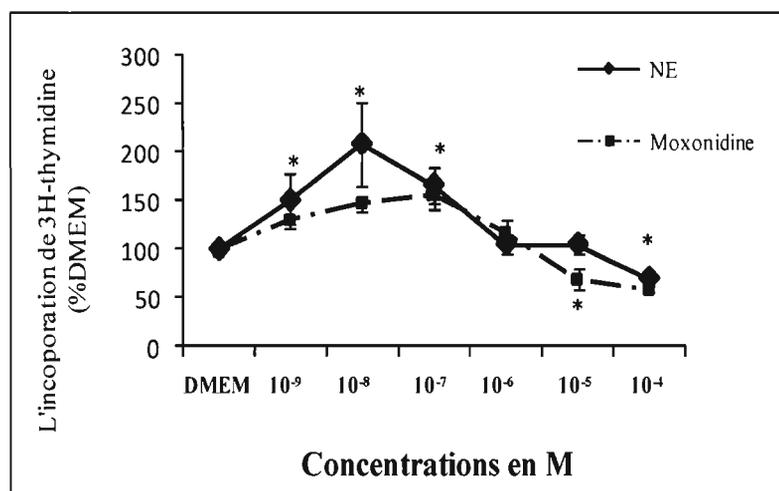
Afin d'évaluer l'effet de la norépinéphrine et de la moxonidine sur la prolifération et l'hypertrophie cellulaire, nous avons utilisé l'incorporation de la thymidine et de la leucine tritiées dans les cardiomyocytes et les fibroblastes ventriculaires néonataux et adultes en culture.

#### 3.1. L'effet dose-dépendant de la norépinéphrine et de la moxonidine sur l'incorporation de $^3\text{H}$ -thymidine chez les cardiocytes néonataux :

Chez les cardiomyocytes ventriculaires des rats néonataux, la norépinéphrine augmente l'incorporation de la thymidine tritiée de façon

dose-dépendante à des concentrations allant de  $10^{-9}$  à  $10^{-8}$  M. L'effet maximal est atteint à  $10^{-8}$  M,  $209 \pm 44$  % ( $p < 0,001$ ), puis disparaît à  $10^{-6}$  et  $10^{-5}$  M, et diminue à  $10^{-4}$  M pour atteindre  $70 \pm 7$  % ( $p < 0,001$ ) des cellules contrôles correspondantes (Figure 5).

La moxonidine augmente l'incorporation de la thymidine tritiée chez les cardiomyocytes ventriculaires des rats néonataux de façon dose-dépendante à des concentrations allant de  $10^{-9}$  à  $10^{-7}$  M pour atteindre un maximum de  $156 \pm 15$  % à  $10^{-7}$  M ( $p < 0,01$ ). Cet effet diminue de façon dose-dépendante à partir de  $10^{-6}$  M et atteint  $59 \pm 4$  % à  $10^{-4}$  M ( $p < 0,01$ ) (Figure 5).

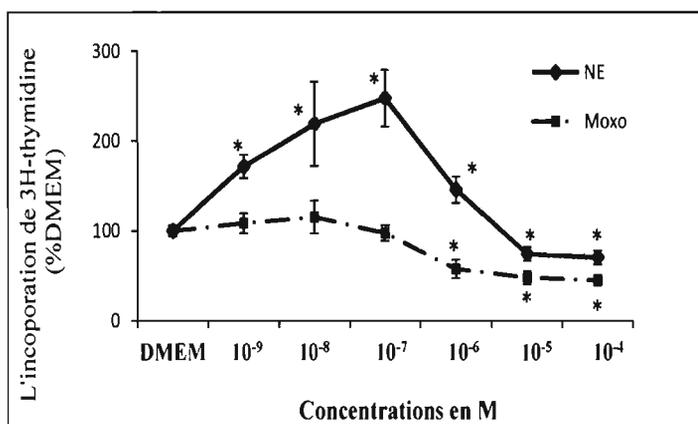


**Figure 5: Incorporation de la  $^3\text{H}$ -thymidine chez les cardiomyocytes ventriculaires des rats néonataux pendant 24 h. N = 16 puits pour chaque traitement provenant de 4 expériences indépendantes. \* $p < 0,01$  vs DMEM.**

Les courbes de la figure 6 montrent que chez les fibroblastes ventriculaires néonataux:

- À des concentrations allant de  $10^{-9}$  à  $10^{-7}$  M, l'incubation avec la norépinéphrine (24 h) augmente l'incorporation de  $^3\text{H}$ -thymidine dans les fibroblastes de façon dose-dépendante. L'effet maximal est atteint à  $10^{-7}$  M avec environ  $248 \pm 9 \%$  ( $p < 0,001$ ), puis commence à diminuer à partir de  $10^{-6}$  M pour atteindre  $71 \pm 8 \%$  à  $10^{-4}$  M ( $p < 0,001$ ).

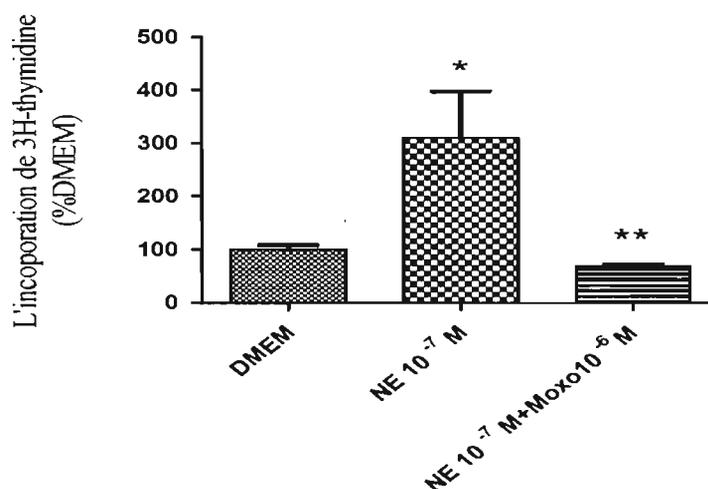
- À des concentrations de  $10^{-9}$  à  $10^{-7}$  M, la moxonidine augmente légèrement l'incorporation de la thymidine tritiée. Cependant, à partir de  $10^{-6}$  M, la moxonidine diminue de moitié l'incorporation de la thymidine tritiée pour atteindre  $45 \pm 6 \%$  à  $10^{-4}$  M ( $p < 0,001$ ).



**Figure 6 : Incorporation de  $^3\text{H}$ -thymidine chez les fibroblastes ventriculaires néonataux. N= 16 puits pour chaque traitement provenant de 4 expériences indépendantes. \* $p < 0,001$  vs DMEM.**

### 3.2. Effet de la moxonidine sur l'incorporation de $^3\text{H}$ -thymidine induite par la norépinéphrine chez les fibroblastes néonataux et adultes:

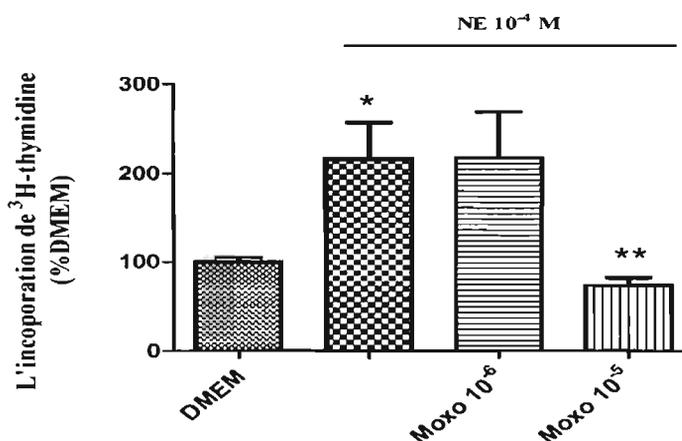
La figure 7 illustre qu'après 24 h d'incubation, la NE  $10^{-7}$  M augmente 3 fois l'incorporation de la thymidine tritiée chez les fibroblastes des rats néonataux ( $310 \pm 88$  %,  $p < 0,05$ ). La coincubation de la norépinéphrine avec la moxonidine  $10^{-6}$  M inhibe cet effet de façon significative ( $69 \pm 4$  %,  $p < 0,03$ ).



**Figure 7: L'effet de la norépinéphrine en absence et en présence de la moxonidine sur l'incorporation de  $^3\text{H}$ -thymidine chez les fibroblastes ventriculaires néonataux. N= 5 puits pour chaque traitement. \* $p < 0,05$  vs DMEM, \*\* $p < 0,01$  vs NE  $10^{-7}$  M.**

Comparée aux cellules contrôles correspondantes, l'incubation pendant 24h avec la norépinéphrine  $10^{-4}$  M augmente 2 fois ( $216 \pm 41$  %,  $p < 0,01$ ) l'incorporation de la  $^3\text{H}$ -thymidine chez les fibroblastes adultes. La moxonidine à  $10^{-6}$  M n'a pas d'effet, alors qu'à  $10^{-5}$  M, elle inhibe l'effet

prolifératif induit par la NE  $10^{-4}$  M de façon significative ( $74 \pm 9$  %,  $p < 0,01$ ).

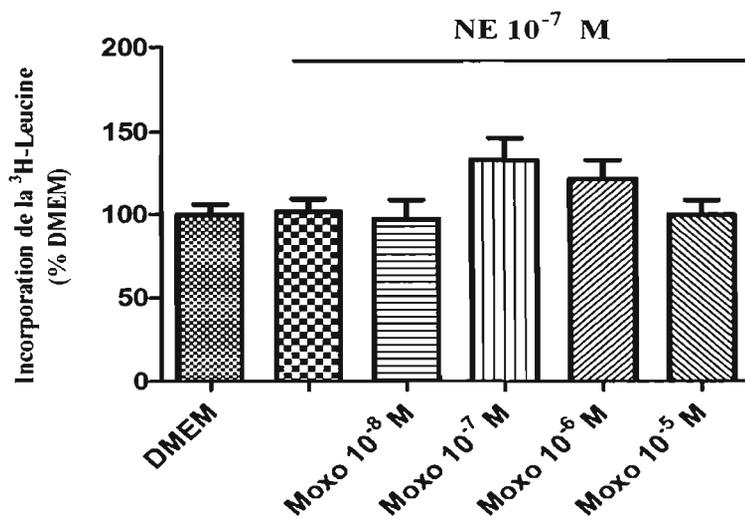


**Figure 8 : Incorporation de la  $^3\text{H}$ -thymidine chez les fibroblastes adultes. N = 24 puits provenant de 4 expériences indépendantes. \* $p < 0,01$  vs DMEM, \*\* $p < 0,01$  vs NE  $10^{-4}$  M.**

### **3.3. Effet de la moxonidine sur l'incorporation de la leucine tritiée induite par la norépinéphrine chez les cardiomyocytes néonataux et adultes:**

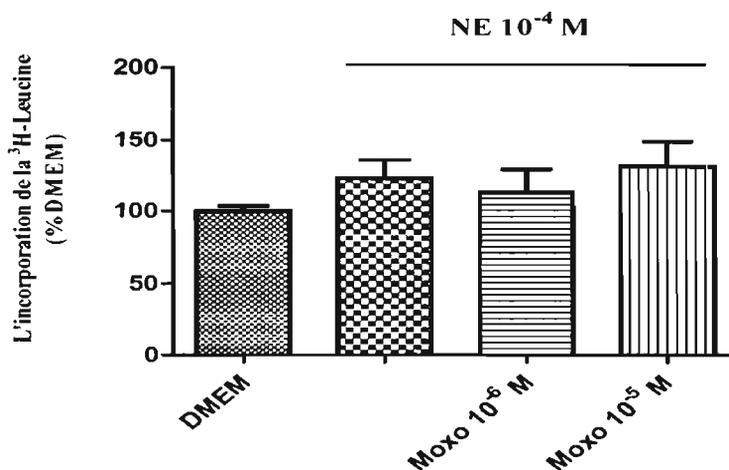
L'effet de la norépinéphrine sur l'incorporation de la  $^3\text{H}$ -leucine est étudié en utilisant deux concentrations de la norépinéphrine  $10^{-7}$  et  $10^{-4}$  M en absence et en présence de différentes concentrations de la moxonidine.

