

Université de Montréal

**Le rôle de l'aldostérone sur le remodelage structurel  
pulmonaire et la fonction ventriculaire droite en  
insuffisance cardiaque congestive**

par

**Andréanne Chabot**

Département de Physiologie, Université de Montréal  
Faculté de Médecine

Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures et postdoctorales  
en vue de l'obtention du grade de MSc en Physiologie

Août, 2011

©, Andréanne Chabot, 2011

Université de Montréal  
Faculté des études supérieures et postdoctorales

Ce mémoire intitulé :  
**Le rôle de l'aldostérone sur le remodelage structurel pulmonaire et la fonction  
ventriculaire droite en insuffisance cardiaque congestive**

Présenté par :  
**Andréanne Chabot**

A été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

---

**Jonathan Ledoux PhD**

Président-rapporteur

---

**Jocelyn Dupuis MD, PhD**

Directeur de recherche

---

**Eileen O'meara MD**

Membre du jury

## Résumé

**INTRODUCTION :** L'insuffisance cardiaque congestive (ICC) induit remodelage pulmonaire et dysfonction ventriculaire droite (VD) qui contribuent de façon importante à la morbidité/mortalité. Malgré l'efficacité prouvée, l'antagonisme des récepteurs minéralocorticoïdes est sous-utilisé en ICC et ses mécanismes d'actions demeurent incompris. Nous avons évalué si l'Aldostérone contribue au remodelage pulmonaire et à la dysfonction VD en stimulant la prolifération des myofibroblastes (MYFs) pulmonaires.

**MÉTHODE ET RÉSULTATS :** L'étude a été réalisée chez des rats avec infarctus du myocarde (IM) de taille modérée à grande permettant le développement de l'ICC. Deux semaines après l'IM, les rats ont été traités avec 100mg/kg/jour d'Aldactone ou non, pendant trois semaines et comparé à un groupe témoin (N=21;24;8). Comparativement au groupe témoin, les rats IM ont développé une ICC caractérisée par une réduction de la fraction de raccourcissement du VG ( $53\pm 1\%$  vs.  $16\pm 2\%$ , moyenne  $\pm$  ESM,  $P < 0.0001$ ), une hypertension pulmonaire (PSVD:  $27\pm 1$  vs.  $40\pm 3$  mmHg,  $P < 0.01$ ) et une hypertrophie VD (VD/(VG+Septum):  $24\pm 1\%$  vs.  $38\pm 3\%$ ,  $P < 0.05$ ). L'Aldactone n'a eu aucun effet sur ces paramètres. Les rats IM ont développé un syndrome pulmonaire caractérisé par un abaissement de la courbe respiratoire pression-volume, un remodelage structurel pulmonaire avec doublement du poids poumon sec ( $P < 0.01$ ) et de la fibrose pulmonaire avec augmentation du taux de collagène dans les poumons ( $P < 0.05$ ). L'Aldactone n'a pas restauré la fonction pulmonaire. Enfin, les MYFs pulmonaires isolés n'ont pas proliféré avec l'exposition de 48h aux deux traitements d'Aldostérone ( $10^{-7}$ M,  $10^{-6}$ M).

**CONCLUSION :** L'Aldostérone ne contribue pas au remodelage pulmonaire et à la dysfonction VD associés à l'ICC. D'autres mécanismes d'actions sont responsables des effets bénéfiques de l'Aldactone.

**MOTS CLÉS :** Insuffisance Cardiaque Congestive, Aldostérone, Maladies Pulmonaires Cardiovasculaires, Fonction pulmonaire, Récepteurs Minéralocorticoïdes, Aldactone et Spironolactone

## Abstract

**BACKGROUND:** Congestive heart failure (CHF) can induce pulmonary remodeling and RV dysfunction, which importantly contribute to morbidity and mortality. Despite proven efficacy, antagonism of mineralocorticoid receptors is underused in CHF and the mechanisms of its benefits still debated. We hypothesized that Aldosterone contributes to pulmonary remodeling and RV dysfunction by stimulating lung myofibroblasts (MYFs) proliferation.

**METHODS AND RESULTS:** We studied rats with moderate to large myocardial infarcts (MI) to allow CHF development. Two weeks after MI, rats were treated with Aldactone 100mg/kg/day (N=21) or untreated (N=24) for three weeks and compared to a sham group (N=8). Five weeks after MI, infarct size was similar in the two MI groups, both by ultrasound and pathologic measures. Compared to sham, the MI-untreated group developed CHF with reduced LV fractional shortening ( $53\pm 1\%$  vs.  $16\pm 2\%$ ; mean $\pm$ SEM,  $P<0.0001$ ), pulmonary hypertension (RVSP:  $27\pm 1$  vs.  $40\pm 3$  mmHg,  $P<0.01$ ) and RV hypertrophy (RV/(LV+septum):  $24\pm 1\%$  vs.  $38\pm 3\%$ ,  $P<0.05$ ). Aldactone treatment had no effect on these parameters and did not improve LV or RV performance. CHF induced a restrictive respiratory syndrome characterized by a downward shift of the respiratory pressure-volume loop, important lung remodeling with nearly doubling of dry lung weight ( $P<0.01$ ) and evidence of lung fibrosis demonstrated by histological lung collagen fractional area ( $P<0.05$ ). The Aldactone therapy could not restore pulmonary function. Finally, isolated lung MYFs did not proliferate after 48hr exposure to aldosterone ( $10^{-7}$ M and  $10^{-6}$ M).

**CONCLUSION:** Aldosterone does not contribute to pulmonary remodeling and RV dysfunction associated with CHF. Other mechanisms of action must be responsible for the beneficial effects of Aldactone in CHF.

**KEYWORDS:** Congestive Heart Failure, Aldosterone, Pulmonary Heart Disease, Pulmonary Function, Cardiovascular Therapeutics, Mineralocorticoid Receptors, Aldactone and Spironolactone

# Table des Matières

<b>PAGE TITRE</b> .....	<b>I</b>
<b>L'IDENTIFICATION DU JURY</b> .....	<b>II</b>
<b>RÉSUMÉ</b> .....	<b>III</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>IV</b>
<b>TABLE DES MATIÈRES</b> .....	<b>V</b>
<b>LISTE DES TABLEAUX</b> .....	<b>VI</b>
<b>LISTE DES FIGURES</b> .....	<b>VII</b>
<b>LISTE DES SIGLES ET DES ABRÉVIATIONS</b> .....	<b>VIII</b>
<b>REMERCIEMENTS</b> .....	<b>XIII</b>
<b>1. INTRODUCTION</b> .....	<b>14</b>
1.1 LE SYSTÈME ALDOSTÉRONE .....	14
1.1.1 <i>L'Aldostérone : une Hormone Stéroïdienne</i> .....	14
1.1.2 <i>La Biosynthèse de l'Aldostérone</i> .....	17
1.1.3 <i>La Régulation de la Sécrétion de l'Aldostérone</i> .....	19
1.1.4 <i>Le Rôle Physiologique Principal de l'Aldostérone</i> .....	23
1.1.5 <i>Les Récepteurs de l'Aldostérone</i> .....	25
1.1.6 <i>La Distribution et la Dégradation de l'Aldostérone</i> .....	27
1.2 L'ALDOSTÉRONE ET LES PATHOLOGIES CARDIOVASCULAIRES .....	28
1.2.1 <i>L'Insuffisance Cardiaque</i> .....	30
1.2.2 <i>L'Hypertension Pulmonaire Associée à l'Insuffisance Cardiaque</i> .....	33
1.2.3 <i>Les Traitements Actuels de l'Hypertension Pulmonaire</i> .....	35
1.3 LES MYOFIBROBLASTES PULMONAIRES.....	37
1.4 L'OSTÉOPONTINE .....	40
1.5 LES ANTAGONISTES DES RÉCEPTEURS MINÉRALOCORTICOÏDES.....	41
1.6 JUSTIFICATION DE L'ÉTUDE .....	43
<b>2. MATÉRIELS ET MÉTHODES</b> .....	<b>45</b>
2.1 IN VIVO.....	45
2.1.1 <i>Protocole Expérimental du Modèle Infarctus du Myocarde</i> .....	45
2.1.2 <i>Étude Échocardiographiques Transthoraciques</i> .....	47
2.1.3 <i>Mesure des Paramètres Hémodynamiques In Vivo</i> .....	49
2.1.4 <i>Mesure de la Fonction Respiratoire In Vivo</i> .....	49
2.1.5 <i>Mesures Morphométriques des Poumons et du Cœur</i> .....	50
2.1.6 <i>Histologie des Poumons et du Cœur</i> .....	50
2.1.7 <i>RT-PCR pour la Mesure de l'Expression du Gène Ostéopontine</i> .....	51
2.2 IN VITRO .....	53
2.2.1 <i>Isolation et Prolifération de MYFs Pulmonaires</i> .....	53
2.2.2 <i>Analyse de Prolifération Cellulaire via la Méthode CyQUANT</i> .....	55
2.3 ANALYSE STATISTIQUE.....	56
<b>3. RÉSULTATS</b> .....	<b>57</b>
<b>4. DISCUSSION</b> .....	<b>84</b>
4.1 LES ANTAGONISTES DES RM ONT DES IMPACTS POSITIFS EN CLINIQUE .....	85
4.2 LES ANTAGONISTES DES RM ONT DES IMPACTS VARIÉS EN PRÉCLINIQUE .....	87
4.3 LIMITES DE L'ÉTUDE DU MODÈLE IM .....	89
4.4 LIMITES DE L'ÉTUDE DE LA CULTURE CELLULAIRE .....	92
<b>5. CONCLUSION</b> .....	<b>94</b>
<b>6. BIBLIOGRAPHIE</b> .....	<b>95</b>

# Liste des Tableaux

## 1. Introduction

Tableau I : Classification actualisée en 2008 de l'hypertension pulmonaire.....	34
Tableau II : Les fonctions des myofibroblastes dans les organes et tissus principaux...	38
Tableau III : Les médiateurs solubles sécrétés par les myofibroblastes.....	38
Tableau IV : Les récepteurs exprimés par les myofibroblastes.....	38

## 3. Résultats

Table 1 LV and RV echocardiographic parameters.....	73
Table 2 Hemodynamic parameters.....	74
Table 3 Effect of spironolactone on BW, heart morphometric and respiratory function parameters.....	75

# Liste des Figures

## 1. Introduction

Figure 1 : Le squelette de l'Aldostérone .....	14
Figure 2 : La glande surrénale : lieu de la synthèse de l'Aldostérone.....	15
Figure 3 : La réaction générale des Cytochromes <i>P450</i> qui catalysent l'hydroxylation des stéroïdes .....	15
Figure 4 : La protéine StAR permet l'entrée du cholestérol dans la mitochondrie.....	16
Figure 5 : La biosynthèse de l'Aldostérone à partir du cholestérol.....	18
Figure 6 : L'appareil juxtaglomérulaire est composé des cellules juxtaglomérulaires et des cellules de la <i>Macula Densa</i> .....	19
Figure 7 : La composition de l'Angiotensinogène et des Angiotensines I et II .....	20
Figure 8 : L'angiotensine II et ses voies de signalisation intracellulaire .....	21
Figure 9 : L'ACTH et ses voies de signalisation intracellulaire .....	23
Figure 10 : Structure des cellules épithéliales principales de la section tardive du tubule contourné distal et de la section corticale du tube collecteur .....	24
Figure 11 : Actions intracellulaires de l'Aldostérone dans les cellules épithéliales principales permettant d'induire la réabsorption sodique .....	25
Figure 12 : Structure de l'Aldostérone, du Spironolactone et de l'Éplérénone .....	41

## 2. Matériel et Méthodes

Figure 13 : Équations du FS, du FAC et du MPI .....	48
---	----

## 3. Résultats

Figure 1. Effect of spironolactone on echocardiographic left ventricular function .....	76
Figure 2. Effect of spironolactone of myocardial fibrosis.....	77
Figure 3. Pulmonary hypertension and RV hypertrophy .....	78
Figure 4. Lung remodelling.....	79
Figure 5. Lung fibrosis .....	80
Figure 6. Respiratory function testing.....	81
Figure 7. Effect of spironolactone on lung tissue Osteopontine (OPN) expression.....	82
Figure 8. Lung myofibroblasts (MYFs) proliferation .....	83

## 4. Discussion

Figure 14 : Étude d'immunofluorescence de myofibroblastes de rats mis en culture ....	93
---	----

## Liste des Sigles et des Abréviations

3 $\beta$ HSD	3 $\beta$ -Hydroxy Steroid Dehydrogenase
11 $\beta$ -HSD2	11 $\beta$ -Hydroxy Stéroïde Déshydrogénase de type 2
A	Paramètre A de l'équation Salazar-Knowles (l'estimation de la capacité inspiratoire)
ACC	American College of Cardiology
ACE	Enzyme de Conversion de l'Angiotensine II
ACTH	Adrenocorticotropin Hormone (Corticotrophine)
ADN	Acide Désoxyribonucléique
aFGF	$\alpha$ Fibroblast Growth Factor
AHA	American Heart Association
AIP	Aldosterone Induced Protein
Aldo	Aldostérone
ALK1	Activin receptor-Like Kinase type 1
AMPc	Adénosine Monophosphate cyclique
ANG II	Angiotensine II
ANOVA	Analysis of Variance
AP-1	Activator Protein-1
ARA	Antagoniste des Récepteurs de l'Angiotensine
ARG	Arginine
ARN	Acide Ribonucléique
ARN <sub>m</sub>	Acide Ribonucléique Messenger
ARN <sub>t</sub>	Acide Ribonucléique de Transfert
ASP	Acide Aspartique
AT1R	Récepteur 1 de l'Angiotensine
ATPase	Adénosine Triphosphatase
A-type	Myofibroblaste qui exprime l' $\alpha$ -actine des muscles lisses
B	Paramètre B de l'équation Salazar-Knowles (l'estimation de la capacité pulmonaire totale à P=0)
bFGF	basic Fibroblast Growth Factor
BHE	Barrière Hémato-Encéphalique
BMPR2	Bone Morphogenetic Protein Receptor type-2
BW	Body Weight
C	Carbone
Ca <sup>2+</sup>	ion Calcium
CCPA	Conseil Canadien de Protection des Animaux
CDA	Comité de Déontologie Animale
CD18	Intégrine $\beta$ -2
cDNA	complementary Deoxyribonucleic Acid
CHF	Congestive Heart Failure
c-kit	proto-oncogene c-Kit or Stem Cell growth Factor Receptor (SCFR) or CD117
CO <sub>2</sub>	Carbon dioxide
CREB	cAMP Response-Element Biding
CREM	cAMP Response-Element Modulator
CRH	Hormone Corticolibérine
CSF	Colony-Stimulating Factor



CTEPH	Chronic Thromboembolic Pulmonary Hypertension
Cyclo A	Cyclophiline A
CYP	Cytochrome P450
CYP 11A1	Cholestérol Desmolase
CYP 11B1	11 $\beta$ -Hydroxylase
CYP 11B2	Aldostérone Synthase
DAG	Diacylglycérol
dATP	Deoxyadenosine Triphosphate
dCTP	Deoxycytidine Triphosphate
dGTP	Deoxyguanosine Triphosphate
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DNase	Deoxyribonuclease
dNTP	Deoxyribonucleotide Triphosphate
dP/dt	dérivée de la pression/dérivée du temps
DTT	Dithiothreitol
dTTP	Deoxythymidine Triphosphate
D-type	Myofibroblaste qui exprime la Desmine
ECG	Électrocardiogramme
EDTA	Ethylene Diamine Tetraacetic Acid
EGFR	Epidemial Growth Factor Receptor
EGTA	Ethylene Glycol Tetraacetic Acid
EMPHASIS-HF	Eplerenone in Mild Patients Hospitalisation And Survival Study in Heart Failure
ENA-78	Epithelial Neutrophil-Activating peptide 78
ENABLE	ENdothelin Antagonist Bosentan for Lowering cardiac Event in HF
eNOS	endothelial Nitric Oxyde Synthase
EPHESUS	Eplerenone Post-acute myocardial infarction Heart failure Efficacy and SURvival Study
ERA	Antagoniste des Récepteurs de l'Endothéline
ESM	Erreur Standard à la Moyenne
FAC	Fractional Area Changing
FBS	Fetal Bovin Serum
Fe	Fer
FIRST	Flolan International Randomized Survival Trial
FS	Fractional Shortening
GDP	Guanosine Diphosphate
GFAP	Glial Fibrillary Acidic Protein
GM-CSF	Granulocyte/Macrophage Colony-Stimulating Factor
GRO	melanoma GROwth-stimulatory activity
GTP	Guanosine Triphosphate
h	Heure(s)
H <sub>2</sub> O	Eau
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Peroxyde d'hydrogène
HBSS	Hank's Balanced Salt Solution
HDL	High Density Lipoprotein
HETEs	Hydroxyeicosatetraenoic acids
Hg	Mercure
HGF	Hepatocyte Growth Factor
HIS	Histidine

