

Université de Montréal

ÉTUDE DE L'EFFICACITÉ PHARMACOLOGIQUE DE FORMULATIONS  
D'OLIGONUCLÉOTIDES ANTISENS POUR CIBLER LA P70S6 KINASE  
SUITE À L'ADMINISTRATION D'ENDOTHÉLINE *in vivo*

par

Marie-Pierre Rousseau

Faculté de pharmacie

Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures

en vue de l'obtention du grade de

Maître ès Sciences (M.Sc)

en sciences pharmaceutiques

option pharmacologie

Mars 2006

© Marie-Pierre Rousseau, 2006



QV

705

U58

2006

V.024



Direction des bibliothèques

## AVIS

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

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  
Faculté des études supérieures

Ce mémoire intitulé :

ÉTUDE DE L'EFFICACITÉ PHARMACOLOGIQUE DE FORMULATIONS  
D'OLIGONUCLÉOTIDES ANTISENS POUR CIBLER LA P70S6 KINASE  
SUITE À L'ADMINISTRATION D'ENDOTHÉLINE *in vivo*

présenté par :

Marie-Pierre Rousseau

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Président du jury : Marc Servant

Directeur de recherche : Pierre Moreau

Co-directeur de recherche : Jean-Christophe Leroux

Examineur externe : Denis DeBlois

## SOMMAIRE

La croissance cellulaire nécessite une accélération de la synthèse protéique, habituellement rendue possible par une augmentation du contenu cellulaire en ribosomes. La p70S6 kinase (p70<sup>S6K</sup>) est une enzyme ubiquitaire qui régularise la traduction d'ARN messenger (ARNm) codant pour des protéines ribosomales. L'inhibition de cette enzyme pourrait réduire un excès de synthèse protéique en période de croissance, sans modifier l'expression de protéines contribuant aux fonctions cellulaires normales. Il existe de bonnes évidences que la p70<sup>S6K</sup> est impliquée dans l'hypertrophie cardiovasculaire et son inactivation par un antisens pourrait permettre de traiter ce problème de façon spécifique. En effet, il n'existe pas de molécule qui inhibe directement son activité. La thérapie antisens repose sur l'utilisation d'oligonucléotides complémentaires aux ARN. Ainsi, un antisens dirigé contre un ARNm diminue la traduction de la protéine cible.

Nous avons donc utilisé la technologie antisens pour réduire la production de la p70<sup>S6K</sup> dans un modèle d'hypertrophie cardiovasculaire. L'angiotensine II (ANG II) joue un rôle central dans la pathophysiologie de l'hypertension, mais également dans les mécanismes d'hypertrophie. Les effets de l'ANG II sur la structure cardiovasculaire se produisent par l'entremise de l'endothéline (ET). Nous avons ainsi étudié le rôle de la p70<sup>S6K</sup> dans un modèle d'hypertrophie vasculaire engendrée par l'administration d'ET *in vivo*. Afin de caractériser et de déterminer l'efficacité maximale de l'oligonucléotide (ODN) dirigé contre l'ARNm de la protéine ciblée, ce dernier était administré chez le rat

témoin à doses croissantes et les animaux étaient sacrifiés à différents temps. L'antisens nu a été comparé à différentes formulations liposomales d'antisens quant à son efficacité à inhiber la p70<sup>S6K</sup> chez les rats témoins. En dernier lieu, plusieurs formulations étaient comparées quant à leur efficacité à inhiber la synthèse protéique cardiovasculaire normalement induite par l'ET *in vivo*. Une diminution de p70<sup>S6K</sup> et de protéines ribosomales comme la S6 devrait conduire à une inhibition de l'effet trophique de l'ET.

L'administration d'ET a mené à une augmentation de l'expression et de la phosphorylation de la p70<sup>S6K</sup> chez le rat. Cependant, l'oligodéoxynucléotide (ODN) antisens utilisé dans nos expériences n'a pas permis de réduire l'expression de la protéine d'intérêt ni d'empêcher les effets de l'ET sur la synthèse protéique. Toutefois, l'étude de l'efficacité pharmacologique d'antisens en utilisant une cible spécifique, la p70<sup>S6K</sup>, a permis d'évaluer de nouveaux vecteurs liposomaux et micellaires.

**Mots clés :** remodelage, hypertrophie, endothéline, p70S6 kinase, antisens, liposome, vecteurs micellaires.

## SUMMARY

The cell multiplication requires an acceleration of the protein synthesis, usually made possible by an increase in the cellular ribosome contents. The p70<sup>S6K</sup> kinase (p70<sup>S6K</sup>) is an ubiquitary enzyme which regularizes the translation of messenger RNA (mRNA) coding for ribosomal proteins. The inhibition of this enzyme could reduce an excess of protein synthesis in period of growth, without modifying the protein expression contributing to the normal cellular functions. There are good evidences that the p70<sup>S6K</sup> is implicated in cardiovascular hypertrophy and its inactivation by an antisense could make it possible to deal with this problem in a specific way. Indeed, there is no molecule which inhibits its activity directly. The antisense therapy rests on the use of oligonucleotides complementary to the RNA. Thus, an antisense directed against mRNA decreases the translation of target protein.

We used antisense technology to reduce the production of the p70<sup>S6K</sup> in a cardiovascular model of hypertrophy. Angiotensin II (ANG II) plays a central part in the pathophysiology of hypertension, but also in the mechanisms of hypertrophy. The effects of the ANG II on the cardiovascular structure occur via the endothelin (ET) pathway. Thus we studied the role of the p70<sup>S6K</sup> in a vascular model of hypertrophy generated by the administration of ET *in vivo*. In order to characterize and to determine the maximum effectiveness of oligonucleotide (ODN) directed against mRNA of targeted protein, a control group received two different dosages of ODN and the animals were sacrificed to

various times. The naked antisense was compared with various liposomal formulations of antisense as for its effectiveness to inhibit the p70<sup>S6K</sup>. Lastly, several formulations were compared as for their effectiveness to inhibit the cardiovascular protein synthesis normally induced by ET *in vivo*. A reduction in p70<sup>S6K</sup> and proteins ribosomal as S6 should lead to an inhibition of the trophic effect of ET.

The administration of ET carried out to an increase in the expression and phosphorylation of the p70<sup>S6K</sup> *in vivo*. However, the antisense used in our experiments did not reduce the expression of p70<sup>S6K</sup> nor to prevent the effects of ET on the protein synthesis. However, the study of the pharmacological effectiveness of antisense by using a specific target, the p70<sup>S6K</sup>, made it possible to evaluate new liposomal and micellar vectors.

**Keywords :** remodeling, hypertrophy, endothelin, p70S6 kinase, antisense, liposome, micellar vectors.

## TABLE DES MATIÈRES

<b>SOMMAIRE</b> .....	iii
<b>SUMMARY</b> .....	v
<b>TABLE DES MATIÈRES</b> .....	vii
<b>LISTE DES TABLEAUX</b> .....	x
<b>LISTE DES FIGURES</b> .....	xi
<b>LISTE DES ABBRÉVIATIONS</b> .....	xiii
<b>REMERCIEMENTS</b> .....	xvii
<b>I. INTRODUCTION</b> .....	1
1. <u>Hypertension</u> .....	1
1.1. Prévalence .....	1
1.2. Définition .....	2
1.3. Types d'hypertension.....	4
1.4. Conséquences de l'hypertension artérielle.....	5
1.5. Maintien de l'homéostasie .....	6
1.6. Composition d'un vaisseau sanguin .....	8
2. <u>Hypertrophie</u> .....	11
2.1. Définitions.....	11
2.2. Signalisation cellulaire.....	13
2.2.1. Le système rénine-angiotensine-aldostérone .....	13
2.2.2. Voies de signalisation de l'ANG II.....	14
2.2.3. Rôles de l'ET .....	20
2.2.4. Signalisation de l'ET.....	21
2.3. Acteurs clés dans le remodelage hypertrophique.....	21
2.4. Intérêt pour la p70 <sup>S6K</sup> .....	24
3. <u>Oligonucléotide de type antisens</u> .....	26
3.1. Mécanisme d'action .....	26
3.2. Avantages et inconvénients.....	28
3.3. Formulations utilisées dans la littérature .....	31
3.3.1. Les liposomes.....	32
3.3.2. Les polymères .....	34
<b>II. OBJECTIFS</b> .....	38
<b>III. MÉTHODOLOGIE GÉNÉRALE</b> .....	40
1. <u>Canulation et traitement des rats</u> .....	40
1.1. Canulation .....	40
1.2. Prélèvements sanguins et tissulaires .....	40
1.3. Traitements à l'ET .....	41
2. <u>Immunobuvardage de type Western</u> .....	41
2.1. Extraction et dosage des protéines.....	41
2.2. Immunobuvardage .....	42
3. <u>Conception de l'antisens et du contrôle négatif</u> .....	43
3.1. Antisens.....	43

3.2.	Contrôle négatif .....	44
6.	<u>Formulation liposomale et dosage des phosphates</u> .....	46
6.1.	Liposomes .....	46
6.2.	Dosage des phosphates .....	46
7.	<u>Synthèse protéique (incorporation de la leucine tritiée)</u> .....	47
8.	<u>Courbe de quench et traitement du sang et des tissus pour mesurer la radioactivité au <sup>35</sup>S</u> .....	48
8.1.	Synthèse des polymères .....	48
8.2.	Caractérisation des polymères .....	49
8.2.1.	Analyses de chromatographie d'exclusion stérique.....	49
8.2.2.	Analyses de résonance magnétique nucléaire.....	49
8.5.	Pharmacocinétique des polyplexes .....	50
8.5.1.	Courbe de quench .....	50
8.5.2.	Échantillons sanguins.....	51
8.6.	Biodistribution des polyplexes.....	52
IV.	<u>PRÉSENTATION ET ANALYSE DES RÉSULTATS</u> .....	53
1.	<u>Expression de la p70<sup>S6K</sup> chez le rat traité à l'ET</u> .....	53
1.1.	Expression de la p70 <sup>S6K</sup> totale et phosphorylée au niveau mésentérique .....	53
2.	<u>Caractérisation de l'antisens</u> .....	54
2.1.	Doses testées : 10 mg/kg vs 1 mg/kg .....	54
2.2.	Effets de l'antisens sur ERK1/2 .....	56
3.	<u>Optimisation de l'efficacité de l'ODN : Conception des liposomes DOPE/DOTAP</u> .....	57
3.1.	Dose de l'antisens à utiliser .....	57
3.2.	Dosage de phosphate.....	57
3.3.	Tailles obtenues .....	58
4.	<u>Cinétique de l'expression de la p70<sup>S6K</sup> suite à une administration bolus de l'antisens nu ou de l'antisens incorporé dans une formulation liposomale</u> .....	58
4.1.	Au niveau plasmatique.....	58
4.3.	Au niveau des petites artères du mésentère .....	60
4.4.	Témoin négatif (« Scrambled ») .....	61
5.	<u>Efficacité de l'antisens chez le rat traité à l'ET</u> .....	62
5.1.	Synthèse protéique au niveau mésentérique .....	62
6.	<u>Cinétique de l'antisens marqué complexé ou non avec un polymère</u> .....	64
6.1.	Généralités .....	64
6.2.	Caractérisation des polymères et des complexes micellaires. ....	65
6.3.	Courbe de quench .....	66
6.4.	Optimisation des études pharmacocinétiques .....	68
6.4.1.	CPM en pourcentage.....	69
6.4.2.	DPM.....	69
6.4.3.	Purification de l'ODN radiomarké.....	71
6.5.	Biodistribution des complexes.....	72
6.6.	Effet du ratio de charge sur l'incorporation de l'ODN .....	74
V.	<u>DISCUSSION</u> .....	76
1.	<u>Expression de la p70<sup>S6K</sup> chez le rat traité à l'ET</u> .....	77
2.	<u>Caractérisation de l'antisens</u> .....	77

4.	<u>Cinétique de l'expression de la p70<sup>S6K</sup> suite à une administration bolus de l'antisens nu ou de l'antisens incorporé dans une formulation liposomale</u> .....	80
5.	<u>Efficacité de l'antisens chez le rat traité à l'ET</u> .....	81
6.	<u>Cinétique de l'antisens marqué complexé ou non avec un polymère</u> .....	85
VI.	CONCLUSION.....	89
VII.	RÉFÉRENCES .....	90

## LISTE DES TABLEAUX

Tableau I-1 Propriétés d'un ODN antisens idéal .....	29
Tableau III-1 Abréviations utilisées pour les polymères .....	49
Tableau IV-1 Diamètre moyen des liposomes obtenu après extrusion sur un filtre de 100nm, puis après une seconde extrusion sur un filtre de 50nm. ....	58
Tableau IV-2 Caractéristiques des polymères utilisés. ....	65
Tableau IV-3 Caractéristiques des complexes micellaires (N/P 1 :1) .....	66
Tableau IV-4 Résultats de radioactivité et de tSIE obtenus. ....	67

## LISTE DES FIGURES

Figure I.1 “Applying the 2005 Canadian Hypertension Education Program recommendations: 1. Diagnosis of hypertension” .....	3
Figure I.2 Composition d’un vaisseau sanguin.....	9
Figure I.3 Différence entre le remodelage hypertrophique et eutrophique.....	11
Figure I.4 Le système rénine-angiotensine-aldostérone. ....	14
Figure I.5 Voies de signalisation de l’ANGII et de l’ET.....	19
Figure I.6 Mécanisme d’action des ODN antisens .....	27
Figure I.7 Structure chimique des liens de type phosphodiester (A), phosphorothioate (B) et méthylphosphonate (C). ....	30
Figure IV.1 Expression de la p70 <sup>S6K</sup> totale au niveau des artères mésentériques chez le rat traité à l’ET pendant 24h. ....	53
Figure IV.2 Expression de la p70 <sup>S6K</sup> phosphorylée au niveau des artères mésentériques chez le rat traité à l’ET pendant 24 heures.....	54
Figure IV.3 Pharmacocinétique de l’expression de la p70 <sup>S6K</sup> dans le plasma riche en leucocytes suite à l’administration de 1 vs 10mg/kg d’ODN nu chez le rat.....	55
Figure IV.4 Expression de ERK1/2 totale 48h après l’administration de 1mg/kg d’ODN nu vs témoin (n=4). ....	56
Figure IV.5 Cinétique de l’expression de la p70 <sup>S6K</sup> au niveau de l’aorte suite à l’administration de l’ODN nu, de l’ODN complexé à la formulation DOPE/DOTAP et de l’ODN témoin (SC) complexé à la formulation DOPE/DOTAP.....	59
Figure IV.6 Cinétique de l’expression de la p70 <sup>S6K</sup> au niveau mésentérique suite à l’administration de l’ODN nu, de l’ODN complexé à la formulation DOPE/DOTAP et de l’ODN témoin (SC) complexé à la formulation DOPE/DOTAP.....	60
Figure IV.7 Immunobuvardage de l’expression de la p70 <sup>S6K</sup> au niveau mésentérique 48h après l’administration l’ODN nu (AS), de l’ODN antisens et de l’ODN témoin (SC) incorporé dans une formulation liposomale DOPE/DOTAP (respectivement LA et LS). ....	61
Figure IV.8 Synthèse protéique au niveau mésentérique après l’administration de l’ODN nu chez les rats traités à l’ET pendant 72 heures.....	63
Figure IV.9 Synthèse protéique au niveau mésentérique après l’administration de l’ODN nu chez les rats traités à l’ET pendant 24 heures.....	64
Figure IV.10 Courbe de quench : pourcentage d’efficacité de la mesure de radioactivité suite à l’administration d’une solution radioactive d’ATP- $\gamma$ - <sup>35</sup> S à ~15 000 cpm/mL de plus en plus opaque.....	68
Figure IV.11 Cinétique plasmatique de l’ODN- <sup>35</sup> S nu et complexé à deux polymères différents.....	70
Figure IV.12 Cinétique plasmatique de l’ATP- <sup>35</sup> S et de l’ODN- <sup>35</sup> S complexé au polymère EG <sub>45</sub> T <sub>15</sub> . ....	71

Figure IV.13 Cinétique plasmatique de l'ODN- <sup>35</sup> S nu et complexé au polymère EG <sub>113</sub> A <sub>15</sub> D <sub>15</sub> .....	72
Figure IV.14 Biodistribution de l'ODN- <sup>35</sup> S nu et complexé au polymère EG <sub>113</sub> A <sub>15</sub> D <sub>15</sub> 24 heures après leur administration.....	73
Figure IV.15 Complexation de l'ODN fluorescent avec le polymère EG <sub>113</sub> A <sub>30</sub> dans un gel de polyacrylamide 20% (avec plasma 50%).....	74
Figure IV.16 Cinétique plasmatique de l'ODN- <sup>35</sup> S nu et complexé au polymère EG <sub>113</sub> A <sub>30</sub> dans un rapport N/P de 4:1.....	75

## LISTE DES ABBRÉVIATIONS

Ac	anticorps
ADN	acide désoxyribonucléique
AEMA	hydrochlorure d' aminoéthyl méthacrylate
Akt	produit du proto-oncogène c-akt/protéine kinase B
ANG I	angiotensine I
ANG II	angiotensine II
ANP	atrial natriuretic peptide
ARN	acide ribonucléique
ARNm	ARN messenger
AS	antisens
AT <sub>1</sub>	sous-type AT <sub>1</sub> des récepteurs de l'ANG II
AT <sub>2</sub>	sous-type AT <sub>2</sub> des récepteurs de l'ANG II
BK	bradykinine
Ca <sup>2+</sup>	calcium
CML	cellules musculaires lisses
CMLV	cellules musculaires lisses vasculaires
CSA	« cross-section area » ou aire de section
DAG	1,2-diacylglycérol
DC	débit cardiaque
DMAEMA	2-(N,N-diméthylamino)éthyl méthacrylate
DOPE	1,2-dioleoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphatidylethanolamine

DOSPA	2,3-dioleoyloxy-N-[2(sperminecarboxamido)ethyl]-N,N-dimethyl-1-propanaminium trifluoroacetate
DOTMA	chlorure de N-[1-(2,3-dioleoyloxy)propyl]-N,N,N-trimethylammonium
DOTAP	1,2-bis-(oleoyloxy)-3-(trimethylammonium)propane
E	épinéphrine ou adrénaline
ECA	enzyme de conversion de l'angiotensine I et de la kininase II
EGF	« epithelial growth factor »
EggPC	phosphatidylcholine d'œuf
eIF4E	facteur d'initiation de la traduction 4E des eucaryotes
4EBP	« eIF4E binding protein »
ERK1/2	« extracellular signal-related kinase 1 and 2 »
ET	endothéline
ET-1	endothéline 1
ET-A	récepteur A de l'endothéline
ET-B	récepteur B de l'endothéline
FAK	« Focal Adhesion Kinase »
FKBP	« FK 506 binding protein »
FRAP	« FKBP-rapamycin associated protein »
HTA	hypertension artérielle
IECA	inhibiteur de l'enzyme de conversion de l'angiotensine 1
IGF1R	récepteur de « insulin-like growth factor » 1
IP	indice de polymolécularité. Correspond au ratio $M_w/M_n$

JAK	« Janus Kinase »
M <sub>n</sub> CES	masse molaire en nombre déterminée par chromatographie d'exclusion stérique
M <sub>n</sub> RMN	masse molaire en nombre déterminée par résonance magnétique nucléaire du proton
M <sub>n</sub> théo	masse molaire en nombre calculée selon l'apport en monomère dans le milieu réactionnel
M <sub>w</sub> CES	masse molaire en poids déterminée par chromatographie d'exclusion stérique
MAPK	« mitogen-activated protein kinase »
mTOR	« mammalian target of rapamycin »
NE	norépinéphrine ou noradrénaline
ODN	oligodésoxyribonucléotide
p70 <sup>S6k</sup>	kinase cytosolique qui phosphoryle la protéine ribosomale S6
p85 <sup>S6K</sup>	kinase nucléaire qui phosphoryle la protéine ribosomale S6
PAEMA	poly[2-(acetoacetoxy)ethyl methacrylate]
PDAEMA	poly(2-(diméthylamino)ethyl methacrylate)
PBS	« Phosphate Buffered Saline »
PEG	poly(éthylène glycol)
PI3-K	phosphatidylinositol 3-kinase
PLA <sub>2</sub>	phospholipase A <sub>2</sub>
PLC	phospholipase C

PLD	phospholipase D
PMSF	fluorure de phénylméthylsulfonyle
RVP	résistance vasculaire périphérique
S6	protéine ribosomale; composante de la sous-unité ribosomale 40S
SC	« scrambled » (témoin)
SDS	dodécylsulfate de sodium
SRA	système rénine-angiotensine
TMAEMA	2-(N,N,N-triméthylamino)éthyl méthacrylate
tSIE	« Transformed Spectral Index of the External Standard »
TYK	« tyrosine kinase »
VS	volume systolique

## REMERCIEMENTS

Je tiens à remercier mon directeur Pierre Moreau, mon co-directeur Jean-Christophe Leroux, Louise Grondin ainsi que mes collègues de travail : Marie-Hélène Dufresne, Vincent Blouin, Huy Hao Dao, Pierre Beaucage, Rachida Essalihi, Céline Bouvet, Liz-Ann Gilbert et Daphné Girardot. Le partage de leurs connaissances, leur soutien et leur collaboration a permis la réalisation de ce mémoire.

Je remercie également les organismes subventionnaires : la FES pour la bourse de recrutement, ainsi que le FRSQ pour la bourse obtenue.

Enfin, je tiens à remercier mes parents, ma famille et mon conjoint pour leur support constant et leurs encouragements.

**« Les rêves sont toujours des départs »**

- Jacqueline Mabit

# I. INTRODUCTION

Ce mémoire présente d'abord un portrait de l'hypertension artérielle (HTA) en abordant la prévalence, la définition, les types d'hypertension, les conséquences physiologiques, l'homéostasie de la tension artérielle ainsi que la composition et le rôle des vaisseaux sanguins dans la régulation de la tension artérielle. La section suivante présente une définition de l'hypertrophie vasculaire et discute des médiateurs impliqués dans l'initiation du remodelage hypertrophique relié à l'hypertension, abordant principalement le rôle de l'ANG et de l'ET. Ainsi, du niveau vasculaire jusqu'au niveau cellulaire et moléculaire, l'étude de l'hypertrophie vasculaire dans l'hypertension conduit à l'étude de la p70<sup>S6K</sup>. Afin de comprendre l'intérêt spécifique de cette protéine dans le processus de remodelage vasculaire, l'utilisation de la technologie antisens est abordée dans une section expliquant le mécanisme d'action, ses avantages et ses inconvénients. Quelques véhicules utilisés pour optimiser cette approche sont ensuite présentés, soit les formulations liposomales et les formulations à base de polymères.

## 1. Hypertension

### 1.1. Prévalence

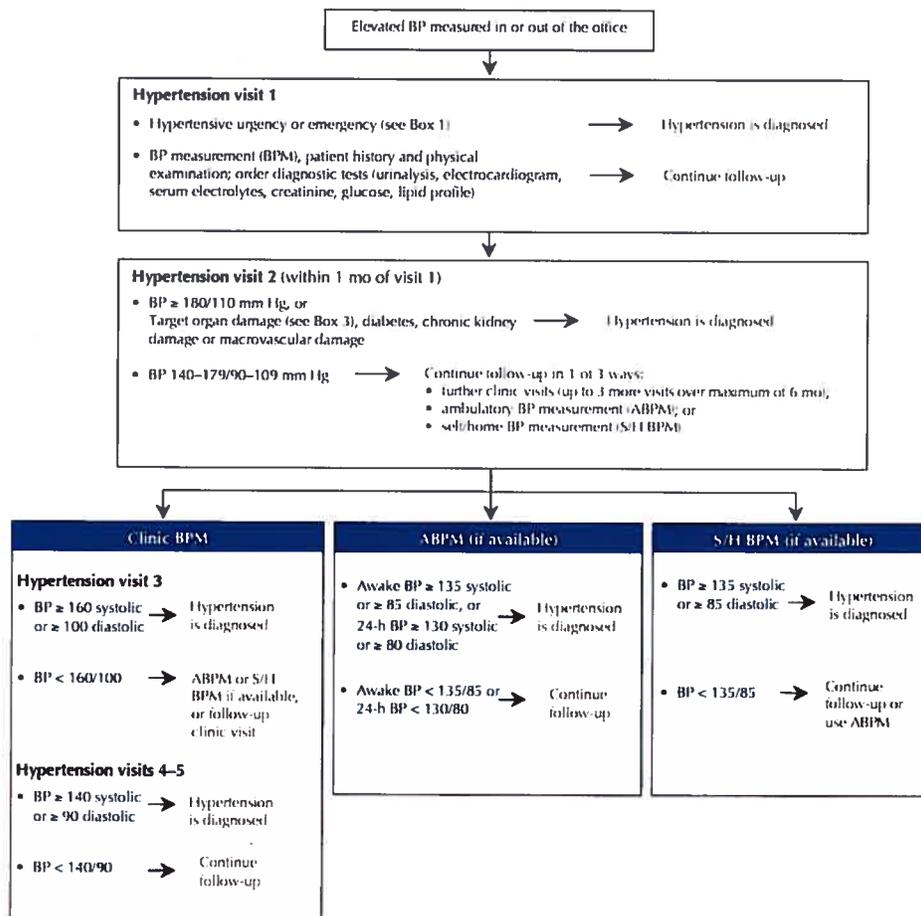
Les maladies de type cardiovasculaire figurent parmi les principales causes de morbidité et de mortalité au Québec et au Canada [1]. L'HTA est un facteur de risque important de maladie cardiovasculaire. L'HTA est une pathologie très commune, affectant environ 10% des adultes au Canada en 1996-1997 [1]. Une plus forte proportion de femmes que d'hommes parmi les 45 ans et plus présentaient un diagnostic d'HTA au

Canada en 2000-2001 [1]. L'HTA peut engendrer de sérieuses complications, dont l'accident cérébrovasculaire, l'insuffisance rénale et l'insuffisance cardiaque.

## 1.2. Définition

La pression artérielle s'exprime généralement par le rapport de la pression systolique sur la pression diastolique. La pression systolique représente la pression dans l'aorte suite à la contraction du ventricule gauche et de l'expulsion du sang, alors que la pression diastolique représente la pression minimale dans l'aorte lors du relâchement du ventricule gauche et de la fermeture des valves aortiques. La contraction du cœur pousse le sang dans l'aorte, créant ainsi une différence de pression et entraînant l'écoulement du sang à l'intérieur des vaisseaux. La circulation sanguine permet d'acheminer les nutriments et l'oxygène nécessaires aux tissus. Les vaisseaux offrent une résistance variable au passage sanguin selon leur localisation et leur fonction dans l'organisme. La pression normale au repos chez l'adulte se situe aux environs de 120 mmHg pour la pression systolique et de 80 mmHg pour la pression diastolique. Selon les recommandations 2005 du « Canadian Hypertension Education Program », les valeurs visées lors d'HTA consistent en une pression systolique inférieure à 140mmHg et une pression diastolique inférieure à 90mmHg [2]. Chez les patients non diabétiques et en absence d'insuffisance rénale, si le médecin traitant note une augmentation de la tension artérielle au repos lors de plusieurs consultations, un diagnostic d'HTA est établi selon les valeurs de tension artérielle observée et le nombre de visites (voir figure I.1) [2]. De plus, le diagnostic d'hypertension doit s'établir sur plusieurs mesures différentes de la tension artérielle sur une période de six mois. L'hypertension est habituellement une

maladie asymptomatique. Bien que son diagnostic soit relié aux valeurs observées de pression systolique et diastolique, il tient également compte de facteurs de risque. En effet, l'atteinte des organes cibles et la présence de facteurs de risque cardiovasculaires permettent de poser le diagnostic d'HTA plus rapidement [2]. Par conséquent, dans le contrôle de l'hypertension, on vise des valeurs plus basses de pression artérielle chez les diabétiques et encore plus basses chez les patients présentant une protéinurie de plus de 1 g/jour (voir figure I.1).