La figure 9 montre que la NE  $10^{-7}$  M n'a aucun effet sur l'incorporation de la  $^3\text{H}$ -leucine chez les cardiomyocytes néonataux. La coincubation de la norépinéphrine avec la moxonidine à  $10^{-7}$  et  $10^{-6}$  M tend à augmenter légèrement l'incorporation de  $^3\text{H}$ -leucine chez les cardiomyocytes de façon non significative pour atteindre  $133 \pm 13$  % et  $121 \pm 12$  %, respectivement.



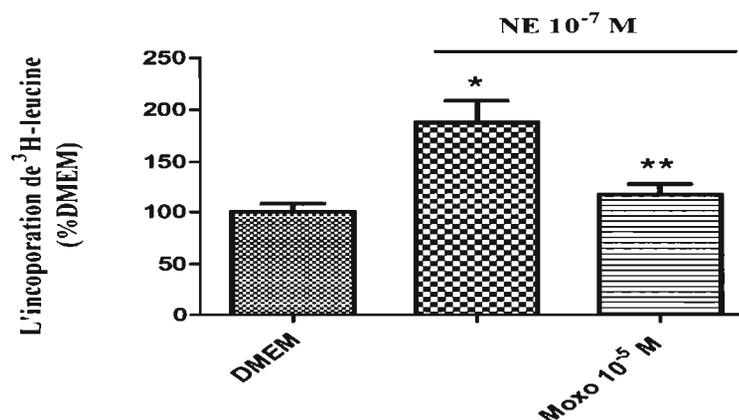
**Figure 9 : Effet de la moxonidine sur l'incorporation de la <sup>3</sup>H-leucine induite par la norépinéphrine 10<sup>-7</sup> M chez les cardiomyocytes ventriculaires néonataux. N = 8 puits provenant de 2 expériences indépendantes.**

La figure 10 montre des résultats similaires. Le traitement avec la norépinéphrine 10<sup>-4</sup> M n'a pas d'effet significatif sur l'incorporation de la <sup>3</sup>H-leucine chez les cardiomyocytes néonataux (123 ± 13 %). De la même façon, la coincubation avec la moxonidine 10<sup>-5</sup> M tend à augmenter l'incorporation de la <sup>3</sup>H-leucine (131 ± 17 %).



**Figure 10 : Effet de la moxonidine sur l'incorporation de la <sup>3</sup>H-leucine induite par la norépinéphrine 10<sup>-4</sup> M chez les cardiomyocytes néonataux. N = 12 puits provenant de 2 expériences indépendantes.**

En revanche, la Figure 11 montre que la norépinéphrine 10<sup>-7</sup> M augmente de façon significative l'incorporation de la leucine tritiée chez les cardiomyocytes des rats adultes (188±21%, p<0,0004). La coincubation avec la moxonidine 10<sup>-5</sup> M inhibe significativement cet effet (119 ± 11 %, p< 0,03).

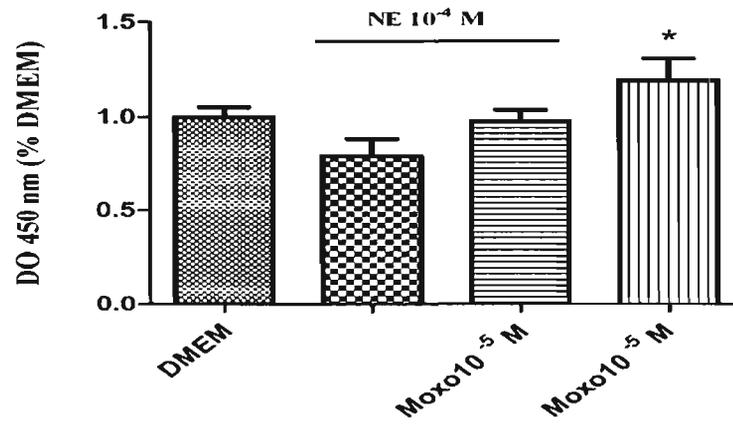


**Figure 11: Incorporation de <sup>3</sup>H-leucine chez les cardiomyocytes des rats adultes. N = 4 puits. \*p < 0,0004 vs DMEM, \*\*p < 0,03 vs NE 10<sup>-7</sup> M.**

#### **4. EFFET DE LA MOXONIDINE SUR L'APOPTOSE INDUITE PAR LA NORÉPINÉPHRINE CHEZ LES CARDIOCYTES VENTRICULAIRES NÉONATUX ET ADULTES:**

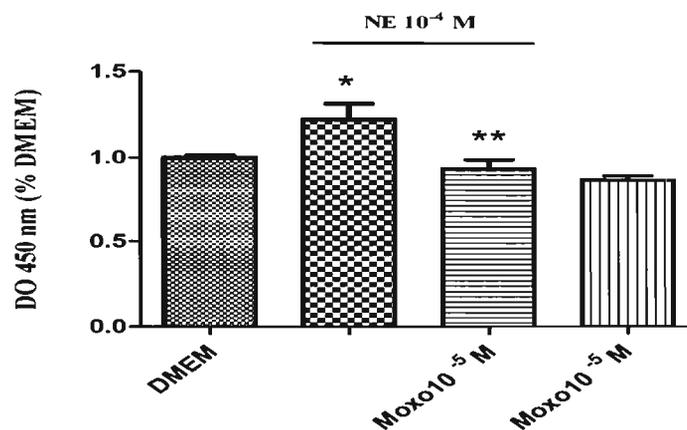
L'apoptose des cardiocytes a été évaluée par un dosage ELISA des oligonucléosomes cytoplasmiques. Au cours de la phase finale du processus apoptotique, l'ADN génomique subit un clivage internucléosomal, générant des complexes ADN-histones de taille variable, qui migrent du noyau vers le cytoplasme.

Les analyses avec ELISA montrent que le traitement pendant 24 h avec la norépinéphrine 10<sup>-4</sup> M tend à diminuer la fragmentation d'ADN chez les fibroblastes néonataux. Inversement, la moxonidine 10<sup>-5</sup> M augmente significativement la fragmentation d'ADN (1,192 ± 0,115, p<0,04) et oppose l'effet de la NE (Figure 12).



**Figure 12: Fragmentation d'ADN chez les fibroblastes ventriculaires néonataux. N = 4 provenant de 2 expériences indépendantes. \*p < 0,04 vs DMEM.**

Le traitement pendant 24 h avec la norépinéphrine 10<sup>-4</sup>M, et non pas avec la moxonidine 10<sup>-5</sup> M, augmente la fragmentation d'ADN chez les cardiomyocytes néonataux (1,222 ± 0,092, p<0,01). Cet effet est inhibé par la coincubation avec la moxonidine (0,928 ± 0,059, p<0,03). (Figure 13).

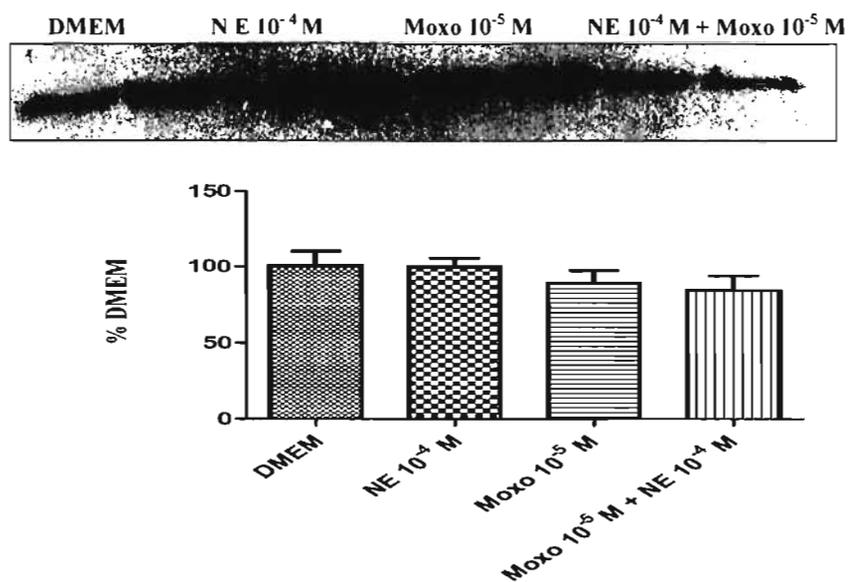


**Figure 13: Fragmentation d'ADN chez les cardiomyocytes ventriculaires néonataux. N = 4 provenant de 2 expériences indépendantes. \*p < 0,01 vs DMEM, \*\*p < 0,03 vs NE 10<sup>-4</sup> M.**

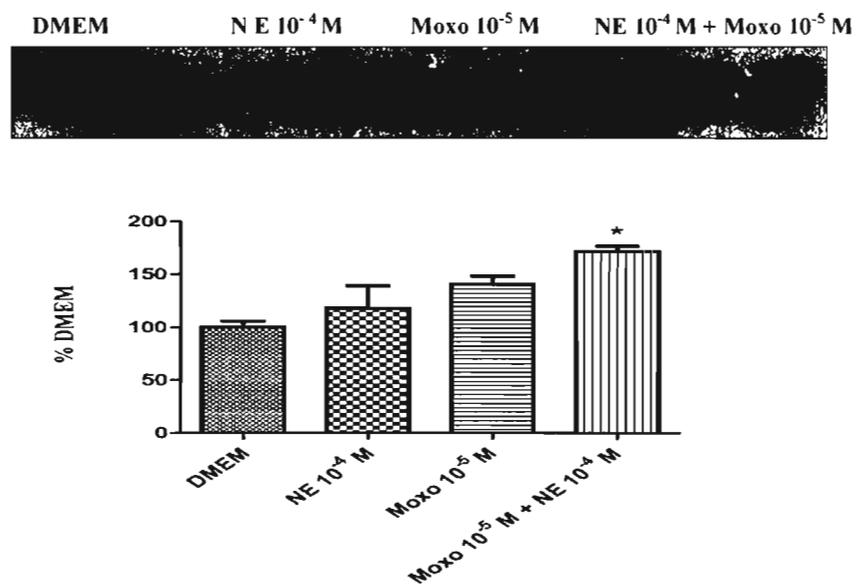
Les effets de la moxonidine sur l'apoptose induite par la norépinéphrine ont été étudiés chez les cardiomyocytes adultes, en analysant les protéines Bcl-2 et Bax.