HIV	Human Immunodeficiency Virus
HMG-CoA	3-hydroxy-3-Méthylglutaryl-Coenzyme A
HP	Hypertension Pulmonaire
hr	Hour(s)
ICAM-1	Intracellular Adhesion Molecule-1
ICC	Insuffisance Cardiaque Congestive
IECA	Inhibiteur de l'Enzyme de Conversion de l'Angiotensine
IGF	Insuline-like Growth Factor
IL	Interleukine
ILE	Isoleucine
IM	Infarctus du Myocarde
IMC	Indice de Masse Corporelle
IP <sub>3</sub>	Inositol Triphosphate
ITS	Insulin Transferrine Selenium
IUPAC	International Union of Pure Applied Chemistry
K	Paramètre K de l'équation Salazar-Knowles (Degré de courbure de la courbe PV)
K <sup>+</sup>	ion Potassium
KCl	Potassium Chloride
KGF	Keratinocyte Growth Factor
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Potassium Phosphate
LDL	Low Density Lipoprotein
LEU	Leucine
LHD	Left Heart Disease
LV	Left Ventricular
LVEDP	Left Ventricular End Diastolic Pressure
LVSP	Left Ventricular Systolic Pressure
MAP	Mean Arterial Pressure
MC2R	Récepteur Mélanocortine 2
MCP	Monocyte Chemoattractant Protein
MCR	Metabolic Clearance Rate
mEGF	Melanocyte Growth Factor
MI	Myocardial Infarction
MIP	Macrophage Protein
M-MLV RT	Moloney Murine Leukemia Virus Reverse Transcriptase
mPAP	Pression Pulmonaire Artérielle Moyenne
MPI	Myocardial Performance Index
MPOC	Maladies Pulmonaires Obstructives Chroniques
MR	Mineralocorticoid Receptor
MYFs	Myofibroblastes ou Myofibroblasts
N	Nombre de rats ou Number of rats
Na <sup>+</sup>	ion Sodium
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	Sodium Phosphate
NaCl	Sodium Chloride
NADPH+H <sup>+</sup>	Nicotinamide Adénine Dinucléotide Phosphate
NaF	Sodium Fluoride
NCAM-1	Neural Cell Adhesion Molecule-1
NfκB	Nuclear Factor κB
NGF	Nerve Growth Factor

NH <sub>2</sub>	Amine
NO	Oxyde Nitrique
OCT	Optimal Cutting Temperature
O <sub>2</sub>	Dioxyde
OH	Hydroxyde
Oligo dT	Short sequence of Deoxy Thymine nucléotides
OMS	Organisation Mondiale de la Santé
OPN	Ostéopontine ou Osteopontin
P	Pression ou Pressure
<i>P</i>	Valeur de P
P1, P2, etc.	Lobe pulmonaire 1, Lobe pulmonaire 2
PAF	Platelet Activating Factor
PAH	Pulmonary Arterial Hypertension
PBS	Phosphate Buffered Saline
PCH	Pulmonary Capillary Hemangiomatosis
PDGF	Platelet-Derived Growth Factor
PGE2	Prostaglandine E2
PH	Pulmonary Hypertension
PHE	Phenylalanine
P <sub>i</sub>	Phosphate inorganique
PIP <sub>2</sub>	Phosphatidylinositol 4,5 Biphosphate
PKA	Proteine Kinase A
PLA	Phospholipase A
PLC	Phospholipase C
PMSF	Phenyl Methane Sulfonyl Fluoride
PRO	Proline
PSVD	Pression Systolique du Ventricule Droit
PV	Pression Volume
PVOD	Pulmonary Veno-Occlusive Disease
qPCR	real-time quantitative Polymerase Chain Reaction
R	Récepteur
RAAS	Système Rénine Angiotensine Aldostérone
RALES	Randomized Aldactone Evaluation Study
RANTES	Regulated, upon Activation, Normal T cell Expressed and Secreted
REACH-1	Research on Endothelin Antagonists in Chronic Heart failure
RF	Renal Failure
RGD	Arginine-Glycine Acide aspartique
RM	Récepteur Minéralocorticoïde
RNase	Ribonuclease
RPM	Révolutions Par Minute
RT	Reverse Transcriptase
RV	Right Ventricular
RVEDP	Right Ventricular End Diastolic Pressure
RVSP	Right Ventricular Systolic Pressure
SCF	Stem Cell Factor
SEM	Standard Error to Mean
SER	Sérine
SMA	α-Actine des Muscles Lisses
SMC	Cellules Musculaires Lisses

StAR	Steroidogenic Acute Regulatory
TAPSE	Tricuspid Annulus Plan Systolic Excursion
TCD	Tubule Contourné Distal
TGF- $\beta$	Transforming Growth Factor- $\beta$
TNF- $\alpha$	Tumor Necrosis Factor- $\alpha$
Tris	Tris Hydroxymethyl Amino Methane (THAM)
TVC-o	Tricuspid Valve closing to opening
TYR	Tyrosine
UDG	Uracil-DNA glycosylase
UDPGA	Uridine Diphosphoglucuronic Acid
V	Volume
VAL	Valine
VCAM-1	Vascular Cell Adhesion Molecule-1
VD	Ventricule Droit
VG	Ventricule Gauche
Vs.	Versus
V-type	Myofibroblaste qui exprime la Vesmine
ZF	Zone Fasciculée
ZG	Zone Glomérulée
ZR	Zone Réticulée
%	Pourcentage
$\pm$	Plus ou moins
<	Plus petit que
$\geq$	Supérieur ou égal à

## Remerciements

Tout d'abord, je tiens à remercier mon directeur de recherche, Dr. Jocelyn Dupuis pour tout le temps qu'il à investit à approfondir mes connaissances scientifiques et à me conseiller, mais surtout merci d'avoir suscité chez moi un intérêt encore plus grand pour la recherche dû à l'ardeur et à la passion que vous mettez dans chacun de vos projets de recherche.

Je désire également remercier personnellement certains collaborateurs qui ont été très précieux pour permettre la réalisation de cette étude. Tout d'abord Emma Dedelis, notre extraordinaire technicienne de laboratoire, sans qui aucune de ces journées n'auraient été les mêmes. Merci Emma de m'avoir apporté ton aide, écouté, transmis ta bonne humeur printanière et surtout merci pour tous ces Des Délices d'Emma. Je veux également souligner le travail exemplaire de Bao Hua Jiang, au poste de post doctorat dans notre laboratoire, qui m'a énormément aidée pour la réalisation des chirurgies IM chez les rats et pour le travail d'analyse de données. Thank you Bao, without you this research project would not have been possible in the allowed time. Je désire aussi remercier Quang Trinh Nguyen pour son expertise et ses conseils. Finalement, je tiens à remercier Bruno Tremblay pour avoir contribué à l'étude préliminaire de ce projet.

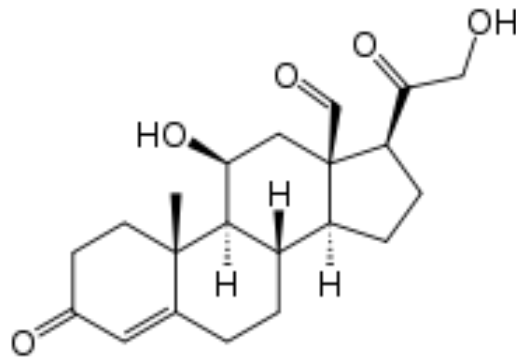
Je désire remercier mes parents, soit ma mère Claire et ma petite mamie Margueritte, qui ont toujours su, depuis ma tendre enfance, m'inculquer des valeurs qui ont fait de moi la personne que je suis aujourd'hui. Avec de l'ambition, de la persévérance et de la passion pour ce que l'on fait, tout est possible. Je vous aime beaucoup et je vous remercie d'avoir toujours cru en moi, de m'avoir encouragé à persévérer dans les moments difficiles et de m'avoir soutenue dans tout ce que j'ai entrepris et dans tout ce que j'entreprendrais. Je veux aussi remercier mon amoureux Marc-André qui réussi toujours à me faire voir la vie différemment avec son écoute attentive et ses conseils précieux. Je t'aime et j'espère passer ma vie avec toi chouchou.

Finalement, je tiens à remercier mes oncles Denis et Bernard pour leurs encouragements, leur support, leurs savoirs inépuisables et l'ardeur qu'ils ont à défendre leurs opinions et dont je tente de m'inspirer jour après jour. Enfin, il est indispensable à mes yeux de terminer ces remerciements avec une mention toute spéciale pour ma belle tante Hélène qui nous a quitté beaucoup trop rapidement il y a déjà 7 ans. Merci Hélène de m'avoir démontré à quel point il est important de profiter des plaisirs de la vie!

# 1. Introduction

## 1.1 Le Système Aldostérone

L'Aldostérone est une hormone stéroïdienne de la famille des minéralocorticoïdes, insoluble dans l'eau, qui permet la réabsorption d'ions sodium et de



**Figure 1 : Le squelette de l'Aldostérone [4]**

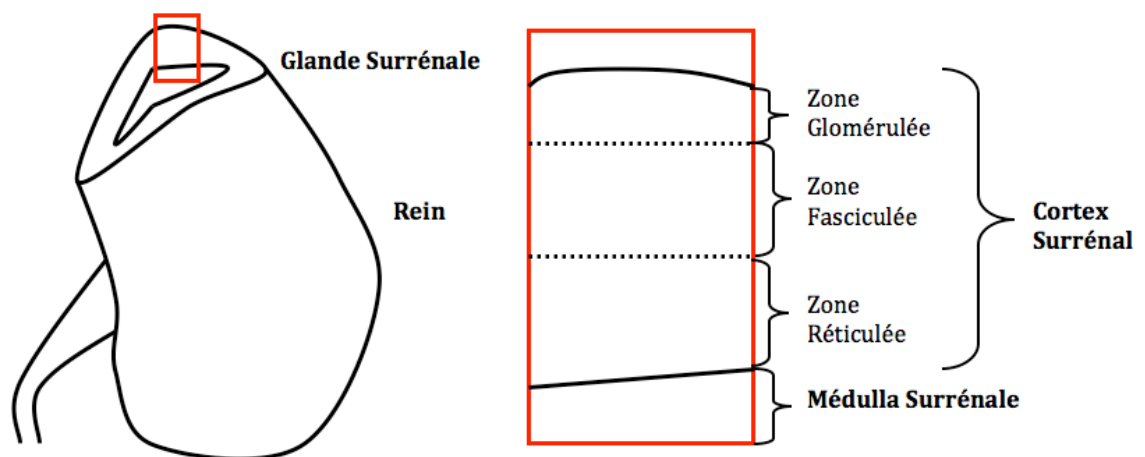
l'eau et la sécrétion d'ions potassium par les néphrons [1-3]. L'Aldostérone est considérée comme étant l'une des hormones les plus essentielles, puisqu'une courte absence de celle-ci peut être fatale [3]. L'aldostérone a une forme aldéhyde, faite de 21 carbones, 28 hydrogènes et 5 oxygènes, elle possède un groupement aldéhyde à son carbone 18 (C18) et un

groupement hydroxyl en C11 (Figure 1), sa masse moléculaire est de 360,44 g/mol et sa nomenclature chimique selon l'International Union of Pure and Applied Chemistry (IUPAC) est 11 $\beta$ -21-dihydroxy-3,20-dioxo-4-pregnene-18-al [3-6]. En 1948, Deane et al. ont déterminé, via des analyses histologiques et anatomiques, que l'Aldostérone, autrefois nommée électrocortine, est sécrétée de la zone glomérulée du cortex surrénalien après stimulation par un régime pauvre en NaCl et riche en K<sup>+</sup> chez le rat [7, 8]. Cependant, ce n'est qu'en 1953 que l'électrocortine a pu être isolée et cristallisée de glandes surrénales de bœuf par Simpson et Tait, puis sa structure a finalement été élucidée en 1954 par Reichstein [3, 7, 9, 10].

### 1.1.1 L'Aldostérone : une Hormone Stéroïdienne

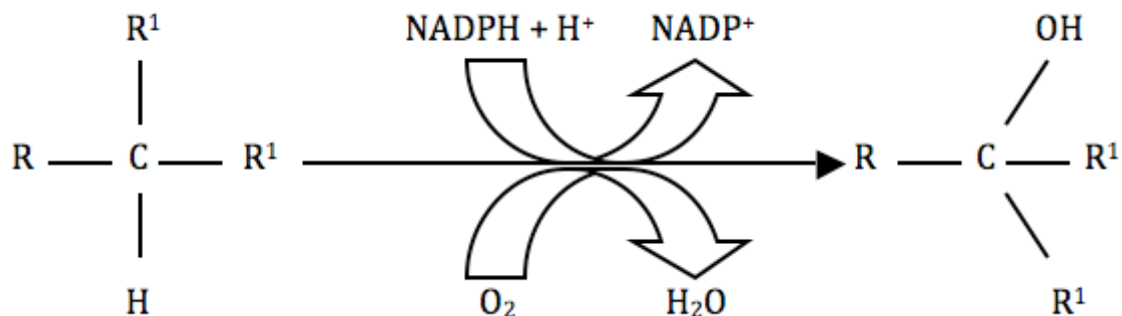
La grande famille des hormones stéroïdiennes est divisée en cinq groupes selon les actions physiologiques de celles-ci. Tout d'abord, les minéralocorticoïdes, sont synthétisés dans le cortex surrénalien et ont pour principale fonction de maintenir la pression artérielle et de contrôler l'équilibre hydrosodique et potassique. Ensuite, les glucocorticoïdes, également synthétisés au niveau du cortex surrénalien, régulent le métabolisme des glucides. Puis, les œstrogènes et les progestogènes sont des hormones

sexuelles féminines produites par les ovaires. Enfin, les androgènes sont des hormones sexuelles masculines synthétisées par les testicules. En fait, le rôle principal du cortex surrénalien et des gonades consiste à synthétiser les hormones stéroïdiennes, phénomène aussi appelé stéroïdogénèse. La stéroïdogénèse constitue la dérivation du cholestérol, puisque celui-ci est le précurseur de toutes les hormones stéroïdiennes chez les vertébrés [2, 11, 12]. La stéroïdogénèse débute dans la glande surrénale, plus particulièrement dans la zone glomérulée (ZG) en surface du cortex surrénalien (Figure 2) [3, 13-16]. Le cortex de la glande surrénale comprend également la zone fasciculée (ZF), située au milieu, et la zone réticulée (ZR), qui est contiguë à la médulla surrénale [1].



**Figure 2 : La glande surrénale : lieu de la synthèse de l'Aldostérone [1]**

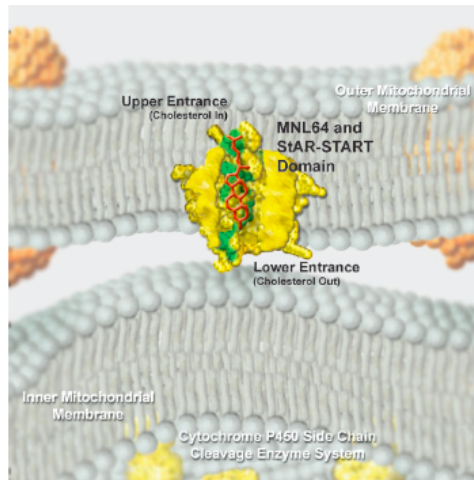
La majorité des enzymes régulant la stéroïdogénèse font parties du groupe des Cytochromes *P450* (CYP) [11]. Les CYP catalysent des réactions d'hydroxylation qui nécessitent la présence d'oxygène moléculaire et la forme réduite du nicotinamide adénine dinucléotide phosphate ( $\text{NADPH} + \text{H}^+$ ) (Figure 3) [15]. Les CYP permettent d'introduire un atome d'oxygène dans le noyau des stéroïdes et leur structure est analogue à celle des cytochromes présents dans la chaîne de transport de électrons des



**Figure 3 : La réaction générale des Cytochromes *P450* qui catalysent l'hydroxylation des stéroïdes [15]**

mitochondries [15]. Enfin, les cytochromes *P450* contiennent tous un groupement hème constitué d'un anneau de porphyrine qui est lié de manière covalente à un atome de fer en son centre qui peut être réversiblement oxydé ou réduit ( $\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+}$ ) [1, 15, 17].