**Figure I.1 “Applying the 2005 Canadian Hypertension Education Program recommendations: 1. Diagnosis of hypertension” — Tiré du JAMC 30-Août-05; 173(5), Page(s) 480-483 avec la permission de l’éditeur. © 2005 AMC Média Inc [2].**

### 1.3. Types d'hypertension

Il existe plusieurs types d'hypertension : l'hypertension essentielle, l'hypertension systolique isolée et l'hypertension secondaire. L'hypertension essentielle se caractérise par une élévation de la pression systolique et de la pression diastolique au repos. L'étiologie de cette maladie demeure encore inconnue jusqu'à ce jour, mais semble multifactorielle. L'hypertension essentielle représente le type d'hypertension le plus commun. L'hérédité semble un facteur prédisposant, mais les mécanismes exacts sont encore méconnus. Le contrôle des facteurs environnementaux tels que l'obésité, une diète riche en sodium et le stress agissent partiellement sur le contrôle de la pression artérielle. L'hypothèse la plus crédible est que plusieurs facteurs contribuent à une élévation soutenue de la pression artérielle.

En présence d'hypertension systolique isolée, la pression diastolique demeure normale alors que la pression systolique est augmentée. Ce type d'hypertension survient plus fréquemment chez les personnes âgées. En effet, jusqu'à l'âge de 55 ans environ, l'hypertension se traduit principalement par une augmentation de la pression diastolique et systolique. Toutefois, après l'âge de 55 ans, la pression diastolique tend à diminuer et la prévalence d'hypertension systolique augmente. L'hypertension systolique est une conséquence tardive de l'artériosclérose et causée principalement par la rigidité de l'aorte, qui n'arrive plus à absorber la pression suite à sa perte d'élasticité. Ce processus se développe avec l'âge, est difficilement réversible et les traitements actuels ne contrôlent pas de façon optimale les valeurs de tension artérielle.

L'hypertension secondaire survient chez une plus faible proportion d'hypertendus et peut notamment être engendrée par un hyperaldostérionisme primaire, le syndrome de Cushing, l'hyperthyroïdie ou par une pathologie rénale. La cause de ce type d'hypertension est identifiable et le traitement vise à éliminer le facteur causal.

#### 1.4. Conséquences de l'hypertension artérielle

Bien que l'hypertension soit généralement asymptomatique, elle fatigue le cœur et endommage les artères. L'hypertension prolongée est la principale cause de l'insuffisance cardiaque, des maladies vasculaires, de l'insuffisance rénale et des accidents vasculaires cérébraux [3].

Une élévation de la pression artérielle résulte d'une augmentation du débit cardiaque (DC), d'une augmentation de la résistance vasculaire périphérique (RVP), ou des deux (équation 1) [4]. Puisque la résistance dépend du diamètre de la lumière artérielle à la puissance deux, ce dernier a donc un impact important sur la pression artérielle. Le débit cardiaque se calcule en multipliant la fréquence cardiaque (FC) par le volume d'éjection systolique (VS) (équation 2). Le débit cardiaque se définit par le volume de sang éjecté par chaque ventricule en une minute, la fréquence cardiaque par le nombre de battements par minute, et le volume d'éjection systolique par le volume de sang éjecté par battement. Le débit cardiaque dépend de la fonction ventriculaire gauche. Cette dernière dépend elle-même de plusieurs facteurs dont la pré-charge, l'état contractile du muscle ventriculaire et la post-charge [4]. La pré-charge représente le

retour veineux ou se définit comme le volume dans ventricule gauche à la fin de la diastole.

**Équation 1**  $DC = \Delta \text{ pression sanguine} / RVP$

**Équation 2**  $DC = FC \times VS$

Où DC : débit cardiaque,  
 $\Delta$  pression sanguine : variation de la pression sanguine  
RVP : résistance vasculaire périphérique,  
FC : fréquence cardiaque,  
VS : volume systolique.

### 1.5. Maintien de l'homéostasie

Le contrôle de la pression artérielle s'exerce par différents mécanismes nerveux, chimiques et rénaux. Une chute de la pression artérielle, par exemple, entraîne l'inhibition des barorécepteurs situés dans l'aorte et les sinus carotidiens et dans les autres artères [3]. Ces mécanorécepteurs détectent par exemple la baisse de la pression artérielle suite à un changement de position. L'inhibition des barorécepteurs suite à la baisse de la pression artérielle en deçà des valeurs normales stimulent le centre vasomoteur du cerveau qui exerce un contrôle sur la résistance périphérique en créant une vasoconstriction des artéioles [3]. De plus, le bulbe rachidien par l'intermédiaire des influx nerveux sympathiques influence le débit cardiaque à la hausse lors d'une chute de pression [3]. Il existe également des chimiorécepteurs au niveau de la crosse de l'aorte et des corpuscules carotidiens pour transmettre des influx nerveux lorsque la teneur en oxygène ou le pH sanguin varie brusquement [3]. En période de stress, la glande surrénale libère de l'épinéphrine (E) et de la norépinéphrine (NE) permettant de contrôler

le débit cardiaque et de provoquer une vasoconstriction [3]. Les oreillettes produisent également une hormone peptidique appelée ANP (« atrial natriuretic peptide ») libérée sous l'influence de l'étirement des oreillettes créé par l'augmentation de la tension artérielle [3]. L'ANP stimule l'excrétion d'eau et de sodium (voir plus bas), ce qui entraîne une diminution du volume sanguin et par conséquent de la tension artérielle [3]. De plus, l'ANP peut produire une vasodilatation [3]. Ainsi, ces hormones et neurotransmetteurs peuvent contrôler la résistance périphérique, le débit cardiaque et le volume systolique de façon rapide.

Par ailleurs, le rein permet de réguler le volume extracellulaire et par conséquent, il influence la pré-charge, le volume systolique et la pression artérielle de façon soutenue [3]. Le rein exerce ainsi un contrôle durable sur la pression artérielle, principalement lorsque les cellules spécialisées de l'appareil juxtaglomérulaire libèrent la rénine [3]. La rénine mène à la formation de l'angiotensine II (ANG II), qui stimule la libération d'aldostérone (discuté plus loin). L'ANG II est une hormone permettant de réguler la pression par l'activation de certains récepteurs provoquant une vasoconstriction [3]. Lorsque l'un de ces mécanismes est défectueux, la pression peut augmenter ou diminuer anormalement.

Il est normal d'observer une élévation de la pression artérielle dans certains cas. Effectivement, l'exercice augmente le besoin des muscles en oxygène, provoquant ainsi une augmentation de la fréquence cardiaque. Il s'en suit alors une augmentation du débit cardiaque et de la pression artérielle. Il peut s'agir d'un phénomène essentiel au corps

humain pour s'adapter à certaines conditions, mais peut également engendrer une cascade d'événements non souhaitables pour l'organisme. Plusieurs évidences soutiennent qu'une tension artérielle élevée de façon soutenue est associée à des altérations morphologiques au niveau des petites artères afin de résister au stress pariétal et ainsi protéger la microcirculation [5]. L'hypertension cause aussi une dysfonction de l'endothélium (voir plus loin) au niveau des vaisseaux sanguins ce qui accélère l'athérosclérose et contribue au durcissement des artères [3]. La réduction de la lumière des vaisseaux diminue l'irrigation des tissus en période de demande accrue et entraîne des complications au niveau cérébral, oculaire, cardiaque et rénal.

#### 1.6. Composition d'un vaisseau sanguin

Les vaisseaux se composent de trois différentes couches nommées l'*intima* (tunique interne), la *media* (tunique moyenne) et l'*adventice* (tunique externe) (voir figure I.2). L'*intima* est formée d'une couche de cellules épithéliales nommée endothélium. Celui-ci est séparé des cellules musculaires lisses et du tissu conjonctif de la média par une lame élastique interne [6]. Il est constitué de cellules endothéliales et représente le seul élément en contact avec le sang. Les cellules endothéliales produisent et secrètent plusieurs molécules qui influencent leur environnement, dont de puissants vasodilatateurs (le monoxyde d'azote (NO) et la prostacycline) ainsi qu'un puissant vasoconstricteur, l'ET. Ainsi, une dysfonction endothéliale, caractérisée par une réduction de la production de NO et une augmentation de la production d'ET, peut avoir un effet marqué sur la pression artérielle. La *media* est une couche composée de cellules musculaires lisses organisées de façon à assurer un contrôle du diamètre et du tonus

vasculaire, contribuant à la résistance périphérique et à la rigidité artérielle. L'adventice est une enveloppe conjonctive qui contient les nerfs sympathiques, une quantité considérable de collagène et de fibroblastes et parfois, dans les gros vaisseaux, l'*adventice* contient des vaisseaux plus petits (*vasa vasorum*) qui permettent son irrigation [6].

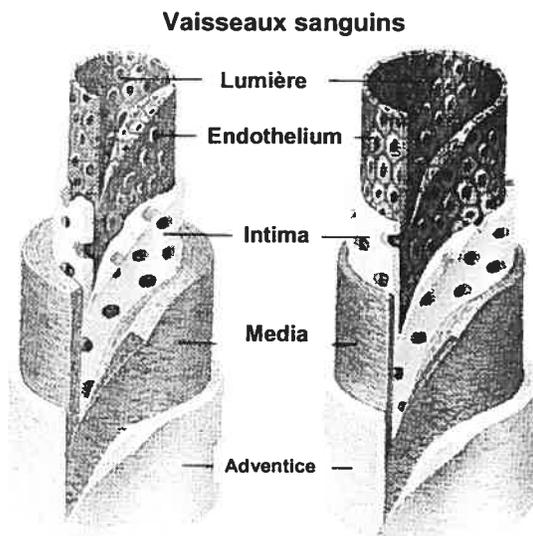


Figure I.2 Composition d'un vaisseau sanguin (adapté de [7]).

La principale caractéristique fonctionnelle des vaisseaux sanguins est le diamètre de la lumière du vaisseau [6]. Celle-ci détermine la résistance du vaisseau et dépend notamment de la contractilité des cellules musculaires lisses, de leur nombre et de leur arrangement et de l'épaisseur de la média [6]. De manière générale, les vaisseaux peuvent être divisés en deux catégories : les vaisseaux de conductance et les vaisseaux de résistance. Les vaisseaux artériels de conductance, aussi appelés gros vaisseaux, possèdent une certaine élasticité leur permettant d'absorber les chocs et de compenser

pour les fluctuations de pression. Ces vaisseaux possèdent une quantité d'élastine assez importante au niveau de la média. L'élastine permet au vaisseau de s'étirer sous la pression durant la systole et reprendre sa forme initiale durant la diastole. Ces vaisseaux permettent principalement d'amortir la force du sang après son éjection cardiaque afin de permettre une distribution plus égale tout au long du cycle cardiaque.

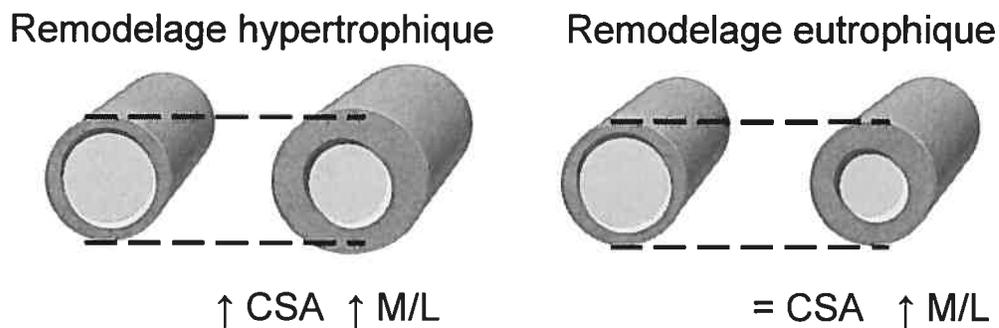
Les vaisseaux de résistance, aussi appelés petits vaisseaux, possèdent une couche musculaire lisse plus importante et une quantité de tissu élastique moins grande que les vaisseaux de conductance. Les artères de résistance se définissent comme des artères pré-capillaires ayant un diamètre inférieur à 500  $\mu\text{m}$ . Les vaisseaux de résistance contrôlent l'apport sanguin aux organes cibles et peuvent se contracter. Les petits vaisseaux déterminent la résistance périphérique, un paramètre constamment élevé dans l'hypertension [6].

Des données cliniques et précliniques suggèrent que l'augmentation de la résistance proviendrait des changements structuraux (nommé remodelage) dans les vaisseaux de résistance [8]. Les études ont démontré que l'hypertension essentielle est associée à une diminution de la lumière de ces vaisseaux et à une augmentation de leur ratio média/lumière [9]. Il a également été démontré que chez les patients atteints d'hypertension essentielle, l'augmentation du ratio média/lumière est principalement causée par un processus de remodelage eutrophique, donc sans augmentation de la quantité de matériel dans la paroi vasculaire [10-12].

## 2. Hypertrophie

### 2.1. Définitions

Le changement de structure des vaisseaux, ou remodelage, peut être de différents types : le remodelage hypertrophique ou le remodelage eutrophique (voir figure I.3). Le remodelage de type eutrophique que l'on peut observer lors de l'hypertension essentielle, se caractérise par une diminution de la lumière, une augmentation du ratio média/lumière (M/L) et une aire de section (CSA) inchangée. Dans ce type de remodelage, il se produit un réarrangement des cellules autour d'un plus petit diamètre [6]. Dans les modèles animaux d'hypertension génétique et chez les patients atteints d'hypertension essentielle, les évidences suggèrent que les changements structuraux des vaisseaux sont en général caractérisés par un remodelage type eutrophique [8, 13].



**Figure I.3** Différence entre le remodelage hypertrophique et eutrophique

Le remodelage hypertrophique se définit par un épaississement de la paroi vasculaire, une augmentation du ratio média/lumière, une élévation de l'aire de section ainsi qu'une augmentation de la synthèse protéique. Le phénomène d'épaississement de la paroi vasculaire survient plus tardivement alors que l'augmentation de la synthèse

protéique de la cellule se manifeste plus tôt dans le processus de l'hypertrophie engendrée par des agents hypertenseurs tels que l'ANG II [14], la norépinephrine [15] et l'ET [16]. L'hypertrophie se différencie de l'hyperplasie, bien qu'il s'agissent tous les deux de processus de croissance. L'hyperplasie est caractérisée par la multiplication du nombre de cellules alors que l'hypertrophie se traduit par une augmentation du contenu cellulaire en protéines. Dans les modèles expérimentaux d'hypertension accompagnée de niveaux élevés de rénine ou d'ANG II, le remodelage de type hypertrophique a été observé [8]. Chez l'Homme, le remodelage hypertrophique survient principalement lors de l'hypertension d'origine rénovasculaire et est également observé chez les patients diabétiques hypertendus et potentiellement dans l'hypertension systolique isolée [17]. La présence de remodelage hypertrophique dans les petites artères n'a pas été observée chez les patients atteints d'hypertension essentielle ni dans l'aldostéronisme primaire [9]. Or, dans les modèles expérimentaux d'hypertension dans lesquels on observe l'hypertrophie des petites artères, l'ET semble jouer un rôle clé : les antagonistes du récepteur à l'ET parviennent à prévenir le développement de ce type de remodelage vasculaire [15, 18].

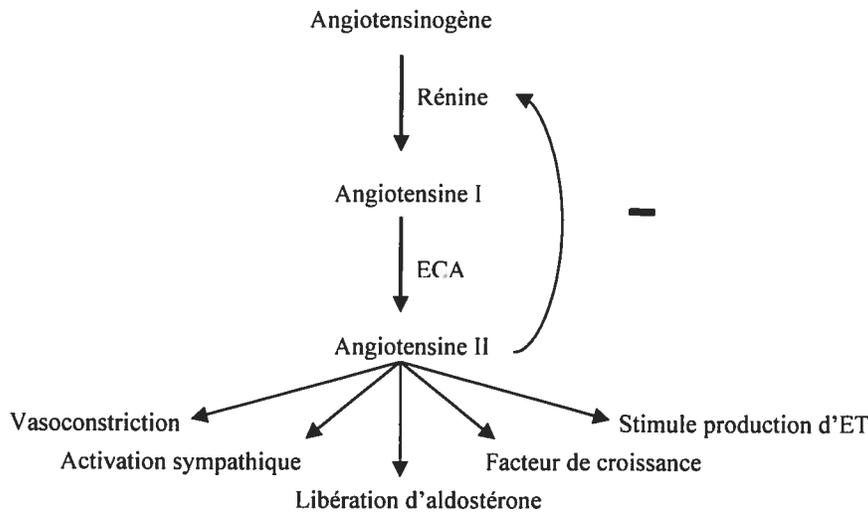
L'hypertrophie des cellules du muscle lisse vasculaire (CMLV) entraîne une diminution de la lumière du vaisseau, amplifie l'effet de la vasoconstriction et soutient la tension artérielle élevée. Le remodelage du vaisseau n'est donc pas sans conséquence. Effectivement, la réduction de la lumière du vaisseau diminue la perfusion des organes cibles et par conséquent, peut engendrer des dommages à ces derniers. Les organes hypoperfusés peuvent perdre certaines fonctions essentielles à l'organisme, principalement en période de demande accrue. Ainsi, l'HTA soutenue peut entraîner une

insuffisance cardiaque, une insuffisance rénale chronique et des accidents cérébro-vasculaires.

## 2.2. Signalisation cellulaire

### 2.2.1. Le système rénine-angiotensine-aldostérone

Nous nous sommes intéressés aux mécanismes impliqués dans l'initiation du remodelage hypertrophique relié à l'hypertension. L'ANG II joue un rôle central dans la pathophysiologie de l'hypertension, mais également dans l'hypertrophie cardiaque, l'infarctus du myocarde, l'athérosclérose et les maladies cardiovasculaires [19]. L'ANG II appartient au système rénine-angiotensine-aldostérone. Ce système régule notamment l'équilibre hydrique, sodique, potassique et, par conséquent, la pression artérielle. La rénine est synthétisée au niveau des cellules juxtaglomérulaires de l'artéiole afférente du rein et sa sécrétion dépend de différents facteurs dont la pression de perfusion, les catécholamines, les ions sodium, chlore et potassium. La rénine est responsable de la conversion de l'angiotensinogène en angiotensine I, qui se convertit en ANG II sous l'action de l'enzyme de conversion de l'angiotensine (ECA). L'ANG II agit par rétroaction négative sur la sécrétion de rénine (voir figure I.3). L'ANG II induit la libération d'aldostérone au niveau des glandes surrénales. L'aldostérone produit l'excrétion de potassium, la rétention de sodium et d'eau, augmentant ainsi le volume vasculaire et la pression artérielle.



**Figure I.4 Le système rénine-angiotensine-aldostérone.**

Le système rénine-angiotensine est également présent au niveau local dans le tissu cardiaque et vasculaire. L'ANG II vasculaire permet la régulation du débit régional, la modulation locale de l'activité sympathique, il pourrait être en partie responsable du développement de l'hypertension artérielle et il est impliqué dans la pathogénèse de l'hypertrophie vasculaire et de l'athérosclérose [20-22]. Sa régulation est différente du système circulant, mais comme il est plus difficile à évaluer, sa contribution n'est pas toujours claire. Normalement, l'inhibition de la formation de l'ANG II avec les IECA et l'antagonisme de ses récepteurs, bloque à la fois le système circulant et le système local.

### 2.2.2. Voies de signalisation de l'ANG II

L'ANG II régule la tension artérielle, le volume plasmatique, l'activité sympathique et la réponse à la soif [19]. Ce peptide vasoconstricteur possède un rôle physiopathologique dans les maladies cardiovasculaires incluant l'hypertrophie

cardiaque, l'infarctus du myocarde, l'hypertension et l'athérosclérose [19]. Dans les cellules mammifères, l'ANG II se lie à deux récepteurs membranaires spécifiques : les récepteurs AT1 et AT2 [19]. Les récepteurs AT1 et AT2 sont des récepteurs couplés aux protéines G, à sept passages transmembranaires. Ils possèdent chacun leurs antagonistes propres. Le récepteur AT1 est sélectivement inhibé par les biphenylimidazoles tel que le losartan alors que le récepteur AT2 est sélectivement inhibé par l'antagoniste PD123319 [23, 24].

Le récepteur AT1 de l'ANG II est exprimé dans les CMLV, dans les cardiomyocytes, les fibroblastes et les cellules glomérulées de la corticosurrénale [25]. De façon générale, la stimulation du récepteur AT1 de l'ANG II produit une vasoconstriction, la libération d'aldostérone et de vasopressine, une rétention hydrosodée, une activation sympathique, une prolifération cellulaire, une hypertrophie, une dysfonction endothéliale et la formation de matrice extracellulaire [26]. L'ANG II agit comme facteur de croissance pour divers types de cellules : les fibroblastes, les cellules corticosurrénales, les CMLV et les cardiomyocytes [27, 28]. L'ANG II induit *in vitro* une croissance hypertrophique des CMLV de rats normaux [29]. Cette croissance se traduit par une augmentation de la taille des cellules et de leur contenu en protéines, sans changer le nombre de cellules ni leur teneur en ADN. L'hypertrophie cellulaire résulte donc de l'augmentation de la synthèse protéique et non de la prolifération cellulaire [29-32]. Le récepteur de type AT1 est responsable des effets de l'ANG II sur l'augmentation du contenu protéique à l'intérieur des CMLV en culture [33].

Le récepteur AT2 de l'ANG II est exprimé notamment au niveau du cœur, des reins, du cerveau et des vaisseaux sanguins (dans l'adventice et la média) [34]. Les rôles fonctionnels de ce récepteur demeurent nébuleux, cependant il semble impliqué dans le développement embryonnaire, la différenciation cellulaire, la réparation des tissus, l'apoptose et la vasodilatation [26, 35, 36]. Le récepteur de type AT2 s'oppose aux effets du récepteur AT1 et il est considéré comme étant bénéfique aux fonctions rénales et cardiovasculaires. Sa stimulation active quatre voies de signalisation différentes. Elle entraîne l'activation de protéines phosphatases, elle permet la régulation du système NO-GMPc, elle stimule la PLA<sub>2</sub> et la libération d'acide arachidonique et entraîne la synthèse *de novo* de ceramide [37].

La stimulation du récepteur AT1 de l'ANG II produit l'activation de voies de signalisation par différentes phospholipases : phospholipase C (PLC), phospholipase D (PLD) et phospholipase A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>). L'activation de la PLC<sub>β</sub> par le récepteur AT1 couplé à la protéine Gq engendre rapidement l'hydrolyse du phosphatidylinositol-4,5-biphosphate pour générer l'inositol triphosphate (IP3) et le diacylglycérol (DAG) [38]. L'IP3 est impliqué dans la mobilisation du calcium ionisé (Ca<sup>2+</sup>) du réticulum endoplasmique, par conséquent dans la contraction des CMLV, alors que le DAG et le Ca<sup>2+</sup> interviennent dans la stimulation de la protéine kinase C (PKC) [39]. Le récepteur AT1 de l'ANG II est également couplé à la protéine Gi, inhibiteur de l'adénylyl cyclase [40].

Par ailleurs, la stimulation de la PLD hydrolyse la phosphatidylcholine, génère l'acide phosphatidique et subséquemment le DAG [41]. L'activation de cette voie par l'ANG II a été associée à l'hypertrophie cardiaque, la prolifération des CMLV et la contractilité vasculaire [42, 43]. Ces effets sont médiés par l'acide phosphatidique et d'autres métabolites de la PLD. Enfin, l'ANG II induit l'activation de PLA<sub>2</sub>, responsable de la libération d'acide arachidonique [44]. L'acide arachidonique est métabolisée par des cyclooxygénases, des lipooxygénases et des oxygénases du cytochrome P450 en plusieurs eicosanoïdes [19]. Ces eicosanoïdes influencent des mécanismes rénaux et vasculaires importants dans la régulation de la pression artérielle [19]. L'activation de la PLA<sub>2</sub> par l'ANG II dépend de la concentration en calcium intracellulaire, de la protéine kinase II Ca<sup>++</sup>-calmoduline-dépendante et de protéines kinases de la famille des MAPK (« mitogen-activated protein kinase ») [44, 45].

L'ANG II est également une hormone pro-inflammatoire qui permet la synthèse de chimiokines et de molécules d'adhésion. L'activité pro-inflammatoire de l'Ang II joue un rôle important dans le développement de la plaque athéroscléreuse et dans la rupture de la plaque [46]. L'Ang II stimule l'expression du facteur nucléaire kappaB (NFkappaB), un facteur de transcription qui module l'expression de gènes tels que l'interleukine-6 (IL-6) et le « monocyte chemoattractant protein-1 » (MCP-1) [46]. Le récepteur AT1 de l'ANG II est augmenté dans la plaque athéroscléreuse, particulièrement au niveau des monocytes et de la capsule fibreuse [46]. De plus, dans les CMLV, l'ANG II augmente la production d'anion superoxyde en activant la NAD(P)H oxidase [19]. Cet effet est soutenu et contribue probablement à la croissance cellulaire à long terme [19].

L'activation du récepteur AT1 de l'ANG II est associée à une augmentation de la phosphorylation de protéines tyrosine kinases et à l'activation des MAPK, mais aussi à une augmentation de leur activité kinase (activité phosphotransférase) [19]. L'ANG II stimule la phosphorylation de plusieurs tyrosine kinases dont la famille des kinases Src, JAK, TYK, FAK, Pyk2, p130Cas et la phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) [19]. Nous nous sommes principalement intéressés à cette dernière. La PI3K est une enzyme composée de deux sous-unités, la sous-unité p85 agissant comme adaptateur et la sous-unité p110 agissant comme catalyseur [19]. La voie de la PI3K influence la survie cellulaire, le métabolisme, la réorganisation cytosquelettique, l'échange membranaire ainsi que la régulation de la croissance des CMLV [19, 47]. La PI3K associée aux récepteurs de type tyrosine kinase est aussi activée par le récepteur AT1 [48, 49]. Le récepteur AT1 active la PI3K par la transactivation du récepteur EGF [50, 51]. L'inhibition de la PI3K par la « wortmannin » et le LY294002 bloque l'hypertrophie induite par l'ANG II dans les CMLV de rat en culture [48]. Les voies de signalisation de la PI3K sont multiples, cependant la protéine Ser/Thr kinase (Akt)/ protéine kinase B (PKB) est une cible importante dans les CMLV stimulés à l'ANG II [19, 49]. Akt/PKB contrôle la synthèse protéique en activant la protéine p70<sup>S6K</sup> [19] par l'intermédiaire de la protéine mTOR (« mammalian target of rapamycin ») (voir figure I.5). De plus, Akt/PKB module la réponse de l'ANG II au niveau des cellules de muscles lisses aortiques en stimulant les canaux calciques, protège les CMLV de l'apoptose et promeut la survie cellulaire en stimulant l'expression de Bcl-2 et de c-Myc et en inhibant les caspases [19, 49]. Bien que les rôles exacts de PI3K dans la signalisation de l'ANG II dans les CMLV

ne soient pas élucidés, il est possible que cette voie contrôle la balance entre la survie cellulaire et l'apoptose [19].