Les analyses avec Western-blot montrent que ni le traitement avec la norépinéphrine 10<sup>-4</sup> M ou avec la moxonidine 10<sup>-5</sup> M ni la combinaison (NE10<sup>-4</sup> M + Moxo 10<sup>-5</sup> M) pendant 24 h a un effet sur l'expression de Bax chez les cardiomyocytes ventriculaires adultes (Figure 14).

De même, la norépinéphrine 10<sup>-4</sup> M n'a aucun effet sur l'expression de Bcl2, tandis que la coincubation avec la moxonidine 10<sup>-5</sup> M augmente significativement l'expression de Bcl-2.

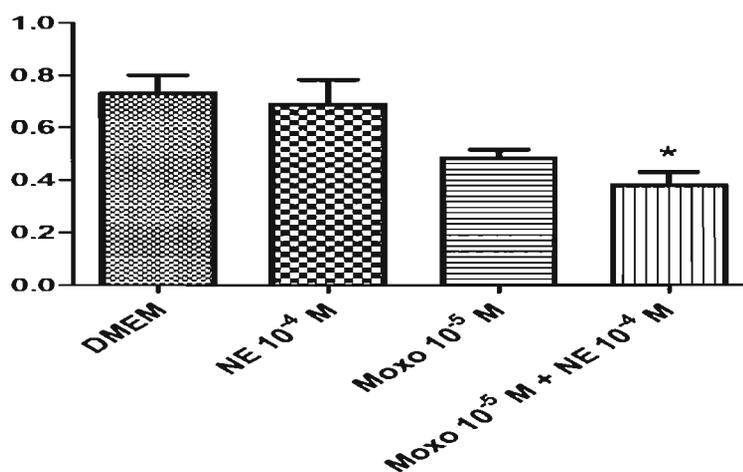


**Figure 14: Expression de Bax chez les cardiomyocytes ventriculaires adultes. N = 3 puits.**



**Figure 15: L'expression de Bcl-2 chez les cardiomyocytes ventriculaires adultes. N = 3 puits. \*P < 0,03 vs NE  $10^{-4}$  M**

La norépinéphrine n'a aucun effet sur le rapport Bax/Bcl-2 ( $0,69 \pm 0,10$  vs  $0,73 \pm 0,07$ ). La moxonidine seule tend à diminuer ce rapport mais de façon non significative ( $0,48 \pm 0,03$ ). La coincubation diminue significativement le rapport Bax/Bcl-2 ( $0,38 \pm 0,05$ ,  $p < 0,03$ ) (figure 17). Le faible rapport Bax/Bcl2 témoigne des effets antiapoptotiques de la moxonidine.



**Figure 16 : Le rapport Bax/Bcl-2 chez les cardiomyocytes ventriculaires adultes. \* $p < 0,03$  vs NE  $10^{-4}$  M**

# **CHAPITRE IV**

**DISCUSSION**

**ET**

**CONCLUSION**

La présente étude est la suite des études précédentes effectuées par le group de Mukaddam-Daher (El-Ayoubi *et coll.* 2002) qui ont révélé la présence des récepteurs aux imidazolines I<sub>1</sub> dans le cœur et particulièrement au niveau des oreillettes et des ventricules. Cette étude montre qu'au niveau cellulaire, ces récepteurs sont présents chez les cardiomyocytes et les fibroblastes. À l'échelle subcellulaire les récepteurs aux imidazoline I<sub>1</sub> sont localisés dans les fractions membranaires et cytosoliques. En outre, l'activation des récepteurs I<sub>1</sub> chez les cardiocytes oppose la prolifération et l'apoptose induite par la norépinéphrine, de manière sélective. Ces effets sont conformes aux effets antiprolifératifs/antihypertrophiques et antiapoptotiques de l'activation des récepteurs I<sub>1</sub> par la moxonidine, qui impliquent l'inhibition de la synthèse et la fragmentation d'ADN induites par la norépinéphrine.

Cette étude est la première à localiser les récepteurs I<sub>1</sub> dans les cardiomyocytes et fibroblastes cardiaques. Des études précédentes ont montré la présence des récepteurs I<sub>1</sub> dans les neurones, comme au niveau de la RVLM et les cellules phéochromocytomes PC12.

Au niveau cérébral, les sites de liaisons I<sub>1</sub> sont exprimés dans la médulla dorso-médiane et la RVLM. Les récepteurs I<sub>1</sub> ne sont pas exprimés dans les astrocytes gliales laissant suggérer que les récepteurs I<sub>1</sub> du cerveau sont principalement localisés dans les neurones (Heemskerk *et coll.* 1998; Ruggiero *et coll.* 1998). Les récepteurs I<sub>1</sub> sont exprimés dans les cellules chromaffines, les cellules phéochromocytomes PC12 et dans les corps carotides (Mallard *et coll.* 1992; Ernsberger *et coll.* 1995; Regunathan et Reis 1996), dérivés embryogénétiques des cellules neurales. Au niveau des reins, ces récepteurs ont été localisés au niveau des cellules épithéliales et leur expression augmente le long du néphron, du mésangium jusqu'aux tubules collecteurs. Ces récepteurs sont aussi localisés au niveau des cellules épithéliales des îlots pancréatiques et des plaquettes, et les cellules

endothéliales vasculaires. Ainsi, les récepteurs I<sub>1</sub> sont exprimés dans les cellules neuronales, épithéliales et sécrétoires.

Dans la présente étude, les récepteurs I<sub>1</sub> ont été identifiés en utilisant l'anticorps anti-Nischarin qui identifie la molécule intégrale de la Nischarin (260 kDa). Certains travaux ont localisé la Nischarin au niveau cytosolique (Juliano *et coll.* 2004) et d'autres au niveau membranaire (Sun *et coll.* 2007). Récemment, il a été proposé que les récepteurs I<sub>1</sub>/Nischarin sont ancrés dans la partie intracellulaire de la membrane plasmique. Ceci peut expliquer nos résultats qui révèlent la localisation des récepteurs Nischarin au niveau membranaire et cytosolique des cardiomyocytes et des fibroblastes.

Nous avons également examiné l'effet de la norépinéphrine sur l'expression des récepteurs Nischarin. L'incubation de ces cellules pendant 24 h avec la norépinéphrine fait augmenter d'environ 7 fois l'expression de ces récepteurs. L'incubation avec la moxonidine seule fait augmenter d'environ 3 fois leur expression. De façon étonnante, la coincubation avec la moxonidine inhibe partiellement l'effet de la norépinéphrine. D'autres expériences sont nécessaires afin d'investiguer les mécanismes impliqués dans cet effet. Cependant, il faut noter qu'*in vivo*, chez les SHRs, qui présentent une hyperactivité sympathique et une augmentation de la norépinéphrine dans le cœur, l'expression des récepteurs I<sub>1</sub> dans le cœur augmente aussi. Le traitement avec la moxonidine, qui inhibe la sécrétion de la norépinéphrine, diminue leur expression. Ceci est probablement dû à l'existence des interactions entre les récepteurs ou des interactions post-récepteurs.

L'augmentation de la masse myocardique résulte d'une hypertrophie des cardiomyocytes qui participent à près de 80% de l'hypertrophie pariétale, mais également d'une augmentation du volume cellulaire représenté par les cellules non contractiles tels que les fibroblastes, les

cellules endothéliales, les cellules musculaires lisses vasculaires et les macrophages (Weber et Brilla 1991). Contrairement aux cardiomyocytes adultes qui ne peuvent pas se diviser, les fibroblastes cardiaques sont capable de se répliquer (Sadoshima et Izumo 1993).

Afin de simuler les conditions physiologiques hypertensives *in vivo*, lors de l'installation de l'HVG, nous avons choisi la norépinéphrine (différentes concentrations) pour induire la prolifération et/ou l'hypertrophie ou l'apoptose. La NE a une grande affinité pour les récepteurs adrénergiques  $\alpha_1 > \beta_1 > \beta_2$ . Chez les cardiomyocytes adultes, la liaison de la NE aux  $\alpha_1$ -ARs provoque une hypertrophie (augmentation de la synthèse protéique), tandis que sa liaison aux  $\beta_1$ -ARs provoque une apoptose et une diminution de la synthèse protéique. Les  $\beta_2$ -ARs ont un effet anti-apoptotique. En outre, les fibroblastes expriment les  $\beta$ -ARs et moins ou pas du tout de  $\alpha_1$ -ARs (Schulze et Fu 1996).. La présence des  $\alpha_2$ -ARs n'a pas été démontrée ni dans les cardiomyocytes ni dans les fibroblastes mais seulement au niveau de l'ARNm (Berkowitz *et coll.* 1994).

La NE augmente la synthèse et le contenu protéique ainsi que la taille des cardiomyocytes. Les études de Simpson *et coll.* (1983) sur des myocytes néonataux en culture, ont démontré que les agonistes  $\alpha_1$ -adrénergiques, telle que la norépinéphrine (0.2 - 20  $\mu$ M) induisent l'hypertrophie des myocytes, en augmentant la synthèse et le contenu protéique (augmentation de l'incorporation de la leucine tritiée) et la taille cellulaire. Le terazosin, un antagoniste selectif des  $\alpha_1$ -adrenergiques inhibent l'effet de la NE, tandis que le propranolol, un antagoniste des  $\beta$ -adrénergiques, n'a aucun effet sur l'hypertrophie des myocytes induite par la NE.

De la même manière, nos études montrent que chez les cardiomyocytes adultes, la NE à  $10^{-7}$  M stimule la synthèse protéique mesurée par l'incorporation de la leucine tritiée. De manière surprenante et

contrairement aux différents travaux, aucune augmentation significative de l'incorporation de la leucine tritiée n'a été observée chez les cardiomyocytes néonataux. Cette réponse est probablement due au fait que nos conditions de culture cellulaire sont différentes. Nous avons utilisé des cellules 4 jours après l'ensemencement, alors que d'autres études utilisent les cellules seulement 2 jours après l'ensemencement ce qui peut influencer le nombre des cellules et les interactions cellule-cellule. Dans le cas des cardiocytes adultes, les conditions de culture ainsi que les résultats obtenus sont similaires à ceux décrits dans la littérature.

Chez les fibroblastes, l'effet prolifératif de la NE est principalement médié par les  $\beta_2$ -ARs (Leicht *et coll.* 2000). Nos résultats montrent que la NE induit l'incorporation de la  $^3\text{H}$ -thymidine, indiquant l'effet de la NE dans la synthèse d'ADN et la prolifération des fibroblastes.