Le cholestérol permettant la stéroïdogénèse provient principalement des lipoprotéines plasmatiques de basse densité (LDL). Pour se faire, le LDL diffuse à partir du plasma jusqu'au liquide interstitiel et se fixe ensuite sur les membranes des cellules corticosurréaliennes via des récepteurs spécifiques présents dans des structures appelées *coated pits*. Les *coated pits* sont par la suite internalisés via endocytose. Il y a alors formation de vésicules qui vont fusionner avec les lysosomes qui contiennent des enzymes de dégradation, ce qui leur permet de relâcher le cholestérol dans les cellules corticosurréaliennes [2]. Cependant, le cholestérol doit également traverser la membrane mitochondriale externe pour parvenir à la membrane mitochondriale interne, puisque la première enzyme de la stéroïdogénèse y est située. En fait, le phénomène de



**Figure 4 : La protéine StAR permet l'entrée du cholestérol dans la mitochondrie [18]**

translocation du cholestérol à la membrane mitochondriale interne constitue l'étape limitante de la stéroïdogénèse [13, 18]. La protéine *Steroidogenic Acute Regulatory* (StAR) permet le transfert des molécules de cholestérol (Figure 4) [12, 13, 18, 19]. La protéine StAR est exprimée dans tous les tissus stéroïdogènes, lorsque ceux-ci sont activés par les agents induisant la biosynthèse des stéroïdes. Le mécanisme du modèle StAR est hypothétiquement décrit par Stocco et al. [18]. Ainsi, StAR entrerait en

contact avec la membrane externe mitochondriale via son extrémité N-terminale. Puis, le domaine START de la protéine StAR aurait une modification instantanée de sa structure tertiaire. Cette modification du domaine START lui permettrait de pénétrer et de traverser la bicouche phospholipidique afin que le domaine START apparaisse finalement à la surface de l'espace intermembranaire. Cependant, le changement conformationnel du domaine START induirait également l'ouverture partielle de l'entrée supérieure, permettant ainsi au cholestérol d'accéder à une poche hydrophobe du domaine START. Ainsi, le cholestérol se déplacerait, une molécule à la fois, le long

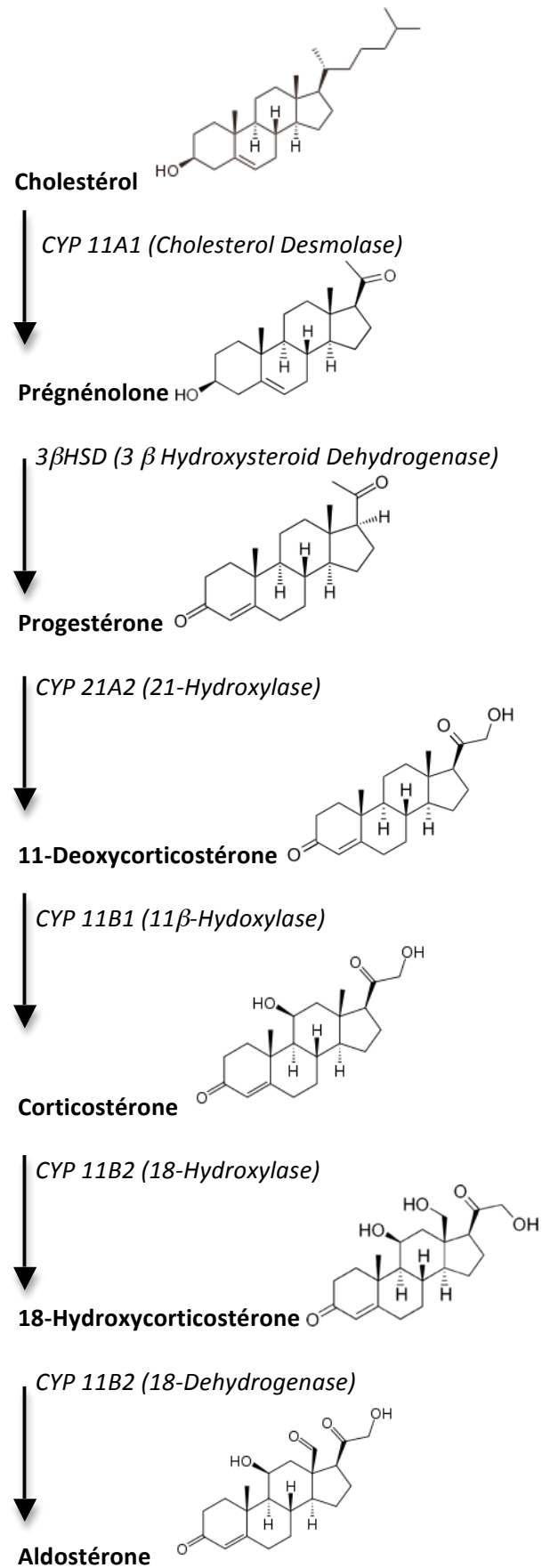


du domaine START, qui est comparable à un tunnel hydrophobe, afin que le cholestérol soit transféré jusqu'à la membrane interne mitochondriale [18]. Toutefois, la compréhension de la régulation de l'expression et de la fonction du gène StAR n'est que partielle et n'a pas encore été établie [20]. Présentement, il est clair que l'expression de la protéine StAR est régie principalement par la voie dépendante à l'AMPc, et ce via un membre de la famille CREB/CREM et les deux types de protéines kinases A (PKA) [20-22]. Aussi, l'expression de la protéine StAR dans des cellules Leydig de souris a été associée à la cascade induite par mEGF [23]. Il paraît ainsi incontestable que la régulation de l'expression et de la fonction du gène StAR est hautement complexe et que plusieurs éléments restent à être découverts et confirmés dû au grand nombre de voies de signalisation impliquées [20].

### ***1.1.2 La Biosynthèse de l'Aldostérone***

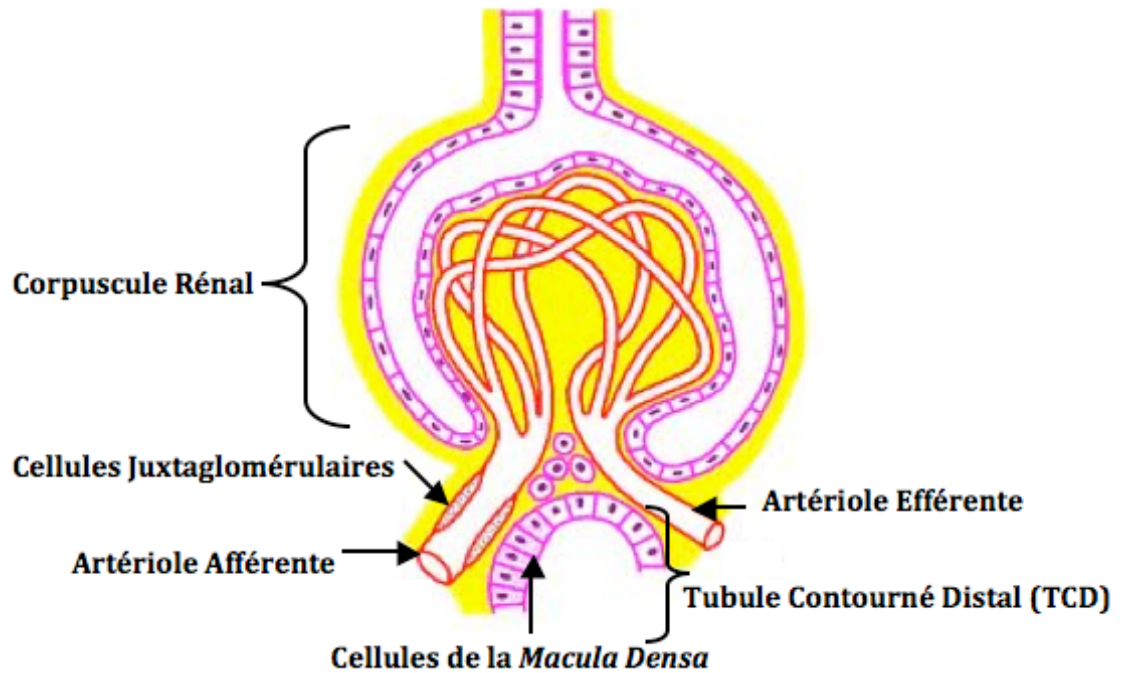
Tout d'abord, l'Aldostérone est le minéralocorticoïde le plus produit par le cortex surrénal [14]. La biosynthèse de l'Aldostérone débute avec l'enzyme CYP 11A1 (*cholesterol desmolase* ou *P450 side-chain cleavage enzyme*) qui est localisé dans la membrane interne mitochondriale et qui catalyse 3 réactions différentes, soit une 20 $\alpha$ -hydroxylation, une 22 $\beta$ -hydroxylation et le clivage du lien entre le C-20 et le C-22, permettant de transformer le cholestérol en prégnénolone (Figure 5) [2, 9, 13, 14, 16, 17, 24, 25]. Ensuite, la prégnénolone est libérée dans le cytosol et est convertie en progestérone via déshydrogénation par le 3 $\beta$ HSD (*3  $\beta$  Hydroxysteroid Dehydrogenase*) qui est située sur la membrane du réticulum endoplasmique lisse. Puis, le CYP21A2 (*21-hydroxylase*), situé lui aussi sur la membrane du réticulum endoplasmique lisse, induit une hydroxylation du C-21 de la progestérone pour la convertir en 11-déoxycorticostérone (DOC). Par la suite, le DOC est converti en corticostérone via le CYP 11B1 (*11 $\beta$ -Hydoxylase*). Le CYP 11B1 est situé dans la mitochondrie et induit une  $\beta$ -hydroxylation en C-11. Enfin, les deux étapes finales sont réalisées par le CYP 11B2 (*aldosterone synthase*) qui est située exclusivement dans la membrane mitochondriale interne présent dans la zone glomérulée du cortex surrénal. Ainsi le CYP 11B2 a deux actions : tout d'abord hydroxyler le C-18 du corticostérone pour former le 18-hydroxycorticostérone et enfin catalyser la déshydrogénation du C-18 du 18-hydroxycorticostérone pour le transformer en Aldostérone [5, 9, 13, 17].

Figure 5 : La biosynthèse de l'Aldostérone à partir du cholestérol [2, 9, 13, 14, 16, 17, 24, 25]



### 1.1.3 La Régulation de la Sécrétion de l'Aldostérone

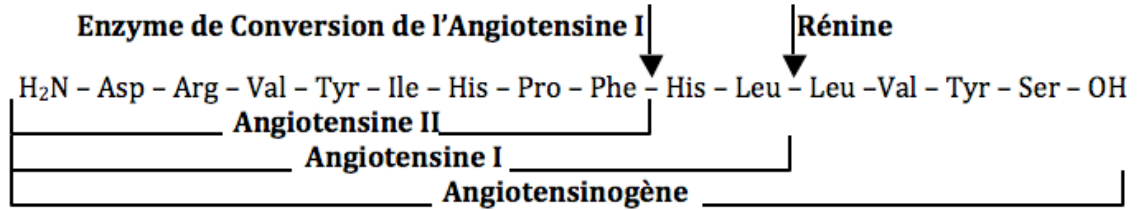
Quatre voies principales régulent la biosynthèse de l'Aldostérone, soit le système Rénine-Angiotensine-Aldostérone (RAAS), l'élévation d'ions potassiques plasmatiques, la diminution du taux sanguin d'ions sodiques et l'ACTH [1, 2, 6]. Tout d'abord, le système RAAS, qui est la voie principale de libération de l'Aldostérone, est activé lorsqu'il y a détection d'une baisse de pression artérielle ou une chute de la concentration sanguine des ions sodiques au niveau des reins [1, 2, 14, 15, 25]. Ces détections sont permises par l'appareil juxta-glomérulaire qui est la section du néphron où la portion initiale du tubule contourné distal (TCD) s'appuie contre l'artériole afférente du corpuscule rénal (Figure 6) [1]. Ainsi, dans les parois de l'artériole afférente



**Figure 6 : L'appareil juxtaglomérulaire est composé des cellules juxtaglomérulaires et des cellules de la *Macula Densa* [1]**

qui alimente le glomérule se retrouvent les cellules juxtaglomérulaires qui jouent le rôle de mécanorécepteurs, permettant alors la détection d'une baisse de pression artérielle [1]. D'ailleurs, les cellules juxtaglomérulaires synthétisent et entreposent la rénine sous sa forme inactive nommée prorénine [2]. Également, dans la paroi du TCD la *Macula Densa* est un amas de cellules, contiguë aux cellules juxta-glomérulaires, qui jouent le rôle de chimiorécepteurs, permettant ainsi la détection d'une variation dans le contenu

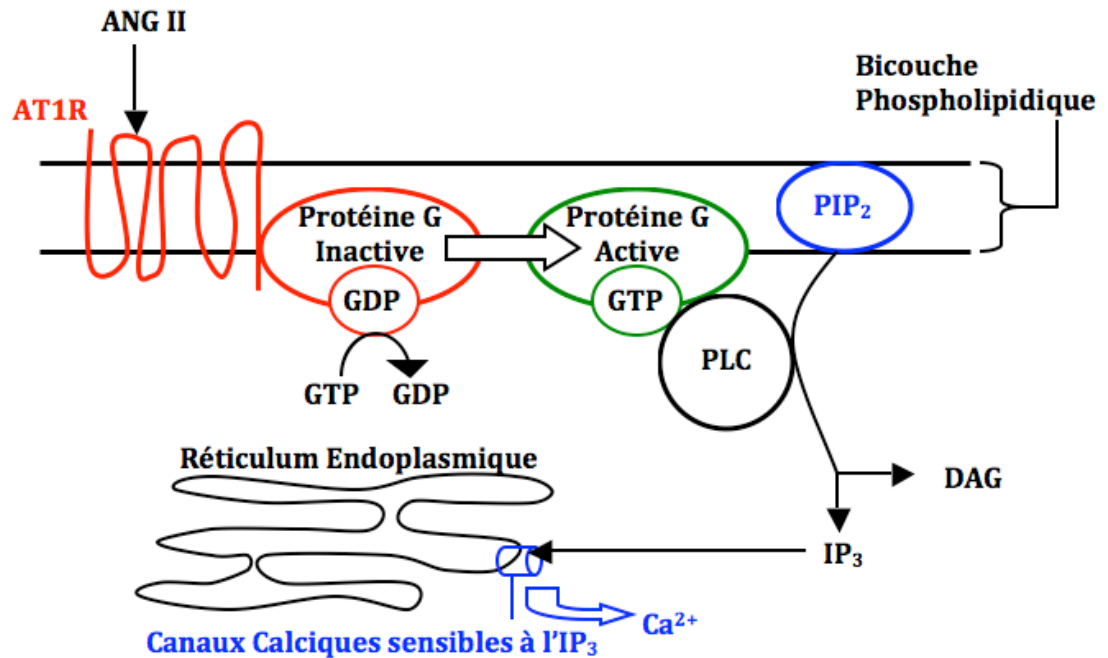
du filtrat urinaire [1]. Ce faisant, lorsqu'il y a une baisse de pression artérielle ou une chute d'ions  $\text{Na}^+$ , s'en suit alors de réactions intrinsèques dans les reins induisant le clivage des molécules de prorénine et donc la libération de rénine par les cellules de l'appareil juxtaglomérulaire [1, 2]. Par la suite, la rénine agit de manière enzymatique sur l'angiotensinogène, qui est une  $\alpha_2$ -globuline plasmatique produite par le foie, pour le cliver afin qu'il relâche un peptide de 10 acides aminés, l'angiotensine I (Figure 7) [2, 6, 14, 15, 24]. La rénine demeure dans le sang durant 30 à 60 minutes produisant encore



**Figure 7 : La composition de l'Angiotensinogène et des Angiotensines I et II [2, 14, 15]**

plus d'angiotensine I. Ensuite, l'angiotensine I est transportée par la circulation sanguine jusqu'aux poumons [2]. Ainsi, l'Enzyme de Conversion de l'angiotensine I (ACE), présente dans l'endothélium des vaisseaux pulmonaires, clive l'angiotensine I en 2 peptides, soit l'angiotensine II (ANG II), un octapeptide, et un peptide de 2 acides aminés [2, 14, 15, 24]. L'angiotensine II a de fortes capacités vasoconstrictrices, mais elle est rapidement inactivée par les angiotensinases [2, 15]. L'angiotensine II retourne à la circulation sanguine, mais ne persiste que 1 à 2 minutes dans le sang, puis stimule les cellules glomérulées du cortex des glandes surrénales à faire la biosynthèse de l'Aldostérone, plutôt que de stimuler sa relâche [1, 2, 14, 16, 24]. En fait, l'action de l'angiotensine II sur la biosynthèse de l'Aldostérone a lieu uniquement dans la zone glomérulée du cortex surrénalien où se situent ses récepteurs spécifiques [16, 25]. Ainsi, l'angiotensine II lie les récepteurs de type I de l'angiotensine II qui sont couplés à des protéines G inactives (Figure 8) [1, 6, 26]. Par la suite, la protéine G est activée lorsque le guanosine triphosphate (GTP) vient se lier à sa sous-unité  $\alpha$  tout en déplaçant le guanosine diphosphate (GDP). Puis, la protéine G activée se lie à la phospholipase C (PLC) et l'active, ce qui inactive la protéine G. Ensuite, la PLC clive le phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate (PIP<sub>2</sub>) en diacylglycérol (DAG) et en inositol triphosphate (IP<sub>3</sub>). Ainsi l'IP<sub>3</sub> peut agir sur les canaux calciques sensible à l'IP<sub>3</sub> présents sur le réticulum endoplasmique pour libérer des ions calciques [1, 2, 17, 26]. L'augmentation de  $\text{Ca}^{2+}$  cytosolique a pour conséquence d'augmenter la conversion du

cholestérol en prégnénolone et la transformation de la corticostérone en Aldostérone [2, 14, 16, 17, 25].