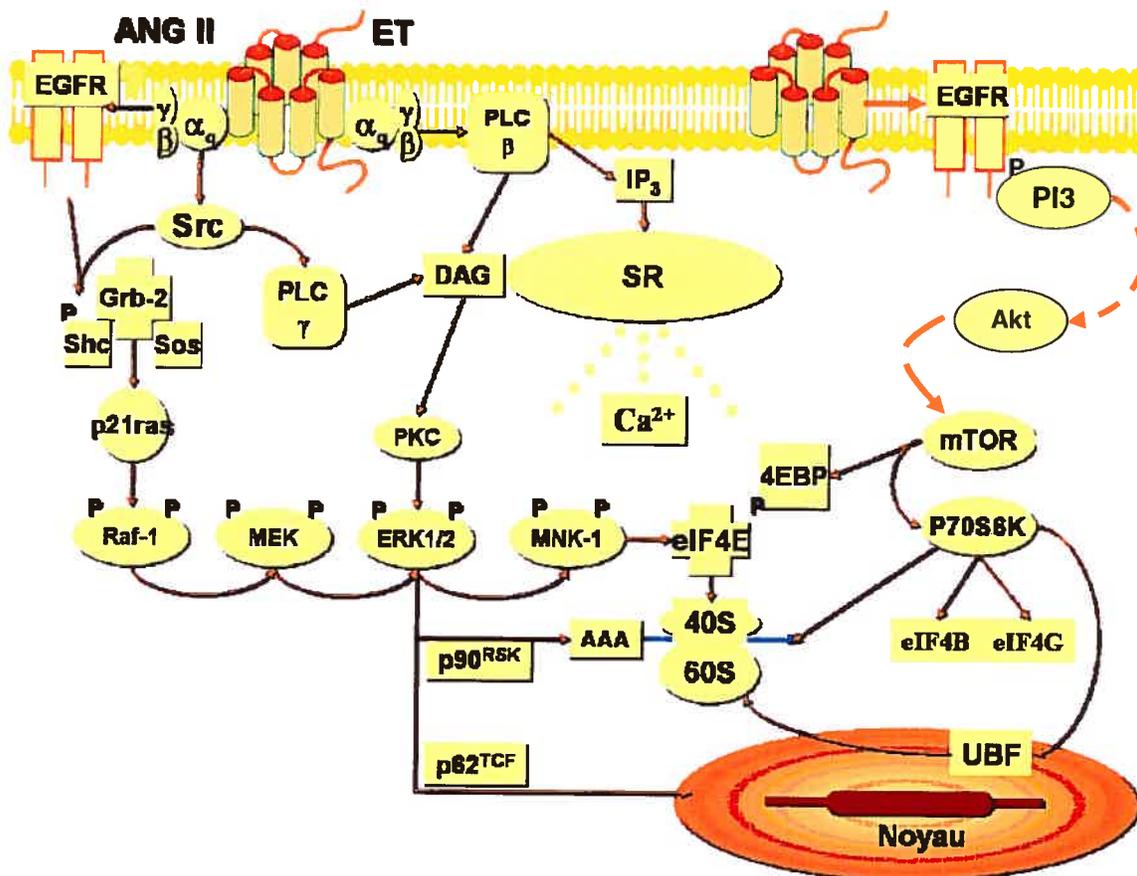


Figure I.5 Voies de signalisation de l'ANGII et de l'ET.

### 2.2.3. Rôles de l'ET

Les effets de l'ANG II sur la structure cardiovasculaire pourraient se faire par l'entremise de l'ET [52]. L'ET-1, un puissant peptide vasoconstricteur provenant de l'endothélium, stimule la croissance du muscle lisse vasculaire. L'ET est également exprimée au niveau des cellules vasculaires lisses et des cardiomyocytes [53, 54]. Les niveaux vasculaires d'ET-1 augmentent dans l'hypertension [52]. La synthèse d'ET s'effectue à partir de la prépro-ET, qui subit un clivage pour devenir la « big-ET ». Cette dernière est convertie par l'enzyme de conversion de l'ET en ET-1, un peptide de 21 acides aminés. La production d'ET-1 par les cellules endothéliales est engendrée par l'hypoxie, les radicaux libres et par certaines hormones, dont l'épinéphrine et l'ANG II. Il existe également deux autres isopeptides de l'ET, soit l'ET-2 et l'ET-3, contenant également 21 acides aminés [55]. Toutefois, l'isoforme ET-1 est le plus puissant vasoconstricteur parmi les formes d'ET et la principale isoforme exprimée au niveau vasculaire [55].

L'ET possède deux sous-types de récepteurs, l'ET-A et l'ET-B. Elle agit de façon paracrine sur les récepteurs ET-A et ET-B des cellules vasculaires lisses et de façon autocrine sur les récepteurs ET-B des cellules endothéliales. Le récepteur ET-A, principalement exprimé au niveau des CMLV, engendre une vasoconstriction via son couplage à une protéine  $G_q$ , la prolifération et l'hypertrophie cellulaire [56]. Le récepteur ET-B, exprimé principalement au niveau des cellules endothéliales, est couplé à une protéine  $G_i$ . Ce type de récepteur provoque une vasodilatation via la production de NO et de prostacycline et produit des effets antiprolifératifs [57, 58]. Iwasaki et al. (1999) ont

montré *in vitro* que le récepteur ET-A induit une croissance vasculaire par les voies des MAP kinases et de la p70<sup>S6K</sup>, engendrées en partie par la transactivation du récepteur EGF [59]. L'inhibition du récepteur ET-A prévient le remodelage vasculaire, la fibrose cardiovasculaire et la réponse inflammatoire dans l'hypertension induite par minéralocorticoïdes chez le rat [60-62]. Les effets de l'ET-1 suggèrent donc son implication dans le développement des dommages aux organes cibles associés à l'hypertension.

#### 2.2.4. Signalisation de l'ET

La liaison de l'ET aux récepteurs ET-A induit l'activation de la PLC de façon protéine G dépendante [55]. Une fois de plus, l'activation de la PLC $\beta$  engendre l'hydrolyse du phosphatidylinositol-4,5-biphosphate pour générer IP3 et DAG [55]. L'IP3 augmente la concentration intracellulaire en calcium alors que le DAG active la PKC tel que mentionné plus haut (voir figure I.5). De plus, des évidences suggèrent que l'ET-1 engendre la fermeture des canaux potassiques, favorisant la dépolarisation de la membrane et la contraction de la cellule [63, 64]. Enfin, l'ET-1 active également la PLA<sub>2</sub>, augmentant la production de prostacycline et de thromboxane A<sub>2</sub> [65].

#### 2.3. Acteurs clés dans le remodelage hypertrophique

Lors d'expériences préalables, l'effet de plusieurs agonistes connus pour augmenter la pression artérielle a été étudié sur la synthèse protéique et/ou la CSA, des paramètres du remodelage hypertrophique. À des doses n'augmentant pas la pression artérielle chez le rat, l'ANG II, la NE et l'ET administrés pendant 24 heures augmentent

la synthèse protéique au niveau de l'aorte et au niveau des artères mésentériques [14]. L'administration exogène d'ANG II pendant deux semaines augmente le ratio média/lumière et la CSA des artères mésentériques *in vivo* [66]. La NE administrée pendant quatre semaines augmentent la CSA des artères de résistance étudiées, un marqueur de l'hypertrophie, sans toutefois affecter la pression artérielle [67]. Certaines voies de signalisation connues pour activer la croissance cellulaire ont été étudiées. Des évidences suggèrent que la voie de la PI3K, serait impliquée dans le processus de croissance cellulaire. Des études chez le porc ont montré que l'ANG II active la PI3K et induit la prolifération des CMLV mises en culture [48]. La PI3K est une enzyme hétérodimérique composée de la sous-unité p85 et de la sous-unité catalytique p110 [19]. Cette enzyme catalyse la synthèse de phosphoinositides phosphorylés en position 3' [19]. La cascade de signalisation de PI3K débute par l'activation de la « phosphoinositide-dependent kinase-1 » (PDK-1), qui engendre l'activation de la sérine/thréonine kinase Akt, aussi connue sous le nom de protéine kinase B (PKB). PI3K phosphoryle le phosphatidylinositol-4,5-biphosphate en position 3' pour générer le phosphatidylinositol-3,4,5-triphosphate [68]. Ce dernier lie PDK-1 et Akt et permet ainsi la phosphorylation d'Akt par PDK-1 afin d'activer Akt [68]. Une fois phosphorylée, Akt active plusieurs protéines impliquées dans la survie cellulaire [69]. Akt phosphoryle notamment la protéine FRAP (« FKBP-rapamycin associated protein ») aussi appelée mTOR (« mammalian target of rapamycin »), responsable de l'activation de la protéine ribosomale p70<sup>S6K</sup> (figure I.5). L'activation de mTOR passe par l'inhibition du complexe TSC1-TSC2 [68]. Ce complexe hétérodimérique module négativement l'activité de mTOR [68]. Akt phosphoryle directement TSC2 et relâche ainsi l'inhibition de TSC2 sur

la voie de signalisation vers mTOR [68]. L'activation de mTOR nécessite l'intégration de plusieurs signaux, incluant l'activation de la PI3K, la présence d'acides aminés, un niveau adéquat d'ATP dans la cellule ainsi que la présence d'acide phosphatidique [70]. L'acide phosphatidique, produit par la phospholipase D, induit directement l'activité mitogénique de mTOR et lui permet d'activer S6K1 [71].

La protéine mTOR peut activer deux voies indépendantes, la 4EBP (aussi nommée PHAS-I) et la p70<sup>S6K</sup>. La phosphorylation de 4EBP par mTOR relâche l'inhibition de 4EBP sur le facteur de traduction eIF-4E en entraînant la dissociation du complexe 4EBP-eIF-4E [72]. Cette cascade d'événements engendrée par l'activation de mTOR augmente le taux global de traduction des ARNm en permettant le recrutement des machines de traduction aux ARNm [72]. Par ailleurs, l'activation de la p70<sup>S6K</sup> par mTOR stimule la production de plusieurs composants de la machinerie nécessaire à la synthèse protéique. En effet, la phosphorylation répétée de la protéine S6 de l'unité ribosomale 40S par la p70<sup>S6K</sup> induit la traduction d'un groupe important d'ARNm, contenant une région de plusieurs pyrimidines au site d'initiation de la transcription (ARNm de type 5'TOP) [72, 73]. Ces ARNm représentent environ 20% des ARNm de la cellule et codent pour des protéines essentielles à la synthèse protéique, i.e. des protéines ribosomales, des facteurs d'initiation de la traduction et des facteurs d'élongation [72]. Les études *in vivo* ont montré que l'inhibition de la protéine mTOR à l'aide de la rapamycine bloque l'augmentation de la synthèse protéique engendrée par l'administration d'ANG II pendant 24 heures, tant au niveau mésentérique qu'au niveau de l'aorte [74].

#### 2.4. Intérêt pour la p70<sup>S6K</sup>

Plusieurs données obtenues *in vitro* mènent à croire que la p70<sup>S6K</sup> jouerait un rôle important dans le remodelage de type hypertrophique [75]. La p70<sup>S6K</sup>, de la famille des protéines ribosomales S6 kinase 1 (S6K1), est une sérine/thréonine kinase responsable de la phosphorylation de la protéine ribosomale S6 [76]. Tel que mentionné plus haut, l'activation de la protéine S6 de l'unité ribosomale 40S par la p70<sup>S6K</sup> permet l'augmentation de la synthèse protéique dans la cellule, un processus clé dans le remodelage hypertrophique. En plus d'être impliquée dans la croissance cellulaire, la p70<sup>S6K</sup> serait impliquée dans l'apoptose. Un épissage alternatif en N-terminal mène à deux formes de S6K1, la p70S6K1 $\alpha$ II et la p85S6K1 $\alpha$ I, ainsi qu'à deux formes de S6K2, la p60S6K2 $\beta$ I et p54S6K2 $\beta$ II [76]. La p70<sup>S6K</sup> se retrouve au niveau cytosolique alors que la p85<sup>S6K</sup> est nucléaire [77]. L'isoforme p85<sup>S6K</sup> diffère de la p70<sup>S6K</sup> par une extension de 23 acides aminés en position N-terminale qui lui confère cette spécificité au noyau [72]. L'activité kinase de mTOR est requise, mais non suffisante, pour activer ses effecteurs, dont les S6K1 [76]. De récentes évidences montrent que mTOR forme un complexe avec deux autres protéines : Raptor (« regulatory associated protein of mTOR ») et mLst8/G $\beta$ L [68]. La présence de Raptor permet à mTOR de phosphoryler plus efficacement les S6K et 4EBP1, alors que la présence de G $\beta$ L est nécessaire pour la formation du complexe entre Raptor et mTOR [68].

Eguchi et al. (1999) ont démontré que la phosphorylation de la p70<sup>S6K</sup> induite par l'ANG II dépendait de la cascade de signalisation PI3K/Akt/mTOR dans les CMLV [78]. La transactivation du récepteur EGF (epithelial growth factor) par l'ANG II joue un rôle

dans la synthèse protéique induite par la p70<sup>S6K</sup> [79]. Giasson et al. (1995) ont montré que la p70<sup>S6K</sup> joue un rôle clé dans la voie de signalisation de l'ANG II pour induire l'hypertrophie des CMLV [80]. Il a été mis en évidence que l'addition d'ANG II engendrait l'activité enzymatique de la p70<sup>S6K</sup> via le sous-type de récepteur AT1 de l'ANG II. De plus, le pré-traitement de cellules du muscle lisse de l'aorte avec la rapamycine a causé une inhibition complète de l'activation de la p70<sup>S6K</sup> par l'ANG II ainsi que l'inhibition significative de la synthèse protéique [80]. Par ailleurs, des études *in vitro* ont montré que des stimulations mitogéniques, des étirements mécaniques et l'engagement de récepteur de type intégrine engendrent l'activation de la p70<sup>S6K</sup> [75]. La p70<sup>S6K</sup> est essentielle pour la progression de la phase G1 du cycle cellulaire en régulant la traduction d'ARNm de protéines impliquées dans cette phase. Le modèle de souris knockout pour la p70<sup>S6K</sup> se caractérise par une diminution significative du poids corporel des souris à leur naissance [81, 82]. Plusieurs évidences suggèrent que la synthèse protéique est contrôlée en partie par la phosphorylation multiple de la protéine ribosomale S6 [83]. Dans les tissus des souris knockout pour S6K1, l'expression de S6K2 était augmentée et la phosphorylation de S6 légèrement réduite, laissant croire la possibilité d'un mécanisme compensatoire. La protéine S6K2 phosphoryle également S6 et avant l'étude de la souris knockout pour S6K1 et S6K2, les études montraient que les fonctions de S6K1 et de S6K2 étaient redondantes [68]. L'activation de S6K2 nécessite les voies de signalisation de PI3K, mTOR et également la voie de la MAPK ERK [76]. Étant donné que nous nous sommes intéressé à la voie de PI3K uniquement, nous avons étudié spécifiquement S6K1.

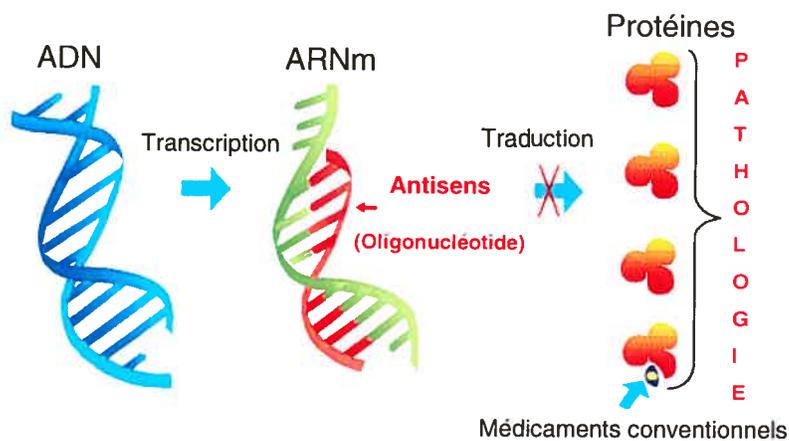
La p70<sup>S6K</sup> semble être activée par plusieurs agents vasoconstricteurs dont l'ANG II et l'ET. Iwasaki et al. (1999) ont montré *in vitro* que le récepteur ET-A induit une croissance vasculaire par les voies des MAP kinases et de la p70<sup>S6K</sup>, engendrées en partie via la transactivation du récepteur EGF [59]. Afin d'étudier la voie de signalisation menant au processus d'hypertrophie *in vivo*, nous avons décidé de bloquer les effets de la p70<sup>S6K</sup> et d'en observer les conséquences sur un paramètre de l'hypertrophie, soit l'augmentation de la synthèse protéique. Nous avons donc entrepris d'étudier le rôle de l'ET dans la stimulation de la p70<sup>S6K</sup> et de ses effets hypertrophiques *in vivo*.

### 3. Oligonucléotide de type antisens

#### 3.1. Mécanisme d'action

Pour bien comprendre les mécanismes intracellulaires de l'hypertrophie et étudier le rôle de la p70<sup>S6K</sup> dans ce phénomène, il est nécessaire d'inhiber la protéine d'intérêt et d'en observer les effets. À l'heure actuelle, il n'existe aucun inhibiteur commercial de la p70<sup>S6K</sup>. La thérapie génique offre d'immenses possibilités. La technologie antisens permet d'empêcher la production de protéine de façon spécifique et sécuritaire. Cette méthode consiste à employer une courte séquence d'ADN complémentaire à une séquence sélectionnée d'ARNm, parfois d'ADN, codant pour la protéine d'intérêt. La séquence d'oligodésoxyribonucléotide (ODN) peut ainsi lier l'ARNm aux sites des bases nucléosidiques complémentaires par des ponts hydrogène. La liaison formée empêche la traduction de l'ARNm en protéine par les ribosomes [84]. L'hybridation permet à l'enzyme RNaseH de se lier au complexe et de détruire l'ARN sans affecter l'ODN, lui permettant ainsi de se lier à un autre ARNm [84]. Les antisens possèdent ainsi une très

grande sélectivité. Les antisens ciblant l'angiotensinogène ou le récepteur AT1 de l'ANG II ont été testés dans plusieurs modèles d'hypertension. Ces études montrent une diminution de la pression artérielle durant plusieurs jours [85, 86]. Chez le rat SHR, l'injection d'une seule dose d'antisens dirigé contre l'ARNm du récepteur adrénergique  $\beta_1$  a permis de réduire significativement la pression artérielle de façon soutenue [87].



**Figure I.6 Mécanisme d'action des ODN antisens (adapté de [88])**

**Légende.**

DNA : acide désoxyribonucléique; mRNA : acide ribonucléique messenger; transcription : transcription de l'ADN en ARNm; translation : traduction de l'ARNm en protéines. L'ODN antisens se lie à l'ARNm et bloque ainsi la traduction. La synthèse de protéines étant inhibée, l'antisens permet d'intervenir plus tôt dans la pathophysiologie de la maladie que les médicaments traditionnels. En effet, les méthodes traditionnelles consistent principalement à inhiber la protéine d'intérêt déjà synthétisée.

### 3.2. Avantages et inconvénients

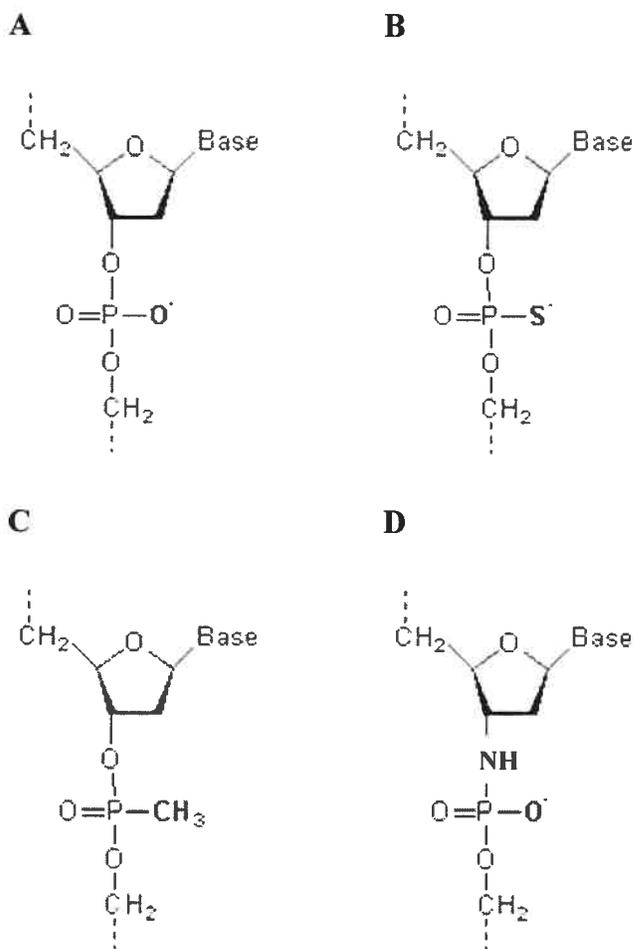
Plusieurs conditions sont requises pour l'inhibition de la traduction de l'ARNm par l'ODN antisens (voir tableau I.1). Par exemple, ce dernier ne doit pas se lier de façon non spécifique aux protéines. La présence de quatre résidus guanosine (G) consécutifs dans la séquence de l'ODN peut à lui seul engendrer des effets antiprolifératifs, peu importe le reste de la séquence [89]. La quantité de résidus guanosine et cytosine ne devrait pas être beaucoup plus élevée que la quantité de résidus adénosine et thymidine dans la séquence de l'ODN [89]. Les meilleurs résidus cibles de la séquence d'ARN sont la région du cap en 5', la région du codon d'initiation AUG et la région non traduite de l'ARNm en 3' [89]. En effet, ces régions sont des sites généralement impliqués dans le contrôle de la traduction des ARNm et sont nécessaires pour permettre au ribosome de reconnaître la région de l'ARNm codant pour la protéine d'intérêt. Par conséquent, l'inhibition de ces sites à l'aide d'un ODN antisens permet d'empêcher le bon fonctionnement de la traduction de l'ARNm d'intérêt. De plus, les antisens de type ADN servent de substrat à la RNase H. La digestion de la portion d'ARN dans le complexe ODN-ARNm par la RNase H laisse la portion d'ODN intacte et lui permet de se lier à un autre ARNm. L'activité de la RNase H peut aussi contribuer à la diminution des niveaux de l'ARNm ciblé dans la cellule, ce qui est évidemment souhaitable.

**Tableau I-1 Propriétés d'un ODN antisens idéal [89]**

1. La séquence d'ADN devrait être spécifique et unique
2. L'incorporation de l'ODN dans la cellule est efficace
3. L'effet de l'ODN dans la cellule est stable
4. Absence de liaisons non-spécifiques aux protéines
5. L'hybridation de l'ODN est spécifique à l'ARN ciblé
6. L'ODN n'est pas toxique
7. Absence de réponse immunitaire induite par l'ODN
8. Les niveaux de la protéine et/ou de l'ARN ciblés sont réduits
9. L'ODN est efficace en comparaison avec les contrôles négatifs sens et mélangé

Les ODN possèdent certains inconvénients qui peuvent être contournés. Ils sont vulnérables face aux ADNases, des enzymes susceptibles de cliver les liens phosphodiesters entre les bases en région 3'. Ce clivage détruit l'activité de l'antisens, mais il peut être évité si l'on substitue les liens phosphodiesters par des liens phosphorothioates : un atome de soufre remplace un atome d'oxygène (voir figure I.6) [84, 89]. Les liens phosphorothioates confèrent une meilleure résistance aux ADNases, mais ils réduisent l'affinité de l'ODN pour l'ARNm ciblé ainsi que la stabilité du complexe. Il est possible de concevoir un antisens en alternant les liens phosphodiesters et phosphorothioates. La modification de type phosphorothioate appartient à la première génération de modifications d'ODN antisens. Parmi les autres stratégies de modifications des ODN, on retrouve les méthylphosphonates (2<sup>e</sup> génération) et les phosphoroamidates

(3<sup>e</sup> génération) dans lesquels un groupement méthyl remplace un atome d'oxygène et un lien amide remplace un lien ester, respectivement [84]. Ces substitutions sont moins utilisées. Les méthylphosphonates ont l'avantage de ne pas entraîner d'effets non spécifiques et sont très résistants aux nucléases, cependant ils se lient moins fortement à l'ARN et ne servent pas de substrat pour la Rnase H [90].



**Figure I.7** Structure chimique des liens de type phosphodiester (A), phosphorothioate (B), méthylphosphonate (C) et phosphoramidate (D).

Par ailleurs, l'ODN doit contenir entre 15 et 20 bases afin d'assurer à la fois sa spécificité et sa pénétration cellulaire [89]. L'ODN trop court perd sa spécificité pour l'ARNm cible tandis que l'ODN trop long parvient plus difficilement à traverser la membrane cellulaire et subit plus facilement les attaques des ADNases. La présence de charges négatives sur les nucléotides empêche les antisens de traverser la membrane lipidique des cellules et d'atteindre leur cible. Pour contourner ce problème, divers véhicules ont été développés.

### 3.3. Formulations utilisées dans la littérature

Afin d'augmenter l'efficacité de l'internalisation de l'ODN dans les cellules, différentes méthodes de livraison et différents vecteurs ont retenu l'attention. Ces méthodes de livraison doivent permettre de contourner deux problèmes : la dégradation rapide de l'ODN et l'efficacité de la pénétration de l'ODN dans la cellule. Or, les vecteurs utilisés dans les expériences *in vivo* ont montré des caractéristiques différentes que dans les études *in vitro* [91]. En effet, l'ODN nu non vectorisé pénètre très faiblement les cellules et une grande concentration est requise pour observer l'efficacité de l'antisens alors qu'*in vivo*, l'ODN antisens peut être actif en l'absence de vecteur [91]. Cependant, un vecteur permettrait en principe de maximiser l'effet de l'ODN en augmentant sa demi vie biologique et en l'acheminant vers le tissu cible (i.e. les vaisseaux de résistance dans le cadre de notre étude). Les vecteurs doivent répondre à certaines nécessités biologiques: ils doivent être stables dans la circulation sanguine, non toxiques et résistants à la dégradation enzymatique [92]. Ils doivent aussi pouvoir pénétrer dans la cellule puis libérer l'antisens afin de lui permettre de se lier à sa cible.

La cellule est délimitée par une bicouche de phospholipides empêchant la libre diffusion des ions. La pénétration des ODN dans la cellule dépend de sa longueur et de la nature des liens entre les bases, les ODN de type phosphorothioate pénétrant davantage la cellule que les phosphodiesters [91]. Par contre, les ODN ayant des liens phosphorothioates se lient fortement aux protéines circulantes [91]. On rapporte que les lymphocytes B et T transformés possèdent un meilleur taux d'internalisation des ODN, suggérant que la multiplication rapide des cellules augmente la pénétration cellulaire des ODN [93]. Le site intracellulaire exact où l'antisens exerce son effet pharmacologique demeure incertain. Toutefois, une corrélation a été observée entre l'amplitude de l'efficacité de l'ODN et sa pénétration dans le noyau dans un contexte de culture cellulaire [94]. Les vecteurs liposomaux ou polymères permettraient d'augmenter la pénétration cellulaire de l'ODN et de le protéger contre l'action des nucléases [91].

### 3.3.1. Les liposomes

Les ODN ont la particularité de posséder des groupements anioniques à pH physiologique. Ils sont chargés négativement, permettant ainsi la formation de complexes polyélectrolytes entre l'ODN et des polycations. Les liposomes sont des vésicules colloïdales constituées de molécules amphiphiles auto-assemblées [91]. Ces particules sphériques, généralement composées de phospholipides et de cholestérol, possèdent une taille le plus souvent comprise entre 100 et 150 nm. L'ODN peut être encapsulé à l'intérieur du liposome ou lié à sa surface par interaction électrostatique [91]. Les liposomes cationiques possèdent des charges positives capables de lier l'ODN. Le

système (lipoplexe) est obtenu simplement en mélangeant l'ODN et les liposomes. Les liens électrostatiques formés n'empêchent pas l'ODN d'être libéré dans la cellule et d'atteindre sa cible. La présence de lipides cationiques favorise les interactions avec la membrane cellulaire et facilite le transfert du matériel génétique de l'endosome vers le cytoplasme [95]. Cependant, la présence de charges à la surface des liposomes accélère leur opsonisation par les protéines plasmatiques, augmentant la taille des complexes. Ainsi, après injection intraveineuse, les lipoplexes stimulent le système immunitaire et sont rapidement éliminés par phagocytose par les macrophages alvéolaires au niveau pulmonaire, par les cellules de Kupffer au niveau du foie et par les macrophages de la rate [96]. En effet, la liaison des protéines sériques à la surface des liposomes joue un rôle critique dans l'élimination des liposomes de la circulation sanguine. L'ajout de poly(éthylène glycol) (PEG), un polymère inerte et biocompatible, à la surface des liposomes permet de masquer les charges, de réduire la liaison des liposomes avec les opsonines et ainsi d'augmenter leur temps de circulation. La couche protectrice de PEG cependant, nuit à l'internalisation dans les cellules. Ainsi, il serait souhaitable qu'après l'accumulation des liposomes PEGylés au site d'action, les chaînes de PEG se détachent pour favoriser l'internalisation des liposomes dans les cellules pathologiques. Par exemple, une diminution du pH dans les tumeurs permettrait le détachement des chaînes de PEG [97]. Zalipsky et al. (1999) ont mis au point un procédé de thiolyse douce des liens dithiobenzyluréthane entre le PEG et un phospholipide aminé tel que le phosphatidyléthanolamine [98], ce qui permet d'obtenir un PEG amovible.