L'analyse avec l'incorporation de la thymidine tritiée qui détermine le pourcentage des cellules en phase S n'est pas très précise parce que la phase S chevauche les phases G1 et G2, en plus il est difficile de s'assurer s'il est lié à la réplication ou à la réparation d'ADN. Il serait également peut-être justifié de refaire les expériences d'incorporation de la thymidine tritiée à un pourcentage de confluence plus faible. D'une manière plus importante, le traitement avec la moxonidine normalise la synthèse d'ADN et des protéines induites par la norépinéphrine chez les cardiomyocytes et les fibroblastes. De même, les études de Paquette *et coll.* (2007) *in vivo* montrent que le traitement chronique des rats SHR avec la moxonidine réduit significativement la taille des cardiomyocytes et inhibe la synthèse d'ADN au niveau des ventricules gauches.

Nous n'avons pas étudié le mécanisme impliqué dans l'inhibition de la synthèse d'ADN ou des protéines par la moxonidine. Cependant, nous avons assez d'évidences pour proposer que cet effet puisse impliquer

l'ANP. Nos résultats préliminaires prouvent que la moxonidine stimule la sécrétion d'ANP par les cardiomyocytes en culture. En outre, la perfusion des cœurs isolés de rats avec la moxonidine stimule la libération d'ANP (Mukaddam-Daher *et coll.* 2006) et il en est de même au cours des traitements *in vivo* des rats normotendus et hypertendus (Mukaddam-Daher et Gutkowska 1999, 2000; Menaouar *et coll.* 2002). L'ANP est une hormone cardiaque ayant des propriétés antihypertrophiques et antiprolifératives *in vivo* et *in vitro*.

Cao et Gardner (1995) ont démontré que, chez les fibroblastes néonataux, l'ANP diminue significativement l'incorporation de  $^3\text{H}$ -thymidine induite par différents stimuli. Calderone *et coll.* (1998) ont aussi démontré que l'ANP inhibe l'effet de la norépinephrine sur la synthèse protéique et d'ADN chez les cardiomyocytes et les fibroblastes néonataux. Ces résultats évoquent l'importance des peptides natriurétiques dans la régulation de la croissance des cardiomyocytes durant l'hypertrophie cardiaque.

Les effets antihypertrophiques et antiprolifératifs des récepteurs aux imidazolines peuvent avoir une application thérapeutique pour le cœur hypertendu avec HVG. La régression de l'HVG a été rapportée chez des patients et des rats hypertendus traités avec la moxonidine (Ollivier et Christen 1994; Mall *et coll.* 1991; Menaouar *et coll.* 2002; Paquette *et coll.* 2007). La régression de l'HVG a été associée aux effets bénéfiques des inhibiteurs de l'ECA ou des bloqueurs adrénergiques.

Nos résultats viennent approuver d'autres études qui montrent que la norépinephrine à de fortes concentrations provoque l'apoptose des cardiomyocytes. L'exposition des cardiomyocytes ventriculaires adultes à NE  $10^{-5}$  M pendant 24h augmente le nombre des cellules apoptotiques et la fragmentation d'ADN, effet médié par les  $\beta_1$ -ARs, impliquant

l'augmentation d'AMPC, ainsi que l'activation de la  $Ca^{2+}$ /calmoduline kinase (Communal *et coll.* 1998; 1999. Singh *et coll.* 2001). Une activation des  $\beta 2$ -ARs peut inhiber l'effet apoptotique des  $\beta 1$ -ARs, via la protéine Gi (Communal *et coll.* 1999). Même si la norépinephrine agit sur les deux types des récepteurs adrénergiques  $\beta 1$  et  $\beta 2$ , l'effet majeur est l'augmentation de l'apoptose. Ceci est dû probablement à la prédominance des  $\beta 1$ -ARs dans les cardiomyocytes adultes qui représentent environ 80% des  $\beta$ -ARs et au fait que la NE a plus d'affinité pour les  $\beta 1$ -ARs que pour les  $\beta 2$ -ARs (Communal *et coll.* 1998).

Nous avons examiné l'effet de la norépinephrine et de la moxonidine sur la viabilité des cardiomyocytes néonataux en culture. Nous avons alors observé et quantifié les cellules apoptotiques par un double marquage avec l'iodure de propidium et l'orange d'acridine. Seules les cellules dont la membrane plasmique a perdu son intégrité, sont perméables à l'iodure de propidium colorant ainsi leur noyau en rouge.

Comparée aux cellules contrôles, la norépinephrine diminue la viabilité cellulaire progressivement pour atteindre 60% à  $10^{-4}$  M, après 24 h d'incubation, ce qui est cohérent avec les effets apoptotiques de la norépinephrine à de fortes concentrations. (Singh *et coll.* 2000). Des concentrations similaires de la moxonidine n'ont aucun effet significatif sur la viabilité des cardiomyocytes.

L'apoptose des cardiocytes néonataux induite par la NE a été également évaluée qualitativement par un dosage ELISA des oligonucléosomes cytoplasmiques. Les analyses avec ELISA montrent que le traitement des cardiomyocytes avec la norépinephrine augmente la fragmentation d'ADN, et que la co-incubation avec la moxonidine inhibe cet effet. Chez les fibroblastes néonataux la norépinephrine tend à diminuer la fragmentation d'ADN et la co-incubation avec la moxonidine inhibe cet effet. Ces résultats montrent

également que la moxonidine s'est remarquablement opposé aux effets de la norépinéphrine dans les deux types cellulaires.

Les mécanismes impliqués dans l'apoptose de cellules peuvent comporter un changement de l'expression des protéines mitochondriales apoptotiques et anti-apoptotiques Bax et Bcl-2. Les protéines Bcl-2 et Bax font partie de la famille des protéines Bcl-2 qui sont des régulateurs de l'apoptose (Lucken-Ardjomande et Martinou 2005). Les taux d'expression des deux protéines peuvent déterminer l'état physiologique d'une cellule: la survie ou l'apoptose. La surexpression de la protéine Bcl-2 peut inhiber l'apoptose, alors que la surexpression de la protéine Bax peut la favoriser, ainsi une diminution du rapport Bax/Bcl2 a été montrée associée à la diminution de probabilité d'apoptose des cellules.

Les analyses de type western blot montrent que la norépinéphrine et la moxonidine n'ont aucun effet sur l'expression des deux protéines, Bax et Bcl<sub>2</sub>. Alors que la co-incubation augmente significativement l'expression de Bcl<sub>2</sub>, provoquant ainsi une diminution de rapport Bax/Bcl<sub>2</sub>. Cet effet témoigne d'une meilleure survie de cardiocytes.

Nos résultats confirment d'autres études qui ont démontré que les agonistes aux récepteurs I<sub>1</sub> peuvent augmenter le nombre des PC12 en culture (Edwards *et coll.* 2001), en inhibant l'apoptose et en augmentant la survie cellulaire (Dontenwill *et coll.* 2003b), impliquant la diminution de l'activité des caspases, la fragmentation nucléaire, et l'inhibition de l'activité mitochondrial.

Les concentrations de la moxonidine utilisées vont jusqu'à 10<sup>-5</sup> M. Même si la moxonidine possède une plus grande affinité pour les récepteurs aux imidazolines I<sub>1</sub> que pour les récepteurs α<sub>2</sub>-adrénergiques (30:1), à des fortes concentrations elle peut perdre cette sélectivité. Afin de déterminer si l'activation de ces récepteurs affecte nos résultats nous pouvons reproduire nos expériences

en utilisant de faibles concentrations de la moxonidine en présence ou en absence de différents antagonistes tels que la phenoxybenzamine ou prazosin ( $\alpha$ -bloquants), l'AGN ou efaroxan (antagonistes des récepteurs aux imidazolines).

Pour compléter cette étude, la cascade de signalisation activée par la moxonidine pourrait être éclaircie. Nos résultats sont en faveur d'une voie de signalisation dans laquelle l'AMPc est diminué et initie à son tour une cascade de signalisation menant à l'inhibition des protéines pro-apoptotiques comme Bax et la stimulation des protéines anti-apoptotiques comme Bcl<sub>2</sub>.

Nos résultats préliminaires montrent que la densité de récepteurs change avec l'âge. Nous considérons donc que leur réponse aux différents stimuli peut également changer, ce qui affecte la voie de signalisation empruntée. Ceci peut expliquer les différents effets observés chez les cardiocytes néonataux et adultes.

En conclusion et à la lumière des données recueillies lors de ces expériences, nous avons pu montrer que les récepteurs aux imidazolines I<sub>1</sub> sont localisés aux niveaux membranaire et cytosolique des cardiomyocytes et des fibroblastes du ventricule gauche. Nous avons aussi suggéré qu'afin de régesser l'hypertrophie ventriculaire gauche et de maintenir la performance et la structure cardiaque suite aux dommages rencontrés lors de l'hypertrophie, la moxonidine s'oppose aux effets de la norépinéphrine chez les fibroblastes et les myocytes via différents mécanismes:

- Contrôle les effets de la norépinéphrine sur la croissance des cellules cardiaques en empêchant l'hypertrophie et la prolifération cellulaire. Ces effets ont comme conséquences la diminution de la synthèse du collagène et l'installation de la fibrose myocardique.

Inhibe la fragmentation d'ADN via des mécanismes qui impliquent la stimulation de Bcl<sub>2</sub> chez les cardiomyocytes prévenant ainsi la perte des cellules cardiaques qui mène le cœur hypertensif à la défaillance cardiaque.

## Bibliographie

**Alahari, S. K., J. W. Lee et R. L. Juliano (2000).** *"Nischarin, a novel protein that interacts with the integrin alpha5 subunit and inhibits cell migration."* J Cell Biol **151**(6): 1141-54.

**Alahari, S. K., P. J. Reddig et R. L. Juliano (2004).** *"The integrin-binding protein Nischarin regulates cell migration by inhibiting PAK."* Embo J **23**(14): 2777-88.

**Anversa, P., G. Olivetti, M. Melissari et A. V. Loud (1979).** *"Morphometric study of myocardial hypertrophy induced by abdominal aortic stenosis."* Lab Invest **40**(3): 341-9.

**Aplin, A. E., A. Howe, S. K. Alahari et R. L. Juliano (1998).** *"Signal transduction and signal modulation by cell adhesion receptors: the role of integrins, cadherins, immunoglobulin-cell adhesion molecules, and selectins."* Pharmacol Rev **50**(2): 197-263.

**Atlas, D. (1994).** *"Identifying clonidine-displacing substance."* Science **266**(5184): 462-4.

**Berkowitz, D. E., D. T. Price, E. A. Bello, S. O. Page et D. A. Schwinn (1994).** *"Localization of messenger RNA for three distinct alpha 2-adrenergic receptor subtypes in human tissues. Evidence for species heterogeneity and implications for human pharmacology."* Anesthesiology **81**(5): 1235-44.

**Bhambi, B. et M. Eghbali (1991).** *"Effect of norepinephrine on myocardial collagen gene expression and response of cardiac fibroblasts after norepinephrine treatment."* Am J Pathol **139**(5): 1131-42.