**Figure 8 : L'angiotensine II et ses voies de signalisation intracellulaire [1, 26]**

Ensuite, une augmentation de l'apport potassique, donc une augmentation de la concentration dans le liquide extracellulaire des ions  $K^+$  à l'extérieur des limites physiologiques, augmente la sécrétion d'Aldostérone [1, 2, 5, 16, 27]. En fait, une simple augmentation de la concentration d'ions  $K^+$  de 0.5mEq/L peut induire la production d'Aldostérone [16]. Cependant, il a été clairement établi chez le rat qu'une concentration idéale d'ions potassiques de 7 à 9 mEq/L induit de manière optimale la production d'Aldostérone, mais qu'au-delà de ces valeurs il y a une diminution significative de la biosynthèse de l'Aldostérone [16]. L'action principale des ions potassiques pour stimuler la biosynthèse de l'Aldostérone consiste à dépolariser la membrane, activant ainsi les canaux calciques voltages dépendant, ce qui permet d'augmenter la concentration d'ions calciques cytosolique [17]. L'augmentation de  $Ca^{2+}$  cytosolique a pour conséquence d'augmenter la transformation du cholestérol en prégnénolone et la conversion de la corticostérone en Aldostérone [16, 17]. Ainsi, tout comme l'angiotensine II, les ions  $K^+$  stimulent la production de l'Aldostérone en agissant de manière spécifique sur les cellules glomérulées du cortex surrénalien [14,

16]. Il est également important de souligner que les effets sur la synthèse d'Aldostérone du potassium et de l'angiotensine II nécessitent absolument la présence d'ions calciques [16, 25].

Aussi, une augmentation dans le liquide extracellulaire de la concentration des ions sodiques diminue la sécrétion d'Aldostérone [1, 2, 14]. Ainsi, si on augmente l'apport sodique dans l'alimentation, il s'en suivra d'une diminution de libération d'Aldostérone. L'inverse est également vrai, donc si on limite l'apport d'ions  $\text{Na}^+$ , si l'on augmente la perte d'ions sodiques par l'organisme, via transpiration, diurèse ou salivation, ou s'il y a une chute de concentration d'ions sodiques en deçà des limites physiologiques, cela a pour effet d'augmenter la production d'Aldostérone [5, 14, 16]. La diminution d'ions sodiums a un impact pour stimuler la biosynthèse de l'Aldostérone en induisant la conversion du cholestérol en prégnénolone et en agissant à l'étape où le corticostérone est transformé en Aldostérone [14, 25]. Également, une baisse d'ions  $\text{Na}^+$  est détectée par les cellules de la *Macula Densa* et amène la sécrétion de rénine, ce qui active le RAAS [17, 25].

Enfin, la corticotrophine (ACTH) de l'hypophyse antérieure n'a pas d'effet direct sur la sécrétion d'Aldostérone en condition normale [1, 16, 17, 24]. Cependant, il y aura une légère augmentation de libération d'Aldostérone en situation de stress. En effet, lors d'un stress intense il y a augmentation de sécrétion de corticolibérine (CRH) par l'hypothalamus, ce qui induit la sécrétion d'ACTH par l'adénohypophyse [1, 5, 16]. L'ACTH se déplace dans la circulation sanguine jusqu'à la surface des cellules glomérulées et lie les récepteurs mélanocortine-2 (MC2R) qui sont couplés à des protéines G inactives (Figure 9) [17]. L'ACTH a cependant une faible affinité pour les cellules de la zone glomérulée [16, 25]. Par la suite, la protéine G est activée lorsque le GTP se lie à sa sous-unité  $\alpha$  tout en déplaçant le GDP. Puis, la protéine G activée se lie à l'adénylate cyclase et l'active, entraînant la production d'adénosine monophosphate cyclique (AMPc) à partir de l'adénosine triphosphate (ATP) [1, 2, 17, 24]. Cela permet d'activer la stéroïdogénèse à l'étape de la transformation du cholestérol en prégnénolone et lors de la conversion du corticostérone en Aldostérone [14, 16, 17, 25]. La corticotrophine stimule la biosynthèse de l'Aldostérone davantage lors d'une diète faible en  $\text{Na}^+$ , plutôt qu'une diète normale, et nécessite absolument la présence des ions

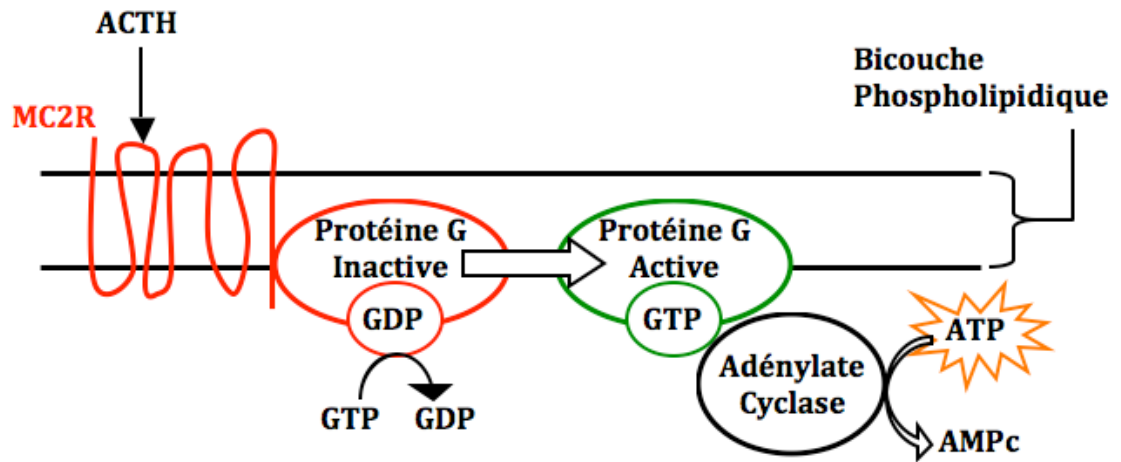


Figure 9 : L'ACTH et ses voies de signalisation intracellulaire [1, 17]

potassiques et calciques pour induire cet effet [16]. Il a également été démontré que l'administration chronique d'ACTH mène à l'hypertrophie de la glande surrénale et induit une diminution considérable de l'activité de l'enzyme *aldosterone synthase*, et donc une baisse de la synthèse de l'Aldostérone [5, 6]. Finalement, l'ACTH a la caractéristique d'augmenter le nombre de récepteurs du LDL présents sur les cellules du cortex surrénal et accroît l'activité des enzymes qui libèrent le cholestérol du LDL [2].

#### 1.1.4 Le Rôle Physiologique Principal de l'Aldostérone

L'Aldostérone a pour principale fonction d'induire la réabsorption sodique par les tubules corticaux rénaux, ce qui a pour conséquence d'augmenter la rétention d'eau par osmose, puisque la réabsorption de l'eau suit fidèlement celle du sodium [1, 2, 14, 15, 24]. Cependant, l'eau retourne dans le sang seulement si l'hormone antidiurétique a augmenté au préalable la perméabilité des tubules, et donc l'Aldostérone n'a pas d'impact direct sur l'équilibre hydrique [1]. À la suite de la réabsorption hydrosodique, il y a alors un accroissement du volume extracellulaire, ce qui mène à l'élévation de la pression artérielle [1, 2]. L'Aldostérone permet la réabsorption d'ions sodiques dans le sang et l'excrétion d'ions potassiques et hydrogènes (sous forme d'ammonium) dans l'urine en agissant sur la section tardive du tubule contourné distal et la section corticale du tube collecteur (Figure 10) [2, 15, 24, 28, 29]. Ainsi, l'Aldostérone a un impact sur la membrane basolatérale des cellules épithéliales principales du néphron en augmentant l'activité de la pompe  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase [2, 14]. Cette pompe a pour fonction de maintenir

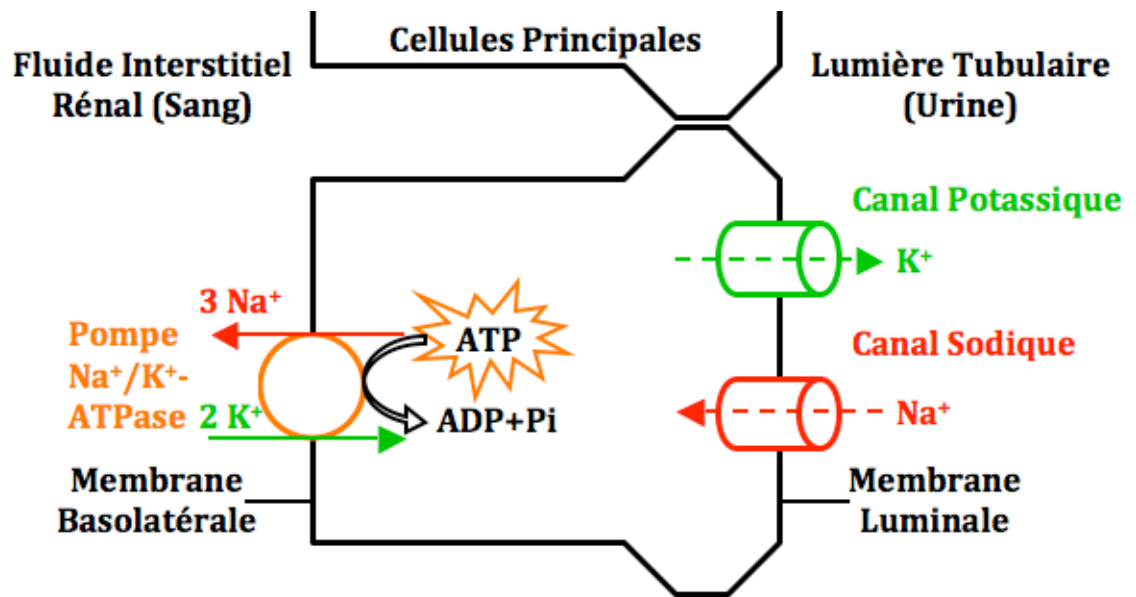


Figure 10 : Structure des cellules épithéliales principales de la section tardive du tubule contourné distal et de la section corticale du tube collecteur [2, 15]

une concentration sodique faible à l'intérieur des cellules principales. Ainsi, le sodium est réabsorbé dans le fluide interstitiel rénal, ce qui permet de favoriser la diffusion du Na<sup>+</sup>, qui provient de la lumière tubulaire, dans les cellules principales via des canaux sodiques [2]. D'ailleurs, l'Aldostérone a également un impact sur la quantité de canaux sodiques présents à la membrane luminaire [14, 15, 30]. La pompe Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase induit aussi l'entrée d'ions K<sup>+</sup> dans les cellules principales. Les ions potassiques diffusent ensuite dans la lumière tubulaire via des canaux potassiques pour s'ajouter au filtrat urinaire. Dans les deux cas, la diffusion des ions Na<sup>+</sup> et K<sup>+</sup> est attribuable au gradient de concentration induit [2]. En bref, l'action de l'Aldostérone consiste à diminuer la concentration plasmatique d'ions K<sup>+</sup> et à augmenter la concentration plasmatique d'ions Na<sup>+</sup> [2, 14, 24]. De plus, l'Aldostérone est le stéroïde lié à la plus grande capacité de rétention sodique, soit d'au moins 40 fois plus que le cortisone, le corticostérone, le cortisol ou encore le deoxycorticostérone [24, 25]. La réabsorption sodique a lieu dans la plupart des sections du néphron, cependant la petite fraction qui est réabsorbée à la suite de l'action de l'Aldostérone a un effet significatif sur la balance électrolytique [15]. Enfin, l'action de l'Aldostérone sur la balance ionique a lieu dans les cellules épithéliales de l'intestin, des glandes salivaires et sudoripares [1, 14, 15, 24, 27].



### 1.1.5 Les Récepteurs de l'Aldostérone

Le mécanisme d'action cellulaire de l'Aldostérone induisant la réabsorption d'ions sodiques n'est pas encore totalement compris, mais en voici les constituantes principales connues jusqu'à ce jour [2, 14, 15]. Tout d'abord, l'Aldostérone peut diffuser facilement à l'intérieur des cellules épithéliales du TCD et du tube collecteur puisque les hormones stéroïdiennes sont liposolubles, et donc, elles traversent aisément les bicouches phospholipidiques qui constituent les membranes (Figure 11) [2, 14, 31]. Puis, l'Aldostérone lie les récepteurs minéralocorticoïdes (RM) de type I cytoplasmiques spécifiquement, puisque ce sont les récepteurs pour lesquels l'Aldostérone a le plus d'affinité [2, 28-31]. Cependant, les glucocorticoïdes ont également une forte affinité pour ces récepteurs. Or, l'Aldostérone circulante est présente dans la circulation en beaucoup plus faible quantité que les glucocorticoïdes, et donc ceux-ci devraient

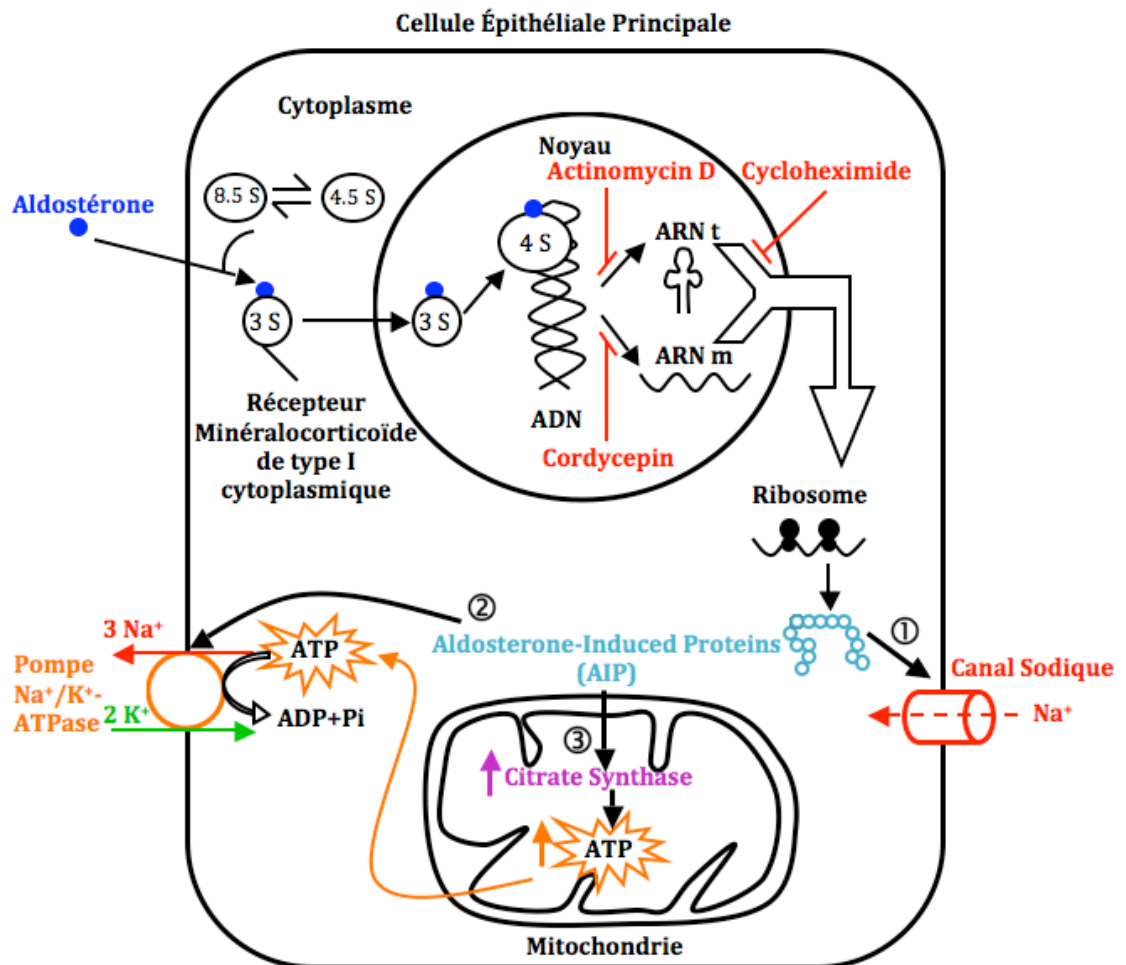


Figure 11 : Actions intracellulaires de l'Aldostérone dans les cellules épithéliales principales permettant d'induire la réabsorption sodique [14]

occuper en majorité les récepteurs de l'Aldostérone. Ce qui confère la spécificité de ces récepteurs pour les minéralocorticoïdes, plutôt que les glucocorticoïdes, est la présence, dans le segment distal du néphron, de l'enzyme 11 $\beta$ -hydroxystéroïde déshydrogénase de type 2 (11 $\beta$ -HSD2). L'enzyme 11 $\beta$ -HSD2 inactive localement les glucocorticoïdes, ce qui permet à l'Aldostérone d'être le corticoïde majoritaire à lier les RM de type 1 [29]. Le récepteur cytosolique de l'Aldostérone a une taille de 8.5 ou 4.5 unités Svedburg (S) [14]. Par la suite, l'Aldostérone forme un complexe nucléaire soluble de 3 S, avec le récepteurs cytoplasmique, qui transloque dans le noyau et forme un complexe 4 S en se liant à la chromatine de l'ADN [2, 14, 15, 28, 30, 31]. Ensuite, ce complexe induit la production d'ARN messager et d'ARN de transfert (ARNt), qui diffusent dans le cytoplasme et interagissent avec des ribosomes pour synthétiser des protéines intermédiaires : *Aldosterone-Induced Proteins* (AIP) [2, 14, 15, 30, 31]. Ce mécanisme d'action de l'Aldostérone a été démontré véridique par Fanestil [14]. En effet, l'ajout d'antibiotiques, tel que l'*actinomycin D* qui inhibe la synthèse d'ARN de transfert en liant les résidus guanosine de l'ADN ou encore le *cordycepin* qui inhibe la synthèse d'ARN ribosomal et inhibe la conversion de l'ARN nucléaire hétérogène en ARNm cytoplasmique fonctionnel, a eu pour effet d'inhiber la synthèse d'AIP. De plus, l'ajout d'inhibiteurs de la synthèse protéique, tel que la *cycloheximide* qui empêche le transfert des acides aminés de l'ARNt à la chaîne polypeptidique, a eu pour effet de bloquer la réponse hormonale de l'Aldostérone en inhibant la synthèse d'AIP [14].