Il existe plusieurs formulations commerciales de liposomes cationiques, notamment la combinaison de 1,2-dioleoyl-*sn*-glycero-3-phosphatidylethanolamine (DOPE) avec le 2,3-dioleoyloxy-N-[2(sperminecarboxamido)ethyl]-N,N-dimethyl-1-propanaminium trifluoroacetate (DOSPA) (commerciallement appelé LipofectAMINE™), la combinaison de DOPE avec le chlorure de N-[1-(2,3-dioleoyloxy)propyl]-N,N,N-trimethylammonium (DOTMA) (commerciallement appelé Lipofectin™). La présence constante du DOPE dans ces formulations s'explique du fait que le DOPE est un lipide neutre fusogène capable de provoquer le passage des complexes de l'endosome au cytoplasme avant la lyse lysosomale [91]. L'efficacité des liposomes cationiques a été démontrée par l'étude de Bennett et al. utilisant l'agent Lipofectin™ [99]. Les liposomes ont permis d'augmenter l'activité biologique d'un ODN antisens (ISI 1570) ciblant la molécule d'adhésion ICAM-1 [99]. De plus, cette formulation de liposomes cationiques a changé la distribution intracellulaire de l'ODN, augmentant l'accumulation de l'ODN dans le noyau [99]. Chen et al. (2001) ont conçu une formulation DOPE/DOTAP (dans lequel DOTAP représente le 1,2-bis-(oleoyloxy)-3-(trimethylammonium)propane) comme véhicule d'un ODN antisens dirigé contre l'ARNm de l'ECA [100]. L'administration de cette formulation d'antisens a permis de réduire les niveaux d'ANG II dans les cœurs de rats traités.

### 3.3.2. Les polymères

Les polymères sont des macromolécules produites suite à une réaction de polymérisation. Cette réaction engendre la formation de chaînes composées de motifs de répétition, de petites molécules identiques appelées monomères. Il existe de nombreux

types de polymères se différenciant selon leur architecture (polymères linéaires, ramifiés ou réticulés) et selon la composition de leur chaîne (homopolymères et copolymères).

L'intérêt des polymères réside dans le fait que l'on peut contrôler leurs caractéristiques et leurs propriétés. En choisissant les monomères appropriés, il est possible de contrôler la nature des groupements fonctionnels présents et donc de faire varier l'affinité du polymère pour l'ADN. Le fait que l'ODN soit un oligomère chargé négativement indique qu'il peut être complexé par un polymère cationique (formation d'un polyplexe). La flexibilité de la chimie des polymères permet d'utiliser plusieurs fonctions différentes pour administrer du matériel génétique de façon efficace tout en maintenant la biocompatibilité et la facilité de fabrication de formulations robustes et stables.

Ainsi, la formation de complexes entre l'ADN et la poly(L-lysine), un peptide comprenant des groupements amine chargés positivement en milieu physiologique, a été étudiée par Wolfert et al. [92]. Des complexes polyélectrolytes de taille variable ont été obtenus dépendamment de la masse molaire du polycation. De fait, avec la poly(L-Lysine) de faible masse molaire (3970 Da), les complexes formés étaient plus petits (20-30 nm) et plus homogènes qu'avec celle de haute masse molaire (224 500 Da, complexes de 120-300 nm de diamètre). Il a aussi été rapporté que les complexes n'étaient pas cytotoxiques. Ainsi, il est plus que possible qu'un polymère aminé de faible masse molaire ait toutes les propriétés requises pour lier l'ODN et former un complexe stable de taille idéale. Il suffit de mettre au point la structure du polymère. Bien qu'efficaces *in*

*vitro*, les complexes obtenus entre un polycation et l'ODN sont généralement instables en présence de sérum dû à leur charge résiduelle positive. Une manière élégante de contrer ce problème consiste à complexer l'ODN à des copolymères composés d'un segment cationique et d'un segment hydrophile (tel le PEG).

Les copolymères blocs (polymères formés de longues séquences, de blocs, de deux monomères ou plus) interagissent de façon électrostatique avec l'ODN pour former des complexes micellaires possédant une architecture cœur/couronne. Les micelles obtenues sont généralement de l'ordre de quelques dizaines de nanomètres [101, 102], soit de taille idéale pour permettre un long temps de circulation [103]. Dans ce type complexes, l'ODN fait parti intégrante du système. L'ODN incorporé se retrouve dans le cœur des micelles et se voit ainsi protégé contre la dégradation enzymatique [104]. Les chaînes de PEG, quant à elles, forment une couronne qui permet en principe de minimiser les interactions avec les protéines sanguines et d'augmenter le temps de circulation des complexes, tel que discuté pour les liposomes cationiques. De plus, la présence de PEG fait en sorte que les complexes demeurent stables en présence de sérum (contrairement aux complexes lipidiques ou complexes polymère non PEGylés qui précipitent). L'inconvénient de l'ajout de PEG est que ce dernier, en masquant les charges positives, inhibe l'interaction du vecteur avec les membranes cellulaires et donc son internalisation [105]. Ainsi, afin de permettre à nouveau l'internalisation du vecteur il devient nécessaire d'ajouter un ligand à l'extrémité de la chaîne de PEG. Différents récepteurs membranaires peuvent être ciblés afin de favoriser l'endocytose du complexe polymère dans les cellules pathologiques [106]. Le ciblage peut être réalisé via plusieurs types de

ligands dont l'acide folique, l'EGF, les anticorps et les fragments d'anticorps [106]. Le ciblage de cellules spécifiques exige l'optimisation de plusieurs paramètres pour obtenir une internalisation efficace, par exemple le bon nombre de ligands sur le complexe, une distance appropriée entre le ligand et le complexe, et la saturation des récepteurs membranaires [106].

La formation de complexe micellaire suite à l'interaction ODN-polymère protège l'ODN contre la dégradation enzymatique dans la circulation sanguine (ADNases). Cependant, un autre obstacle à la thérapie génique consiste en la dégradation enzymatique dans les lysosomes. Effectivement, après l'internalisation des vecteurs dans la cellule par endocytose, les polyplexes peuvent être emprisonnés dans les lysosomes, des vésicules acides remplies d'enzymes de dégradation [107]. Certains polymères cationiques, dont le PAEMA (poly[2-(acetoacetoxy)ethyl methacrylate]) et le PDMAEMA (poly(2-(diméthylamino)ethyl methacrylate)), pourraient faciliter le passage des complexes de l'endosome au cytoplasme avant qu'ils ne soient dégradés lors de la lyse lysosomale. En effet, ces polymères possèdent respectivement des amines primaires et tertiaires capables de s'ioniser suite à leur passage du pH neutre extracellulaire au pH acide de l'endosome/lysosome (les copolymères de type PEG-*b*-PAEMA et PEG-*b*-PDMAEMA ont des valeurs  $pK_a$  de 7.1 et 6.6 respectivement [108]). Cette capacité des amines à capturer des protons aurait pour effet de contrer l'acidification de l'endosome et d'induire une entrée massive de contre-ions dans la vésicule, causant sa rupture par osmose (« proton sponge effect ») [109]. L'ODN pourra alors diffuser vers le cytoplasme/noyau pour remplir ses activités.

## II. OBJECTIFS

Notre premier objectif consistait à inhiber l'expression de la p70<sup>S6K</sup> afin d'en déterminer l'impact au niveau du remodelage hypertrophique chez les rats traités avec l'ET. Puisque la littérature relie l'hypertrophie vasculaire à la voie de la PI3K et que les expériences préalables au laboratoire nous indiquaient que l'inhibition de mTOR bloque la synthèse protéique, que S6K1 est un effecteur de cette voie de signalisation, alors que S6K2 est également activé par la voie des MEK, nous avons choisi de cibler plus particulièrement S6K1. Afin d'atteindre cet objectif, nous avons observé l'effet de l'ET sur l'expression de la p70<sup>S6K</sup> totale et phosphorylée. Une augmentation de l'expression de la protéine est attendue dans le cas où elle joue un rôle dans la signalisation cellulaire engendrée par l'ET. L'inhibition de l'expression de la p70<sup>S6K</sup> permettait ensuite d'évaluer l'importance de l'activité de cette protéine dans le processus de remodelage hypertrophique. Puisqu'il n'existe aucun inhibiteur commercial de la p70<sup>S6K</sup>, la thérapie antisens s'avérait une avenue tout à fait intéressante. La validation de l'efficacité de l'antisens sur l'expression basale de la protéine d'intérêt est d'abord requise afin d'en étudier les effets en condition pathologique. Nous avons donc observé les effets de l'antisens au niveau sanguin et dans deux types de vaisseaux différents (aorte et artères mésentériques).

Toutefois, les ODN antisens possèdent certains inconvénients discutés plus haut. Ainsi, le second objectif consistait à améliorer le véhicule d'administration afin d'augmenter le temps de circulation et éventuellement la pénétration tissulaire de l'antisens. Nous avons d'abord étudié l'efficacité de l'antisens à l'aide d'un véhicule

composé de lipides cationiques sur l'expression de la p70<sup>S6K</sup> au niveau aortique et mésentérique. En second lieu, nous avons étudié plusieurs véhicules polymères et leurs effets sur la pharmacocinétique et la biodistribution de l'antisens. Nous avons étudié les caractéristiques des composés de polymères afin d'optimiser leur efficacité.

### III. MÉTHODOLOGIE GÉNÉRALE

#### 1. Canulation et traitement des rats

##### 1.1. Canulation

Les rats mâles Sprague Dawley (275-325 g) étaient anesthésiés à l'aide de pentobarbital à une dose de 50 mg/kg injectée de façon intrapéritonéale. Les animaux endormis ont été canulés au niveau de la veine et de l'artère fémorales. Les canules traversaient le dos de l'animal sous la peau de façon à ressortir par le cou. La canule de la veine fémorale permettait d'injecter l'ODN antisens (ou un soluté physiologique contrôle) de façon intraveineuse. La canule au niveau de l'artère permettait de recueillir des échantillons de 1 mL de sang toutes les 24 heures. Environ 0,2 mL d'héparine était injectée avant le prélèvement de chaque échantillon sanguin pour éviter la coagulation.

##### 1.2. Prélèvements sanguins et tissulaires

Yatscoff et al. (1998) ont observé que presque toute l'activité de la p70<sup>S6K</sup> dans le sang se retrouve dans les lymphocytes [110]. Pour obtenir suffisamment de cellules lymphocytaires pour effectuer un test d'immunobuvardage de type Western, il aurait fallu retirer 8 mL de sang de l'animal. Puisque cette technique exigeait trop de sang et nécessitait que l'animal soit sacrifié, nous avons alors décidé de prendre 1 mL de sang artériel, auquel nous avons additionné 200 µL de dextran 6%, puis incubé ces derniers à 37°C dans un bain-marie pendant 30 minutes. Nous avons alors aperçu la formation de deux phases distinctes afin de recueillir le surnageant (plasma riche en leucocytes) en prenant soin de ne pas prélever les érythrocytes. Les échantillons de sang et de tissus (aorte, artères mésentériques) étaient congelés à -80°C jusqu'à leur utilisation. Les tissus

congelés étaient broyés à l'aide d'un mortier et d'un pilon, maintenus à très basse température avec de la glace sèche et de l'azote liquide.

### 1.3. Traitements à l'ET

La synthèse protéique était induite à l'aide de minipompes osmotiques (modèle 1003D Alzet, Braintree Scientific inc., Braintree, Massachusetts) au niveau péritonéal libérant une dose constante d'ET (5  $\mu\text{mol/kg/min}$ ). Cette dose, étudiée préalablement au cours d'études pilotes, permettait de stimuler la synthèse protéique sans affecter la pression artérielle. Les minipompes osmotiques étaient préparées à l'avance ou non, selon le temps de libération voulue. Les minipompes utilisées libèrent le médicament à une vitesse de 1  $\mu\text{L/heure}$  et peuvent contenir un volume de 100  $\mu\text{L}$ , ce qui représente un temps de libération d'environ trois jours selon le fabricant. Dans le cadre de nos expériences, le temps de libération d'ET a été fixé à 24 heures ou à 72 heures. Les animaux témoins ont subi la chirurgie sans toutefois recevoir la minipompe osmotique (i.e. sans traitement à l'endothéline).

## 2. Immunobuvardage de type Western

### 2.1. Extraction et dosage des protéines

D'abord, nous avons réalisé l'extraction des protéines à partir du plasma ou des tissus broyés. Nous avons effectué la lyse des cellules à l'aide d'un tampon de lyse comprenant du PBS (« Phosphate Buffered Saline »), de l'igepal CA-630, du désoxycholate sodique, du SDS, du PMSF et de l'aprotinine. La quantité de lysat ajouté variait selon le poids de l'échantillon. Les échantillons, toujours conservés sur glace à

4°C, étaient ensuite homogénéisés au Polytron™ à vitesse maximale pendant quelques secondes puis incubés pendant 30 minutes à 4°C. Par la suite, les échantillons étaient centrifugés à 12 000 rpm durant 30 minutes. Le surnageant de chaque échantillon était recueilli et conservé à -80°C jusqu'à utilisation. Pour le dosage des protéines, nous avons utilisé la méthode par le BCA (acide bicinchoninique). Cette méthode consiste en la formation de complexes entre les ions de cuivre et les liens peptidiques pour produire un produit final pourpre. L'absorbance du produit formé est mesurée à 562 nm. La concentration de protéines de chaque échantillon était déterminé en interpolant l'absorbance mesurée avec une courbe standard préparée avec du BSA (« bovine serum albumine »),

## 2.2. Immunobuvardage

L'expression de la p70<sup>S6K</sup> dans les cellules plasmatiques ou tissulaires a été mesurée par immunobuvardage de type Western sur un gel à 7.5 ou 10% de polyacrylamide. Les protéines ayant migré sur le gel étaient transférées sur une membrane de nitrocellulose par électrophorèse. Suite au blocage des liaisons non spécifiques à l'aide de lait écrémé 5%, la détection des protéines était effectuée à l'aide d'un anticorps primaire contre la p70<sup>S6K</sup> totale (Santa Cruz) ou phosphorylée (au niveau Thr421/Ser424, New England Biolabs). L'anticorps primaire a été dilué dans du lait écrémé 5% à une concentration variant de 1 :1000 à 1 :500. Par la suite, nous avons utilisé un anticorps secondaire conjugué à l'enzyme HRP (« horseradish peroxidase ») (« Anti-rabbit IgG HRP-linked », Cell Signaling) avec une dilution de 1 :1000. Enfin, une solution de révélation, préparée à partir d'une solution de luminol et d'une solution de

peroxyde, permettait de voir et de quantifier la protéine d'intérêt par la méthode de chimioluminescence. En effet, en présence de peroxyde d'hydrogène, l'HRP catalyse la réaction d'oxydation du luminol, ce qui produit une lumière bleue captée par la caméra AlphaImager (Alpha Innotech Corporation, San Leandro, USA) et quantifiée à partir du programme ChemiImager 5500 v 2.03. Les membranes ont pu être réutilisées à l'aide d'un protocole de « stripping » afin d'évaluer d'autres paramètres avec un anticorps primaire différent.

### 3. Conception de l'antisens et du contrôle négatif

#### 3.1. Antisens

Nous avons opté pour un antisens de 20 nucléotides dirigé contre l'ARNm de la p70<sup>S6K</sup> du rat. Banerjee et al. (1997) ont élucidé la séquence d'ARNm de la p70<sup>S6K</sup> chez le rat [111]. La séquence de notre ODN doit être complémentaire à une séquence précise de l'ARNm de la protéine cible. Afin de cibler de façon sélective l'ARNm de la p70<sup>S6K</sup>, trois facteurs importants sont à considérer :

- 1) Les nucléotides doivent comprendre le codon d'initiation AUG, la séquence indiquant le premier acide aminé de la protéine à synthétiser.
- 2) La séquence de vingt nucléotides ne doit pas contenir une suite de trois guanidines consécutives.
- 3) La série de nucléotides choisis doit être spécifique à la protéine ciblée.

Ainsi, l'antisens conçu pour cibler le codon d'initiation de l'ARNm de la p70<sup>S6K</sup> chez le rat possède la séquence suivante : 5'-(ACTCC-[S-OLIGO])-TGCCATGTC-(CTCAGC-[S-OLIGO])-3' (MediCorp, Canada, Montréal). Cet antisens a un poids moléculaire de 5954,83 g/mol et comprend onze liens de type phosphorothioate. Nous avons choisi d'alterner les liens de type phosphorothioate et de type phosphodiester afin de réduire la vulnérabilité de l'ODN aux nucléases tout en sauvegardant son affinité pour la séquence d'ARNm ciblée.

### 3.2. Contrôle négatif

Quant à la séquence du témoin négatif, il est possible de choisir la séquence « sens » de l'antisens ou une séquence aléatoire des acides nucléiques de l'antisens (« scrambled »). Nous avons opté pour la séquence aléatoire suivante : 5'-(CATCT-[S-OLIGO])-TACCACCGCTG-(GCCCT-[S-OLIGO])-3' (MediCorp, Canada, Montréal). Cette séquence possède un poids moléculaire de 6244,01 g/mol et comprend dix liens de type phosphorothioate. La séquence aléatoire ne correspondait à aucune protéine chez le rat selon la base de données génétiques de PubMed (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi>).

## 4. Grefte d'un marqueur fluorescent sur l'oligonucléotide : la fluorescéine

Pour incorporer la fluorescéine sur l'extrémité 5' de l'ODN, nous avons d'abord greffé de l'ATP $\gamma$ S (soufre) à l'extrémité 5' en se servant de l'enzyme T4 polynucléotide kinase. Ensuite, un dérivé de la fluorescéine (la 5-IAF) était introduit pour se lier au soufre de l'ATP $\gamma$ S.

#### 4.1. Préparation

Plus précisément, 25  $\mu\text{L}$  d'eau déminéralisée étaient ajoutés dans un tube contenant de l'enzyme T4 polynucléotide kinase (PNK, 8-10 unités d'enzyme actives, Amersham Biosciences). Le tout était incubé à la température de la pièce pendant 2 à 5 minutes puis resuspendu à la pipette. Ensuite, 5  $\mu\text{L}$  d'ODN étaient ajoutés. La solution était complétée à 50  $\mu\text{L}$  avec 17  $\mu\text{L}$  d'eau déminéralisée, puis avec 3  $\mu\text{L}$  d'ATP- $\gamma$ -S 1mM. La solution finale était homogénéisée par centrifugation (2-3 secondes à 5000 rpm soit 2300 g) puis incubée à 37°C pendant 30 minutes. Cette étape permettait à l'enzyme de greffer de l'ATP- $\gamma$ -S à l'ODN. La réaction était arrêtée par l'addition de 12.5  $\mu\text{L}$  d'EDTA 0.1 M. La greffe de la fluorescéine s'effectuait alors par l'ajout de 2  $\mu\text{L}$  de 5-IAF 25 mM suivi d'une incubation à 37°C pendant 30 minutes. À ce stade, nous obtenions un mélange non purifié d'ODN marqué et d'ODN non marqué.

#### 4.2. Purification de l'ODN marqué

La purification était effectuée grâce à une colonne MicroSpin™ G50 (Amersham Biosciences) : colonne de Sephadex™ G50 DNA Grade F prééquilibrée dans un tampon TE (pH=8.0, Tris-HCl 10mM et EDTA 1 mM) contenant 0.05% de Kathon™ CG/ICP Biocide comme agent de préservation. La colonne était préparée en resuspendant la résine à l'aide du vortex. L'embout de plastique était ensuite enlevé et la colonne était placée dans un tube de 1.5 mL pour centrifugeuse horizontale. Elle était précentrifugée à 2000 rpm (735 g) pendant une minute pour éliminer le liquide tampon. La colonne était ensuite placée dans un autre tube de 1.5 mL puis l'ODN marqué (50  $\mu\text{L}$ ) était additionné au centre de la colonne. La centrifugation à 735 g pendant deux minutes permettait de

recueillir l'échantillon purifié au fond du tube. Il était possible de vérifier la liaison effective du composé en le faisant migrer sur un gel de polyacrylamide 20%.

## 5. Grefte d'un marqueur radioactif sur l'oligonucléotide : le $^{35}\text{S}$

Pour incorporer un soufre radioactif sur l'extrémité 5' de l'ODN, nous avons d'abord greffé de l'ATP $\gamma^{35}\text{S}$  (Perkin Elmer) à l'extrémité 5' en se servant de l'enzyme T4 polynucléotide kinase tel que décrit plus haut.

## 6. Formulation liposomale et dosage des phosphates

### 6.1. Liposomes

Nous avons choisi dans un premier temps de concevoir une formulation liposomale composée des lipides DOPE et DOTAP, en proportions égales. Nous avons pesé 6.99 mg de DOTAP et 7.44 mg de DOPE puis ajouté 1 mL de chloroforme à chacun d'eux afin d'obtenir des solutions à 10 mM chacune. Ensuite, les deux solutions ont été ajoutées dans un même ballon et le solvant évaporé sous vide à l'aide d'un rotavapeur (température du bain :  $\sim 37^\circ\text{C}$ ), permettant ainsi la formation d'un mince film sur la paroi du ballon. Afin de disperser le film de lipides, nous avons ajouté 420  $\mu\text{L}$  de dextrose 5%. Enfin, nous avons extrudé la dispersion de lipides au travers de filtres de 100 puis de 50 nm afin d'obtenir des liposomes ayant une taille d'environ 100 nm.

### 6.2. Dosage des phosphates

Afin de vérifier la concentration finale de charges positives dans les liposomes formés et de mesurer les pertes encourues lors de la filtration, nous avons mesuré la

quantité de phosphates provenant du DOPE. À partir de 10  $\mu\text{L}$  de chaque échantillon de liposomes, nous avons ajouté 60  $\mu\text{L}$  d'acide sulfurique, puis 10  $\mu\text{L}$  de peroxide d'hydrogène. Les échantillons ont ensuite été chauffés à 200°C pendant 10 minutes sous la hotte. Après refroidissement des tubes, nous avons ajouté 670  $\mu\text{L}$  d'eau pure, puis 20  $\mu\text{L}$  de metabisulphite de sodium. Les échantillons ont été chauffés à 100°C pendant 5 minutes. Après refroidissement, nous avons ajouté 200  $\mu\text{L}$  de molybdate 2% en solution à chacun des tubes, puis 20  $\mu\text{L}$  d'acide ascorbique. Les échantillons étaient chauffés une fois de plus à 100°C pendant 10 minutes. Une coloration bleue apparaissait, graduellement plus foncée pour les échantillons plus concentrés de la courbe de calibration. L'absorbance de chacun des échantillons a été mesurée à 820 nm.

### 6.3. Préparation des complexes

Les lipoplexes ont été préparés dans un eppendorff contenant 420  $\mu\text{L}$  de liposomes auxquels nous avons ajouté 420  $\mu\text{L}$  d'ODN. Nous avons passé le mélange au vortex cinq secondes puis nous avons laissé l'échantillon à température ambiante 15 minutes pour permettre la complexation.

## 7. Synthèse protéique (incorporation de la leucine tritiée)

Les rats recevaient une infusion de L-[4,5-<sup>3</sup>H]leucine (12  $\mu\text{Ci/h}$ ) (Perkin-Elmer/Life Science) pendant quatre heures à l'aide de leur canule au niveau de la veine fémorale, puis l'animal était sacrifié par surdose d'anesthésique. Pendant l'infusion de la leucine, la pression artérielle et la fréquence cardiaque de l'animal étaient mesurées à l'aide d'un capteur de pression relié à la canule au niveau artériel. Un ordinateur

compilait les données. Lors du sacrifice de l'animal, l'aorte et les artères mésentériques étaient prélevées puis rapidement conservées à  $-80^{\circ}\text{C}$ . L'incorporation de leucine tritiée était mesurée à partir des tissus broyés. Les échantillons étaient traités avec une quantité d'acide trichloroacétique (TCA) 10% variant selon le poids et incubés toute la nuit à  $4^{\circ}\text{C}$ . Les tissus étaient ensuite lavés puis solubilisés avec du KOH dans un bain-marie à  $50^{\circ}\text{C}$ . La quantité de radioactivité retrouvée était calibrée en fonction de la quantité de protéines de l'échantillon, mesurée à l'aide de  $15\ \mu\text{L}$  de l'échantillon selon la méthode de Lowry [112]. L'ajout de  $10\ \text{mL}$  de liquide à scintillation Ultima Gold (Perkin Elmer) à  $1\ \text{mL}$  de chacun des échantillons permettait de mesurer la radioactivité de ces derniers. Graphiquement, la radioactivité mesurée chez les rats témoins est représentée par la valeur 100% et la radioactivité mesurée chez les rats traités est représentée par un pourcentage du témoin.

## 8. Courbe de quench et traitement du sang et des tissus pour mesurer la radioactivité au $^{35}\text{S}$

### 8.1. Synthèse des polymères

Les polymères ont été synthétisés par Mme Marie-Hélène Dufresne du laboratoire de Jean-Christophe Leroux. Les copolymères, de type bloc, étaient composés de PEG et de poly(alkyl(aminoéthyl)méthacrylate). Les méthacrylates utilisés étaient les suivants : hydrochlorure d'aminoéthyl méthacrylate (AEMA, amine primaire), 2-(N,N-diméthylamino)éthyl méthacrylate (DMAEMA, amine tertiaire) et 2-(N,N,N-triméthylamino)éthyl méthacrylate (TMAEMA, amine quaternaire). La composition des polymères a été variée afin de tester l'influence de la balance EG/monomère cationique et

du type d'amine sur la formation de complexes. Pour faciliter la lecture du texte, nous avons abrégé chacun des polymères synthétisés tel que présenté dans le tableau III-1.

**Tableau III-1 Abréviations utilisées pour les polymères**

<b>Polymère</b>	<b>Abréviation</b>
PEG <sub>113</sub> - <i>b</i> -PAEMA <sub>15</sub>	EG <sub>113</sub> A <sub>15</sub>
PEG <sub>113</sub> - <i>b</i> -P(AEMA <sub>15</sub> -co-DMAEMA <sub>15</sub> )	EG <sub>113</sub> A <sub>15</sub> D <sub>15</sub>
PEG <sub>113</sub> - <i>b</i> -PAEMA <sub>30</sub>	EG <sub>113</sub> A <sub>30</sub>
PEG <sub>45</sub> - <i>b</i> -PTMAEMA <sub>15</sub>	EG <sub>45</sub> T <sub>15</sub>

Où PEG : Poly(éthylène glycol),  
 AEMA : Hydrochlorure d'aminoéthyl méthacrylate,  
 DMAEMA : 2-(N,N-diméthylamino)éthyl méthacrylate,  
 TMAEMA : 2-(N,N,N-triméthylamino)éthyl méthacrylate.

## 8.2. Caractérisation des polymères

### 8.2.1. Analyses de chromatographie d'exclusion stérique

Les masses molaires en nombre ( $M_n$ ) et en poids ( $M_w$ ) des polymères ont été déterminées par chromatographie d'exclusion stérique (CES) à l'aide d'un système Alliance GPCV 2000 (Waters, Milford, MA) équipé de trois colonnes Styragel (Waters, colonnes HR1, HR3 et HR4) placées en série et d'un réfractomètre. Les analyses ont été faites à 40°C à un débit de 1.0 mL/min dans du tétrahydrofurane. Les masses molaires ont été calculées relativement à des standards de PEG quasi monodispersés.

### 8.2.2. Analyses de résonance magnétique nucléaire

Les spectres de résonance magnétique nucléaire (RMN) de proton ont été enregistrés à l'aide d'un appareil Bruker opérant à 300 MHz (Bruker, Milton, Ontario,

Canada). Les échantillons ont été préparés dans des solvants deutériés (chloroforme ou eau).