**Bidet, M., P. Poujeol et A. Parini (1990).** *"Effect of imidazolines on Na<sup>+</sup> transport and intracellular pH in renal proximal tubule cells."* Biochim Biophys Acta **1024**(1): 173-8.

**Boise, L. H., M. Gonzalez-Garcia, C. E. Postema, L. Ding, T. Lindsten, L. A. Turka, X. Mao, G. Nunez et C. B. Thompson (1993).** *"bcl-x, a bcl-2-related gene that functions as a dominant regulator of apoptotic cell death."* Cell **74**(4): 597-608.

**Bousquet, P., V. Bruban, S. Schann et J. Feldman (2000).** *"Imidazoline receptors: a challenge."* Pharm Acta Helv **74**(2-3): 205-9.

**Bousquet, P. et J. Feldman (1999).** *"Drugs acting on imidazoline receptors: a review of their pharmacology, their use in blood pressure control and their potential interest in cardioprotection."* Drugs **58**(5): 799-812.

**Bousquet, P., J. Feldman, R. Bloch et J. Schwartz (1980).** *"Medullary cardiovascular effects of tetrodotoxin in anaesthetized cats."* Eur J Pharmacol **65**(2-3): 293-6.

**Bousquet, P., J. Feldman, R. Bloch et J. Schwartz (1981).** *"The nucleus reticularis lateralis: a region highly sensitive to clonidine."* Eur J Pharmacol **69**(3): 389-92.

**Bousquet, P., J. Feldman et J. Schwartz (1984).** *"Central cardiovascular effects of alpha adrenergic drugs: differences between catecholamines and imidazolines."* J Pharmacol Exp Ther **230**(1): 232-6.

**Bousquet, P. et J. Schwartz (1983).** *"Alpha-adrenergic drugs. Pharmacological tools for the study of the central vasomotor control."* Biochem Pharmacol **32**(9): 1459-65.

**Bricca, G., M. Dontenwill, A. Molines, J. Feldman, A. Belcourt et P. Bousquet (1988).** *"Evidence for the existence of a homogeneous population of imidazoline receptors in the human brainstem."* Eur J Pharmacol **150**(3): 401-2.

**Bricca, G., M. Dontenwill, A. Molines, J. Feldman, A. Belcourt et P. Bousquet (1989).** *"The imidazoline preferring receptor: binding studies in bovine, rat and human brainstem."* Eur J Pharmacol **162**(1): 1-9.

**Bricca, G., H. Greney, M. Dontenwill-Kieffer, J. Zhang, A. Belcourt et P. Bousquet (1993).** *"Heterogeneity of the specific imidazoline binding of [3H]idazoxan in the human cerebral cortex."* Neurochem Int **22**(2): 153-63.

**Bricca, G., J. Zhang, H. Greney, M. Dontenwill, J. Stutzmann, A. Belcourt et P. Bousquet (1993).** *"Relevance of the use of [3H]-clonidine to identify imidazoline receptors in the rabbit brainstem."* Br J Pharmacol **110**(4): 1537-43.

**Brown, C. A., S. L. Chan, M. R. Stillings, S. A. Smith et N. G. Morgan (1993).** *"Antagonism of the stimulatory effects of esfaroxan and glibenclamide in rat pancreatic islets by the imidazoline, RX801080."* Br J Pharmacol **110**(3): 1017-22.

**Calderone, A., C. M. Thaik, N. Takahashi, D. L. Chang et W. S. Colucci (1998).** *"Nitric oxide, atrial natriuretic peptide, and cyclic GMP inhibit the growth-promoting effects of norepinephrine in cardiac myocytes and fibroblasts."* J Clin Invest **101**(4): 812-8.

**Campbell, W. R. et D. E. Potter (1994).** *"The central effects of moxonidine on intraocular pressure and its antagonism by L-659, 066 and L-657, 743 in the rabbit."* Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry **18**(6): 1051-61

**Cao, L. et D. G. Gardner (1995).** *"Natriuretic peptides inhibit DNA synthesis in cardiac fibroblasts."* Hypertension **25**(2): 227-34.

**Carpene, C., P. Collon, A. Remaury, A. Cordi, A. Hudson, D. Nutt et M. Lafontan (1995).** *"Inhibition of amine oxidase activity by derivatives that recognize imidazoline I2 sites."* J Pharmacol Exp Ther **272**(2): 681-8.

**Carpy, A., J. M. Leger, G. Leclerc, N. Decker, B. Rouot et C. G. Wermuth (1982).** *"Comparison of crystallographic and quantum mechanical analysis with biological data on clonidine and some related analogues."* Mol Pharmacol **21**(2): 400-8.

**Chan, C. K. et G. A. Head (1996).** *"Relative importance of central imidazoline receptors for the antihypertensive effects of moxonidine and rilmenidine."* J Hypertens **14**(7): 855-64.

**Chan, S. L., C. A. Brown et N. G. Morgan (1993).** *"Stimulation of insulin secretion by the imidazoline alpha 2-adrenoceptor antagonist efaroxan is mediated by a novel, stereoselective, binding site."* Eur J Pharmacol **230**(3): 375-8.

**Chan, S. L., C. A. Brown, K. E. Scarpello et N. G. Morgan (1994).** *"The imidazoline site involved in control of insulin secretion: characteristics that distinguish it from I1- and I2-sites."* Br J Pharmacol **112**(4): 1065-70.

**Chan, S. L. et N. G. Morgan (1990).** *"Stimulation of insulin secretion by efaroxan may involve interaction with potassium channels."* Eur J Pharmacol **176**(1): 97-101.

**Colombo, F., J. Noel, P. Mayers, I. Mercier et A. Calderone (2001).** *"beta-Adrenergic stimulation of rat cardiac fibroblasts promotes protein synthesis via the activation of phosphatidylinositol 3-kinase."* J Mol Cell Cardiol **33**(6): 1091-106.

**Communal, C., K. Singh, D. R. Pimentel et W. S. Colucci (1998).** *"Norepinephrine stimulates apoptosis in adult rat ventricular myocytes by activation of the beta-adrenergic pathway."* Circulation **98**(13): 1329-34.

**Communal, C., K. Singh, D. B. Sawyer et W. S. Colucci (1999).** *"Opposing effects of beta(1)- and beta(2)-adrenergic receptors on cardiac myocyte apoptosis : role of a pertussis toxin-sensitive G protein."* Circulation **100**(22): 2210-2.

**Connor, H. E., G. M. Drew, L. Finch et P. E. Hicks (1981).** *"Pharmacological characteristics of spinal alpha-adrenoreceptors in rats."* J Auton Pharmacol **1**(2): 149-56.

**Coupry, I., D. Atlas, R. A. Podevin, I. Uzielli et A. Parini (1990).** *"Imidazoline-guanidinium receptive site in renal proximal tubule: asymmetric distribution, regulation by cations and interaction with an endogenous clonidine displacing substance."* J Pharmacol Exp Ther **252**(1): 293-9.

**Coupry, I., R. A. Podevin, J. P. Dausse et A. Parini (1987).** "Evidence for imidazoline binding sites in basolateral membranes from rabbit kidney." *Biochem Biophys Res Commun* **147**(3): 1055-60.

**Cubeddu, L., S. Z. Langer et N. Weiner (1974).** "The relationships between alpha receptor block, inhibition of norepinephrine uptake and the release and metabolism of 3H-norepinephrine." *J Pharmacol Exp Ther* **188**(2): 368-85.

**Diamant, S., T. Eldar-Geva et D. Atlas (1992).** "Imidazoline binding sites in human placenta: evidence for heterogeneity and a search for physiological function." *Br J Pharmacol* **106**(1): 101-8.

**Doering, C. W., J. E. Jalil, J. S. Janicki, R. Pick, S. Aghili, C. Abrahams et K. T. Weber (1988).** "Collagen network remodelling and diastolic stiffness of the rat left ventricle with pressure overload hypertrophy." *Cardiovasc Res* **22**(10): 686-95.

**Donath, M. Y., J. Zapf, M. Eppenberger-Eberhardt, E. R. Froesch et H. M. Eppenberger (1994).** "Insulin-like growth factor I stimulates myofibril development and decreases smooth muscle alpha-actin of adult cardiomyocytes." *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**(5): 1686-90.

**Dontenwill, M., G. Pascal, J. E. Piletz, M. Chen, J. Baldwin, P. Ronde, L. Dupuy, D. Urosevic, H. Greney, K. Takeda et P. Bousquet (2003).** "IRAS, the human homologue of Nischarin, prolongs survival of transfected PC12 cells." *Cell Death Differ* **10**(8): 933-5.

**Dontenwill, M., J. E. Piletz, M. Chen, J. Baldwin, G. Pascal, P. Ronde, L. Dupuy, H. Greney, K. Takeda et P. Bousquet (2003).** "IRAS is an anti-apoptotic protein." *Ann N Y Acad Sci* **1009**: 400-12.

**Dupuy, L., D. Urosevic, H. Greney, W. Quaglia, M. Pignini, L. Brasili, M. Dontenwill et P. Bousquet (2004).** "I1 imidazoline receptor-mediated effects on apoptotic processes in PC12 cells." *Cell Death Differ* **11**(9): 1049-52.

**Dzau, V. J. (1993).** "Tissue renin-angiotensin system in myocardial hypertrophy and failure." *Arch Intern Med* **153**(8): 937-42.

**Edwards, L. et P. Ernsberger (2003).** "The I(1)-imidazoline receptor in PC12 pheochromocytoma cells reverses NGF-induced ERK activation and induces MKP-2 phosphatase." *Brain Res* **980**(1): 71-9.

**Edwards, L., D. Fishman, P. Horowitz, N. Bourbon, M. Kester et P. Ernsberger (2001).** "The I1-imidazoline receptor in PC12 pheochromocytoma cells activates protein kinases C, extracellular signal-regulated kinase (ERK) and c-jun N-terminal kinase (JNK)." *J Neurochem* **79**(5): 931-40.

**Eglen, R. M., A. L. Hudson, D. A. Kendall, D. J. Nutt, N. G. Morgan, V. G. Wilson et M. P. Dillon (1998).** *"Seeing through a glass darkly': casting light on imidazoline 'I' sites."* Trends Pharmacol Sci **19**(9): 381-90.

**El-Ayoubi, R., J. Gutkowska, S. Regunathan et S. Mukaddam-Daher (2002).** *"Imidazoline receptors in the heart: characterization, distribution, and regulation."* J Cardiovasc Pharmacol **39**(6): 875-83.

**El-Ayoubi, R., A. Menaouar, J. Gutkowska et S. Mukaddam-Daher (2003).** *"Normalization of up-regulated cardiac imidazoline I(1)-receptors and natriuretic peptides by chronic treatment with moxonidine in spontaneously hypertensive rats."* Ann N Y Acad Sci **1009**: 274-8.

**El-Ayoubi, R., A. Menaouar, J. Gutkowska et S. Mukaddam-Daher (2005).** *"Urinary responses to acute moxonidine are inhibited by natriuretic peptide receptor antagonist."* Br J Pharmacol **145**(1): 50-6.