Il existe trois différents types d'AIP qui sont produits pour induire l'effet biologique de l'Aldostérone [14]. Tout d'abord, une AIP recrute et active des canaux sodiques inactifs afin d'augmenter la perméabilité à l'ion Na<sup>+</sup> dans la membrane luminale des cellules épithéliales ① (Figure 11) [14, 15, 30]. Ensuite, la synthèse protéique produit une seconde AIP, soit l'enzyme sodium-potassium adénosine triphosphatase, qui migre ensuite à la membrane basolatérale des cellules principales pour permettre la sortie de sodium, et donc l'action de l'Aldostérone n'est pas d'activer les pompes déjà présentes, mais bien d'en synthétiser de nouvelles ② [14, 15, 28, 30]. Cependant, cette pompe Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase nécessite de l'énergie sous forme d'ATP pour permettre le transport actif du sodium. Donc, la troisième AIP produite dans le cytoplasme est la citrate synthase qui migre dans la matrice mitochondriale et catalyse ensuite la synthèse de citrate à partir d'oxaloacétate et d'acétyl CoA ③. Ainsi, il y a une

grande quantité de citrate synthétisé qui peut alors traverser la voie oxydative mitochondriale en formant de l'énergie sous forme d'ATP [14, 15, 30]. Ces trois actions induites par l'Aldostérone sur différents gènes ont pour conséquence de permettre un flux sodique unidirectionnel à travers les cellules épithéliales principales du TCD et du tube collecteur [30].

Suite à la sécrétion d'Aldostérone, il y a un délai de 60 à 90 minutes avant d'observer le transport unidirectionnel du sodium. Ceci est attribuable au temps nécessaire à la production d'ARNm et ARNt, qui nécessite environ 30 minutes, et ensuite à la synthèse des protéines intermédiaires AIP. Après cette période de latence, il y a un accroissement linéaire du transport sodique sur une période de 6 heures [2, 14]. Enfin, il est important de noter que les récepteurs minéralocorticoïdes sont présents non seulement dans les reins, mais aussi dans la vessie, les glandes salivaires et sudoripares, les poumons, l'intestin, le foie et le cœur [15, 30]. D'ailleurs, il a été démontré que des organes du système cardiovasculaire sécrètent également de l'Aldostérone afin que cette hormone paracrine régule la fonction cardiaque [1].

### ***1.1.6 La Distribution et la Dégradation de l'Aldostérone***

En condition normale, il y a relativement peu d'Aldostérone sécrétée dans l'organisme humain, soit environ 70 à 250µg par jour [14, 24, 25, 31]. La concentration plasmatique habituelle de l'Aldostérone est de 1 à 12ng/100mL et le *Metabolic Clearance Rate* (MCR) de l'Aldostérone est de 1200 à 1600L de plasma par jour [14, 24]. La clairance métabolique est décrite comme étant le volume de plasma duquel les stéroïdes sont effacés complètement et irréversiblement par unité de temps [24]. L'Aldostérone n'est pas conservée dans aucun organe et elle est transportée dans la circulation sanguine sous forme non liée à 30 à 40% ou liée aux lipoprotéines et à l'albumine à 60 à 65%. Le temps de demi-vie de l'Aldostérone dans le sang est plutôt court, soit environ 20 minutes [3, 31].

L'excrétion urinaire de l'Aldostérone est de 5 à 20µg par jour, donc son excrétion sous forme inchangée ne constitue que 0,1% des produits urinaires de l'Aldostérone [14]. Ceci s'explique facilement par le fait que l'Aldostérone est éliminée

pratiquement en totalité lors d'un seul passage hépatique, puisque son taux d'extraction hépatique est de 85 à 95% [14]. En fait, la plupart du métabolisme de l'Aldostérone a lieu au niveau du foie, soit de 85 à 92%, alors que les reins ne sont responsables que de 5 à 10% de son métabolisme [5]. Ensuite, environ la moitié des métabolites de l'Aldostérone sont excrétés dans les urines sous forme de conjugués glucuronides, dont les plus fréquents sont le 3-glucuronide, conjugué au tétrahydroaldostérone et constituant 20 à 30% des produits urinaires de l'Aldostérone, et le 18-glucuronide, conjugué à l'Aldostérone et qui constitue 7 à 12% des produits urinaires de l'Aldostérone [14, 25, 31, 32]. L'étape de la conjugaison, réalisée par la glucuronyl transférase, a lieu principalement au niveau des microsomes du foie, mais aussi en plus faible proportion au niveau des reins. Ainsi, les microsomes utilisent le substrat *uridinediphosphoglucuronic acid* (UDPGA) et catalysent la réaction :  $UDPGA + \text{Stérol} \rightarrow \text{Stéroïde Glucuronide} + \text{UDP}$  [14, 15]. Le métabolite urinaire principal de l'Aldostérone est le tétrahydroaldostérone ( $3\alpha, 11\beta, 21$ -trihydroxy-20-oxo- $5\beta$ -pregnan-18-al) qui constitue 15 à 40% des produits urinaires excrétés avec une excrétion journalière de 0.46mg [14, 24, 25, 31, 33]. On retrouve également dans les urines des métabolites d'acétal bicyclique tel que le  $3\alpha$ -Hydroxypregnane ( $11\beta, 18S$ ) ( $18S-20\alpha$ )-dioxide (8%) et le  $3\alpha, 21$ -Dihydroxypregnane ( $11\beta, 18S$ ) ( $18S-20\alpha$ )-dioxide (2%) [14]. Enfin, d'autres métabolites sont sécrétés en quantité plus infime tel que le  $3\alpha, 5\alpha$ -tetrahydroaldostérone, le  $3\beta, 5\beta$ -tertahydroaldostérone, le  $5\beta$ -dihydroaldostérone, le 21-deoxytetrahydroaldostérone, le  $11\beta$ -hydroxy-3,20-dioxo-4-pregnen-18-al, le  $11\beta, 21$ -dihydroxy-3, 20-dioxo- $5\beta$ -pregnan-18-al, le  $3\alpha, 11\beta$ -dihydroxy-20-oxo- $5\beta$ -pregnan-18-al et le  $11\beta, 21$ -Dihydroxy-18-oxopregnane-3,20-dione [14, 24, 25, 31]

## 1.2 L'Aldostérone et les Pathologies Cardiovasculaires

Les maladies cardiovasculaires ont été la cause principale de mort à travers le monde dans la dernière décennie et elles ont été responsables de 29% des décès en 2001. Ce phénomène a été observé dans le dernier siècle dans les pays riches et développés, mais désormais les pays à revenus faibles et intermédiaires voient une augmentation inquiétante de leur taux d'individus atteints de maladies cardiovasculaires. Les facteurs de risques des maladies cardiovasculaires sont multiples. Un premier facteur est

l'hypertension qui est définie comme étant une pression sanguine de 140/90 mm de mercure ou supérieure. Cependant, le taux d'hypertension non diagnostiqué, et donc non traité, est très élevé. Ainsi, il a été estimé que 14% des décès mondiaux sont attribuables à des niveaux non optimaux, ou non contrôlés, de pression artérielle. Un second facteur est le cholestérol, puisque un taux élevé de cholestérol *Low-Density Lipoproteins* (LDL) sanguin est responsable de 56% des cardiopathies ischémiques à travers le monde. Cependant, les cholestérols *High-Density Lipoproteins* (HDL) sont de bons cholestérols puisqu'ils améliorent la santé cardiovasculaire. En effet, à chaque augmentation de 1 mg/dL de HDL cholestérol, il y a une diminution de 2 à 3% de risque de développer des maladies cardiovasculaires. Ensuite, la consommation tabagique est considérée comme étant un facteur de risque important qui pourrait être facilement évitable. Il ne faut pas oublier que la fumée secondaire participe à l'accroissement de 1,31 fois du risque d'être atteint de troubles cardiovasculaires. L'inactivité physique est également un facteur de risque de maladie cardiovasculaire qui a une prévalence importante dans les pays riches. Les lignes directrices actuelles suggèrent soit de l'exercice modéré durant 30 minutes 5 fois par semaines ou encore une activité physique soutenue et intense pendant 20 minutes 3 fois par semaines, mais malheureusement peu d'individus les respectent. Une alimentation inappropriée constituée de gras animal saturé, d'acides gras trans et de carbohydrates simples constitue aussi un facteur de risque de troubles cardiovasculaires. En fait, une combinaison d'un manque d'exercice à une alimentation non saine peut mener indubitablement à de l'obésité, une autre cause importante de maladies cardiovasculaires. Une étude réalisée en 2005 a estimé que 23% des adultes âgés de plus de 20 ans ont un surpoids, c'est-à-dire que leur indice de masse corporelle (IMC) est supérieur à 25, et qu'un 10% additionnel de la population adulte est obèse (IMC>30). Enfin, le diabète est aussi une maladie ayant une grande prévalence, affectant près de 180 millions de personnes dans le monde, qui a un impact important sur le développement des maladies cardiovasculaires. En fait, l'impact du diabète de type 2 sur la santé cardiovasculaire est tel que cela induit un risque comparable à vieillir de 15 ans. Également, les patients atteints de diabète sont de 2 à 8 fois plus susceptibles d'avoir des évènements cardiovasculaires. En bref, les maladies cardiovasculaires ont une prévalence beaucoup trop importante actuellement et les deux facteurs de risques majoritaires les induisant sont l'hypertension artérielle et la présence d'une faible concentration de cholestérol HDL et une grande concentration de cholestérol LDL [34].

### ***1.2.1 L'Insuffisance Cardiaque***

Tout d'abord, l'insuffisance cardiaque (IC) est une cause importante de mortalité, de morbidité, avec un millions d'hospitalisations annuellement aux États-Unis, et induit une élévation des coûts de la santé [35, 36]. De plus, l'incidence de l'IC augmente avec l'âge et au Canada, en 2004, 85% des patients hospitalisés pour cette maladie avaient 65 ans ou plus [37]. Donc la quête d'une solution thérapeutique pour améliorer la qualité de vie des patients atteints d'IC s'avère d'autant plus importante au sein de notre population vieillissante.

L'insuffisance cardiaque fait référence à l'incapacité du cœur à assurer un débit cardiaque suffisant pour permettre de satisfaire les besoins de l'organisme en nutriments et en oxygène [2]. Il s'agit d'un syndrome chronique qui résulte d'une anomalie de la fonction cardiaque, tel qu'une défaillance de la contraction (dysfonction systolique) ou encore du remplissage (dysfonction diastolique) des ventricules. De plus, il est important de faire une spécification quant au type d'insuffisance cardiaque dont il est question. L'IC peut atteindre soit le ventricule gauche, soit le ventricule droit ou encore les deux, on parle alors d'IC globale. Aussi, il existe une distinction importante entre l'insuffisance cardiaque et l'insuffisance cardiaque congestive (ICC). L'insuffisance cardiaque fait référence à tous les types de pathologies pouvant l'induire, tel que les valvulopathie, l'hypertension, les cardiomyopathies génétiques ou encore l'infarctus du myocarde. L'insuffisance cardiaque congestive, quant à elle, est spécifiquement attribuable à un infarctus du myocarde. Ce phénomène a pour effet de diminuer la fonction de pompe du cœur en l'empêchant de contracter normalement, et ce, dû à l'hypoxie causant la mort des myocytes cardiaques. Étant donné que les myocytes cardiaques ne peuvent pas se régénérer, la perte de fonction cardiaque est directement proportionnelle au nombre de myocytes inactifs. Enfin, seule l'ICC peut induire de l'hypertension pulmonaire.

L'IC est la conséquence d'une anomalie dans la structure, la fonction, le rythme ou la conduction cardiaque [35, 38]. Ainsi, l'insuffisance cardiaque est un trouble progressif débutant à la suite d'un événement déclencheur particulier pouvant être brutal, tel qu'un infarctus du myocarde (IM) où il y a une perte de la fonctionnalité

des myocytes cardiaques, ou encore progressif en étant causé par de l'hypertension artérielle induisant une vasoconstriction périphérique excessive, ou également attribuable à une cardiomyopathie génétique ou une valvulopathie [2, 34, 35, 37-39]. Peu importe la nature de cet événement, il aura toujours pour conséquence d'induire une anomalie dans la fonction de pompe du cœur et de diminuer le débit cardiaque [2, 39].

À la suite d'une baisse de la capacité de pompage du cœur, des mécanismes compensatoires sont activés pour permettre un maintien de la fonction ventriculaire gauche afin que la capacité fonctionnelle du patient soit conservée au maximum. Voici un éventail des différents mécanismes compensatoires. Tout d'abord, il y a une activation précoce du système nerveux adrénergique et du système Rénine-Angiotensine-Aldostérone (RAAS), qui permet la rétention hydrosodique, afin de maintenir le débit cardiaque [27, 35, 38, 39]. Cependant, une activation persistante du RAAS est délétère chez les patients atteints d'ICC, puisque cela induit une expansion inappropriée des volumes intravasculaires et extravasculaires [27, 36, 40]. Cette augmentation du volume sanguin et du retour veineux provoque alors une élévation de la pression auriculaire, ce qui induit la libération de peptides natriurétiques auriculaires et ventriculaires, tel que l'ANP (Atrial Natriuretic Peptide), le BNP (Brain Natriuretic Peptide), et le CNP. Ainsi, ces peptides neutralisent le système RAAS, puisque qu'ils favorisent l'excrétion hydrosodique et permettent alors d'éviter le développement d'une congestion systémique [27, 36, 39]. De plus, diverses molécules vasodilatatrices, tel que les peptides natriurétiques, l'oxyde nitrique, les prostaglandines et les kinines, sont sécrétées en réponse à la vasoconstriction excessive induite par le système adrénergique. Ainsi, la libération de molécules vasodilatatrices permet de conserver une fonction systolique déprimée, mais qui néanmoins permet aux patients de demeurer asymptomatiques ou peu symptomatiques durant plusieurs années, on qualifie alors l'IC de compensée [39]. En insuffisance cardiaque compensée certains symptômes, tel que la dyspnée à l'effort et la fatigue, n'apparaissent que lors d'un travail musculaire lourd [27]. Cependant, lorsque les patients sont symptomatiques, c'est à dire qu'il y a apparition de ces symptômes au repos ou lors d'un effort moindre, alors l'IC est décompensée et on constate une augmentation impressionnante des taux de mortalité et de morbidité [27, 36, 39]. Ce qui mène à l'insuffisance cardiaque décompensée est l'avènement d'une réduction de la perfusion rénale [27, 36]. S'en suit alors d'une surexpression de

molécules biologiquement actives, tel que l'Aldostérone, l'Angiotensine II, les cytokines, la noradrénaline, l'endothéline et le TNF- $\alpha$ , qui exercent des effets délétères sur le système cardiovasculaire en induisent le remodelage et la dilatation du VG, la fibrose dans le système cardiovasculaire et une augmentation dramatique des volumes intra et extravasculaires [27, 34, 36, 39]. Évidemment, la progression de l'IC est également attribuable à la perte des effets bénéfiques des vasodilatateurs endogènes qui ne parviennent plus à freiner la vasoconstriction induite par le système adrénergique [39].