### 8.3. Préparation des complexes

Les polyplexes ont été préparés à des ratios molaires N/P de 1:1 ou 4:1 en ajoutant simplement une solution d'ODN à une solution de polymère. Par exemple, pour le polymère EG<sub>113</sub>A<sub>15</sub>D<sub>15</sub>, nous avons préparé une solution contenant 7,86 mg de polymère dans 1,428 mL de dextrose 5%. Dans un tube eppendorff contenant 800 µL de la solution de polymère, nous avons ajouté 420 µL d'ODN non marqué et 180 µL d'ODN marqué au <sup>35</sup>S. Nous avons passé le mélange au vortex cinq secondes puis nous avons laissé reposer l'échantillon à température ambiante 15 minutes pour permettre la complexation. Les quantités des autres polymères ont été ajustées pour tenir compte du nombre de charges nécessaires pour complexer l'ODN.

### 8.4. Caractérisation des complexes

Les tailles des complexes injectés ont été mesurées par spectroscopie de corrélation de photons à 173° à l'aide d'un Zetasizer Nano ZS (Malvern, Worcestershire, UK) équipé d'un laser He-Ne opérant à 633 nm.

### 8.5. Pharmacocinétique des polyplexes

#### 8.5.1. Courbe de quench

La courbe de quench permet de normaliser l'effet de la coloration du sang sur la mesure de radioactivité dans les échantillons de sang recueillis. Nous avons d'abord

préparé une solution radioactive d'ATP- $\gamma$ - $^{35}\text{S}$  à  $\sim 15\,000$  cpm/mL (dose recommandée par la compagnie) dans le liquide à scintillation Hionic Fluor. Nous avons ensuite préparé des échantillons contenant des quantités croissantes de sang, auxquels nous avons ajouté 800  $\mu\text{L}$  de Soluene<sup>®</sup>-350, 500  $\mu\text{L}$  d'isopropanol et 200  $\mu\text{L}$  de peroxyde d'hydrogène (produits utilisés pour la préparation des échantillons sanguins, voir plus bas). Les valeurs de radioactivité ont été mesurées 24 heures après la préparation des échantillons (les échantillons avaient été conservés à l'abri de la lumière). Nous avons obtenu pour chaque échantillon une valeur de radioactivité en cpm, un facteur de quench appelé « tSIE » ainsi qu'un pourcentage d'efficacité de la mesure de radioactivité. À l'aide de ces valeurs, on peut tracer une courbe de la radioactivité réelle en fonction du facteur « tSIE ». Nous avons finalement établi une équation à l'aide du logiciel Origin 6.0 selon un modèle exponentiel permettant de calculer la radioactivité réelle des échantillons sanguins recueillis.

#### Équation obtenue

$$y = y_0 + A_1(1 - e^{-x/t_1})$$

Où  $y_0 = 23,12$  ;  $A_1 = 77,94$  ;  $t_1 = 109,04$ .

#### 8.5.2. Échantillons sanguins

Nous avons traité les échantillons de 100  $\mu\text{L}$  de sang avec 800  $\mu\text{L}$  de Soluene<sup>®</sup>-350 (Perkin Elmer), un produit composé de toluène (60-70%), hydroxyde de diméthylidialkylammonium (30-40%) et méthanol (5-8%), puis avec 500  $\mu\text{L}$

d'isopropanol afin de solubiliser les lipides sanguins. Ensuite, nous avons décoloré les échantillons à l'aide de 200  $\mu$ L de peroxyde d'hydrogène 30%.

#### 8.6. Biodistribution des polyplexes

Les tissus ont été prélevés (cœur, foie, rate, rein, poumon et artérioles mésentériques) lors du sacrifice de l'animal 24 heures après l'injection de l'ODN radioactif (ou de l'ODN radioactif complexé au polymère cationique). Les tissus ont été pesés puis, selon leur poids, une certaine quantité de Soluene<sup>®</sup>-350 leur a été ajoutée afin de les solubiliser (1 mL de Soluene<sup>®</sup>-350 pour 0.1g de tissu). Après une nuit à l'obscurité, 10 mL de liquide à scintillation Hionic Fluor étaient ajoutés à chacun des échantillons. Ces derniers pouvaient alors être lus au compteur pour déterminer leur contenu en soufre radioactif.

#### 8.7. Analyse statistique

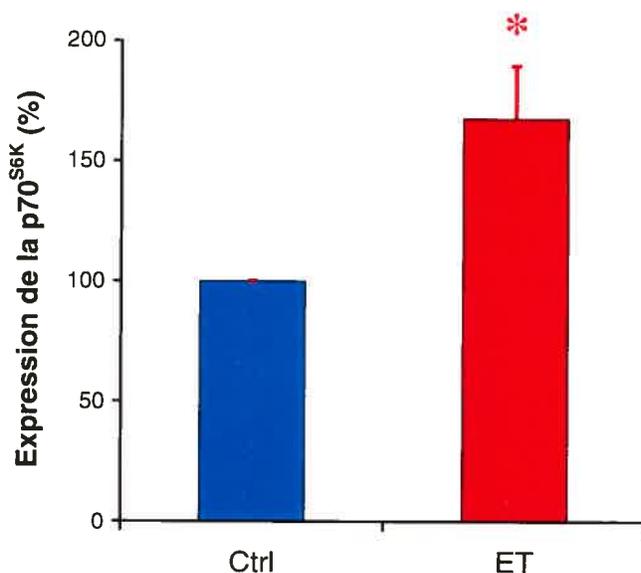
Les résultats présentés représentent des moyennes de valeurs obtenues  $\pm$  erreur standard. Le nombre d'échantillons est inscrit sous chacune des figures. L'analyse statistique a été effectuée en utilisant le test t de Student. L'analyse de variance (ANOVA) a été utilisée pour comparer plusieurs moyennes entre elles. Une valeur de p inférieure à 0.05 était considérée significative. Lorsque des différences significatives ont été trouvées, celles-ci ont subi une procédure de comparaisons multiples (Post hoc Bonferroni) afin de déterminer leur origine.

## IV. PRÉSENTATION ET ANALYSE DES RÉSULTATS

### 1. Expression de la p70<sup>S6K</sup> chez le rat traité à l'ET

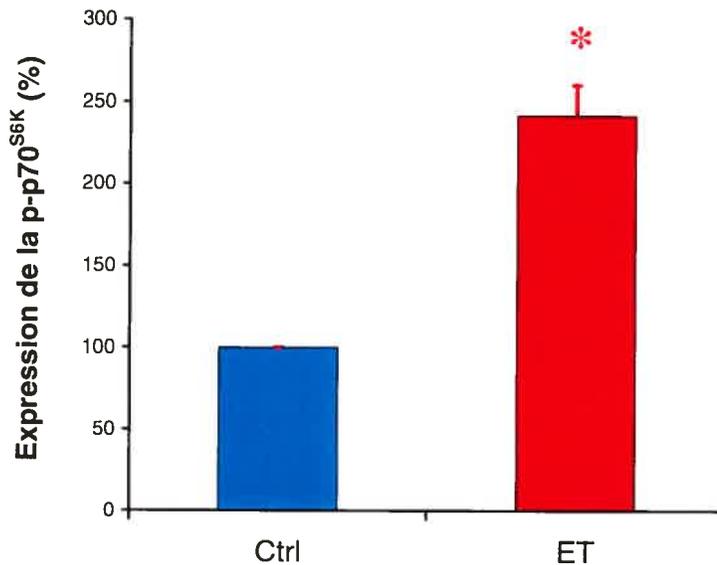
#### 1.1. Expression de la p70<sup>S6K</sup> totale et phosphorylée au niveau mésentérique

L'objectif visé par la conception de cet antisens consiste à étudier le rôle de la p70<sup>S6K</sup> dans le remodelage hypertrophique. Nous avons observé par immunobuvardage de type western que l'administration d'ET par minipompe osmotique pendant 24 heures a stimulé de façon significative l'expression et la phosphorylation de la p70<sup>S6K</sup> au niveau mésentérique (figures IV.1 et IV.2).



**Figure IV.1 Expression de la p70<sup>S6K</sup> totale au niveau des artères mésentériques chez le rat traité à l'ET pendant 24h.**

L'expression de la p70<sup>S6K</sup> totale chez le rat témoin est normalisée à 100% alors que l'expression de la p70<sup>S6K</sup> totale chez les rats traités à l'ET (n=4) représente un pourcentage de la première. \*p<0,05 vs témoin.



**Figure IV.2 Expression de la p70<sup>S6K</sup> phosphorylée au niveau des artères mésentériques chez le rat traité à l'ET pendant 24 heures.**

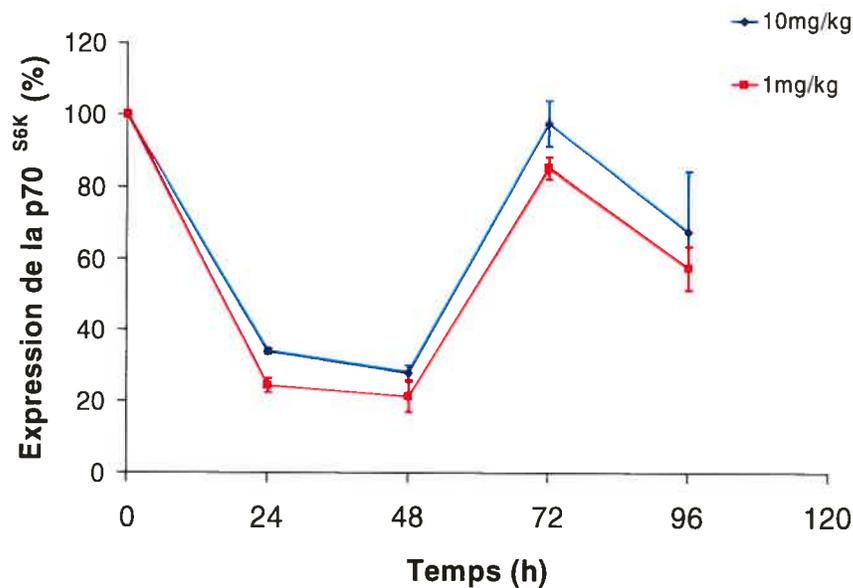
L'expression de la p70<sup>S6K</sup> phosphorylée chez le rat témoin est normalisée à 100% alors que l'expression de la p70<sup>S6K</sup> totale chez les rats traités à l'ET (n=4) représente un pourcentage de la première. \*p<0,05 vs témoin.

## 2. Caractérisation de l'antisens

### 2.1. Doses testées : 10 mg/kg vs 1 mg/kg

Dans le but de caractériser l'antisens, de vérifier son efficacité et sa spécificité, nous avons d'abord mené une étude pilote dans laquelle nous avons observé l'expression de la p70<sup>S6K</sup> dans le plasma riche en leucocytes suite à l'administration de deux doses différentes de l'ODN nu, soit 10 mg/kg et 1 mg/kg. L'ODN était injecté en bolus par la voie intraveineuse, à l'aide d'une canule préalablement installée au niveau de la veine fémorale. Nous avons observé que l'expression de la p70<sup>S6K</sup> est réduite de façon significative dans le plasma riche en leucocytes 24 heures après l'injection de l'ODN, pour atteindre un minimum d'expression à 48 heures environ. Nous pouvons observer

qu'à plus de 72 heures après l'injection de l'ODN, l'expression de la p70<sup>S6K</sup> revient à la normale. Nous n'avons noté aucune différence entre les deux doses d'ODN étudiée (figure IV.3). Par conséquent, la dose utilisée pour les expériences subséquentes était de 1 mg/kg, la plus faible dose étudiée et trouvée efficace pour réduire de façon importante l'expression de la protéine d'intérêt.



**Figure IV.3 Pharmacocinétique de l'expression de la p70<sup>S6K</sup> dans le plasma riche en leucocytes suite à l'administration de 1 vs 10mg/kg d'ODN nu chez le rat.**

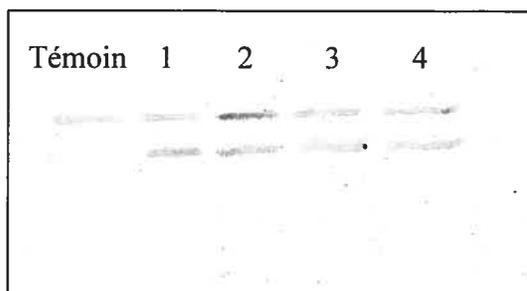
L'expression de la p70<sup>S6K</sup> au temps 0 est normalisée à 100% alors que l'expression de la protéine aux temps 24, 48, 72 et 96 h représente un pourcentage du temps 0 (n=2 pour chaque temps).

Au niveau sanguin, la p70<sup>S6K</sup> se retrouve principalement dans les lymphocytes. Pour obtenir suffisamment de cellules lymphocytaires pour effectuer un test d'immunobuvardage de type Western, il aurait fallu retirer 8 mL de sang de l'animal. Puisque cette technique exigeait trop de sang et nécessitait que l'animal soit sacrifié, nous avons alors décidé de prendre 1 mL de sang total pour mesurer l'expression de la p70<sup>S6K</sup>

chez le même animal à 24, 48 et 72 heures après l'injection de l'antisens. Cependant, dans un volume de 1mL de sang, la p70<sup>S6K</sup> se retrouve en plus faible quantité et plus difficile à détecter. En conclusion, le manque potentiel de précision pour la quantification était compensée par l'utilisation de mesures répétées chez le même animal, ce que nous jugions plus adéquat.

## 2.2. Effets de l'antisens sur ERK1/2

Par ailleurs, pour voir si l'ODN antisens exerçait des effets non spécifiques sur l'ARNm d'autres protéines, nous avons mesuré l'expression de ERK1/2 par immunobuvardage de type Western. Ces protéines aussi appelées p42/44 MAPK jouent un rôle essentiel dans la prolifération cellulaire et possèdent un ARNm différent de celui de la p70<sup>S6K</sup> [113, 114]. L'administration de l'antisens à quatre rats différents n'a pas affecté l'expression de ERK1/2 totale dans le plasma riche en leucocytes (figure IV.4).



**Figure IV.4** Expression de ERK1/2 totale 48h après l'administration de 1 mg/kg d'ODN nu vs témoin (n=4).

### 3. Optimisation de l'efficacité de l'ODN : Conception des liposomes DOPE/DOTAP

#### 3.1. Dose de l'antisens à utiliser

Afin d'assurer la pénétration cellulaire et d'augmenter le temps de circulation de l'antisens, nous avons additionné l'ODN à une préparation liposomale DOPE/DOTAP. L'ODN contient des charges négatives alors que le lipide DOTAP est positif. Afin de complexer 0,3 mg (soit 1 mg/kg pour un rat d'environ 300 g) de l'ODN aux liposomes DOPE/DOTAP, nous avons opté pour un rapport de charges +/- de 4:1.

#### 3.2. Dosage de phosphate

Le dosage des phosphates permet de s'assurer que la concentration de lipides avant et après le processus d'extrusion demeure comparable et que les pertes de lipides sur le filtre sont minimales. La concentration de phosphate mesurée représente la concentration du lipide DOPE dans les liposomes. Puisque le lipide DOTAP était associé au lipide DOPE dans un rapport 1:1, nous pouvons ainsi en déduire la concentration de lipide DOTAP (de charges positives) dans le complexe. Par exemple, avant extrusion, nous avons une concentration moyenne de  $8.52 \pm 0.16$   $\mu\text{mol/mL}$  et après extrusion, nous avons obtenu une concentration moyenne de  $9.04 \pm 0.22$   $\mu\text{mol/mL}$ . D'après ce résultat, le processus d'extrusion n'a pas réduit la concentration de lipides phosphatés et nous a permis de calculer plus exactement la concentration de charges négatives (d'ODN) à ajouter afin d'obtenir un rapport azote/phosphate (N/P) de 4:1.

### 3.3. Tailles obtenues

Après extrusion sur un filtre de 100 nm, le diamètre moyen des liposomes obtenu variait entre 133 et 145 nm (tableau IV-1). Par la suite, une seconde extrusion sur un filtre de 50 nm permettait d'obtenir des tailles inférieures variant de 98 à 107 nm (tableau IV-2). Enfin, les différents échantillons étaient tous mélangés ensemble afin de pouvoir uniformiser la quantité de liposomes injectée à chacun des rats.

**Tableau IV-1 Diamètre moyen des liposomes obtenu après extrusion sur un filtre de 100 nm, puis après une seconde extrusion sur un filtre de 50nm.**

Échantillon	Filtre de 100nm	Filtre de 50nm
1	141 ± 40	98 ± 34
2	139 ± 41	98 ± 32
3	133 ± 44	103 ± 36
4	135 ± 39	107 ± 37
5	145 ± 48	99 ± 30
6	139 ± 40	99 ± 31

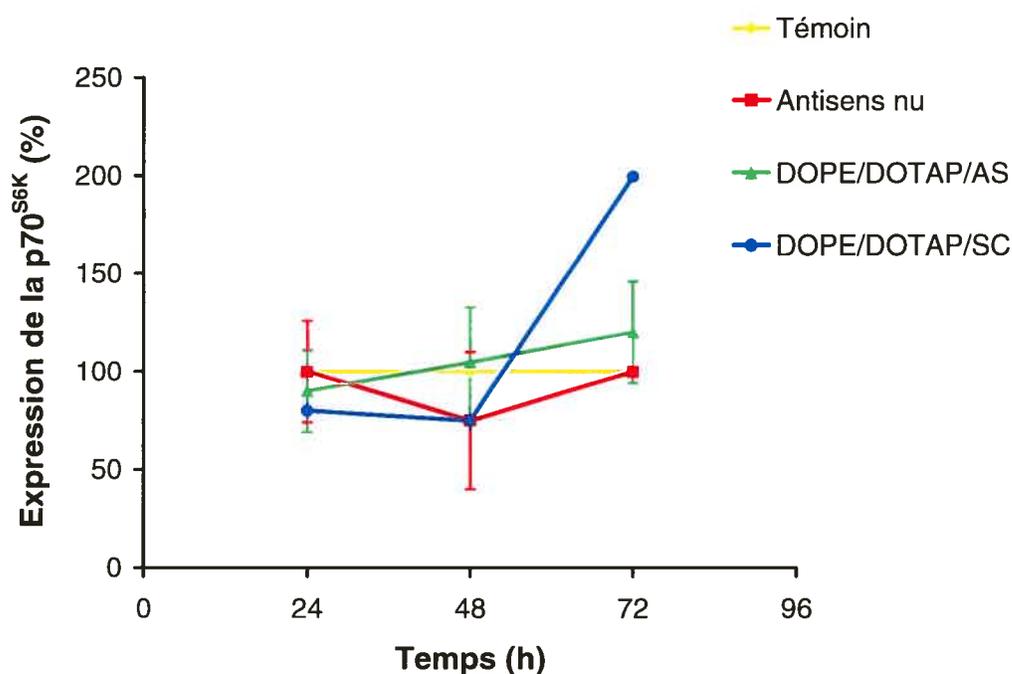
## 4. Cinétique de l'expression de la p70<sup>S6K</sup> suite à une administration bolus de l'antisens nu ou de l'antisens incorporé dans une formulation liposomale

### 4.1. Au niveau plasmatique

Tel que mentionné plus tôt, nous avons observé une diminution de l'expression de la p70<sup>S6K</sup> au niveau du plasma recueilli (riche en leucocytes) environ 48 heures après l'administration de l'ODN nu (figure IV.3 montrée plus haut).

#### 4.2. Au niveau de l'aorte

Afin de déterminer le début d'action de l'antisens dans les tissus, nous avons suivi l'expression de la p70<sup>S6K</sup> dans l'aorte et les artères mésentériques 24, 48 et 72 heures après l'administration de l'ODN nu et de l'ODN complexé aux liposomes. L'expression de la protéine est demeurée inchangée au niveau de l'aorte suite à l'administration de l'ODN nu et complexé à tous les temps observés (figure IV.5).

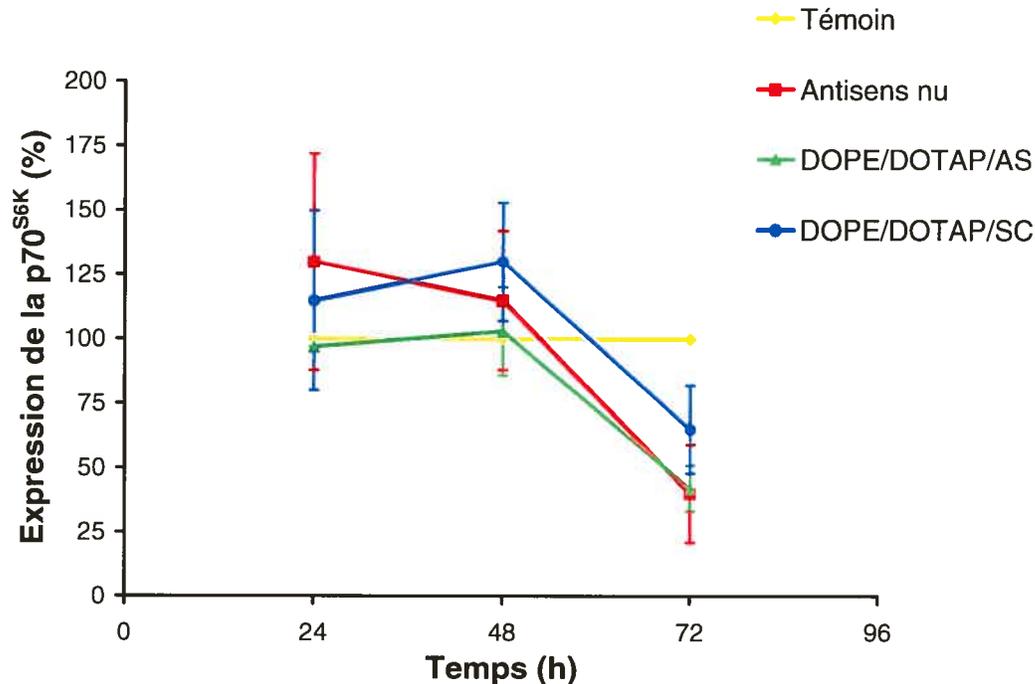


**Figure IV.5 Cinétique de l'expression de la p70<sup>S6K</sup> au niveau de l'aorte suite à l'administration de l'ODN nu, de l'ODN complexé à la formulation DOPE/DOTAP et de l'ODN témoin (SC) complexé à la formulation DOPE/DOTAP chez les rats non traités à l'endothéline.**

L'expression de la p70S6K chez les témoins est normalisé à 100% alors que l'expression de la protéine aux temps 24, 48 et 72 h représente un pourcentage du témoin (n=2 pour chaque temps et chaque formulation testée à l'exception de DOPE/DOTAP/SC à 72h n=1).

#### 4.3. Au niveau des petites artères du mésentère

En comparant les rats traités avec l'antisens et les rats non traités, on observe une diminution de l'expression de la p70<sup>S6K</sup> au niveau mésentérique environ 72 heures après l'injection (figure IV.6).



**Figure IV.6** Cinétique de l'expression de la p70<sup>S6K</sup> au niveau mésentérique suite à l'administration de l'ODN nu, de l'ODN complexé à la formulation DOPE/DOTAP et de l'ODN témoin (SC) complexé à la formulation DOPE/DOTAP chez les rats non traités à l'endothéline.

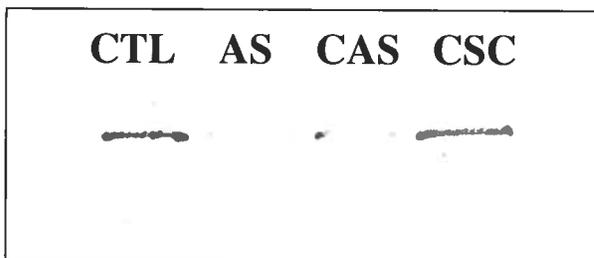
L'expression de la p70<sup>S6K</sup> chez les témoins est normalisé à 100% alors que l'expression de la protéine aux temps 24h, 48h et 72h représente un pourcentage du témoin (n=2 pour chaque temps et chaque formulation testée).

La complexation de l'ODN aux liposomes DOPE/DOTAP n'a pas permis d'améliorer la réponse obtenue avec l'ODN nu. En effet, la diminution de l'expression de la p70<sup>S6K</sup> dans les artères mésentériques 72 heures après l'administration de DOPE/DOTAP/AS s'est avérée comparable à la diminution observée suite à l'administration de l'antisens nu (figure IV.6). Ce résultat s'explique probablement par la

séparation du complexe *in vivo* et/ou son élimination rapide. Il est intéressant de noter que l'effet observé dans les artères mésentériques survient plus tardivement qu'au niveau plasmatique. De plus, l'antisens semble efficace au niveau des artères de résistance, un site de choix pour cibler le remodelage hypertrophique. La diminution de l'expression de la p70<sup>S6K</sup> suite à l'administration du témoin négatif, quoique moins importante que la diminution observée avec l'antisens, est inattendue et demeure sans explication.

#### 4.4. Témoin négatif (« Scrambled »)

L'administration d'un contrôle négatif ou « scrambled » n'a pas réduit l'expression de la p70<sup>S6K</sup> tant au niveau mésentérique (figure IV.7), qu'au niveau de l'aorte. En effet, l'expression de la p70<sup>S6K</sup> chez les rats contrôles était similaire à celle des rats ayant reçu l'injection du contrôle négatif jumelé aux liposomes DOPE/DOTAP (identifié CSC) à tous les temps étudiés, à l'exception d'une seule valeur inattendue tel que mentionné ci-haut. Nous croyons cependant qu'en augmentant le nombre d'expériences, nous aurions démontré que cette valeur est marginale. La dose de liposomes injectée était d'environ 48 mg/kg et le ratio N/P était de 4:1.

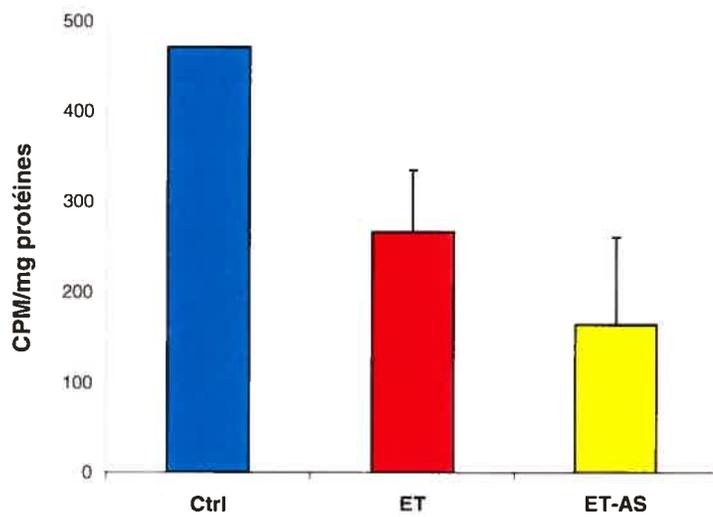


**Figure IV.7** Immunobuvardage de l'expression de la p70<sup>S6K</sup> au niveau mésentérique chez le rat témoin non traité (CTL), 72 heures après l'administration de l'ODN nu (AS), du complexe ODN antisens-liposomes (CAS) et du complexe ODN témoin « scrambled »-liposomes (CSC).