**Engelmann, G. L., K. D. Boehm, J. F. Haskell, P. A. Khairallah et J. Ilan (1989).** *"Insulin-like growth factors and neonatal cardiomyocyte development: ventricular gene expression and membrane receptor variations in normotensive and hypertensive rats."* Mol Cell Endocrinol **63**(1-2): 1-14.

**Ernsberger, P. (1999).** *"The I1-imidazoline receptor and its cellular signaling pathways."* Ann N Y Acad Sci **881**: 35-53.

**Ernsberger, P., T. H. Damon, L. M. Graff, S. G. Schafer et M. O. Christen (1993).** *"Moxonidine, a centrally acting antihypertensive agent, is a selective ligand for I1-imidazoline sites."* J Pharmacol Exp Ther **264**(1): 172-82.

**Ernsberger, P., R. Giuliano, R. N. Willette, A. R. Granata et D. J. Reis (1988).** *"Hypotensive action of clonidine analogues correlates with binding affinity at imidazole and not alpha-2-adrenergic receptors in the rostral ventrolateral medulla."* J Hypertens Suppl **6**(4): S554-7.

**Ernsberger, P., R. Giuliano, R. N. Willette et D. J. Reis (1990).** *"Role of imidazole receptors in the vasodepressor response to clonidine analogs in the rostral ventrolateral medulla."* J Pharmacol Exp Ther **253**(1): 408-18.

**Ernsberger, P., M. E. Graves, L. M. Graff, N. Zakieh, P. Nguyen, L. A. Collins, K. L. Westbrook et G. G. Johnson (1995).** *"I1-imidazoline receptors. Definition, characterization, distribution, and transmembrane signaling."* Ann N Y Acad Sci **763**: 22-42.

**Ernsberger, P., M. P. Meeley, J. J. Mann et D. J. Reis (1987).** *"Clonidine binds to imidazole binding sites as well as alpha 2-adrenoceptors in the ventrolateral medulla."* Eur J Pharmacol **134**(1): 1-13.

**Ernsberger, P. et I. H. Shen (1997).** *"Membrane localization and guanine nucleotide sensitivity of medullary II-imidazoline binding sites."* *Neurochem Int* **30**(1): 17-23.

**Evinger, M. J., P. Ernsberger, S. Regunathan et D. J. Reis (1995).** *"Regulation of phenylethanolamine N-methyltransferase gene expression by imidazoline receptors in adrenal chromaffin cells."* *J Neurochem* **65**(3): 988-97.

**Felsen, D., P. Ernsberger, P. M. Sutaria, R. J. Nejat, P. Nguyen, M. May, D. S. Breslin, D. N. Marion et E. D. Vaughan, Jr. (1994).** *"Identification, localization and functional analysis of imidazoline and alpha adrenergic receptors in canine prostate."* *J Pharmacol Exp Ther* **268**(2): 1063-71.

**Fowler, J. S., J. Logan, N. D. Volkow, G. J. Wang, R. R. MacGregor et Y. S. Ding (2002).** *"Monoamine oxidase: radiotracer development and human studies."* *Methods* **27**(3): 263-77.

**Fuller, S. J., J. R. Mynett et P. H. Sugden (1992).** *"Stimulation of cardiac protein synthesis by insulin-like growth factors."* *Biochem J* **282** ( Pt 1): 85-90.

**Giancotti, F. G. et E. Ruoslahti (1999).** *"Integrin signaling."* *Science* **285**(5430): 1028-32.

**Gibson, L., S. P. Holmgren, D. C. Huang, O. Bernard, N. G. Copeland, N. A. Jenkins, G. R. Sutherland, E. Baker, J. M. Adams et S. Cory (1996).** *"bcl-w, a novel member of the bcl-2 family, promotes cell survival."* *Oncogene* **13**(4): 665-75.

**Gillis, R. A., P. J. Gatti et J. A. Quest (1985).** *"Mechanism of the antihypertensive effect of alpha 2-agonists."* *J Cardiovasc Pharmacol* **7 Suppl 8**: S38-44.

**Glavin, G. B., M. A. Carlisle et D. D. Smyth (1995).** *"Agmatine, an endogenous imidazoline receptor agonist, increases gastric secretion and worsens experimental gastric mucosal injury in rats."* *J Pharmacol Exp Ther* **274**(2): 741-4.

**Glennon, P. E., P. H. Sugden et P. A. Poole-Wilson (1995).** *"Cellular mechanisms of cardiac hypertrophy."* *Br Heart J* **73**(6): 496-9.

**Gothert, M. et G. J. Molderings (1991).** *"Involvement of presynaptic imidazoline receptors in the alpha 2-adrenoceptor-independent inhibition of noradrenaline release by imidazoline derivatives."* *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* **343**(3): 271-82.

**Gothert, M., G. J. Molderings, K. Fink et E. Schlicker (1995).** *"Alpha 2-adrenoceptor-independent inhibition by imidazolines and guanidines of noradrenaline release from peripheral, but not central noradrenergic neurons."* *Ann N Y Acad Sci* **763**: 405-19.

**Greenberg, S., F. Curro, G. C. Palmer, S. J. Palmer, S. Darda et W. Hoefke (1980).** *"Possible involvement of cyclic AMP and frontal cortex in amitriptyline mediated suppression of the hypotensive effect of clonidine."* Life Sci **27**(25-26): 2669-74.

**Greney, H., G. Bricca, M. Dontenwill, J. Stutzmann, P. Bousquet et A. Belcourt (1994).** *"Characterization of imidazoline binding protein(s) solubilized from human brainstem: studies with [3H]idazoxan and [3H]clonidine."* Neurochem Int **25**(2): 183-91.

**Greney, H., P. Ronde, C. Magnier, F. Maranca, C. Rascente, W. Quaglia, M. Giannella, M. Pignini, L. Brasili, C. Lugnier, P. Bousquet et M. Dontenwill (2000).** *"Coupling of I(1) imidazoline receptors to the cAMP pathway: studies with a highly selective ligand, benzazoline."* Mol Pharmacol **57**(6): 1142-51.

**Greney, H., D. Urosevic, S. Schann, L. Dupuy, V. Bruban, J. D. Ehrhardt, P. Bousquet et M. Dontenwill (2002).** *"[125I]2-(2-chloro-4-iodo-phenylamino)-5-methyl-pyrroline (LNP 911), a high-affinity radioligand selective for I1 imidazoline receptors."* Mol Pharmacol **62**(1): 181-91.

**Haeusler, G. (1974).** *"Proceedings: Sympathetic nerve activity after noradrenaline depletion and its alteration by clonidine."* Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol **282**(0): suppl 282:R29.

**Hara, A., K. Yuhki, T. Fujino, T. Yamada, K. Takayama, S. Kuriyama, O. Takahata, H. Karibe, Y. Okada, C. Y. Xiao, H. Ma, S. Narumiya et F. Ushikubi (2005).** *"Augmented cardiac hypertrophy in response to pressure overload in mice lacking the prostaglandin I2 receptor."* Circulation **112**(1): 84-92.

**Hayashi, D., S. Kudoh, I. Shiojima, Y. Zou, K. Harada, M. Shimoyama, Y. Imai, K. Monzen, T. Yamazaki, Y. Yazaki, R. Nagai et I. Komuro (2004).** *"Atrial natriuretic peptide inhibits cardiomyocyte hypertrophy through mitogen-activated protein kinase phosphatase-1."* Biochem Biophys Res Commun **322**(1): 310-9.

**Heemskerk, F. M., M. Dontenwill, H. Greney, C. Vonthron et P. Bousquet (1998).** *"Evidence for the existence of imidazoline-specific binding sites in synaptosomal plasma membranes of the bovine brainstem."* J Neurochem **71**(5): 2193-202.

**Hockenbery, D., G. Nunez, C. Milliman, R. D. Schreiber et S. J. Korsmeyer (1990).** *"Bcl-2 is an inner mitochondrial membrane protein that blocks programmed cell death."* Nature **348**(6299): 334-6.

**Hohage, H., K. Hess, C. Jahl, J. Greven et E. Schlatter (1997).** *"Renal and blood pressure effects of moxonidine and clonidine in spontaneously hypertensive rats."* Clin Nephrol **48**(6): 346-52.

**Hudson, A. L., S. Luscombe, R. E. Gouch, D. J. Nutt et R. J. Tyacke (1999).** *"Endogenous indoleamines demonstrate moderate affinity for 12 binding sites."* Ann N Y Acad Sci **881**: 212-6.

**Ito, H., M. Hiroe, Y. Hirata, M. Tsujino, S. Adachi, M. Shichiri, A. Koike, A. Nogami et F. Marumo (1993).** *"Insulin-like growth factor-I induces hypertrophy with enhanced expression of muscle specific genes in cultured rat cardiomyocytes."* Circulation **87**(5): 1715-21.

**Ivanov, T. R., J. C. Jones, M. Dontenwill, P. Bousquet et J. E. Piletz (1998).** *"Characterization of a partial cDNA clone detected by imidazoline receptor-selective antisera."* J Auton Nerv Syst **72**(2-3): 98-110.

**Jalil, J. E., C. W. Doering, J. S. Janicki, R. Pick, S. G. Shroff et K. T. Weber (1989).** *"Fibrillar collagen and myocardial stiffness in the intact hypertrophied rat left ventricle."* Circ Res **64**(6): 1041-50.

**Juliano, R. L., P. Reddig, S. Alahari, M. Edin, A. Howe et A. Aplin (2004).** *"Integrin regulation of cell signalling and motility."* Biochem Soc Trans **32**(Pt3): 443-6.

**Kalra, S. P., E. Pearson, A. Sahu et P. S. Kalra (1995).** *"Agmatine, a novel hypothalamic amine, stimulates pituitary luteinizing hormone release in vivo and hypothalamic luteinizing hormone-releasing hormone release in vitro."* Neurosci Lett **194**(3): 165-8.

**Kamisaki, Y., T. Ishikawa, Y. Takao, H. Omodani, N. Kuno et T. Itoh (1990).** *"Binding of [<sup>3</sup>H]p-aminoclonidine to two sites, alpha 2-adrenoceptors and imidazoline binding sites: distribution of imidazoline binding sites in rat brain."* Brain Res **514**(1): 15-21.

**King, B. D., D. Sack, M. R. Kichuk et T. H. Hintze (1987).** *"Absence of hypertension despite chronic marked elevations in plasma norepinephrine in conscious dogs."* Hypertension **9**(6): 582-90.

**Kirchberger, K., H. Schmitt, C. Hummel, A. Peinemann, E. Pauli, B. Kettenmann et H. Stefan (1998).** *"Clonidine- and methohexital-induced epileptiform discharges detected by magnetoencephalography (MEG) in patients with localization-related epilepsies."* Epilepsia **39**(10): 1104-12.

**Kline, R. L. et D. F. Cechetto (1993).** *"Renal effects of rilmenidine in anesthetized rats: importance of renal nerves."* J Pharmacol Exp Ther **266**(3): 1556-62.

**Kobinger, W. et A. Walland (1967).** *"[Blood circulation studies with 2-(2,6-dichlorophenylamino)-2-imidazoline hydrochloride]."* Arzneimittelforschung **17**(3): 292-300.