L'Aldostérone a un rôle important dans la physiopathologie de l'ICC. Ainsi, cette hormone est impliquée dans la progression de l'insuffisance cardiaque congestive et de ses symptômes dû à l'activation des récepteurs minéralocorticoïdes au niveau de différents organes, dont entre autre le cœur, les vaisseaux et les poumons qui possèdent des RM, tout en induisant son effet classique sur la réabsorption hydrosodique rénale [34, 36, 41-45]. D'ailleurs, il a été démontré que les RM présents dans le système cardiovasculaire et dans les tissus fibreux sont exprimés en concomitance avec l'enzyme 11 $\beta$ -hydroxystéroïde déshydrogénase de type 2 (11 $\beta$ -HSD2) [36, 44, 46-51]. En effet, tout comme au niveau rénal, les RM présents dans d'autres organes nécessitent la présence de l'enzyme 11 $\beta$ -HSD2 qui permet de conférer la spécificité des récepteurs pour l'Aldostérone. Sans la présence de cette enzyme, les RM ont une affinité équivalente pour les minéralocorticoïdes et les glucocorticoïdes, qui ont des niveaux circulants nettement supérieur à l'Aldostérone, et donc les RM seraient occupés en majorité par les glucocorticoïdes [36, 44, 52-55]. Toutefois, l'enzyme 11 $\beta$ -HSD2 converti uniquement les glucocorticoïdes en produits 11-céto inactifs pour ainsi favoriser l'accès aux RM à l'Aldostérone [36, 52]. De plus, l'Aldostérone active le système sympathique et inhibe le système parasympathique, induit le dysfonctionnement des barorécepteurs, bloque l'absorption de noradrénaline par le myocarde, induit des arythmies, permet la promotion de l'inflammation et du stress oxydatif ainsi que le développement de la fibrose myocardique et vasculaire [27, 34-36, 40, 43, 44, 56-69]. L'Aldostérone induit aussi la production de collagène, le remodelage structurel et fonctionnel des tissus cardiaques, et donc de l'hypertrophie ventriculaire, ainsi que des dommages vasculaires et une diminution de la compliance artérielle [27, 40, 43, 44, 60,



62, 70]. Aussi, l'activation des récepteurs minéralocorticoïdes par l'Aldostérone a des implications pathophysiologiques dû à son rôle fondamental sur la fonction endothéliale et pour augmenter le renouvellement de la matrice extracellulaire, phénomènes associés à de la fibrose cardiaque, rénale et pulmonaire [35, 36, 44, 71-77]. Également, chez les patients atteints d'IC, les taux urinaire et plasmatique de cette hormone sont augmentés [27, 36, 40, 78-82]. Enfin, lors d'ICC, il y a une augmentation de la biosynthèse myocardique et vasculaire de l'Aldostérone, puisque l'enzyme CYP 11B2 est présente dans ces tissus [36, 44, 59, 83-91].

### ***1.2.2 L'Hypertension Pulmonaire Associée à l'Insuffisance Cardiaque***

L'hypertension pulmonaire (HP) est définie par une pression pulmonaire artérielle moyenne (mPAP) supérieure à 25 mmHg au repos [34, 92]. La première classification de l'HP a été réalisée par l'Organisation Mondiale de la santé (OMS) en 1973. En 2008, le 4<sup>ième</sup> symposium mondial sur l'HP a eu lieu en Californie. Lors de cet événement, des modifications de la classification déjà existante ont été apportées (Tableau I) [92, 93]. Ainsi, la catégorie *PH owing to LHD*, autrefois nommée *PH with left heart disease*, a été modifiée afin de faire une distinction entre les diverses maladies cardiaques gauche, tel que la dysfonction systolique, diastolique ou valvulaire, puisque la classification de 2003 du symposium mondial de l'HP de Venise manquait de clarté à cet égard et ne reflétait plus fidèlement la littérature publiée [92, 93].

L'hypertension pulmonaire est reconnue comme étant un problème de santé majeur et la cause la plus fréquente de cette pathologie est l'insuffisance cardiaque [92, 94-97]. D'ailleurs, 70% des patients atteints d'IC et dont la fraction d'éjection est normale développent une HP [97]. L'HP a aussi une conséquence néfaste qui fait progresser la pathologie, soit le développement d'une insuffisance ventriculaire droite [34, 92, 94-98]. De plus, l'HP, plus particulièrement lorsqu'elle est associée à une dysfonction VD, est l'un des facteurs de mauvais pronostic de l'IC et réduit la capacité à l'exercice [94-96]. L'hypertension pulmonaire est en fait une HP veineuse et il s'agit de la forme d'HP la plus commune [34, 98]. Lors d'HP veineuse, les patients ont une pression veineuse pulmonaire élevée qui est attribuable à une dysfonction VG. Ainsi, le déclenchement de cette pathologie est conséquent à une élévation chronique de la

**Tableau I : Classification actualisée en 2008 de l'hypertension pulmonaire [93]**

<b>1. Pulmonary arterial hypertension (PAH)</b> 1.1. Idiopathic PAH 1.2. Heritable 1.2.1. BMPR2 1.2.2. ALK1, endoglin (with or without hereditary hemorrhagic telangiectasia) 1.2.3. Unknown 1.3. Drug- and toxin-induced 1.4. Associated with 1.4.1. Connective tissue diseases 1.4.2. HIV infection 1.4.3. Portal hypertension 1.4.4. Congenital heart diseases 1.4.5. Schistosomiasis 1.4.6. Chronic hemolytic anemia 1.5 Persistent pulmonary hypertension of the newborn
<b>1'. Pulmonary veno-occlusive disease (PVOD) and/or pulmonary capillary hemangiomatosis (PCH)</b>
<b>2. Pulmonary hypertension owing to left heart disease</b> 2.1. Systolic dysfunction 2.2. Diastolic dysfunction 2.3. Valvular disease
<b>3. Pulmonary hypertension owing to lung diseases and/or hypoxia</b> 3.1. Chronic obstructive pulmonary disease 3.2. Interstitial lung disease 3.3. Other pulmonary diseases with mixed restrictive and obstructive pattern 3.4. Sleep-disordered breathing 3.5. Alveolar hypoventilation disorders 3.6. Chronic exposure to high altitude 3.7. Developmental abnormalities
<b>4. Chronic thromboembolic pulmonary hypertension (CTEPH)</b>
<b>5. Pulmonary hypertension with unclear multifactorial mechanisms</b> 5.1. Hematologic disorders: myeloproliferative disorders, splenectomy 5.2. Systemic disorders: sarcoidosis, pulmonary Langerhans cell histiocytosis: lymphangioleiomyomatosis, neurofibromatosis, vasculitis 5.3. Metabolic disorders: glycogen storage disease, Gaucher disease, thyroid disorders 5.4. Others: tumoral obstruction, fibrosing mediastinitis and chronic RF on dialysis

pression de remplissage diastolique du VG, et donc, conséquemment il y a une augmentation de la pression dans le système veineux pulmonaire [34, 97]. Ce phénomène provoque alors une vasoconstriction dans le lit artériel pulmonaire [94, 97, 98]. Également, d'autres mécanismes d'adaptation pulmonaire à l'IC sont induits, tel que le remodelage structurel pulmonaire et une prolifération abondante de myofibroblastes (MYFs) pulmonaires [93, 95, 99-102]. La prolifération des MYFs est également associée à des dépôts significatifs de collagène et de réticuline dans les septa alvéolaires, conduisant à l'épaississement des cellules de la membrane basale de

l'endothélium capillaire et de l'épithélium alvéolaire (formant la barrière alvéolo-capillaire), ce qui entraîne une réduction de la compliance pulmonaire, dû à une augmentation de la résistance vasculaire pulmonaire total, et ce, afin d'offrir une protection contre la formation d'œdème pulmonaire [34, 79, 95, 99, 101-107]. Ces mécanismes induisent un syndrome respiratoire restrictif conséquent à l'IC, affectant la mécanique pulmonaire et les échanges gazeux, ce qui conduit à la perte des capacités fonctionnelles des patients atteints d'ICC [79, 94, 95, 99, 100, 102, 103, 105, 108]. Évidemment, la réduction de la capacité pulmonaire totale est proportionnelle à la gravité de la pathologie cardiaque, tel que mesuré à partir de tests sur la fonction pulmonaire à l'exercice [107]. Malheureusement, les déterminants biologiques du remodelage structurel pulmonaire associée à l'IC sont actuellement inconnus.

Une des molécules biologiques de l'organisme qui pourrait être responsable du remodelage structurel pulmonaire associé à l'IC est l'Aldostérone. Tout d'abord, la présence des RM a été démontrée dans les poumons [41, 79]. De plus, la littérature a révélée que l'Aldostérone pourrait jouer un rôle dans le développement de fibrose pulmonaire [75, 79]. Également, l'utilisation de Spironolactone s'est démontrée efficace pour améliorer la diffusion des gaz pulmonaires et la capacité à l'exercice chez les patients atteints d'IC [79]. Une augmentation du taux plasmatique d'Aldostérone a été observée dans diverses maladies pulmonaires, tel qu'une érythrocytose secondaire à une maladie pulmonaire obstructive chronique (MPOC), une hypertension pulmonaire primaire ou encore une hypertension pulmonaire conséquence à une MPOC [109-111]. Enfin, lors de traitements à l'adrénomédulline et au captopril, une diminution du taux plasmatique d'Aldostérone a été constatée et des impacts bénéfiques sur la fonction hémodynamique de patients atteints d'hypertension pulmonaire ont été observés [112, 113].

### ***1.2.3 Les Traitements Actuels de l'Hypertension Pulmonaire***

Dans les dernières années, divers traitements ont été testés cliniquement chez des patients ayant développé de l'hypertension pulmonaire conséquence à de l'insuffisance cardiaque. Tout d'abord, en 1997 l'étude FIRST (*Flolan International Randomized Survival Trial*), où le traitement employé était l'époprosténol, a été entreprise chez des

patients ayant une IC sévère. Des bénéfices ont été observés sur la fonction hémodynamique des patients recevant ce traitement additionnel, cependant, l'étude a dû être arrêtée de manière prématurée en raison d'une augmentation de la mortalité de 12% après 6 mois d'utilisation [34, 97, 98, 114]. Cette mortalité était attribuable pour la plupart des patients à une insuffisance cardiaque congestive progressive [114]. Ensuite, des études avec les antagonistes des récepteurs de l'endothéline ont été réalisées. Ainsi, l'étude REACH-1 (*Research on Endothelin Antagonists in Chronic Heart failure*) a été réalisée chez des insuffisants cardiaques avancés. Le traitement de Bosentan a toutefois dû être arrêté prématurément en raison du taux élevé des transaminases chez les patients [98, 115]. Par la suite, l'étude ENABLE (*Endothelin Antagonist Bosentan for Lowering cardiac Event in heart failure*) a étudié les conséquences d'un abaissement des doses de Bosentan chez des patients IC. Cependant, aucun bénéfice n'a pu être démontré et en plus il y a eu une augmentation des risques d'exacerbation des IC [34, 97, 98, 116]. Toutefois, l'administration de Bosentan a été bénéfique chez des patients qui étaient inadmissibles pour une transplantation cardiaque, puisque cette administration a permis de résorber une HP sévère et irréversible. Ainsi, les patients ont pu recevoir leur transplantation, et ce, avec succès. Un dernier médicament a été étudié pour le traitement de l'HP consécutive à une IC, soit le sildénafil, un inhibiteur de la phosphodiesterase-5 (PDE-5). Trois études ont été menées durant de courtes durées chez des patients atteints d'ICC/HP et ont démontré que le sildénafil améliore les fonctions hémodynamiques, le pic  $VO_2$  et permet une vasodilatation pulmonaire au repos et à l'exercice [34, 98, 117-119]. Bref, actuellement, aucune médication ne peut traiter de manière spécifique l'hypertension pulmonaire associée à l'IC. Il est d'ailleurs très important, pour l'instant, de traiter en priorité la pathologie cardiaque gauche induisant l'hypertension pulmonaire et de s'assurer de sa stabilité, puisqu'en diminuant l'ampleur de l'IC, l'HP en est à son tour diminuée [34, 97]. Dû à l'augmentation faramineuse du risque de mortalité lors de la concomitance de ces deux pathologies, la quête d'un traitement spécifique à l'HP s'avère d'autant plus importante. Il reste encore plusieurs voies qui peuvent être étudiées pour le traitement de l'hypertension pulmonaire consécutive à l'ICC, dont, entre autre, une utilisation à long terme du sildénafil, ou encore une autre voie qui n'a pas encore été étudiée, tel que l'Aldostérone [98]. Même si les antagonistes de l'Aldostérone sont actuellement utilisés pour traiter l'IC, leurs effets sur le remodelage pulmonaire et l'HP sont inconnus.

### 1.3 Les Myofibroblastes Pulmonaires

Les myofibroblastes (MYFs) sont des cellules en forme d'étoile qui sont présentes dans plusieurs tissus de l'organisme et dont l'apparence, la morphologie et la fonction sont semblables, et ce, indépendamment du tissu d'où ils proviennent [101, 102, 120]. Ces cellules ont été décrites pour la première fois par Gabbiani et al. comme étant des fibroblastes modifiés qui ont la capacité de contraction des cellules musculaires lisses, leur conférant le phénotype parfait pour participer à la cicatrisation [120-122]. D'ailleurs, ces cellules, ont été nommées 'myofibroblastes' en 1971 par Majno, un collègue de Gabbiani [120, 123, 124]. Les MYFs ont un rôle physiologique dans la cicatrisation, la phagocytose, la synthèse et la réparation de la matrice extracellulaire, la régulation de la prolifération et de la différenciation des cellules endothéliales, la régulation du flux sanguin, l'angiogenèse, la perméabilité vasculaire, l'inflammation, la fibrose, la croissance et le développement des tissus et des organes [101, 102, 120, 122, 125-128]. De plus, l'activation ou la prolifération des myofibroblastes induit de nombreuses maladies affectant différents organes, tel la fibrose myocardique, l'athérosclérose, les microvasculopathies, la resténose des artères coronaires, l'hypertension pulmonaire, la fibrose interstitielle pulmonaire, la sarcoïdose, la fibrose tubulo-interstitielle rénale ou encore la glomérulonéphrite proliférative et sclérosante [120, 128]. Également, dû à leur ubiquité dans l'organisme, les MYFs sont des joueurs majeurs dans les maladies multisystémiques [120]. Voici d'ailleurs une liste des fonctions des myofibroblastes lorsqu'ils sont présents dans certains organes principaux, soit le cœur, les poumons et les reins (Tableau II). Afin d'exécuter ces fonctions, les MYFs vont sécréter divers médiateurs solubles, tel que les chémokines, les cytokines, les facteurs de croissance ou les médiateurs inflammatoires (Tableau III) [101, 120, 128]. Évidemment, les myofibroblastes nécessitent la présence de multiples récepteurs exprimés à leur surface afin de répondre aux signaux environnant pour exécuter leurs rôles (Tableau IV). D'ailleurs, l'Aldostérone est un important facteur soluble qui permet de promouvoir l'activation des MYFs [120]. En effet, il a été démontré que l'Aldostérone stimule la croissance des MYFs dans le côlon distal, et ce, sans aucun apport de l'Angiotensine [129, 130]. Également, l'Aldostérone est reconnue pour stimuler la prolifération de myofibroblastes pour induire la fibrose myocardique [131].