## 5. Efficacité de l'antisens chez le rat traité à l'ET

### 5.1. Synthèse protéique au niveau mésentérique

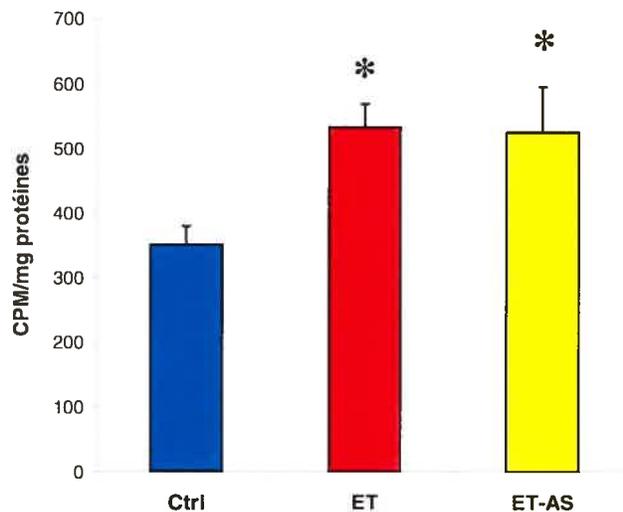
Nous avons vérifié si l'antisens dirigé contre la p70<sup>S6K</sup> pouvait empêcher les effets de l'ET sur la synthèse protéique, un marqueur de l'hypertrophie. Afin d'éviter l'anesthésie répétée de l'animal, nous avons installé la pompe d'ET au niveau intrapéritonéal le même jour que la canulation de la veine fémorale et que l'injection de l'ODN. Ainsi, l'animal recevait une dose d'ET pendant 72 heures, le temps nécessaire pour le début d'action de l'antisens au niveau des artères mésentériques. L'administration de l'antisens a permis d'inhiber la synthèse protéique chez les rats traités à l'ET. Cependant, nous n'avons pas observé d'augmentation de la synthèse protéique dans les artères mésentériques chez les rats traités avec l'ET seul pendant 72 heures (figure IV.8). Cette absence d'effet peut s'expliquer par le fait que les minipompes utilisées n'auraient pas libéré l'ET ou que sa libération étant épuisée n'aurait pas permis de maintenir le processus de synthèse protéique. L'effet observé avec l'antisens reflèterait peut-être alors l'inhibition de la synthèse protéique basale.



**Figure IV.8 Synthèse protéique au niveau mésentérique après l'administration de l'ODN nu chez les rats traités à l'ET pendant 72 heures.**

L'ODN a été administré à une dose de 1 mg/kg (n=2 pour chaque traitement à l'exception du témoin n=1). Il n'y a pas de différence statistiquement significative entre les groupes.

Puisqu'il est bien connu que l'administration d'ET pendant 24 heures augmente la synthèse protéique, nous avons préféré cette méthode. Pour ce faire, l'animal était anesthésié une première fois pour effectuer la canulation de la veine fémorale et l'injection de l'antisens, puis une seconde fois 48 heures plus tard pour l'installation intrapéritonéale de la minipompe d'ET. Enfin, l'animal était sacrifié 72 heures après l'administration de l'ODN, soit 24 heures après l'installation de la pompe. De cette façon, nous avons observé une augmentation de la synthèse protéique chez les rats traités à l'ET seul. Cependant, l'administration de l'antisens n'a pas permis d'empêcher ni de ralentir les effets de l'ET seul (figure IV.9).



**Figure IV.9 Synthèse protéique au niveau mésentérique après l'administration de l'ODN nu chez les rats traités à l'ET pendant 24 heures.**

L'ODN a été administré à une dose de 1 mg/kg, 72 h avant le sacrifice de l'animal alors que la minipompe osmotique libérant l'ET a été installée 24 h avant le sacrifice de l'animal (n=2 pour chaque traitement).

\*p<0.05 vs témoin.

## 6. Cinétique de l'antisens marqué complexé ou non avec un polymère

### 6.1. Généralités

Puisque les liposomes ne semblaient pas améliorer l'efficacité de l'ODN, nous avons opté pour une formulation différente, les micelles de polymères. Les micelles de polymères ont entre autres été choisies pour leur taille optimale, généralement plus petite que celle des liposomes (30 nm vs 100 nm). Pour cette partie de mes recherches, j'ai travaillé en collaboration avec Marie-Hélène Dufresne du laboratoire de Jean-Christophe Leroux. Marie-Hélène a synthétisé plusieurs polymères, chacun d'entre eux possédant des caractéristiques différentes pour la complexation d'ODN. Les complexes ont été étudiés pour leur habileté à augmenter le temps de circulation de l'ODN et,

éventuellement, son efficacité *in vivo*. Pour suivre l'ODN dans le sang, une méthode de marquage au  $^{35}\text{S}$  a été mise au point. Cette méthode consiste à utiliser l'enzyme T4 polynucléotide kinase pour ajouter un ATP marqué au  $^{35}\text{S}$  au bout de la chaîne d'ODN en 5'. La méthode nous a permis d'obtenir un ODN radioactif et de mesurer la radioactivité d'échantillons sanguins à l'aide de la méthode décrite par Mosqueira et al. [115]. De plus, nous avons dû établir une courbe de quench pour corriger la différence de mesure de radioactivité due à la coloration des échantillons.

## 6.2. Caractérisation des polymères et des complexes micellaires.

Les caractéristiques physico-chimiques des différents polymères synthétisés par Marie-Hélène Dufresne sont résumées dans le tableau IV-2.

**Tableau IV-2 Caractéristiques des polymères utilisés.**

Polymère	$M_n$ théo	$M_n$ RMN	Conc. N (mol/g)	$M_n$ CES	$M_w$ CES	IP
EG <sub>113</sub> A <sub>15</sub> <sup>†</sup>	7650	7100	0,001800248	6550	7700	1,17
EG <sub>113</sub> A <sub>15</sub> D <sub>15</sub> <sup>†</sup>	9850	7600	0,002083941	7100	8350	1,17
EG <sub>113</sub> A <sub>30</sub> <sup>†</sup>	10000	9650	0,002898463	7800	9300	1,19
EG <sub>45</sub> T <sub>15</sub> <sup>*</sup>	6750	6450	0,002313867	3850	4700	1,23

### Légende

$M_n$  théo : Masse molaire en nombre calculée selon l'apport en monomère dans le milieu réactionnel

$M_n$  RMN : Masse molaire en nombre déterminée par résonance magnétique nucléaire du proton

Densité N : Correspond à la densité d'azote par gramme de polymère. Calculée selon les données RMN

$M_n$  CES : Masse molaire en nombre déterminée par chromatographie d'exclusion stérique.

$M_w$  CES : Masse molaire en poids déterminée par chromatographie d'exclusion stérique.

IP : Indice de polymolécularité. Correspond au ratio  $M_w/M_n$ .

<sup>†</sup> Les valeurs de  $M_n$ ,  $M_w$  et IP sont celles obtenues pour un polymère précurseur contenant des monomères protégés (AEMABoc vs. AEMA)

<sup>\*</sup> Les valeurs de  $M_n$ ,  $M_w$  et IP sont celles obtenues pour un polymère précurseur, soit PEG<sub>45</sub>-b-PDMAEMA<sub>15</sub>

La taille des complexes a également été mesurée et les résultats sont résumés dans le tableau IV-3. La présence d'agrégats dans les formulations testées représentait une faible proportion de la population de particules (environ 5 à 10%). L'index de polydispersité nous donne un indice sur la distribution de la taille des complexes. En effet, le complexe ayant l'index de polydispersité le plus élevé présentait davantage d'agrégats que les autres formulations testées.

**Tableau IV-3 Caractéristiques des complexes micellaires (N/P 1 :1)**

<b>Complexes</b>	<b>Z Average<sup>†</sup> (nm)</b>	<b>Index de polydispersité<sup>†</sup></b>	<b>Particularités</b>
ODN - EG <sub>113</sub> A <sub>15</sub>	38.0	0.410	Présence d'agrégats +
ODN - EG <sub>113</sub> A <sub>15</sub> D <sub>15</sub>	41.7	0.377	-
ODN - EG <sub>113</sub> A <sub>30</sub>	128.8	0.99	Présence d'agrégats ++
ODN - EG <sub>45</sub> T <sub>15</sub>	98.6	0.309	Présence d'agrégats +

**Légende**

Z Average : Taille moyenne des complexes déterminée par la somme des intensités de la lumière diffusée.

Index de polydispersité : Variance relative.

<sup>†</sup> Les valeurs calculées représente une moyenne de 3 mesures de taille obtenues sans dilution.

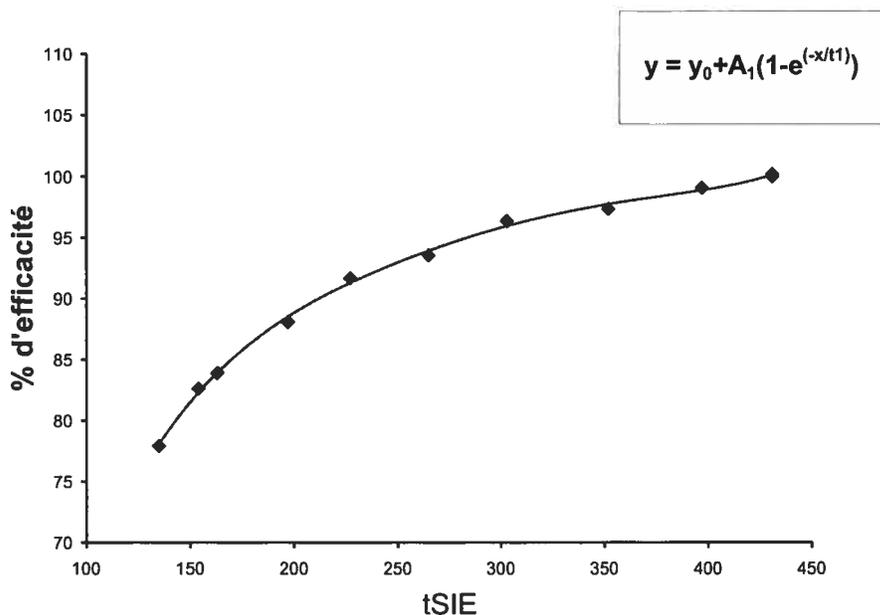
### 6.3. Courbe de quench

Les échantillons sanguins possédaient différentes colorations suite au traitement de solubilisation et de décoloration (voir méthodologie), ce qui induisait une erreur dans la mesure de radioactivité. Pour éliminer ce facteur de variabilité, nous avons entrepris de faire une courbe de quench. Nous avons obtenu pour chacun des volumes recueillis une valeur en cpm et une valeur de « tSIE » (un facteur d'opacité) pour lesquels nous avons

pu calculer un pourcentage d'efficacité de la mesure (tableau IV-4). À l'aide de ces valeurs, nous avons tracé une courbe de la radioactivité réelle (dpm) en fonction du facteur « tSIE » donné par l'appareil (modèle exponentiel). Cette courbe de calibration nous a ensuite permis calculer la radioactivité réelle des échantillons sanguins recueillis (Figure IV.10).

**Tableau IV-4 Résultats de radioactivité et de tSIE obtenus.**

<b>Échantillon #</b>	<b>Description</b>	<b>CPM</b>	<b>tSIE</b>	<b>% Efficacité</b>
1	Soluene, IPA, H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	14088.0	431	100.0
2	20 µL sang, soluene, IPA, H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	14110.6	431	100.2
3	40 µL sang, soluene, IPA, H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	13962.8	397	99.1
4	60 µL sang, soluene, IPA, H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	13720.0	352	97.4
5	80 µL sang, soluene, IPA, H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	13577.0	303	96.4
6	100 µL sang, soluene, IPA, H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	13184.6	265	93.6
7	120 µL sang, soluene, IPA, H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	12912.4	227	91.7
8	140 µL sang, soluene, IPA, H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	12410.6	197	88.1
9	160 µL sang, soluene, IPA, H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	11815.2	163	83.9
10	180 µL sang, soluene, IPA, H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	11630.6	154	82.6
11	200 µL sang, soluene, IPA, H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	10976.6	135	77.9



**Figure IV.10 Courbe de quench : pourcentage d'efficacité de la mesure de radioactivité suite à l'administration d'une solution radioactive d'ATP- $\gamma$ - $^{35}\text{S}$  à ~15 000 cpm/mL de plus en plus opaque.**

La quantité croissante de sang dans les échantillons augmente l'opacité de la solution radioactive. Par conséquent, plus l'opacité de l'échantillon est élevée, plus la valeur de « tSIE » obtenue est faible et plus le pourcentage d'efficacité de la lecture de la radioactivité est faible.

#### 6.4. Optimisation des études pharmacocinétiques

Nous avons d'abord mesuré la radioactivité (en cpm) des échantillons sanguins des rats traités avec l'ODN nu et des rats traités avec diverses formulations micellaires préparées à un ratio molaire N/P de 1 :1. Ces résultats n'ont pas permis de mettre en évidence une augmentation du temps de circulation de l'ODN complexé au polymères et ce, durant les 2 heures suivant l'injection. De plus, les mesures de radioactivité obtenues

chez un même rat étaient variables et erratiques. Effectivement, la méthode de décoloration des échantillons sanguins ne permet pas d'obtenir un liquide transparent, ni une coloration identique d'un échantillon à l'autre. Ces résultats préliminaires décevants nous ont poussé à identifier les facteurs susceptibles d'expliquer et d'améliorer l'expérimentation. Ces facteurs seront abordés dans les sections ci-dessous.

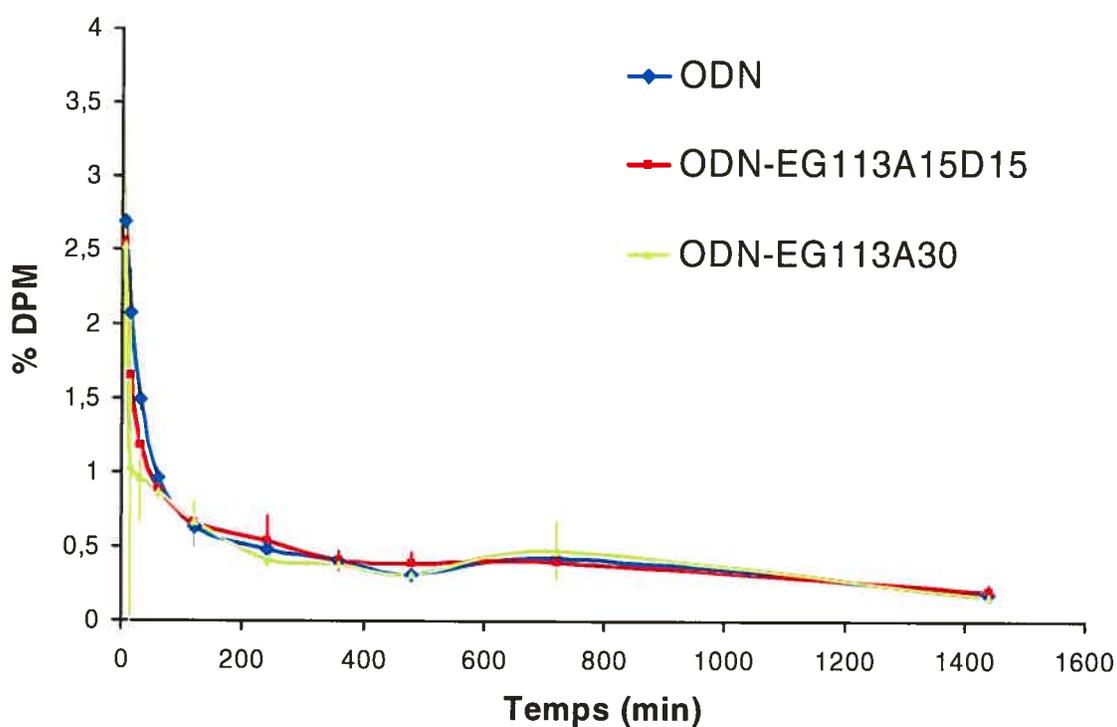
#### 6.4.1. CPM en pourcentage

Afin de rendre les résultats comparables entre eux, les valeurs de cpm obtenues ont été transformées en pourcentage de la dose administrée. En effet, tout au long des expérimentations, la valeur de radioactivité pouvait être réduite au cours du temps, car la demi-vie de l'isotope  $^{35}\text{S}$  est d'environ 44 à 76 jours. Puisque les expérimentations ont eu lieu sur plusieurs mois, nous voulions pouvoir comparer les résultats des premiers essais avec les derniers. Pour ce faire, nous avons mesuré la radioactivité de la dose d'ODN- $^{35}\text{S}$  injectée chez l'animal. Les valeurs de radioactivité obtenues pour les échantillons sanguins ou tissulaires ont ensuite été exprimées relativement à cette dose (en pourcentage).

#### 6.4.2. DPM

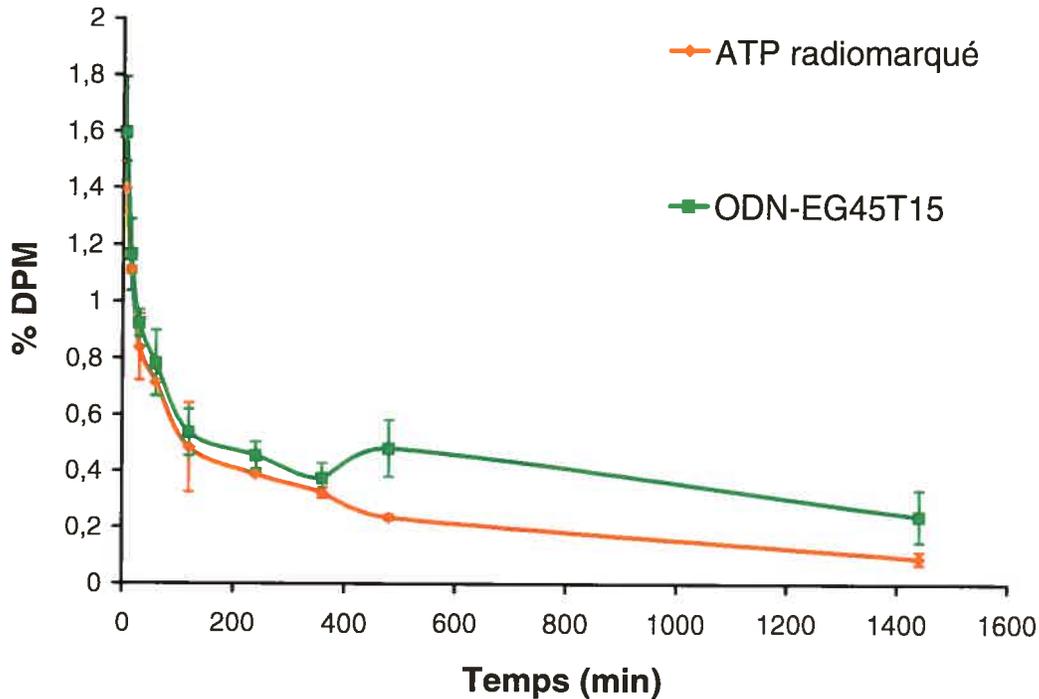
Afin de relativiser les valeurs de radioactivité obtenues en fonction de l'opacité de l'échantillon, nous avons conçu une courbe de quench, servant de courbe standard pour comparer les échantillons. Malgré nos efforts à exprimer les résultats en % de la dose injectée à partir des mesures de dpm, nous n'avons pas pu démontrer de différence de temps de circulation entre l'ODN libre et les différentes formulations d'ODN (figure

IV.11). Ces résultats se sont avérés surprenants puisqu'une augmentation du temps de circulation des complexes, même faible, était attendue [116]. À ce stade, nous avons émis l'hypothèse que le marqueur radioactif n'était peut-être pas conjugué à l'ODN mais bien libre. À cette fin, nous avons entrepris de mesurer la cinétique du marqueur radioactif seul, soit le nucléotide ATP- $\gamma$ - $^{35}\text{S}$ . Or, nous avons observé que l'ATP- $\gamma$ - $^{35}\text{S}$  est éliminé au même rythme que l'ODN complexé au polymère EG<sub>45</sub>T<sub>15</sub> (figure IV.12). Ces résultats suggèrent que l'ATP- $\gamma$ - $^{35}\text{S}$  se retrouve en grande partie libre dans la solution.



**Figure IV.11 Cinétique plasmatique de l'ODN- $^{35}\text{S}$  nu et complexé à deux polymères différents.**

La radioactivité mesurée est exprimée en dpm et en pourcentage de la dose d'ODN administrée (n=2 pour chaque formulation).



**Figure IV.12 Cinétique plasmatique de l'ATP-<sup>35</sup>S et de l'ODN-<sup>35</sup>S complexé au polymère EG<sub>45</sub>T<sub>15</sub>.**

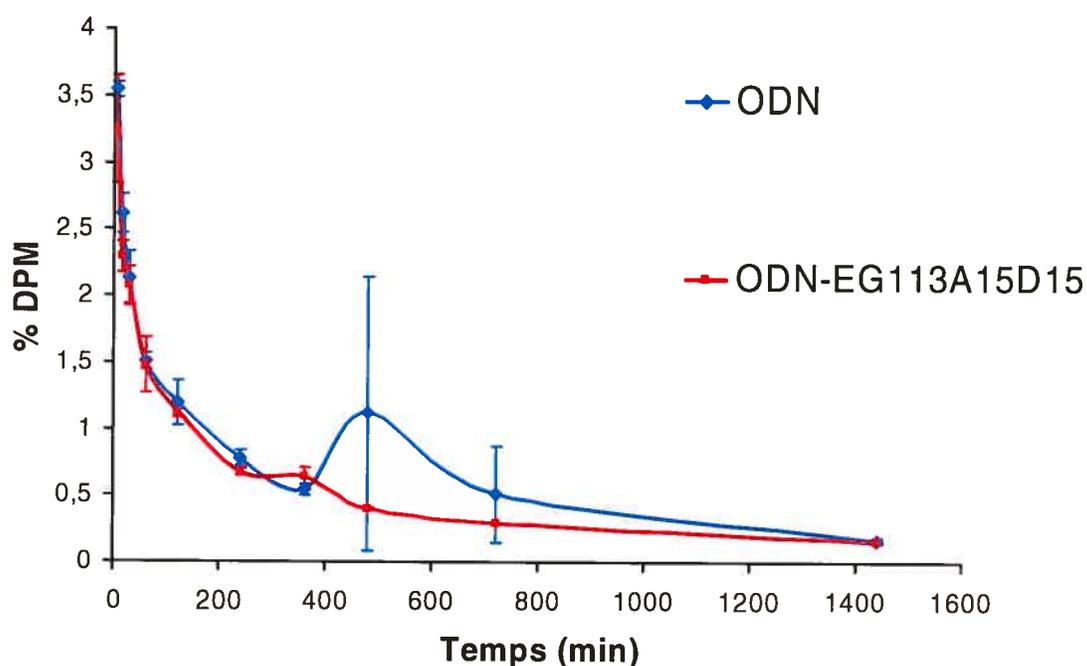
La radioactivité mesurée est exprimée en dpm et en pourcentage de la dose d'ODN administrée (n=2 pour l'ATP et n=4 pour l'ODN complexé).

#### 6.4.3. Purification de l'ODN radiomarqué

Nous avons donc amélioré la méthode de marquage de l'ODN en ajoutant davantage d'ATP radioactif et d'ODN dans la réaction. De plus, nous avons passé l'ODN marqué sur plusieurs minicolonnes MicroSpin G-25 afin d'éliminer le plus d'ATP radioactif non libre possible. Après passage sur trois colonnes, nous avons pu éliminer 91% de l'ATP libre.

Malgré ces ajustements, nous n'avons toujours pas été capables de démontrer un effet de la complexation de l'ODN aux polymères. Comme le montre la figure IV.13,

environ 35% de l'ODN radiomarqué disparaît de la circulation sanguine 15 minutes seulement après l'injection et environ 60% disparaît 60 minutes après l'injection du polyplexe. Cette observation pourrait refléter l'incorporation partielle de l'ODN dans les complexes ou la décomplexation de l'ODN suite à l'administration *in vivo*. Pour valider ces hypothèses, nous avons étudié les complexes par gel d'électrophorèse.



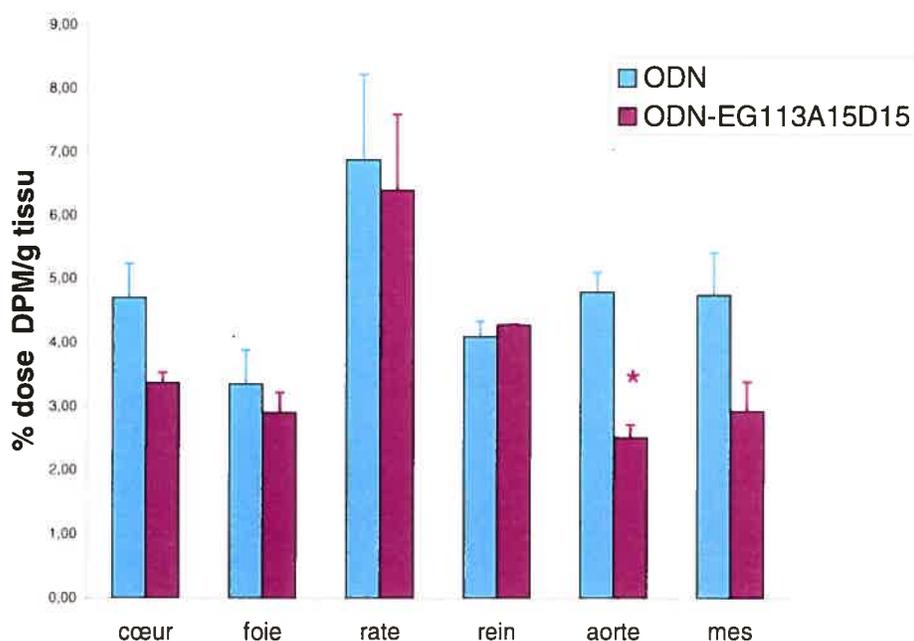
**Figure IV.13 Cinétique plasmatique de l'ODN-<sup>35</sup>S nu et complexé au polymère EG<sub>113</sub>A<sub>15</sub>D<sub>15</sub>.**

La radioactivité mesurée est exprimée en dpm et en pourcentage de la dose d'ODN administrée (n=2 pour chaque formulation).

### 6.5. Biodistribution des complexes

Nous avons observé la radioactivité dans différents tissus 24 heures après l'administration des polyplexes radiomarqués (figure IV.14). Nous avons remarqué une

diminution significative de la pénétration de l'ODN complexé dans l'aorte. Ce phénomène pourrait être souhaitable dans la mesure où nous ciblons les petites artères plus spécifiquement pour étudier l'hypertrophie vasculaire. Par contre, la complexation de l'ODN au polymère EG<sub>113</sub>A<sub>15</sub>D<sub>15</sub> n'a pas permis d'augmenter la pénétration de l'ODN dans les tissus souhaités, i.e. les artères mésentériques. Par ailleurs, les polyplexes ne s'accumulent pas au niveau du foie ou la rate, ce qui pourrait signifier que l'opsonisation des complexes était minime ou qu'il y a eu décomplexation *in vivo*.



**Figure IV.14 Biodistribution de l'ODN-35S nu et complexé au polymère EG<sub>113</sub>A<sub>15</sub>D<sub>15</sub> 24 heures après leur administration.**

La radioactivité mesurée est exprimée en dmp en fonction du poids du tissu prélevé et en pourcentage de la dose d'ODN radiomarqué administrée (n=2). \*p<0.05

## 6.6. Effet du ratio de charge sur l'incorporation de l'ODN

Des complexes ont été préparés avec un ODN marqué à la fluorescéine à différents ratios molaires N/P. Les complexes ont été incubés ou non pendant une heure à 37°C en présence de plasma de rat. Les polymères ont ensuite été appliqués sur un gel de polyacrylamide 20 % et les bandes visualisées à l'aide de la caméra AlphaImager. Une incorporation efficace et stable de l'ODN se traduit par un retard sur gel de la bande de l'ODN. Nous avons observé que l'ODN ne demeurait pas lié aux différents polymères au ratio de 1:1 (ratio utilisé jusqu'alors dans les études *in vivo*) et ce, même sans incubation (figure IV.15). Par contre, une augmentation du ratio N/P a permis la formation de complexes stables capables de retenir l'ODN, avec un ratio optimal se situant autour de 4:1.