**Kobinger, W. et A. Walland (1967).** "Investigations into the mechanism of the hypotensive effect of 2-(2,6-dichlorophenylamino)-2-imidazoline-HCl." *Eur J Pharmacol* **2**(3): 155-62.

**Kolesnikov, Y., S. Jain et G. W. Pasternak (1996).** "Modulation of opioid analgesia by agmatine." *Eur J Pharmacol* **296**(1): 17-22.

**Komuro, I., T. Kaida, Y. Shibazaki, M. Kurabayashi, Y. Katoh, E. Hoh, F. Takaku et Y. Yazaki (1990).** "Stretching cardiac myocytes stimulates protooncogene expression." *J Biol Chem* **265**(7): 3595-8.

**Komuro, I., Y. Katoh, T. Kaida, Y. Shibazaki, M. Kurabayashi, E. Hoh, F. Takaku et Y. Yazaki (1991).** "Mechanical loading stimulates cell hypertrophy and specific gene expression in cultured rat cardiac myocytes. Possible role of protein kinase C activation." *J Biol Chem* **266**(2): 1265-8.

**Langin, D. et M. Lafontan (1989).** "[3H]idazoxan binding at non-alpha 2-adrenoceptors in rabbit adipocyte membranes." *Eur J Pharmacol* **159**(2): 199-203.

**Langin, D., H. Paris et M. Lafontan (1990).** "Binding of [3H]idazoxan and of its methoxy derivative [3H] RX821002 in human fat cells: [3H]idazoxan but not [3H] RX821002 labels additional non-alpha 2-adrenergic binding sites." *Mol Pharmacol* **37**(6): 876-85.

**Laubie, M. et H. Schmitt (1977).** "Sites of action of clonidine: centrally mediated increase in vagal tone, centrally mediated hypotensive and sympatho-inhibitory effects." *Prog Brain Res* **47**: 337-48.

**Leicht, M., N. Greipel et H. Zimmer (2000).** "Comitogenic effect of catecholamines on rat cardiac fibroblasts in culture." *Cardiovasc Res* **48**(2): 274-84.

**Li, G., S. Regunathan, C. J. Barrow, J. Eshraghi, R. Cooper et D. J. Reis (1994).** "Agmatine: an endogenous clonidine-displacing substance in the brain." *Science* **263**(5149): 966-9.

**Liedtke, C. M., J. Furin et P. Ernsberger (1993).** "Alpha 2-adrenergic, but not imidazole, agonists activate NaCl cotransport in rabbit tracheal epithelial cells." *Am J Physiol* **264**(3 Pt 1): C568-76.

**Limon, I., I. Couprie, S. M. Lanier et A. Parini (1992).** "Purification and characterization of mitochondrial imidazoline-guanidinium receptive site from rabbit kidney." *J Biol Chem* **267**(30): 21645-9.

**Lucken-Ardjomande, S. et J. C. Martinou (2005).** "Regulation of Bcl-2 proteins and of the permeability of the outer mitochondrial membrane." *C R Biol* **328**(7): 616-31.

**Mall, G., D. Greber, H. Gharenbaghi, G. Wiest, K. Amann et T. Mattfeldt (1991).** *"Effects of nifedipine and moxonidine on cardiac structure in spontaneously hypertensive rats (SHR)--stereological studies on myocytes, capillaries, arteries, and cardiac interstitium."* Basic Res Cardiol **86 Suppl 3**: 33-44.

**Mallard, N. J., A. L. Hudson et D. J. Nutt (1992).** *"Characterization and autoradiographical localization of non-adrenoceptor idazoxan binding sites in the rat brain."* Br J Pharmacol **106**(4): 1019-27.

**Matsuoka, H., M. Nakata, K. Kohno, Y. Koga, G. Nomura, H. Toshima et T. Imaizumi (1996).** *"Chronic L-arginine administration attenuates cardiac hypertrophy in spontaneously hypertensive rats."* Hypertension **27**(1): 14-8.

**Matter, M. L. et E. Ruoslahti (2001).** *"A signaling pathway from the alpha5beta1 and alpha(v)beta3 integrins that elevates bcl-2 transcription."* J Biol Chem **276**(30): 27757-63.

**Menaouar, A., R. El-Ayoubi, M. Jankowski, J. Gutkowska et S. Mukaddam-Daher (2002).** *"Chronic imidazoline receptor activation in spontaneously hypertensive rats."* Am J Hypertens **15**(9): 803-8.

**Michel, M. C., O. E. Brodde, B. Schnepel, J. Behrendt, R. Tschada, H. J. Motulsky et P. A. Insel (1989).** *"[3H]idazoxan and some other alpha 2-adrenergic drugs also bind with high affinity to a nonadrenergic site."* Mol Pharmacol **35**(3): 324-30.

**Michel, M. C., J. W. Regan, M. A. Gerhardt, R. R. Neubig, P. A. Insel et H. J. Motulsky (1990).** *"Nonadrenergic [3H]idazoxan binding sites are physically distinct from alpha 2-adrenergic receptors."* Mol Pharmacol **37**(1): 65-8.

**Molderings, G. J., D. Moura, K. Fink, H. Bonisch et M. Gothert (1993).** *"Binding of [3H]clonidine to 11-imidazoline sites in bovine adrenal medullary membranes."* Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol **348**(1): 70-6.

**Mukaddam-Daher, S. et J. Gutkowska (1999).** *"The renal actions of moxonidine are mediated by atrial natriuretic peptide and involve the opioid receptors."* Ann N Y Acad Sci **881**: 385-7.

**Mukaddam-Daher, S. et J. Gutkowska (2000).** *"Atrial natriuretic peptide is involved in renal actions of moxonidine."* Hypertension **35**(6): 1215-20.

**Mukaddam-Daher, S., A. Menaouar et J. Gutkowska (2006).** *"Receptors involved in moxonidine-stimulated atrial natriuretic peptide release from isolated normotensive rat hearts."* Eur J Pharmacol **541**(1-2): 73-9.

**Musgrave, I. F. et E. Badoer (2000).** *"Harmaline produces hypotension following microinjection into the RVLM: possible role of I(1)-imidazoline receptors."* Br J Pharmacol **129**(6): 1057-9.

**Musgrave, I. F., D. Krautwurst, J. Hescheler et G. Schultz (1995).** *"Clonidine and cirazoline inhibit activation of nicotinic channels in PC-12 cells."* Ann N Y Acad Sci **763**: 272-82.

**Naylor, W. G., D. Chipperfield et T. E. Lowe (1969).** *"The negative inotropic effect of adrenergic betareceptor blocking drugs on human heart muscle."* Cardiovasc Res **3**(1): 30-6.

**Ollivier, J. P. et M. O. Christen (1994).** *"I1-imidazoline-receptor agonists in the treatment of hypertension: an appraisal of clinical experience."* J Cardiovasc Pharmacol **24 Suppl 1**: S39-48.

**Oltvai, Z. N., C. L. Milliman et S. J. Korsmeyer (1993).** *"Bcl-2 heterodimerizes in vivo with a conserved homolog, Bax, that accelerates programmed cell death."* Cell **74**(4): 609-19.

**Paquette P-A, D. Duguay, R. El- Ayoubi, A. Menaouar, B. Danalache, J. Gutkowska, D. DeBlois et S. Mukaddam-Daher (2007).** *"Control of Left Ventricular Mass by Moxonidine Involves Reduced DNA Synthesis and Enhanced DNA Fragmentation."* Br J Pharmacol (sous presse)

**Parini, A., C. G. Moudanos, N. Pizzinat et S. M. Lanier (1996).** *"The elusive family of imidazoline binding sites."* Trends Pharmacol Sci **17**(1): 13-6.

**Penner, S. B. et D. D. Smyth (1994).** *"Sodium excretion following central administration of an I1 imidazoline receptor agonist, moxonidine."* Br J Pharmacol **112**(4): 1089-94.

**Penner, S. B. et D. D. Smyth (1995).** *"The role of the peripheral sympathetic nervous system in the natriuresis following central administration of an I1 imidazoline agonist, moxonidine."* Br J Pharmacol **116**(6): 2631-6.

**Piletz, J. E., A. C. Andorn, J. R. Unnerstall et A. Halaris (1991).** *"Binding of [3H]-p-aminoclonidine to alpha 2-adrenoceptor states plus a non-adrenergic site on human platelet plasma membranes."* Biochem Pharmacol **42**(3): 569-84.

**Piletz, J. E., T. R. Ivanov, J. D. Sharp, P. Ernsberger, C. H. Chang, R. T. Pickard, G. Gold, B. Roth, H. Zhu, J. C. Jones, J. Baldwin et D. J. Reis (2000).** *"Imidazoline receptor antisera-selected (IRAS) cDNA: cloning and characterization."* DNA Cell Biol **19**(6): 319-29.

**Piletz, J. E. et K. Sletten (1993).** *"Nonadrenergic imidazoline binding sites on human platelets."* J Pharmacol Exp Ther **267**(3): 1493-502.

**Piletz, J. E., H. Zhu et D. N. Chikkala (1996).** *"Comparison of ligand binding affinities at human 11-imidazoline binding sites and the high affinity state of alpha-2 adrenoceptor subtypes."* J Pharmacol Exp Ther **279**(2): 694-702.

**Prell, G. D., G. P. Martinelli, G. R. Holstein, J. Matulic-Adamic, K. A. Watanabe, S. L. Chan, N. G. Morgan, M. A. Haxhiu et P. Ernsberger (2004).** *"Imidazoleacetic acid-ribotide: an endogenous ligand that stimulates imidazol(in)e receptors."* Proc Natl Acad Sci U S A **101**(37): 13677-82.

**Raasch, W., B. Jungbluth, U. Schafer, W. Hauser et P. Dominiak (2003).** *"Modification of noradrenaline release in pithed spontaneously hypertensive rats by 11-binding sites in addition to alpha2-adrenoceptors."* J Pharmacol Exp Ther **304**(3): 1063-71.

**Raasch, W., B. Jungbluth, U. Schafer, W. Hauser et P. Dominiak (2003).** *"Norepinephrine release is reduced by I(1)-receptors in addition to alpha(2)-adrenoceptors."* Ann N Y Acad Sci **1009**: 270-3.

**Raddatz, R., A. Parini et S. M. Lanier (1995).** *"Imidazoline/guanidinium binding domains on monoamine oxidases. Relationship to subtypes of imidazoline-binding proteins and tissue-specific interaction of imidazoline ligands with monoamine oxidase B."* J Biol Chem **270**(46): 27961-8.

**Raddatz, R., A. Parini et S. M. Lanier (1997).** *"Localization of the imidazoline binding domain on monoamine oxidase B."* Mol Pharmacol **52**(4): 549-53.

**Regunathan, S. (2006).** *"Agmatine: biological role and therapeutic potentials in morphine analgesia and dependence."* Aaps J **8**(3): E479-84.

**Regunathan, S. et D. J. Reis (1996).** *"Imidazoline receptors and their endogenous ligands."* Annu Rev Pharmacol Toxicol **36**: 511-44.