Tableau II : Les fonctions des myofibroblastes dans les organes et tissus principaux [120]

Tissu ou Organe	Fonction
Cœur et Péricarde	Structure de la valve cardiaque; Réparation après l'IM
Poumons Cellules Contractiles Interstitielles	Formation des alvéoles
Reins Cellules Interstitielles Cellules Mésangiales	Croissance et différenciation des tubules Croissance et différenciation des tubules; Régulation du flux sanguin glomérulaire

Tableau III : Les médiateurs solubles sécrétés par les myofibroblastes [120]

Chémokines	Cytokines	Facteurs de Croissance	Médiateurs Inflammatoires
ENA GRO-1 $\alpha$ IL-8 MCP-1 MIP-1 $\alpha$ MIP-2 RANTES	IL-1 IL-6 IL-10 TNF- $\alpha$	bFGF CSF-1 GM-CSF HGF IGF-I IGF-II KGF NGF PDGF-AA PDGF-BB SCF TGF- $\beta$	CO HETEs H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> NO O <sup>-</sup> PAF PGE <sub>2</sub> Prostacycline Protéine Activatrice PLA <sub>2</sub>

Tableau IV : Les récepteurs exprimés par les myofibroblastes [120]

Cytokines	Facteurs de Croissance	Médiateurs de l'Inflammation	Neurotransmetteurs et Médiateurs Paracrines	Protéines d'Adhésion
IL-1 IL-1 Ra IL-4 R IL-6 R IL-8 R IL-11 R TNF- $\alpha$	aFGF R bFGF R <i>c-kit</i> FGFR-II IGF-IR PDGF- $\alpha$ PDGF- $\beta$ TGF- $\alpha$ /EGFR TGF- $\beta$ RI et RII Thrombine R	HETEs Prostaglandines	Acétylcholine <b>Aldostérone</b> Angiotensine II Bradykinine Endothéline Facteur Natriurétique A Histamine Sérotonine	CD18 ICAM-1 Intégrine $\alpha_1\beta_1$ MCP-1 NCAM VCAM-1

Lorsqu'ils sont activés, les myofibroblastes expriment la vimentine, la desmine et l' $\alpha$ -actine des muscles lisses et il s'agit des trois types de filaments les plus étudiés pour

permettre l'identification des MYFs en culture [101, 120, 122, 126, 127, 129, 130, 132]. Dépendamment des filaments exprimés par ces cellules, une classification des myofibroblastes est faite. En effet, les MYFs qui expriment la vimentine sont nommé V-type, la desmine D-type, l' $\alpha$ -actine des muscles lisses A-type, de même que lorsque plus d'un filament est présent, VD-type, VAD-type, etc. En plus des ces trois filaments principaux, les myofibroblasts expriment également la lamine, la myosine, le GFAP (*Glial Fibrillary Acidic Protein*), les actines  $\beta$  et  $\gamma$  et les tubulines des microtubules [101, 120, 122]. De plus, les MYFs activés expriment des molécules d'adhésion et des intégrines  $\alpha$  et  $\beta$  et produisent des molécules de la matrice tel que le collagène, la réticuline, la fibronectine, l'Ostéopontine et la ténascine-C [120, 122, 126, 127, 129-131, 133]. Une autre caractéristique propre aux MYFs est leur capacité à entrer en contact avec la matrice extracellulaire et à se joindre l'un à l'autre via des adhérentes et des jonctions communicantes (*gap junctions*) [120, 122, 127, 129, 130].

Les myofibroblastes peuvent être différenciés à partir de plusieurs types de cellules pour former des MYFs activés. Tout d'abord, les MYFs sont différenciés à partir de cellules souches embryonnaires à la suite de la sécrétion du PDGF (*Platelet-Derived Growth Factor*) et du SCF (*Stem Cell Factor*) [120]. Les MYFs sont également différenciés à partir des fibroblastes, et ce, en deux étapes. Tout d'abord, sous contrainte mécanique, les fibroblastes se différencient en proto-MYFs, qui sont des MYFs qui n'expriment pas l' $\alpha$ -actine des muscles lisses, mais qui sont malgré tout capables de générer de la force contractile. Ensuite, le TGF- $\beta$  (*Transforming Growth Factor- $\beta$* ) augmente l'expression de la ED-A fibronectine, puis ces deux facteurs s'allient aux contraintes mécaniques pour promouvoir la transdifférenciation des proto-MYFs en MYFs différenciés [120, 122, 125, 127, 133, 134]. Les MYFs différenciés expriment alors l' $\alpha$ -actine des muscles lisses, ainsi qu'une plus grande quantité de la ED-A fibronectine et peuvent générer une force de contraction nettement supérieure à celle des proto-MYFs [122].

Dans les tissus pulmonaires sains, on retrouve un nombre limité de MYFs pulmonaires dans les septa alvéolaires au niveau de la lame basale des microvaisseaux, et ce, près des jonctions des cellules endothéliales [101, 135]. Cependant, lors d'ICC il y

a une prolifération importante des MYFs pulmonaires. S'en suit alors d'une production de collagène et de réticuline, qui entraîne des dépôts significatifs de matrice interstitielle dans les septa alvéolaires, conduisant à l'épaississement des cellules de la membrane basale de l'endothélium capillaire et de l'épithélium alvéolaire, ce qui entraîne une réduction de la compliance pulmonaire afin d'offrir une protection contre la formation d'œdème [99, 101-107]. Bref, une surproduction de MYFs pulmonaires entraîne un syndrome respiratoire restrictif, du remodelage et mène à l'hypertension pulmonaire [95, 101]. Enfin, il a été démontré que la différenciation et l'activité des myofibroblastes consécutive à la sécrétion de TGF- $\beta$  nécessite la présence d'Ostéopontine [127, 136].

## 1.4 L'Ostéopontine

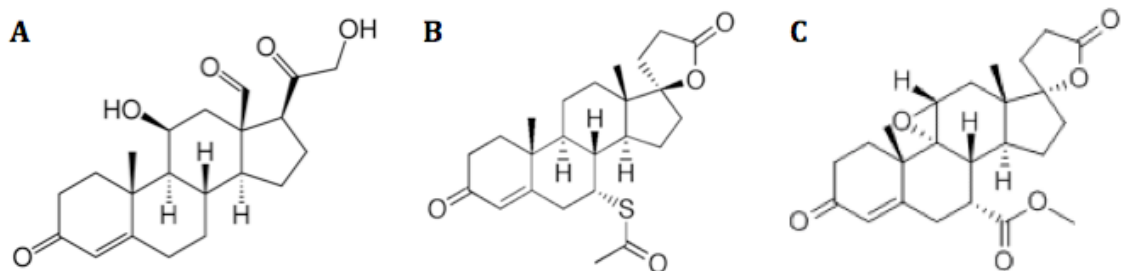
L'Ostéopontine (OPN) est une protéine qui contient 314 acides aminés, dont la séquence de liaison arginine-glycine-acide aspartique (RGD), et est sécrétée par une variété de cellules, tels que les ostéoclastes, les lymphocytes, les cellules T activées, les macrophages, les cellules épithéliales et les cellules musculaires lisses vasculaires (SMC) [58, 137-141]. L'OPN est une protéine matri-cellulaire phosphoglycosylée multifonctionnelle impliquée dans un large éventail de processus pathologiques, mais considérée aussi en tant que cytokine puisqu'elle peut moduler une variété d'activités cellulaires associées à des réponses fibrotiques, tel que la prolifération, l'adhérence, la survie, la motilité et la phagocytose en plus de réaliser des interactions avec les intégrines, les CD44, le collagène et la fibronectine [58, 136, 140-143]. De plus, l'expression de cette protéine, initialement découverte en 1979, a été démontrée essentielle pour la différenciation et l'activité des MYFs [127, 136, 140]. En effet, l'expression de l'OPN est requise à l'expression de l' $\alpha$ -actine des muscles lisses (SMA), la réorganisation du cytosquelette de l'actine et l'adhésion stable de la matrice cellulaire [136, 143]. L'expression de l'OPN est induite par l'Aldostérone, plusieurs facteurs de croissances et des cytokines tel que l'angiotensine II [141]. D'ailleurs, il a été démontré que l'Aldostérone induit l'expression du gène de l'Ostéopontine dans le cœur, en se liant aux RM des cellules endothéliales cardiaques de rat [58, 144, 145]. Aussi, l'Aldostérone a un impact direct sur le développement de la fibrose rénale en liant les récepteurs minéralocorticoïdes, et ce, via l'induction de la transcription du gène de l'Ostéopontine via des facteurs de transcription tels l'*Activator protein 1* (AP-1) et le *nuclear factor*



*kappa B* (NfκB) [141, 146]. De plus, l'OPN est exprimée de façon constitutive au niveau de l'épithélium bronchique sain et son expression est prédominante lors d'une fibrose pulmonaire [140]. D'ailleurs, il a été démontré que l'Ostéopontine est la protéine dont l'expression est la plus importante dans le cas de maladies pulmonaires [140]. Également, l'OPN joue un rôle dans l'inflammation, la réparation tissulaire et induit du remodelage en participant au processus pathologique de la fibrose pulmonaire, en favorisant la différenciation et l'activité des myofibroblastes, ainsi que la migration, l'adhésion et la prolifération des fibroblastes pulmonaires [136, 137, 140]. De cette façon, l'Ostéopontine affecte l'expression et la synthèse du collagène [140, 141, 146]. Enfin, l'IC est associée à des niveaux accrus d'OPN dans les tissus cardiaques et l'OPN pourrait être un marqueur pronostique potentiel des résultats cliniques à la suite d'un infarctus du myocarde, puisque cette protéine contribue au remodelage myocardique [136, 142, 143, 145-150].

### 1.5 Les Antagonistes des Récepteurs Minéralocorticoïdes

Le Spironolactone, dont le nom commercial est Aldactone, est plus particulièrement connu pour agir en temps que diurétique au site d'action de l'Aldostérone dans les reins, soit au niveau du tubule contourné distal et au tube collecteur. Le Spironolactone est structurellement similaire à l'Aldostérone et lie les récepteurs minéralocorticoïdes (Figure 12 A et B). Ainsi, il compétitionne et bloque l'interaction de l'Aldostérone avec son récepteur, ce qui a pour conséquence d'inhiber la réabsorption sodique et diminuer l'excrétion potassique (hypokaliurie) et hydronique.



**Figure 12 : Structure de l'Aldostérone (A), du Spironolactone (B) et de l'Éplérénone (C) [151]**

Cependant, le Spironolactone a comme effet secondaire la gynécomastie, qui est un gonflement des tissus mammaires chez l'homme. L'Éplérénone a donc été synthétisé (Figure 12 C), puisque cet analogue n'induit pratiquement pas cet effet secondaire [40, 151]. Cependant, il y a des différences pharmacologiques entre l'Éplérénone et l'Aldactone. En effet, l'Éplérénone a une plus faible affinité que l'Aldactone pour les récepteurs androgènes, progestérones et glucocorticoïdes. Toutefois, le métabolisme de l'Aldactone induit des métabolites de longue durée d'action. Également, les deux agents produisent des augmentations des concentrations de potassium dose-dépendante, mais l'effet de l'Aldactone semble être plus important lorsque les deux médications sont administrées aux doses recommandées [152].

Aussi, les antagonistes des RM sont actuellement approuvés pour le traitement de l'IC par trois études cliniques majeures, soit l'étude RALES (*Randomized Aldactone Evaluation Study*) en 1999, l'étude EPHEUS (*Eplerenone Post-acute myocardial infarction Heart failure Efficacy and Survival Study*) en 2003 et l'étude EMPHASIS-HF (*Eplerenone in Mild Patients Hospitalization And Survival Study in Heart Failure*) en 2011, puisqu'elles ont démontré que les antagonistes de l'Aldostérone permettent de diminuer la mortalité et la morbidité chez des patients ayant différents degrés d'IC lorsqu'ils sont ajoutés aux thérapies usuelles pour cette maladie [40, 42, 61, 151, 153]. De cette façon l'antagonisme des RM est utilisé comme traitement d'appoint à la médication habituellement prescrite à la suite d'un infarctus du myocarde, tel que les inhibiteurs de l'enzyme de conversion de l'Angiotensine II (IECA) ou les antagonistes des récepteurs de l'angiotensine (ARA), auxquels on ajoute des bêta-bloquants, des diurétiques et parfois même de la digitaline [154]. De plus, dû à sa caractéristique d'améliorer le statut et le pronostic de la pathologie, l'antagonisme de l'Aldostérone est jugé utile, efficace et recommandé en insuffisance cardiaque modérée à sévère selon les recommandations de l'ACC (*American College of Cardiology*), l'AHA (*American Heart Association*) et la SCC (*Société Canadienne de Cardiologie*)[154-156].

La littérature confère également différents mécanismes d'action extra-rénaux aux antagonistes de l'Aldostérone leur permettant d'induire les bénéfices cliniques, puisque des RM sont présents dans les tissus cardiaques et pulmonaires [41, 44]. Ainsi, l'une des actions de l'antagonisme des RM consiste à diminuer le remodelage cardiaque en

prévenant la prolifération du collagène dans le myocarde sain, en diminuant l'inflammation et la production de stress oxydatif [35, 56, 59, 60, 73, 74, 79, 91, 157-163]. D'ailleurs, le Spironolactone et l'Éplérénone permettent de diminuer le remodelage cardiaque et le dysfonctionnement systolique et diastolique en inhibant l'expression de l'Ostéopontine dans le myocarde non-infarci via le blocage spécifique des RM [58, 143, 144, 149]. Cependant, le blocage via un antagoniste des récepteurs glucocorticoïde (RU486) n'a eu aucun effet [58]. Aussi, le Spironolactone permet de limiter le renouvellement excessif de la matrice extracellulaire, soit un processus essentiel au remodelage et à l'hypertrophie cardiaque, et de cette manière peut contribuer à l'effet bénéfique chez les patients atteints d'ICC [73]. Ensuite, des études ont démontré que l'Éplérénone et le Spironolactone permettent de diminuer la taille de l'infarctus et améliore l'état du cœur à la suite d'une ischémie/reperfusion en améliorant la récupération de la pression du VG [164, 165]. Un effet cardioprotecteur du Spironolactone consiste à réduire l'incidence de fibrillations ventriculaires [44, 67, 164]. Également, il a été établi que le Spironolactone améliore les paramètres électrophysiologiques, dont la dispersion de l'intervalle QT, des sujets atteints d'IC [44, 166]. Aussi, le Spironolactone améliore l'hémodynamie, la fonction et le remodelage du VG, tout en prévenant l'apoptose des myocytes [167, 168]. De plus, le Canrénone, une métabolite actif de l'Aldactone, permet d'atténuer la dilatation du VG et le remodelage interstitiel tout en améliorant la fonction systolique du VG chez des rats IM [87]. Également, l'utilisation de l'Aldactone a montré des effets positifs sur les tissus pulmonaires des patients IC en améliorant leur capacité à l'exercice et la diffusion des gaz à travers les poumons [79]. D'ailleurs, le Spironolactone a des effets protecteurs en diminuant le collagène pulmonaire et ainsi la fibrose pulmonaire [75]. Enfin, l'antagonisme des RM, lorsqu'ajouté à des IECA, induit des effets additifs bénéfiques sur le remodelage cardiaque, la dysfonction endothéliale et l'activation des plaquettes en ICC [87, 89, 169-171].

## 1.6 Justification de l'Étude

L'insuffisance cardiaque congestive, secondaire à un infarctus du myocarde, induit du remodelage pulmonaire, de l'hypertension pulmonaire, une dysfonction VD et VG, de l'hypertrophie VD et un remodelage structurel pulmonaire important caractérisé

par un dépôt de collagène dans les parois alvéolaires provoquant un syndrome respiratoire restrictif, qui ensemble contribuent de façon importante à la morbidité et à la mortalité de cette pathologie. De plus, tel que démontré précédemment, le système Aldostérone est activé en ICC et pourrait contribuer au remodelage pulmonaire et à la dysfonction VD en stimulant la prolifération des myofibroblastes (MYFs) pulmonaires. Toutefois, malgré les avantages prouvés en études cliniques sur la réduction de la mortalité et de la morbidité, les mécanismes d'action de l'antagonisme des récepteurs minéralocorticoïdes demeurent incompris et plusieurs chercheurs ont rapporté la sous-utilisation de ces agents. En effet, la littérature rapporte qu'aussi peu qu'un tiers des patients, répondant aux critères actuels des lignes directrices pour la thérapie constituée d'antagonistes des RM et sans contre-indications documentées, sont traités avec cette médication. Le faible taux de prescription de ces agents peut être expliqué par deux raisons principales. Tout d'abord, cette thérapie peut risquer d'induire une hyperkaliémie. Ensuite, il y a un manque de connaissances sur le mécanisme d'action systémique de l'Aldostérone et donc une mauvaise compréhension à utiliser l'Aldactone en tant qu'antagoniste des RM sur différents tissus, plutôt que comme un simple diurétique [154]. Avec cette étude, nous avons l'occasion d'élucider un mécanisme d'action systémique possible et jusqu'à ce jour inexploré de l'Aldostérone, soit son effet potentiel sur le remodelage structurel pulmonaire et la dysfonction VD en stimulant la prolifération des MYFs pulmonaires en ICC. Afin de vérifier notre hypothèse, nous avons développé deux objectifs distincts. Tout d'abord, évaluer l'effet *in vivo* de l'Aldactone, un antagoniste des récepteurs minéralocorticoïdes, sur la fonction VD, l'hypertension et le remodelage pulmonaire et l'expression du gène de l'Ostéopontine. Dans un deuxième temps, évaluer l'effet de l'Aldostérone la prolifération des myofibroblastes pulmonaires isolés en culture cellulaire.

## 2. Matériels et Méthodes

Ce protocole de recherche a été approuvé par le Comité de Déontologie Animale (CDA) du Centre de Recherche de l'Institut de Cardiologie de Montréal. Il respecte également les directives et les règles d'éthique du Conseil Canadien de Protection des Animaux (CCPA) et suit le *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals*. Aussi, afin de permettre aux animaux de s'acclimater à leur nouvel environnement, une période de repos de 24 heures leur est allouée à leur arrivée à l'animalerie, et ce, avant toute manipulation.