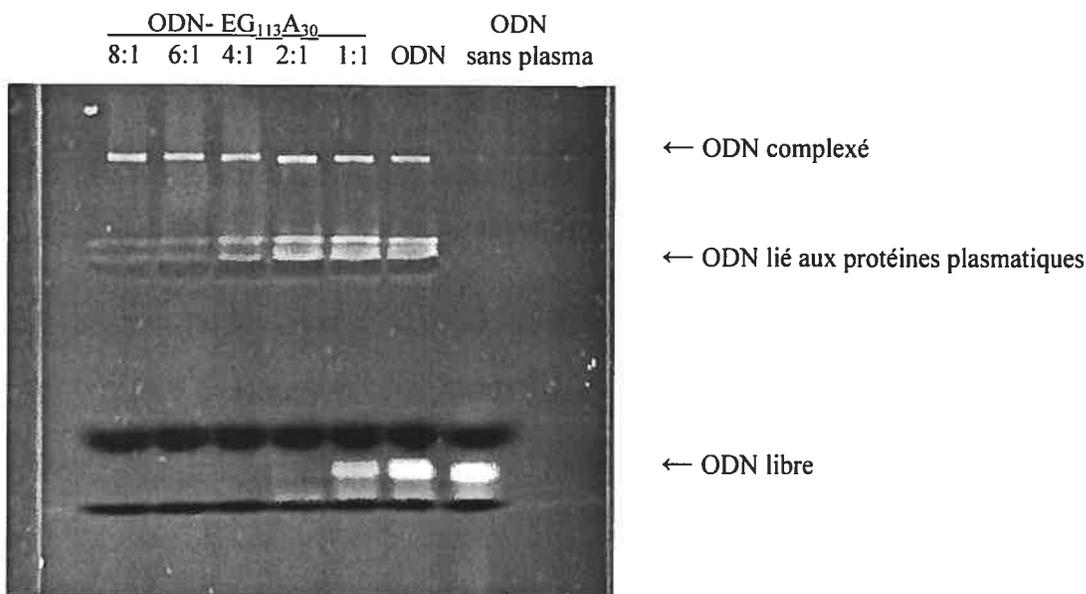
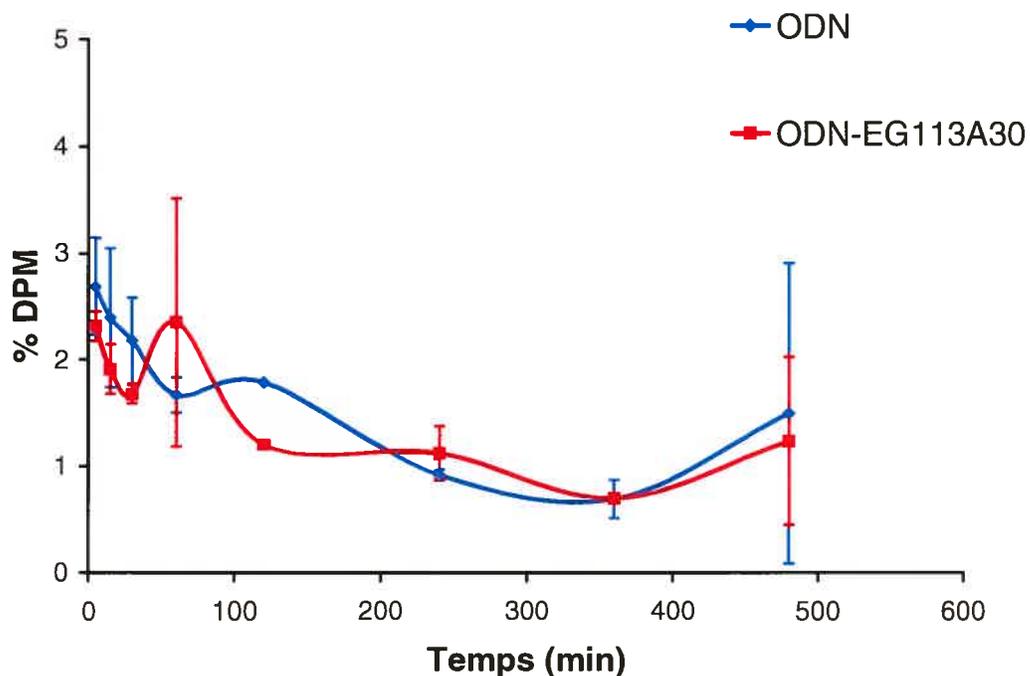


Figure IV.15 Complexation de l'ODN fluorescent avec le polymère EG<sub>113</sub>A<sub>30</sub> dans un gel de polyacrylamide 20% (avec plasma 50%).

Avec ces résultats en main, nous avons performé une dernière pharmacocinétique pour le complexe ODN-EG<sub>113</sub>A<sub>30</sub> préparé à un ratio molaire N/P de 4:1. Encore une fois, nous n'avons pas observé d'amélioration significative du temps de circulation de l'ODN à l'aide du véhicule utilisé (voir figure IV.16).



**Figure IV.16 Cinétique plasmatique de l'ODN-<sup>35</sup>S nu et complexé au polymère EG<sub>113</sub>A<sub>30</sub> dans un rapport N/P de 4:1.**

La radioactivité mesurée est exprimée en dpm et en pourcentage de la dose d'ODN administrée (n=2 pour chaque formulation).

## V. DISCUSSION

Bien des molécules utilisées chez l'homme pour réduire la pression artérielle bloquent la voie de signalisation de l'ANG II : l'énalapril et le losartan, par exemple, sont respectivement un inhibiteur de l'ECA et un bloqueur des récepteurs AT<sub>1</sub> de l'ANG II. En plus d'être un agent vasoconstricteur, l'ANG II possède des propriétés indépendantes de ses effets sur la pression artérielle pouvant être néfastes sur l'organisme. Il a été démontré que l'ANG II peut induire la croissance hypertrophique des CMLV en augmentant la synthèse protéique de ces cellules sans provoquer une augmentation de la pression artérielle chez le rat [14]. Par ailleurs, l'ANG II active la production de l'ET, un peptide également capable d'engendrer la prolifération et l'hypertrophie des cellules musculaires lisses. De plus, l'inhibition du récepteur ET-A prévient plusieurs complications vasculaires liées à l'hypertension. Plusieurs évidences suggèrent également que la voie de la PI3K est impliquée dans le remodelage de type hypertrophique. Giasson et al. (1995) ont montré que la p70<sup>S6K</sup> joue un rôle clé dans la voie de signalisation de l'ANG II pour induire l'hypertrophie des cellules musculaires lisses du tissu vasculaire [80]. De plus, il a été démontré *in vivo* que l'inhibition de la protéine mTOR par la rapamycine permet de freiner la synthèse protéique engendrée par l'administration d'ANG II chez le rat [74]. Nous avons tenté de démontrer que l'inhibition de la p70<sup>S6K</sup> prévient le remodelage hypertrophique engendré par l'ET *in vivo*. La thérapie antisens s'avérait une avenue tout à fait intéressante pour empêcher la synthèse de p70<sup>S6K</sup>.

## 1. Expression de la p70<sup>S6K</sup> chez le rat traité à l'ET

L'administration d'ET par minipompe osmotique pendant 24 heures permet de stimuler l'expression et la phosphorylation de la p70<sup>S6K</sup> au niveau mésentérique. Ces résultats suggèrent que la p70<sup>S6K</sup> jouerait un rôle dans la signalisation cellulaire engendrée par l'ET *in vivo*. De plus, ces résultats concordent avec une étude *in vitro* publiée en 2002 par Wang et al. démontrant l'activation de S6K1 par l'ET dans les cardiomyocytes [117]. Cette étude démontre que l'administration d'ET dans ces cellules augmente la phosphorylation de S6K1 et que cette phosphorylation est maximale 30 minutes après l'administration d'ET [117]. Cependant, cette étude ne démontre pas d'augmentation d'expression de S6K1 suite à l'administration d'ET.

## 2. Caractérisation de l'antisens

Nous avons d'abord observé l'expression de la p70<sup>S6K</sup> au niveau plasmatique et nous avons observé une diminution de l'expression de la protéine environ 48 heures suite à l'administration bolus de deux doses différentes de l'ODN nu, dans la mesure où cet effet est spécifique à l'ODN. Nous avons estimé que notre protéine d'intérêt nécessite entre 24 et 48 heures avant d'être renouvelée dans la cellule et qu'il est possible de voir les effets de l'ODN antisens environ 48 heures après son administration. Toutefois, pour confirmer cette hypothèse, le contrôle « scrambled » devrait être utilisé afin d'éliminer la présence d'un effet non spécifique de l'ODN.

Nous n'avons observé aucune différence entre les deux doses d'ODN utilisées, i.e. 1 vs 10 mg/kg. Cette observation suggère que l'antisens inhibe la synthèse de p70<sup>S6K</sup> peu

importe la dose, ce qui pouvait remettre en doute son mécanisme d'action. L'inhibition de la synthèse de p70<sup>S6K</sup> devrait normalement être dépendante de la dose, i.e. plus la dose d'antisens est élevée, plus on réduit l'expression de l'enzyme. Plusieurs facteurs peuvent expliquer pourquoi nous n'avons pas observé ce phénomène. L'une des possibilités est que nous avons observé un effet toxique de l'antisens, non relié à son mécanisme d'action. Afin d'éliminer cette éventualité, nous avons mesuré de façon qualitative l'expression d'une autre protéine non apparentée, ERK 1/2, suite à l'administration de l'antisens dirigé contre l'ARNm de la p70<sup>S6K</sup>. Puisque l'expression de ERK1/2 est demeurée inchangée, il est très probable que la diminution de l'expression de la p70<sup>S6K</sup> observée suite à l'administration de l'antisens soit reliée à son mécanisme d'action. L'explication la plus plausible de cette observation serait que nous ayons dépassé un certain point d'inhibition maximale et que nous ayons atteint un plateau. Ainsi, avec de plus petites doses, il aurait été possible d'observer une courbe dose-réponse linéaire. Les doses utilisées dans la littérature peuvent varier d'une étude à l'autre : une étude chez le rat a permis de démontrer une diminution prolongée de la pression artérielle suite à l'administration d'une seule dose d'antisens dirigé contre l'ARNm du récepteur AT<sub>1A</sub> de l'ANG II à raison de 0.33 mg/kg [118]. Par ailleurs, d'autres études rapportent l'efficacité d'une dose d'ODN administrée de 200 µg par rat (soit environ 0.7 mg/kg) [100], et de 1 mg/kg [87]. De plus, il aurait probablement été plus facile d'observer une courbe dose-réponse à l'aide d'un tissu renfermant une plus grande concentration de la protéine étudiée, dans les lymphocytes par exemple.

### 3. Optimisation de l'efficacité de l'ODN : Conception des liposomes

#### DOPE/DOTAP

Afin de complexer 0,3 mg de l'ODN aux liposomes DOPE/DOTAP, nous avons opté pour un rapport de charges positives/négatives (+/-) de 4:1. Zhang et al. ont étudié l'efficacité de plusieurs ratio de charges à l'aide de liposomes DOPE/DOTAP et d'un ODN 15-mer dirigé contre l'ARNm du récepteur adrénergique  $\beta_1$  [87]. Le ratio de charges optimal, i.e. celui qui procurait une baisse de la pression artérielle la plus prolongée, était de 2.5:1 (+/-) [87], ce qui est similaire au ratio utilisé dans nos expériences. L'augmentation des charges positives par rapport aux charges négatives permet de s'assurer que toutes les charges négatives sont liées. Autrement dit, on entoure l'ODN de charges positives pour protéger sa destruction et favoriser sa pénétration à travers la bicouche phospholipidique de la membrane cellulaire. Les charges positives favorisent l'internalisation du complexe par endocytose [119]. Le ratio +/- est critique pour déterminer les caractéristiques physico-chimiques du complexe. L'étude de ces caractéristiques après l'addition du vecteur DOPE/DOTAP a démontré que l'agrégation et la fusion est induite par l'ODN pour un ratio de charge +/- optimal entre 2.5 et 0.5 [120]. Ces ratios forment des complexes d'environ 1  $\mu\text{m}$ .

Après extrusion sur un filtre de 100 nm, une seconde extrusion sur un filtre de 50 nm et la combinaison des échantillons, nous avons obtenu une taille moyenne des liposomes d'environ 90 nm. La taille des liposomes permet de s'assurer que ces derniers ne s'agglomèrent pas dans les capillaires, les plus petits vaisseaux sanguins. Il est à noter qu'un globule rouge mesure 8  $\mu\text{m}$  de diamètre. Cependant, une fois dans la circulation

sanguine, les liposomes complexés à l'ODN peuvent s'agglomérer et former des complexes beaucoup plus gros. Les caractéristiques physico-chimiques des liposomes telles que leur taille, leur composition et leurs charges influencent leur pharmacocinétique. On observe généralement de l'agrégation dans le sérum.

#### 4. Cinétique de l'expression de la p70<sup>S6K</sup> suite à une administration bolus de l'antisens nu ou de l'antisens incorporé dans une formulation liposomale

L'ODN nu ainsi que l'ODN complexé à la formulation liposomale DOPE/DOTAP se sont avérés inefficaces pour inhiber l'expression de la protéine visée au niveau de l'aorte. L'absence d'efficacité de l'antisens au niveau de l'aorte peut être expliqué par le fait que l'aorte, un vaisseau de conductance, possède une paroi vasculaire beaucoup plus épaisse et contenant plus de matériel élastique que les artérioles mésentériques, des vaisseaux de résistance. Par conséquent, l'antisens pénètre plus difficilement l'aorte. Or, la formulation liposomale ne semble pas exercer l'effet désiré, c'est-à-dire améliorer la pénétration cellulaire et tissulaire de l'ODN. L'hypothèse serait que les liposomes s'accumuleraient au niveau pulmonaire, hépatique et/ou au niveau de la rate suite à leur opsonisation [96]. En effet, la liaison des protéines sériques à la surface des liposomes joue un rôle critique dans l'élimination des liposomes de la circulation sanguine. L'ajout de PEG à la surface des liposomes permet de stabiliser le système, de réduire l'opsonisation des liposomes et ainsi augmenter leur temps de circulation. L'utilisation de liposomes greffé avec des molécules de PEG aurait été une alternative

intéressante. Cependant, la couche protectrice de PEG empêche l'internalisation dans les cellules. L'utilisation d'un ligand aurait également pu être envisagé [106].

Par ailleurs, la formulation liposomale n'a pas amélioré l'efficacité de l'antisens au niveau mésentérique non plus, ce qui pourrait laisser croire que nous avons observé l'effet de l'antisens nu. L'ODN se serait détaché rapidement du complexe avec les liposomes. La mesure du potentiel zêta nous aurait indiqué si l'ODN était effectivement bien complexé par interactions électrostatiques aux liposomes dans le tampon. La stabilité de la liaison suite à l'incubation dans le plasma aurait pu être déterminée par électrophorèse. Une autre possibilité serait une fois de plus que les complexes liposomes-ODN, de type phosphorothioate, seraient liés aux opsonines et phagocytés par les macrophages. En effet, la capture des véhicules colloïdaux par le système de phagocytes mononucléés suite à l'administration intraveineuse est un obstacle majeur [115]. Une étude de pharmacocinétique et de biodistribution nous aurait renseigné sur la nature du complexe après son injection *in vivo*.

## 5. Efficacité de l'antisens chez le rat traité à l'ET

Suite à l'administration d'ET pendant 24 heures, nous avons observé une augmentation de la synthèse protéique chez les rats traités à l'ET seul. Cependant, l'administration de l'antisens n'a pas permis d'empêcher ni de ralentir les effets de l'ET seul. La complexation de l'ODN avec les liposomes ne s'est pas avérée plus efficace que l'ODN nu. Il est possible que l'ODN injecté ait réduit la traduction de la p70<sup>S6K</sup> de façon

insuffisante pour ralentir la synthèse protéique induite par l'ET. Une autre explication serait que l'inhibition de la synthèse de p70<sup>S6K</sup> ne soit pas suffisante pour bloquer l'activation de la protéine ribosomale S6 suite à l'administration d'ET. La phosphorylation de S6 et la traduction d'ARNm dépendante de cette voie se déroulent normalement dans les fibroblastes de souris manquant le gène S6K1, suggérant un mécanisme compensatoire des fonctions de S6K1 [81]. S6K2 phosphoryle S6 *in vitro* [81]. De plus, une augmentation de l'ARNm de S6K2 a été observée chez les souris knockout pour S6K1 [81]. S6K1 et S6K2 possèdent une grande homologie. De récentes évidences suggèrent que les deux kinases, S6K1 et S6K2, soient requises pour une phosphorylation complète de S6, mais que S6K2 jouerait en rôle prépondérant dans la phosphorylation de S6 [121]. En effet, on observe une diminution plus importante de la quantité de S6 phosphorylée chez la souris knockout pour S6K2, par rapport à la souris knockout pour S6K1 [121].

Dans l'hypothèse où S6K1 ne serait pas impliquée dans les effets trophiques de l'ET, la littérature ne rapporte qu'une seule étude à notre connaissance démontrant que l'administration d'ET *in vitro* augmente la phosphorylation de S6K2 de façon MEK-dépendante [122]. Toutefois, une étude de Beaucage et al. a démontré que l'inhibition de la voie MEK ne modifie pas la synthèse protéique augmentée par l'ET *in vivo* [16]. Il serait intéressant d'évaluer lors d'études subséquentes le rôle de S6K2 dans l'hypertrophie vasculaire engendrée par l'ET *in vivo*. Une étude récente a démontré que l'hypertrophie cardiaque ne semble pas dépendante des S6Ks [123]. En effet, l'absence des gènes S6K1 et S6K2 n'a eu aucun impact sur le développement de l'hypertrophie

cardiaque pathologique, physiologique ou induite par surexpression de IGF1R-PI3K [123]. Ainsi, plusieurs modèles différents d'hypertrophie cardiaque ont été utilisés dans cette étude pour tester l'implication des S6Ks. Tel que le mentionnent les auteurs de cette étude, on ne peut exclure la présence d'un mécanisme compensatoire masquant le rôle des S6Ks dans des conditions normales. Notre modèle d'hypertrophie vasculaire par l'administration d'ET ressemble au modèle de surexpression de PI3K utilisé dans l'étude précédente dans la mesure où on stimule une voie de signalisation connue pour engendrer l'hypertrophie. Il est possible que S6K1 et S6K2 ne jouent pas un rôle prépondérant tant dans l'hypertrophie cardiaque que dans l'hypertrophie d'origine vasculaire. Toutefois, les protéines jouant un rôle clé dans le remodelage hypertrophique au niveau vasculaire pourraient être différentes qu'au niveau cardiaque. La modulation d'un signal, son amplitude, sa durée, l'interaction avec d'autres voies de signalisation, jouent un rôle important dans l'effet physiologique [124]. Cette régulation est permise grâce à des protéines d'échaffaudage, inhibitrices et adaptatrices. Ensemble, ces modulateurs peuvent déterminer le comportement biologique de la voie de signalisation [124]. Ainsi, une modulation différente peut avoir lieu au niveau cardiaque qu'au niveau vasculaire. Pour confirmer cette hypothèse, une étude portant sur l'inhibition simultanée de S6K1 et de S6K2 suite à l'administration de deux ODN chez le rat traité à l'ET pourrait nous indiquer si la synthèse protéique demeure inchangée ou non au niveau des artères de résistance et si les S6Ks jouent un rôle essentiel dans l'hypertrophie de type vasculaire.

Tel que mentionné plus tôt, la phosphorylation de S6 induit la traduction d'un groupe important d'ARNm de type 5'TOP [72, 73]. Il serait attendu que la suppression

des gènes S6K1 et S6K2 empêchent la traduction de ces ARNm. Or, la progression du cycle cellulaire et la traduction d'ARNm de type 5'-TOP demeurent modulées par les mitogènes de façon rapamycine-dépendante dans les cellules de souris knockout pour S6K1 et S6K2 [121]. Ainsi, la rapamycine inhibe la traduction d'ARNm de type 5'-TOP malgré l'absence des S6Ks. De façon surprenante, la protéine S6 demeure phosphorylée chez les souris knockout pour S6K1 et S6K2 [121]. La p90rsk, une kinase MAPK-dépendante, serait à l'origine de la phosphorylation de S6 chez ces souris [121]. Cette phosphorylation de S6 par p90rsk pourrait représenter une voie de signalisation compensatoire de S6K1 et S6K2, ou la présence d'une voie normalement masquée par les S6Ks [121]. Ainsi, en plus d'évaluer le rôle de S6K2, il serait également intéressant dans une étude future d'analyser l'impact de l'inhibition de la p90rsk sur la synthèse protéique dans notre modèle d'hypertrophie vasculaire.

Par ailleurs, on retrouve dans la littérature plusieurs études sur les possibilités thérapeutiques des antisens *in vivo*. Il est possible que l'antisens conçu dans le cadre de mes recherches soit peu efficace pour inhiber l'ARNm et empêcher la synthèse de p70<sup>S6K</sup> *in vivo*. Le manque de consistance des résultats illustrent un problème de reproductibilité et de variabilité interindividuelle élevée. L'anticorps utilisé pour reconnaître et mesurer la p70<sup>S6K</sup> mettait en évidence plusieurs bandes, dont probablement la p85<sup>S6K</sup>. Un anticorps plus sélectif aurait peut-être permis de mettre en évidence une différence plus subtile. Un anticorps dirigé contre la p85<sup>S6K</sup> aurait pu confirmer que l'antisens possédait une efficacité spécifique. Il n'existe malheureusement pas d'anticorps disponible commercialement pour cette protéine. L'utilisation d'une autre thérapie génique pourrait

également être une voie intéressante pour la poursuite de ce projet. Par exemple, l'essai de la technologie des siRNA (« small interfering RNA ») permettrait l'inhibition de l'expression d'un gène et pourrait s'avérer plus performant que l'ODN antisens utilisé.

## 6. Cinétique de l'antisens marqué complexé ou non avec un polymère

Puisque les liposomes ne semblaient pas améliorer l'efficacité de l'ODN, nous avons opté pour une formulation différente, les micelles de polymères. Les copolymères blocs choisis forment des micelles par interaction électrostatique. Ces micelles sont stabilisées par une couronne de PEG qui permet en principe de minimiser l'interaction avec les protéines sanguines. Les copolymères EG<sub>113</sub>A<sub>15</sub> et EG<sub>113</sub>A<sub>30</sub> ont été spécifiquement choisis du fait qu'ils permettent d'obtenir des complexes relativement stables à pH physiologique (leur pK<sub>a</sub> de 7.1 assure un niveau de protonation (ou d'ionisation) suffisant pour former des complexes stables). Le copolymère EG<sub>113</sub>A<sub>15</sub>D<sub>15</sub> a été synthétisé dans le but de maximiser la capacité tampon du polymère (présence du monomère DMAEMA dont le pK<sub>a</sub> est plus faible), tout en assurant la stabilité des micelles à pH physiologique (présence du monomère AEMA dont le pK<sub>a</sub> est plus élevé). Le copolymère EG<sub>45</sub>T<sub>15</sub> a été utilisé pour éliminer l'effet du pH sur la stabilité des micelles. En effet, ce polymère possède des amines quaternaires qui sont, par définition, chargées de façon permanente. Les micelles formées à base de ce polymère sont donc aussi stables à pH neutre qu'à pH acide, et permettant de mettre en évidence une augmentation du temps de circulation.

La complexation de l'ODN aux polymères dans un rapport molaire N/P de 1:1 n'a pas permis de ralentir l'élimination de l'ODN durant les deux heures suivant l'injection et ce, même après l'ajustement des valeurs obtenues en fonction de la dose de départ et de la coloration de l'échantillon. Deux hypothèses susceptibles d'expliquer les résultats ont alors été proposées : d'abord, le marqueur radioactif n'était peut-être pas lié à l'ODN, nous empêchant de voir correctement l'effet du polymère sur la cinétique de ce dernier et, d'autre part, le complexe ODN-polymère n'était pas optimal.

Nous avons observé que l'ATP- $\gamma$ -<sup>35</sup>S était éliminé au même rythme que l'ODN complexé au polymère nommé EG<sub>45</sub>T<sub>15</sub>. Ces résultats suggèrent que l'ATP- $\gamma$ -<sup>35</sup>S n'était en effet pas totalement lié à l'ODN et que l'échantillon d'ODN contenait un mélange d'ODN radiomarqué et d'ATP- $\gamma$ -<sup>35</sup>S libre. Nous avons alors amélioré la méthode de marquage de l'ODN dans le but d'éliminer le plus d'ATP libre possible. Après cette optimisation, nous nous attendions à voir des cinétiques plasmatiques de l'ODN complexé aux polymères décalées vers le haut par rapport à l'ODN nu ou à l'ATP radioactif. Une courbe décalée vers le haut représente une augmentation de l'aire sous la courbe ainsi qu'une augmentation de la biodisponibilité de l'ODN. Malheureusement, aucun des complexes ODN-polymère n'a permis d'augmenter le temps de circulation de l'ODN.

Ces derniers résultats semblent donc indiquer que les complexes sont instables dans le sang, les liens électrostatiques entre l'ODN et le polymère étant probablement insuffisants. À l'aide d'essais *in vitro* sur gel de polyacrylamide, nous avons observé que

l'ODN était faiblement lié aux différents polymères au ratio utilisé. Nous avons donc essayé d'augmenter le rapport N/P afin d'améliorer la complexation de l'ODN au polymère. Pour deux des polymères testés (soit EG<sub>113</sub>A<sub>30</sub> et EG<sub>45</sub>T<sub>15</sub>), nous avons observé qu'une augmentation du ratio N/P permettait d'obtenir des complexes plus stables, le ratio optimal se situant autour de 4 :1.

Malgré toutes les améliorations apportées au marquage de l'ODN, à la façon de mesurer la radioactivité, et à la complexation de l'ODN au polymère, nous n'avons pas été en mesure de démontrer une augmentation du temps de circulation de l'ODN complexé au niveau sanguin ni une augmentation de la pénétration tissulaire de l'ODN. À ce stade, les études pharmacocinétiques des autres polymères au rapport de molaire N/P de 4 :1 n'ont pas été tentées. Notre incapacité à mettre en évidence une diminution de la clairance des différentes formulations d'antisens testées pourrait être expliqué par le faible échantillonnage (n=2 rats par formulation testée). Un échantillonnage plus élevé pourrait révéler une différence statistiquement significative. De plus, des travaux futurs visant à améliorer les tailles des micelles pourraient être effectués. En effet, toutes les formulations injectées présentaient des distributions de taille bimodales avec une population de micelles agrégées susceptibles d'être rapidement éliminées de la circulation. Des résultats obtenus dans le laboratoire de Jean-Christophe Leroux mettent en évidence un effet de la concentration sur la formation des micelles. Ainsi, le mélange de solutions d'ODN et de polymère concentrées donne lieu à des complexes plus larges et/ou agrégats comparativement au mélange de solutions diluées (résultats non présentés). Des micelles possédant une distribution de taille unimodale (dans un volume facilement

injectable) pourraient donc être obtenues en concentrant une solution micellaire diluée sous vide à l'aide d'un SpeedVac®.

## VI. CONCLUSION

Plusieurs évidences suggèrent que la voie de la PI3 kinase et que l'ET sont des joueurs clés dans le remodelage de type hypertrophique. Nous avons tenté de démontrer que l'inhibition de la p70<sup>S6K</sup> prévient le remodelage hypertrophique engendré par l'ET *in vivo* à l'aide de la technologie antisens. L'ODN dirigé contre l'ARNm de la protéine ciblée, soit la p70<sup>S6K</sup>, a permis de réduire l'expression de la protéine dans les artères mésentériques, lieu de prédilection pour observer les conséquences de cette inhibition sur l'hypertrophie vasculaire. Nous avons démontré que l'administration d'ET stimule l'expression et la phosphorylation de la p70<sup>S6K</sup> chez le rat. Toutefois, d'autres expérimentations sont nécessaires pour démontrer que l'inhibition de la p70<sup>S6K</sup> prévient le remodelage hypertrophique engendré par l'ET *in vivo*.

La thérapie antisens demeure une avenue intéressante et il s'agit de mettre au point le véhicule approprié pour en observer l'efficacité pharmacologique. Les prochaines étapes consisteraient à optimiser le temps de circulation de l'ODN lié au vecteur puis à ajouter un ligand au polymère ou au liposome afin de maximiser l'internalisation par les cellules cibles. Ainsi, le vecteur présenterait à sa surface un ligand peptidique spécifique pour un récepteur donné, par exemple ET-B. L'essai d'un antisens dirigé contre une partie différente de l'ARNm ciblé pourrait également s'avérer intéressant afin de comparer l'efficacité pharmacologique des deux antisens. Bref, ce projet a permis de développer de nouveaux outils qui peuvent encore être exploités davantage.