**Reiss, K., J. Kajstura, J. M. Capasso, T. A. Marino et P. Anversa (1993).** *"Impairment of myocyte contractility following coronary artery narrowing is associated with activation of the myocyte IGF1 autocrine system, enhanced expression of late growth related genes, DNA synthesis, and myocyte nuclear mitotic division in rats."* Exp Cell Res **207**(2): 348-60.

**Reynoldson, J. A., G. A. Head et P. I. Korner (1979).** *"Effect of 6-hydroxydopamine on blood pressure and heart rate responses to intracisternal clonidine in conscious rabbits."* Eur J Pharmacol **55**(3): 257-62.

**Ruggiero, D. A., S. Regunathan, H. Wang, T. A. Milner et D. J. Reis (1998).** *"Immunocytochemical localization of an imidazoline receptor protein in the central nervous system."* Brain Res **780**(2): 270-93.

**Sadoshima, J. et S. Izumo (1993).** *"Mechanical stretch rapidly activates multiple signal transduction pathways in cardiac myocytes: potential involvement of an autocrine/paracrine mechanism."* *Embo J* **12**(4): 1681-92.

**Sadoshima, J. et S. Izumo (1993).** *"Mechanotransduction in stretch-induced hypertrophy of cardiac myocytes."* *J Recept Res* **13**(1-4): 777-94.

**Sadoshima, J. et S. Izumo (1993).** *"Molecular characterization of angiotensin II--induced hypertrophy of cardiac myocytes and hyperplasia of cardiac fibroblasts. Critical role of the AT1 receptor subtype."* *Circ Res* **73**(3): 413-23.

**Sadoshima, J. et S. Izumo (1993).** *"Signal transduction pathways of angiotensin II--induced c-fos gene expression in cardiac myocytes in vitro. Roles of phospholipid-derived second messengers."* *Circ Res* **73**(3): 424-38.

**Sadoshima, J., Y. Xu, H. S. Slayter et S. Izumo (1993).** *"Autocrine release of angiotensin II mediates stretch-induced hypertrophy of cardiac myocytes in vitro."* *Cell* **75**(5): 977-84.

**Sadoshima, S., K. Fujii, H. Ooboshi, S. Ibayashi et M. Fujishima (1993).** *"Angiotensin converting enzyme inhibitors attenuate ischemic brain metabolism in hypertensive rats."* *Stroke* **24**(10): 1561-6; discussion 1566-7.

**Sattler, R. W., Van Zwieten et P. A. (1967).** *"Acute hypotensive action of 2-(2,6-dichlorophenylamino)-2-imidazoline hydrochloride (St 155) after infusion into the cat's vertebral artery."* *Eur J Pharmacol* **2**(1): 9-13.

**Schmitt, H., J. R. Boissier, J. F. Giudicelli et J. Fichelle (1968).** *"Cardiovascular effects of 2-(2,6-dichlorophenylamino)-2-imidazoline hydrochloride (ST 155). II. Central sympathetic structures."* *Eur J Pharmacol* **2**(5): 340-6.

**Schwarz, W. et J. Kandziora (1990).** *"[Long-term experiences with moxonidine, a new antihypertensive agent]."* *Fortschr Med* **108**(32): 616-20.

**Sen, S., G. Kundu, N. Mekhail, J. Castel, K. Misono et B. Healy (1990).** *"Myotrophin: purification of a novel peptide from spontaneously hypertensive rat heart that influences myocardial growth."* *J Biol Chem* **265**(27): 16635-43.

**Separovic, D., M. Kester et P. Ernsberger (1996).** *"Coupling of II-imidazoline receptors to diacylglyceride accumulation in PC12 rat pheochromocytoma cells."* *Mol Pharmacol* **49**(4): 668-75.

**Simpson, P. (1983).** *"Norepinephrine-stimulated hypertrophy of cultured rat myocardial cells is an alpha 1 adrenergic response."* *J Clin Invest* **72**(2): 732-8.

**Simpson, P. (1985).** *"Stimulation of hypertrophy of cultured neonatal rat heart cells through an alpha 1-adrenergic receptor and induction of beating through an*

*alpha 1- and beta 1-adrenergic receptor interaction. Evidence for independent regulation of growth and beating.*" *Circ Res* **56**(6): 884-94.

**Singh, K., C. Communal et W. S. Colucci (2000).** "Inhibition of protein phosphatase 1 induces apoptosis in neonatal rat cardiac myocytes: role of adrenergic receptor stimulation." *Basic Res Cardiol* **95**(5): 389-96.

**Singh, K., L. Xiao, A. Remondino, D. B. Sawyer et W. S. Colucci (2001).** "Adrenergic regulation of cardiac myocyte apoptosis." *J Cell Physiol* **189**(3): 257-65.

**Smyth, D. D. et S. B. Penner (1995).** "Renal 11-imidazoline receptor-selective compounds mediate natriuresis in the rat." *J Cardiovasc Pharmacol* **26 Suppl 2**: S63-7.

**Starke, K., H. D. Taube et E. Browksi (1977).** "Presynaptic receptor systems in catacholamingeric transmission." *Biochem Pharmacol* **26**(4): 259-68.

**Strauer, B. E., F. Bayer, H. M. Brecht et W. Motz (1985).** "The influence of sympathetic nervous activity on regression of cardiac hypertrophy." *J Hypertens Suppl* **3**(4): S39-44.

**Sun, Z., C. H. Chang et P. Ernsberger (2007).** "Identification of IRAS/Nischarin as an 11-imidazoline receptor in PC12 rat pheochromocytoma cells." *J Neurochem* **101**(1): 99-108.

**Swynghedauw, B. (2002).** "Myocardial remodelling: pharmacological targets." *Expert Opin Investig Drugs* **11**(5): 661-74.

**Tesson, F., C. Prip-Buus, A. Lemoine, J. P. Pegorier et A. Parini (1991).** "Subcellular distribution of imidazoline-guanidinium-receptive sites in human and rabbit liver. Major localization to the mitochondrial outer membrane." *J Biol Chem* **266**(1): 155-60.

**Timmermans, P. B. et P. A. Van Zwieten (1980).** "Postsynaptic alpha 1- and alpha 2-adrenoceptors in the circulatory system of the pithed rat: selective stimulation of the alpha 2-type by B-HT 933." *Eur J Pharmacol* **63**(2-3): 199-202.

**Tolentino-Silva, F. P., M. A. Haxhiu, S. Waldbaum, I. A. Dreshaj et P. Ernsberger (2000).** "alpha(2)-adrenergic receptors are not required for central anti-hypertensive action of moxonidine in mice." *Brain Res* **862**(1-2): 26-35.

**Urosevic, D., S. Schann, J. D. Ehrhardt, P. Bousquet et H. Greney (2004).** "LNP 906, the first high-affinity photoaffinity ligand selective for 11 imidazoline receptors." *Br J Pharmacol* **142**(3): 609-17.

**Van Kerckhoven, R., P. R. Saxena et R. G. Schoemaker (2002).** "Restored capillary density in spared myocardium of infarcted rats improves ischemic tolerance." *J Cardiovasc Pharmacol* **40**(3): 370-80.

**Van Zwieten, P. A. (1980).** "Pharmacology of centrally acting hypotensive drugs." *Br J Clin Pharmacol* **10 Suppl 1**: 13S-20S.

**Villarreal, F. J. et W. H. Dillmann (1992).** "Cardiac hypertrophy-induced changes in mRNA levels for TGF-beta 1, fibronectin, and collagen." *Am J Physiol* **262**(6 Pt 2): H1861-6.

**Wang, H., S. Regunathan, C. Youngson, S. Bramwell et D. J. Reis (1995).** "An antibody to agmatine localizes the amine in bovine adrenal chromaffin cells." *Neurosci Lett* **183**(1-2): 17-21.

**Wang, K., X. M. Yin, D. T. Chao, C. L. Milliman et S. J. Korsmeyer (1996).** "BID: a novel BH3 domain-only death agonist." *Genes Dev* **10**(22): 2859-69.

**Weber, K. T. (1989).** "Cardiac interstitium in health and disease: the fibrillar collagen network." *J Am Coll Cardiol* **13**(7): 1637-52.

**Weber, K. T. et C. G. Brilla (1991).** "Pathological hypertrophy and cardiac interstitium. Fibrosis and renin-angiotensin-aldosterone system." *Circulation* **83**(6): 1849-65.

**Weber, K. T., J. E. Jalil, J. S. Janicki et R. Pick (1989).** "Myocardial collagen remodeling in pressure overload hypertrophy. A case for interstitial heart disease." *Am J Hypertens* **2**(12 Pt 1): 931-40.

**Weber, K. T., J. S. Janicki, R. Pick, C. Abrahams, S. G. Shroff, R. I. Bashey et R. M. Chen (1987).** "Collagen in the hypertrophied, pressure-overloaded myocardium." *Circulation* **75**(1 Pt 2): I40-7.

**Weber, K. T., R. Pick, J. E. Jalil, J. S. Janicki et E. P. Carroll (1989).** "Patterns of myocardial fibrosis." *J Mol Cell Cardiol* **21 Suppl 5**: 121-31.

**Wermuth, C. G. et A. Exinger (1972).** "[Morpholinoethylamino-3 methyl-4 phenyl-6 pyridazine dihydrochloride (Agar 1240)]." *Agressologie* **13**(5): 285-9.

**Yablonsky, F. et J. P. Dause (1991).** "Non-adrenergic binding sites for the "alpha 2-antagonist" [3H]idazoxan in the rabbit urethral smooth muscle. Pharmacological and biochemical characterization." *Biochem Pharmacol* **41**(5): 701-7.

**Yang, E., J. Zha, J. Jockel, L. H. Boise, C. B. Thompson et S. J. Korsmeyer (1995).** "Bad, a heterodimeric partner for Bcl-XL and Bcl-2, displaces Bax and promotes cell death." *Cell* **80**(2): 285-91.

**Zak, R.** (1973). "Cell proliferation during cardiac growth." *Am J Cardiol* **31**(2): 211-9.

**Zandberg, P., W. De Jong et D. De Wied** (1979). "Effect of catecholamine-receptor stimulating agents on blood pressure after local application in the nucleus tractus solitarii of the medulla oblongata." *Eur J Pharmacol* **55**(1): 43-56.

**Zhang, J., M. M. El-Mas et A. A. Abdel-Rahman** (2001). "Imidazoline I(1) receptor-induced activation of phosphatidylcholine-specific phospholipase C elicits mitogen-activated protein kinase phosphorylation in PC12 cells." *Eur J Pharmacol* **415**(2-3): 117-25.

**Zierhut, W. et H. G. Zimmer** (1989). "Significance of myocardial alpha- and beta-adrenoceptors in catecholamine-induced cardiac hypertrophy." *Circ Res* **65**(5): 1417-25.

**Zonnenchein, R., S. Diamant et D. Atlas** (1990). "Imidazoline receptors in rat liver cells: a novel receptor or a subtype of alpha 2-adrenoceptors?" *Eur J Pharmacol* **190**(1-2): 203-15.