## VII. RÉFÉRENCES

1. Wielgosz A AM, Carew M, Ferguson A, Johansen H, Nair C et al., Le nouveau visage des maladies cardiovasculaires et des accidents vasculaires cérébraux au Canada. pp. 1-109. Fondation des maladies du coeur, Ottawa, Canada, 1999.
2. Bolli P, Myers M and McKay D, Applying the 2005 Canadian Hypertension Education Program recommendations: 1. Diagnosis of hypertension. *Cmaj* **173**(5): 480-3, 2005.
3. Marieb E, *Anatomie et physiologie humaines*, Saint-Laurent, Canada, 1993.
4. Mayet J and Hughes A, Cardiac and vascular pathophysiology in hypertension. *Heart* **89**(9): 1104-9, 2003.
5. d'Uscio LV, Barton M, Shaw S, Moreau P and Luscher TF, Structure and function of small arteries in salt-induced hypertension: effects of chronic endothelin-subtype-A-receptor blockade. *Hypertension* **30**(4): 905-11., 1997.
6. Mulvany MJ, Small artery remodeling and significance in the development of hypertension. *News Physiol Sci* **17**: 105-9, 2002.
7. Fajardo LF, The complexity of endothelial cells. A review. *Am J Clin Pathol* **92**(2): 241-50, 1989.
8. Heagerty AM, Aalkjaer C, Bund SJ, Korsgaard N and Mulvany MJ, Small artery structure in hypertension. Dual processes of remodeling and growth. *Hypertension* **21**(4): 391-7, 1993.
9. Rizzoni D, Porteri E, Guefi D, Piccoli A, Castellano M, Pasini G, Muiesan ML, Mulvany MJ and Rosei EA, Cellular hypertrophy in subcutaneous small arteries of patients with renovascular hypertension. *Hypertension* **35**(4): 931-5, 2000.
10. Schiffrin EL, Deng LY and Laroche P, Blunted effects of endothelin upon small subcutaneous resistance arteries of mild essential hypertensive patients. *J Hypertens* **10**(5): 437-44, 1992.
11. Korsgaard N, Aalkjaer C, Heagerty AM, Izzard AS and Mulvany MJ, Histology of subcutaneous small arteries from patients with essential hypertension. *Hypertension* **22**(4): 523-6, 1993.
12. Heagerty AM, Bund SJ and Aalkjaer C, Effects of drug treatment on human resistance arteriole morphology in essential hypertension: direct evidence for structural remodelling of resistance vessels. *Lancet* **2**(8622): 1209-12, 1988.
13. Mulvany MJ, Baumbach GL, Aalkjaer C, Heagerty AM, Korsgaard N, Schiffrin EL and Heistad DD, Vascular remodeling. *Hypertension* **28**(3): 505-6, 1996.
14. Beaucage P, Yamaguchi N, Lariviere R and Moreau P, Heterogeneity in the acute control of vascular protein synthesis in vivo. *J Vasc Res* **40**(2): 123-31, 2003.
15. Dao HH, McMartens F, Zaor A, de Champlain J and Moreau P, [Role of endothelin in the hypertrophic remodeling of small arteries induced by exogenous norepinephrine]. *Arch Mal Coeur Vaiss* **92**(8): 1059-62., 1999.
16. Beaucage P, Iglarz M, Servant M, Touyz RM and Moreau P, Position of Src tyrosine kinases in the interaction between angiotensin II and endothelin in vivo vascular protein synthesis. *J Hypertens* **23**(2): 329-35, 2005.

17. Dao HH, Essalihi R, Graillon JF, Lariviere R, De Champlain J and Moreau P, Pharmacological prevention and regression of arterial remodeling in a rat model of isolated systolic hypertension. *J Hypertens* **20**(8): 1597-606, 2002.
18. Schiffrin EL, Role of endothelin-1 in hypertension and vascular disease. *Am J Hypertens* **14**(6 Pt 2): 83S-89S, 2001.
19. Touyz RM and Berry C, Recent advances in angiotensin II signaling. *Braz J Med Biol Res* **35**(9): 1001-15, 2002.
20. Michel JB, [Tissue consequence of renin-angiotensin system activation]. *Bull Acad Natl Med* **188**(4): 611-9; discussion 620, 2004.
21. Beevers G, Lip GY and O'Brien E, ABC of hypertension: The pathophysiology of hypertension. *Bmj* **322**(7291): 912-6, 2001.
22. Re RN, The clinical implication of tissue renin angiotensin systems. *Curr Opin Cardiol* **16**(6): 317-27, 2001.
23. Ardaillou R, Angiotensin II receptors. *J Am Soc Nephrol* **10 Suppl 11**: S30-9, 1999.
24. de Gasparo M, Husain A, Alexander W, Catt KJ, Chiu AT, Drew M, Goodfriend T, Harding JW, Inagami T and Timmermans PB, Proposed update of angiotensin receptor nomenclature. *Hypertension* **25**(5): 924-7, 1995.
25. Allen AM, Zhuo J and Mendelsohn FA, Localization and function of angiotensin AT1 receptors. *Am J Hypertens* **13**(1 Pt 2): 31S-38S, 2000.
26. Kaschina E and Unger T, Angiotensin AT1/AT2 receptors: regulation, signalling and function. *Blood Press* **12**(2): 70-88., 2003.
27. Schelling P, Fischer H and Ganten D, Angiotensin and cell growth: a link to cardiovascular hypertrophy? *J Hypertens* **9**(1): 3-15., 1991.
28. Sadoshima J and Izumo S, 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., 1993.
29. Berk BC, Vekshtein V, Gordon HM and Tsuda T, Angiotensin II-stimulated protein synthesis in cultured vascular smooth muscle cells. *Hypertension* **13**(4): 305-14., 1989.
30. Geisterfer AA, Peach MJ and Owens GK, Angiotensin II induces hypertrophy, not hyperplasia, of cultured rat aortic smooth muscle cells. *Circ Res* **62**(4): 749-56., 1988.
31. Berk BC and Rao GN, Angiotensin II-induced vascular smooth muscle cell hypertrophy: PDGF A-chain mediates the increase in cell size. In: *J Cell Physiol*, Vol. 154, pp. 368-80., 1993.
32. Owens GK, Control of hypertrophic versus hyperplastic growth of vascular smooth muscle cells. *Am J Physiol* **257**(6 Pt 2): H1755-65., 1989.
33. Chiu AT, Roscoe WA, McCall DE and Timmermans PB, Angiotensin II-1 receptors mediate both vasoconstrictor and hypertrophic responses in rat aortic smooth muscle cells. *Receptor* **1**(3): 133-40., 1991.
34. Nahmias C and Strosberg AD, The angiotensin AT2 receptor: searching for signal-transduction pathways and physiological function. *Trends Pharmacol Sci* **16**(7): 223-5, 1995.

35. Touyz RM, Endemann D, He G, Li JS and Schiffrin EL, Role of AT2 receptors in angiotensin II-stimulated contraction of small mesenteric arteries in young SHR. *Hypertension* **33**(1 Pt 2): 366-72, 1999.
36. Horiuchi M, Hayashida W, Kambe T, Yamada T and Dzau VJ, Angiotensin type 2 receptor dephosphorylates Bcl-2 by activating mitogen-activated protein kinase phosphatase-1 and induces apoptosis. *J Biol Chem* **272**(30): 19022-6, 1997.
37. Horiuchi M, Akishita M and Dzau VJ, Recent progress in angiotensin II type 2 receptor research in the cardiovascular system. *Hypertension* **33**(2): 613-21, 1999.
38. Alexander RW, Brock TA, Gimbrone MA, Jr. and Rittenhouse SE, Angiotensin increases inositol trisphosphate and calcium in vascular smooth muscle. *Hypertension* **7**(3 Pt 1): 447-51, 1985.
39. Ushio-Fukai M, Griendling KK, Akers M, Lyons PR and Alexander RW, Temporal dispersion of activation of phospholipase C-beta1 and -gamma isoforms by angiotensin II in vascular smooth muscle cells. Role of alpha11, alpha12, and beta gamma G protein subunits. *J Biol Chem* **273**(31): 19772-7, 1998.
40. Shirai H, Takahashi K, Katada T and Inagami T, Mapping of G protein coupling sites of the angiotensin II type 1 receptor. *Hypertension* **25**(4 Pt 2): 726-30, 1995.
41. Billah MM, Phospholipase D and cell signaling. *Curr Opin Immunol* **5**(1): 114-23, 1993.
42. Dhalla NS, Xu YJ, Sheu SS, Tappia PS and Panagia V, Phosphatidic acid: a potential signal transducer for cardiac hypertrophy. *J Mol Cell Cardiol* **29**(11): 2865-71, 1997.
43. Touyz RM and Schiffrin EL, Ang II-stimulated superoxide production is mediated via phospholipase D in human vascular smooth muscle cells. *Hypertension* **34**(4 Pt 2): 976-82, 1999.
44. Bonventre JV, Phospholipase A2 and signal transduction. *J Am Soc Nephrol* **3**(2): 128-50, 1992.
45. Nasjletti A, Arthur C. Corcoran Memorial Lecture. The role of eicosanoids in angiotensin-dependent hypertension. *Hypertension* **31**(1 Pt 2): 194-200, 1998.
46. Phillips MI and Kagiya S, Angiotensin II as a pro-inflammatory mediator. *Curr Opin Investig Drugs* **3**(4): 569-77, 2002.
47. Leervers SJ, Vanhaesebroeck B and Waterfield MD, Signalling through phosphoinositide 3-kinases: the lipids take centre stage. *Curr Opin Cell Biol* **11**(2): 219-25, 1999.
48. Saward L and Zahradka P, Angiotensin II activates phosphatidylinositol 3-kinase in vascular smooth muscle cells. *Circ Res* **81**(2): 249-57., 1997.
49. Takahashi T, Taniguchi T, Konishi H, Kikkawa U, Ishikawa Y and Yokoyama M, Activation of Akt/protein kinase B after stimulation with angiotensin II in vascular smooth muscle cells. *Am J Physiol* **276**(6 Pt 2): H1927-34, 1999.
50. Voisin L, Foisy S, Giasson E, Lambert C, Moreau P and Meloche S, EGF receptor transactivation is obligatory for protein synthesis stimulation by G protein-coupled receptors. *Am J Physiol Cell Physiol* **283**(2): C446-55, 2002.
51. Shah BH, Neithardt A, Chu DB, Shah FB and Catt KJ, Role of EGF receptor transactivation in phosphoinositide 3-kinase-dependent activation of MAP kinase by GPCRs. *J Cell Physiol* **206**(1): 47-57, 2006.

52. Schiffrin EL, Deng LY, Sventek P and Day R, Enhanced expression of endothelin-1 gene in resistance arteries in severe human essential hypertension. *J Hypertens* **15**(1): 57-63., 1997.
53. Hahn AW, Resink TJ, Scott-Burden T, Powell J, Dohi Y and Buhler FR, Stimulation of endothelin mRNA and secretion in rat vascular smooth muscle cells: a novel autocrine function. *Cell Regul* **1**(9): 649-59., 1990.
54. Moe GW, Albernaz A, Naik GO, Kirchengast M and Stewart DJ, Beneficial effects of long-term selective endothelin type A receptor blockade in canine experimental heart failure. *Cardiovasc Res* **39**(3): 571-9., 1998.
55. Haynes WG and Webb DJ, Endothelin as a regulator of cardiovascular function in health and disease. *J Hypertens* **16**(8): 1081-98, 1998.
56. de Nucci G, Thomas R, D'Orleans-Juste P, Antunes E, Walder C, Warner TD and Vane JR, Pressor effects of circulating endothelin are limited by its removal in the pulmonary circulation and by the release of prostacyclin and endothelium-derived relaxing factor. *Proc Natl Acad Sci U S A* **85**(24): 9797-800., 1988.
57. Schiffrin EL and Touyz RM, Vascular biology of endothelin. *J Cardiovasc Pharmacol* **32**(Suppl 3): S2-13., 1998.
58. Hirata Y, Emori T, Eguchi S, Kanno K, Imai T, Ohta K and Marumo F, Endothelin receptor subtype B mediates synthesis of nitric oxide by cultured bovine endothelial cells. *J Clin Invest* **91**(4): 1367-73., 1993.
59. Iwasaki H, Eguchi S, Ueno H, Marumo F and Hirata Y, Endothelin-mediated vascular growth requires p42/p44 mitogen-activated protein kinase and p70 S6 kinase cascades via transactivation of epidermal growth factor receptor. *Endocrinology* **140**(10): 4659-68., 1999.
60. Park JB and Schiffrin EL, Cardiac and vascular fibrosis and hypertrophy in aldosterone-infused rats: role of endothelin-1. *Am J Hypertens* **15**(2 Pt 1): 164-9., 2002.
61. Ammarguellat FZ, Gannon PO, Amiri F and Schiffrin EL, Fibrosis, matrix metalloproteinases, and inflammation in the heart of DOCA-salt hypertensive rats: role of ET(A) receptors. *Hypertension* **39**(2 Pt 2): 679-84., 2002.
62. Ammarguellat F, Larouche I and Schiffrin EL, Myocardial fibrosis in DOCA-salt hypertensive rats: effect of endothelin ET(A) receptor antagonism. *Circulation* **103**(2): 319-24., 2001.
63. Kim S, Morimoto S, Koh E, Miyashita Y and Ogihara T, Comparison of effects of a potassium channel opener BRL34915, a specific potassium ionophore valinomycin and calcium channel blockers on endothelin-induced vascular contraction. *Biochem Biophys Res Commun* **164**(3): 1003-8, 1989.
64. Miyoshi Y, Nakaya Y, Wakatsuki T, Nakaya S, Fujino K, Saito K and Inoue I, Endothelin blocks ATP-sensitive K<sup>+</sup> channels and depolarizes smooth muscle cells of porcine coronary artery. *Circ Res* **70**(3): 612-6, 1992.
65. Trevisi L, Bova S, Cargnelli G, Ceolotto G and Luciani S, Endothelin-1-induced arachidonic acid release by cytosolic phospholipase A2 activation in rat vascular smooth muscle via extracellular signal-regulated kinases pathway. *Biochem Pharmacol* **64**(3): 425-31, 2002.

66. Moreau P, d'Uscio LV, Shaw S, Takase H, Barton M and Luscher TF, Angiotensin II increases tissue endothelin and induces vascular hypertrophy: reversal by ET(A)-receptor antagonist. *Circulation* **96**(5): 1593-7, 1997.
67. Dao HH, Martens FM, Lariviere R, Yamaguchi N, Cernacek P, de Champlain J and Moreau P, Transient involvement of endothelin in hypertrophic remodeling of small arteries. *J Hypertens* **19**(10): 1801-12, 2001.
68. Inoki K, Ouyang H, Li Y and Guan KL, Signaling by target of rapamycin proteins in cell growth control. *Microbiol Mol Biol Rev* **69**(1): 79-100, 2005.
69. Datta SR, Brunet A and Greenberg ME, Cellular survival: a play in three Akts. *Genes Dev* **13**(22): 2905-27, 1999.
70. Chen J and Fang Y, A novel pathway regulating the mammalian target of rapamycin (mTOR) signaling. *Biochem Pharmacol* **64**(7): 1071-7, 2002.
71. Fang Y, Vilella-Bach M, Bachmann R, Flanigan A and Chen J, Phosphatidic acid-mediated mitogenic activation of mTOR signaling. *Science* **294**(5548): 1942-5, 2001.
72. Marmy-Conus N, Hannan KM and Pearson RB, Ro 31-6045, the inactive analogue of the protein kinase C inhibitor Ro 31-8220, blocks in vivo activation of p70(s6k)/p85(s6k): implications for the analysis of S6K signalling. *FEBS Lett* **519**(1-3): 135-40., 2002.
73. Volarevic S and Thomas G, Role of S6 phosphorylation and S6 kinase in cell growth. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* **65**: 101-27, 2001.
74. Daigle C, Martens FM, Girardot D, Dao HH, Touyz RM and Moreau P, Signaling of angiotensin II-induced vascular protein synthesis in conduit and resistance arteries in vivo. *BMC Cardiovasc Disord* **4**(1): 6, 2004.
75. Kobayashi N, Nakano S, Mori Y, Mita S, Kobayashi T, Honda T, Tsubokou Y and Matsuoka H, Betaxolol inhibits extracellular signal-regulated kinase and P70S6 kinase activities and gene expressions of platelet-derived growth factor A-chain and transforming growth factor-beta1 in Dahl salt-sensitive hypertensive rats. *Hypertens Res* **25**(2): 211-9., 2002.
76. Park IH, Bachmann R, Shirazi H and Chen J, Regulation of ribosomal S6 kinase 2 by mammalian target of rapamycin. *J Biol Chem* **277**(35): 31423-9. Epub 2002 Jun 26., 2002.
77. Reinhard C, Fernandez A, Lamb NJ and Thomas G, Nuclear localization of p85s6k: functional requirement for entry into S phase. *Embo J* **13**(7): 1557-65., 1994.
78. Eguchi S, Iwasaki H, Ueno H, Frank GD, Motley ED, Eguchi K, Marumo F, Hirata Y and Inagami T, Intracellular signaling of angiotensin II-induced p70 S6 kinase phosphorylation at Ser(411) in vascular smooth muscle cells. Possible requirement of epidermal growth factor receptor, Ras, extracellular signal-regulated kinase, and Akt. *J Biol Chem* **274**(52): 36843-51., 1999.
79. Eguchi S, Numaguchi K, Iwasaki H, Matsumoto T, Yamakawa T, Utsunomiya H, Motley ED, Kawakatsu H, Owada KM, Hirata Y, Marumo F and Inagami T, Calcium-dependent epidermal growth factor receptor transactivation mediates the angiotensin II-induced mitogen-activated protein kinase activation in vascular smooth muscle cells. *J Biol Chem* **273**(15): 8890-6, 1998.

80. Giasson E and Meloche S, Role of p70 S6 protein kinase in angiotensin II-induced protein synthesis in vascular smooth muscle cells. *J Biol Chem* **270**(10): 5225-31., 1995.
81. Shima H, Pende M, Chen Y, Fumagalli S, Thomas G and Kozma SC, Disruption of the p70(s6k)/p85(s6k) gene reveals a small mouse phenotype and a new functional S6 kinase. *Embo J* **17**(22): 6649-59., 1998.
82. Montagne J, Stewart MJ, Stocker H, Hafen E, Kozma SC and Thomas G, Drosophila S6 kinase: a regulator of cell size. *Science* **285**(5436): 2126-9., 1999.
83. Stewart MJ and Thomas G, Mitogenesis and protein synthesis: a role for ribosomal protein S6 phosphorylation? *Bioessays* **16**(11): 809-15, 1994.
84. Galderisi U, Cascino A and Giordano A, Antisense oligonucleotides as therapeutic agents. *J Cell Physiol* **181**(2): 251-7, 1999.
85. Kimura B, Mohuczy D, Tang X and Phillips MI, Attenuation of hypertension and heart hypertrophy by adeno-associated virus delivering angiotensinogen antisense. *Hypertension* **37**(2 Part 2): 376-80, 2001.
86. Peng JF, Kimura B, Fregly MJ and Phillips MI, Reduction of cold-induced hypertension by antisense oligodeoxynucleotides to angiotensinogen mRNA and AT1-receptor mRNA in brain and blood. *Hypertension* **31**(6): 1317-23, 1998.
87. Zhang YC, Bui JD, Shen L and Phillips MI, Antisense inhibition of beta(1)-adrenergic receptor mRNA in a single dose produces a profound and prolonged reduction in high blood pressure in spontaneously hypertensive rats. *Circulation* **101**(6): 682-8, 2000.
88. Chemistry Online: An Approach Based on Chemical Logic. 2005.
89. Phillips MI, Antisense technology. Part A, General methods, methods of delivery and RNA studies. Basic Principles of Using Antisense Oligonucleotides *In Vivo*. In: *Methods in Enzymology*, Vol. 313 (Ed. Phillips MI), pp. 580 p. Academic Press, San Diego, 1999.
90. Croke ST, Molecular mechanisms of action of antisense drugs. *Biochim Biophys Acta* **1489**(1): 31-44, 1999.
91. Garcia-Chaumont C, Seksek O, Grzybowska J, Borowski E and Bolard J, Delivery systems for antisense oligonucleotides. *Pharmacol Ther* **87**(2-3): 255-77, 2000.
92. Wolfert MA and Seymour LW, Atomic force microscopic analysis of the influence of the molecular weight of poly(L)lysine on the size of polyelectrolyte complexes formed with DNA. *Gene Ther* **3**(3): 269-73, 1996.
93. Krieg AM, Gmelig-Meyling F, Gourley MF, Kisch WJ, Chrisey LA and Steinberg AD, Uptake of oligodeoxyribonucleotides by lymphoid cells is heterogeneous and inducible. *Antisense Res Dev* **1**(2): 161-71, 1991.
94. Alahari SK, DeLong R, Fisher MH, Dean NM, Viliet P and Juliano RL, Novel chemically modified oligonucleotides provide potent inhibition of P-glycoprotein expression. *J Pharmacol Exp Ther* **286**(1): 419-28, 1998.
95. Zelphati O and Szoka FC, Jr., Mechanism of oligonucleotide release from cationic liposomes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**(21): 11493-8, 1996.
96. Ishida T, Harashima H and Kiwada H, Liposome clearance. *Biosci Rep* **22**(2): 197-224, 2002.

97. Torchilin VP, Recent advances with liposomes as pharmaceutical carriers. *Nat Rev Drug Discov* **4**(2): 145-60, 2005.
98. Zalipsky S, Qazen M, Walker JA, 2nd, Mullah N, Quinn YP and Huang SK, New detachable poly(ethylene glycol) conjugates: cysteine-cleavable lipopolymers regenerating natural phospholipid, diacyl phosphatidylethanolamine. *Bioconjug Chem* **10**(5): 703-7, 1999.
99. Bennett CF, Chiang MY, Chan H, Shoemaker JE and Mirabelli CK, Cationic lipids enhance cellular uptake and activity of phosphorothioate antisense oligonucleotides. *Mol Pharmacol* **41**(6): 1023-33, 1992.
100. Chen H, Mohuczy D, Li D, Kimura B, Phillips MI, Mehta P and Mehta JL, Protection against ischemia/reperfusion injury and myocardial dysfunction by antisense-oligodeoxynucleotide directed at angiotensin-converting enzyme mRNA. *Gene Ther* **8**(10): 804-10., 2001.
101. Kataoka K, Harada A and Nagasaki Y, Block copolymer micelles for drug delivery: design, characterization and biological significance. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **47**: 113-131, 2001.
102. Harada A and Kataoka K, Formation of polyion complex micelles in an aqueous milieu from a pair of oppositely-charged block copolymers with poly(ethylene glycol) segments. *Macromolecules* **28**: 5294-5299, 1995.
103. Moghimi MS, Hunter CA and Murray CJ, Long-circulating and target-specific nanoparticles: theory to practice. *Pharmaco. Rev.* **53**(2): 283-318, 2001.
104. Harada A, Togawa H and Kataoka K, Physicochemical properties and nuclease resistance of antisense-oligonucleotides entrapped in the core of polyion complex micelles composed of poly(ethylene glycol)-poly(L-lysine) block copolymers. *Eur. J. Pharm. Sci.* **13**: 35-42, 2001.
105. Mishra S, Webster P and Davis ME, PEGylation significantly affects cellular uptake and intracellular trafficking of non-viral gene delivery particles. *Eur J Cell Biol* **83**(3): 97-111, 2004.
106. Pack DW, Hoffman AS, Pun S and Stayton PS, Design and development of polymers for gene delivery. *Nat Rev Drug Discov* **4**(7): 581-93, 2005.
107. Mukherjee S, Ghosh RN and Maxfield FR, Endocytosis. *Physiol Rev* **77**(3): 759-803, 1997.
108. Dufresne MH and Leroux JC, Study of the micellization behavior of different order amino block copolymers with heparin. *Pharm. Res.* **21**(1): 160-169, 2004.
109. Boussif O, Lezoualc'h F, Zanta MA, Mergny MD, Scherman D, Demeneix B and Behr J-P, A versatile vector for gene and oligonucleotide transfer into cells in culture and *in vivo*: polyethylenimine. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92**(August 1995): 7297-7301, 1995.
110. Gallant HL and Yatscoff RW, P70 S6 kinase assay: a pharmacodynamic monitoring strategy for rapamycin; assay development. *Transplant Proc* **28**(6): 3058-61., 1996.
111. Banerjee P, Ahmad MF, Grove JR, Kozlosky C, Price DJ and Avruch J, Molecular structure of a major insulin/mitogen-activated 70-kDa S6 protein kinase. *Proc Natl Acad Sci U S A* **87**(21): 8550-4., 1990.
112. Waterborg JH and Matthews HR, The Lowry method for protein quantitation. *Methods Mol Biol* **32**: 1-4, 1994.

113. Williams AF, Barclay AN, Letarte-Muirhead M and Morris RJ, Rat thy-1 antigens from thymus and brain: their tissue distribution, purification, and chemical composition. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* **41 Pt 1**: 51-61, 1977.
114. Torii S, Nakayama K, Yamamoto T and Nishida E, Regulatory mechanisms and function of ERK MAP kinases. *J Biochem (Tokyo)* **136(5)**: 557-61, 2004.
115. Mosqueira VC, Legrand P, Morgat JL, Vert M, Mysiakine E, Gref R, Devissaguet JP and Barratt G, Biodistribution of long-circulating PEG-grafted nanocapsules in mice: effects of PEG chain length and density. *Pharm Res* **18(10)**: 1411-9, 2001.
116. Fischer D, Osburg B, Petersen H, Kissel T and Bickel U, Effect of poly(ethylene imine) molecular weight and pegylation on organ distribution and pharmacokinetics of polyplexes with oligodeoxynucleotides in mice. *Drug Metab Dispos* **32(9)**: 983-92, 2004.
117. Wang L and Proud CG, Ras/Erk signaling is essential for activation of protein synthesis by Gq protein-coupled receptor agonists in adult cardiomyocytes. *Circ Res* **91(9)**: 821-9, 2002.
118. Galli SM and Phillips MI, Angiotensin II AT(1A) receptor antisense lowers blood pressure in acute 2-kidney, 1-clip hypertension. *Hypertension* **38(3 Pt 2)**: 674-8, 2001.
119. Miller CR, Bondurant B, McLean SD, McGovern KA and O'Brien DF, Liposome-cell interactions in vitro: effect of liposome surface charge on the binding and endocytosis of conventional and sterically stabilized liposomes. *Biochemistry* **37(37)**: 12875-83, 1998.
120. Jaaskelainen I, Monkkonen J and Urtti A, Oligonucleotide-cationic liposome interactions. A physicochemical study. *Biochim Biophys Acta* **1195(1)**: 115-23, 1994.
121. Pende M, Um SH, Mieulet V, Sticker M, Goss VL, Mestan J, Mueller M, Fumagalli S, Kozma SC and Thomas G, S6K1(-/-)/S6K2(-/-) mice exhibit perinatal lethality and rapamycin-sensitive 5'-terminal oligopyrimidine mRNA translation and reveal a mitogen-activated protein kinase-dependent S6 kinase pathway. *Mol Cell Biol* **24(8)**: 3112-24, 2004.
122. Wang L, Gout I and Proud CG, Cross-talk between the ERK and p70 S6 kinase (S6K) signaling pathways. MEK-dependent activation of S6K2 in cardiomyocytes. *J Biol Chem* **276(35)**: 32670-7, 2001.
123. McMullen JR, Shioi T, Zhang L, Tarnavski O, Sherwood MC, Dorfman AL, Longnus S, Pende M, Martin KA, Blenis J, Thomas G and Izumo S, Deletion of ribosomal S6 kinases does not attenuate pathological, physiological, or insulin-like growth factor 1 receptor-phosphoinositide 3-kinase-induced cardiac hypertrophy. *Mol Cell Biol* **24(14)**: 6231-40, 2004.
124. Kolch W, Coordinating ERK/MAPK signalling through scaffolds and inhibitors. *Nat Rev Mol Cell Biol* **6(11)**: 827-37, 2005.