### 2.1 In Vivo

#### 2.1.1 Protocole Expérimental du Modèle Infarctus du Myocarde

Des infarctus du myocarde (IM) du ventricule gauche (VG) ont été induits chez des rats mâles Wistar (Charles River) pesant de 200 à 250g. Afin de recréer le modèle infarctus, les rats ont été anesthésiés avec un mélange de Kétamine (50 mg/kg, Ketalean, Bimeda-MTC) et Xylazine (10 mg/kg, Rompun, Bayer). Puis, les rats ont été intubés. Pour ce faire, les pattes du rat ont été fixées à une plaque avec du ruban adhésif, puis sa tête a également été fixée à la plaque à l'aide d'un élastique qui liait les incisives du rat à la plaque. Puis, la langue du rat a été tirée par les doigts permettant de glisser une spatule incurvée dans sa gorge. Ce faisant, l'épiglotte du rat a été repoussée contre le palais afin d'ouvrir la trachée. Par la suite, un cathéter intraveineux humain, dont l'extrémité solide a été préalablement limée, a été inséré dans la trachée afin de ne laisser que la partie flexible du cathéter dans la trachée. L'intubation a été réalisée correctement si l'on observe de la condensation sur une spatule placée vis-à-vis l'ouverture du cathéter. Par la suite, l'élastique a été retiré des incisives du rat et le cathéter a été solidement fixé à la gueule du rat avec de l'adhésif. Puis le rat a été relié, via le cathéter intraveineux humain, à un respirateur pour rongeurs (Harvard Apparatus) afin que la ventilation soit maintenue à un rythme de 70 cycles par minutes avec un volume courant de 2mL et une pression expiratoire de 2cm d'H<sub>2</sub>O. Par la suite, une thoracotomie du côté gauche a été opérée afin d'exposer le cœur. Pour ce faire, le thorax des rats a été rasé et aseptisé avec de la Chlorhexidine (Dexidin 0.5, Laboratoires Atlas

Inc.). Puis, une incision d'environ 1cm a été réalisée verticalement à la base du sternum du côté gauche. Par la suite, la peau et les muscles ont été écartés via dissection mousse pour permettre la visualisation des côtes, en faisant attention de ne pas couper les muscles afin que ceux-ci puissent se rabattre facilement après la chirurgie. Puis, une deuxième incision a été effectuée, cette fois-ci horizontalement, située au niveau du quatrième espace intercostal et mesurant 1cm de long. Il a alors été possible d'installer un écarteur permettant de séparer les côtes afin d'observer un trou carré de 1cm<sup>2</sup>. Les rats ont ensuite été tournés sur le côté droit pour permettre une meilleure visualisation du côté gauche du cœur. Par la suite, il a été possible d'extérioriser le cœur, en pinçant et soulevant ce dernier. Puis, l'oreillette gauche a été soulevée et la ligature de la branche interventriculaire antérieure de l'artère coronaire gauche a été réalisée avec une soie 4-0 montée sur une aiguille atraumatique (Ethicon). La cage thoracique a alors été refermée de manière à évacuer l'air pour permettre le rétablissement de la pression négative à l'intérieure de la cavité thoracique. Pour ce faire, les côtes ont été refermées avec deux ligatures verticales réalisées sur les muscles avec une soie 3-0 montée sur une aiguille atraumatique (Ethicon). Ensuite, les muscles, puis la peau, furent replacés et brochés à l'aide d'agrafes cutanées (Autoclip, Becton Dickinson) pour éviter l'apparition d'infection. Enfin, les animaux ont été retirés du respirateur lorsque le réflexe de respiration indépendante était restauré. Les rats du groupe Témoin ont subi la même procédure et le même stress induit par la chirurgie, à l'exception de la ligature de l'artère coronaire gauche. Afin de diminuer la douleur induite par la chirurgie, tous les rats ont reçu deux doses de 0.02mL de Buprénorphine (Temgenic, Schering-Plough) injecté sous-cutanée, l'une avant le réveil et l'autre 24 heures post chirurgie.

Dans cette étude, il était essentiel de sélectionner des rats ayant des infarctus de taille modérée à élevée afin de permettre le développement de la pathophysiologie de l'insuffisance cardiaque congestive (ICC) menant au développement de l'hypertension pulmonaire (HP). Ainsi, la présence et la taille des infarctus induits chez les rats ont été vérifiées avant de réaliser la randomisation des rats dans les différents groupes. Afin de permettre une prédiction précoce de la taille de l'infarctus, des échantillons sanguins de 3mL ont été collectés par la veine sous-clavière chez tous les rats IM 24h post chirurgie et introduits dans des tubes lavende K2 EDTA 7.2mg de 4mL (BD Vacutainer, BD). Ensuite, les échantillons sanguins ont été centrifugés pendant 10 minutes à 3000 RPM à

4°C et le plasma a été analysé par un immunoessai d'électrochimiluminescence standard en utilisant le *Cobas e 601* (Roche). Cette méthode a été employée, puisque précédemment dans notre laboratoire une corrélation d'une valeur de 89% a été établie entre le taux de Troponines-T plasmatique 24 heures post chirurgie et l'anormalité de la motilité des parois du VG à 5 semaines [172]. Ainsi, si la concentration plasmatique de troponine-T était supérieure ou égale à 5.1µg/L, alors l'anormalité de la motilité des parois du VG était  $\geq 30\%$ , révélant des infarctus de taille modérée à élevée. À cette valeur seuil de 5,1µg/L, la sensibilité est de 91% et la spécificité est de 84%. La sensibilité fait référence à la capacité du test à déterminer la présence d'anomalies, alors que la spécificité fait référence à sa capacité à exclure les résultats négatifs (dans notre cas des infarctus de taille trop petite). En conséquence, seuls les rats dont la concentration de Troponine-T était  $\geq 5.1\mu\text{g/L}$  étaient conservés pour l'étude et répartis aléatoirement en 2 groupes.

Afin de permettre le développement de l'ICC et de l'HP le traitement n'a été débuté que 2 semaines après la chirurgie. Ainsi, 3 différents groupes ont été constitués. Tout d'abord, le groupe **IM+Aldactone** (N=21), où les rats ont reçu 100mg d'Aldactone (Novopharm) par kg de masse du rat par jour ajouté à de la nourriture en poudre (Harlan), puis le groupe **IM** (N=24) sans traitement ajouté à la nourriture et finalement le groupe **Témoin** (N=8) où les rats n'ont pas subi la ligature de l'artère coronaire gauche et n'ont reçu aucun traitement ajouté à la nourriture. La période de traitement a duré 3 semaines. Durant les 5 semaines de l'étude, tous les rats ont subi un cycle de 12h de lumière suivi de 12h d'obscurité et ont reçu de l'eau *ad libitum*. Cependant, en ce qui concerne la nourriture, celle-ci a été administrée *ad libitum* durant la période de 2 semaines permettant le développement de l'ICC menant à l'HP, puis durant les 3 dernières semaines, pour la période de traitement, la nourriture a été mesurée chaque semaine pour chacun des rats, puisque le médicament était ajouté à la nourriture.

### ***2.1.2 Étude Échocardiographiques Transthoraciques***

Cinq semaines après la chirurgie, une échocardiographie a été réalisée pour chacun des rats ayant subi la ligature de la branche interventriculaire antérieure de l'artère coronaire gauche. Pour ce faire, les rats ont été anesthésiés avec 2% d'isoflurane

complété avec de l'oxygène. Le thorax des rats a été rasé, puis les fonctions VD et VG ont été mesurées en utilisant une sonde *10S multi-éléments* (4.5-11.5 Mégahertz) reliée à un système *Vivid 7* (GE Healthcare Ultrasound). L'échocardiographie a permis de mesurer l'anormalité de la motilité des parois du VG, qui reflète quelle portion du VG ne faisait aucun mouvement lors de l'échocardiographie. L'échocardiographie a également permis de déterminer l'ampleur de l'atteinte ventriculaire gauche en IM avec la mesure du *fractional shortening* (FS) ou la fraction de raccourcissement et le *fractional area changing* (FAC) ou fraction du changement de l'aire. Ces deux paramètres font référence au diamètre du VG en diastole moins le diamètre du VG en systole, le tout divisé par le diamètre du VG en diastole, le tout en pourcentage (Figure 13). Le FS mesure le diamètre horizontalement, alors que le FAC mesure le diamètre verticalement. L'échocardiographie permet aussi d'évaluer la dimension du VG en fin de systole et en fin de diastole ainsi que l'aire du VG en fin de systole et en fin de diastole. L'échocardiographie a également permis de déterminer l'ampleur de l'atteinte ventriculaire droite en IM avec la mesure du *myocardial performance index* (MPI) ou l'index de performance myocardique et le *tricuspid annulus plane systolic excursion* (TAPSE) ou l'excursion systolique du plan de l'anneau tricuspide. Le MPI fait référence au temps de relaxation du VD (Temps pendant l'ouverture et la fermeture de la valve tricuspide située entre l'oreillette et le VD) moins le temps d'éjection (moment où les valves pulmonaires s'ouvrent et se ferment durant la contraction du VD) divisé par le temps d'éjection, en pourcentage (Figure 13). Le TAPSE, quant à lui, fait référence au mouvement de la valve tricuspide. Plus le mouvement en millimètre est élevé, meilleure est la contraction. Enfin, l'échocardiographie permet aussi d'évaluer la dimension en fin de diastole du VD et le *tricuspid valve closing to opening* (TVc-o) ou le temps de la fermeture à l'ouverture de la valve tricuspide.

$$\text{FS} = \frac{\text{diamètre horizontal du VG en diastole} - \text{diamètre horizontal du VG en systole}}{\text{diamètre horizontal du VG en diastole}}$$

$$\text{FAC} = \frac{\text{diamètre vertical du VG en diastole} - \text{diamètre vertical du VG en systole}}{\text{diamètre vertical du VG en diastole}}$$

$$\text{MPI} = \frac{\text{temps de relaxation du VD} - \text{temps d'éjection}}{\text{temps d'éjection}}$$

**Figure 13 : Équations du FS, du FAC et du MPI**



### ***2.1.3 Mesure des Paramètres Hémodynamiques In Vivo***

Lors du sacrifice, 5 semaines après la chirurgie, les rats ont été anesthésiés avec un mélange de Kétamine (50 mg/kg, Ketalean, Bimeda-MTC) et Xylazine (10 mg/kg, Rompun, Bayer). Puis, la veine jugulaire droite et l'artère carotidienne gauche ont été isolées et ponctionnées, permettant l'insertion de cathéters de pression haute fidélité (Millar Instruments) qui enregistrent les pressions ventriculaires, veineuse centrale et artérielle en utilisant le système *polygraph Powerlab* (AD Instruments). La mesure des paramètres hémodynamiques permet de mesurer la pression artérielle moyenne (MAP), la pression systolique du VD, la pression en fin de diastole du VG (LVEDP) et les indices de contractilité du cœur (LV/RV (+) dP/dt et LV/RV (-) dP/dt). Un électrocardiogramme (ECG) est également installé pour déterminer le rythme cardiaque.

### ***2.1.4 Mesure de la Fonction Respiratoire In Vivo***

À la suite de la mesure des paramètres hémodynamiques, pendant que les rats étaient encore anesthésiés, la trachée a été isolée, une trachéotomie a été effectuée et un tube endotracheal a été installé et relié à un appareil *Flexivent* (Scireq), un ventilateur pour petits animaux contrôlé par ordinateur. Avec ce logiciel, une courbe respiratoire pression volume (*PV-loop*) a été produite pour chacun des rats. Ainsi, la fonction respiratoire a pu être analysée via l'équation Salazar-Knowles :  $V=A-Be^{-KP}$ . Ici, A correspond à l'estimation de la capacité inspiratoire (soit la somme du volume courant et du volume de réserve inspiratoire); B correspond à l'estimation de la capacité pulmonaire totale (soit la somme du volume courant, du volume de réserve inspiratoire, du volume de réserve expiratoire et du volume résiduel) lorsque la pression égale 0; K correspond à l'indice du degré de courbure de la courbe PV; P correspond à la pression et V correspond au volume. La mesure de la fonction respiratoire permet de créer une courbe pression-volume, de mesurer les paramètres A, B et K et de déterminer la compliance (qui est la capacité des poumons à se dilater) et l'élastance (qui est un indicateur de rigidité des poumons) pour chacun des rats.

### ***2.1.5 Mesures Morphométriques des Poumons et du Cœur***

À la suite de la mesure de la fonction respiratoire, la cavité thoracique des rats a été ouverte pour permettre la visualisation du complexe cœur/poumons. Il fallait cependant être méticuleux afin d'éviter le plus possible des saignements et évidemment éviter de couper la trachée qui était encore reliée au tube endotracheal. Ensuite, les lobes pulmonaires P1, P2, P3 et P5 ont été ligaturés et retirés. Les lobes P1 et P5 ont été pesés, puis congelés dans l'azote liquide et serviront par la suite à l'extraction d'ARN. Les lobes P2 et P3 ont été pesés humides, puis séchés pendant 2 semaines et pesés secs. Il a alors été possible de vérifier la présence d'œdème pulmonaire avec le ratio poids poumon sec/poids poumon humide. Le taux de remodelage pulmonaire a été évalué, quant à lui, par la mesure des ratios poids poumon humide/poids corporel et poids poumon sec/poids corporel. En ce qui concerne le lobe P4, celui-ci a été conservé pour les analyses d'histologie. Pour ce faire, une petite incision a été faite au niveau de l'artère pulmonaire droite et l'embout d'une seringue de 30mL remplie de solution saline y a été inséré. Les oreillettes ont également été percées afin de permettre la circulation de la solution saline dans le lobe P4, qui a alors été blanchit et lavé. Par la suite, le complexe cœur/poumons a été retiré et une autre seringue de 30mL, cette fois-ci remplie du composé *optimal cutting temperature* (OCT) (Sakura) chauffé à 37°C, a été insérée dans le tube endotracheal. Ainsi, le lobe P4 a été perfusé et fixé avec l'OCT, puis le lobe a été coupé en quatre et refroidi rapidement dans de l'azote liquide pour finalement être gelé et conservé à -80°C dans une solution de 2-méthylbutane. Également, le cœur a été isolé et disséqué, permettant de séparer et peser le VD, VG, l'oreillette droite, l'oreillette gauche et le septum, qui ont par la suite été congelés à -80°C. Ce faisant, il a été possible d'évaluer l'hypertrophie du VD avec le ratio des masses VD/(VG+septum), le tout en pourcentage. Enfin, pour les groupes de rats IM et IM+Aldactone, la cicatrice du VG a été disséquée, pesée et l'aire de sa surface a été déterminée par planimétrie.

### ***2.1.6 Histologie des Poumons et du Cœur***

Le lobe pulmonaire P4 et le VG de tous les rats (N=8, 10, 10 pour les groupes Témoin, IM et IM+Aldactone respectivement) ont été décongelés, puis coupés avec une

lame de scalpel pour faire des tranches de tissus de 5mm d'épaisseur. Chaque coupe a été placée dans une cassette jaune identifiée à la mine, puis la cassette a été refermée et mise dans un bécher stérile contenant une solution *Tissufix* (Chaptec), un fixateur histologique. Puis ces cassettes ont été envoyées au département d'hématologie de l'Institut de Cardiologie de Montréal pour faire des lames d'histologie colorées au Trichrome de Masson avec chacun des échantillons. Le trichrome de Masson a la caractéristique de colorer le collagène en bleu, permettant ainsi de quantifier la déposition de collagène dans les échantillons pour évaluer le taux de remodelage tissulaire. Pour chaque lame histologique, 10 champs visuels aléatoires ont été effectués à un grossissement de 10X et ont été analysés avec le logiciel *Image-Pro Plus 6.2* (Media Cybernetics). Enfin, le ratio de la somme du collagène divisé par la somme du tissu total a permis d'évaluer la proportion, en pourcentage, de collagène présente dans chaque échantillon tissulaire.

### ***2.1.7 RT-PCR pour la Mesure de l'Expression du Gène Ostéopontine***

Tout d'abord, les échantillons congelés de lobes pulmonaires P1 et P5 (N=8, 10, 10 pour les groupes Témoin, IM et IM+Aldactone respectivement) devaient être transformés en poudre. Pour se faire, de l'azote liquide a été versée à plusieurs reprises dans un mortier jusqu'à ce que la température du mortier et du pilon atteigne environ -70°C. Ensuite, l'échantillon de tissu pulmonaire a été ajouté à l'azote liquide et transformé en poudre en le broyant délicatement avec le pilon dans le mortier afin d'obtenir 30mg de poudre de tissu pulmonaire. Puis, 2mL de *TRI Reagent* (Sigma-Aldrich) ont été ajoutés à chaque échantillon et le tissu a ensuite été homogénéisé à l'aide d'un polytron (Kinematica). Ensuite, 400µL de chloroforme ont été ajoutés, puis la solution a été vortexée et centrifugée à 14 000 RPM à 4°C pour 15 minutes. La phase aqueuse a été prélevée afin d'isoler l'ARN total avec le protocole *RNeasy Protect Mini Kit* (Qiagen) en utilisant *RNase-Free DNase Set* (Qiagen). Pour ce faire, un volume égal d'éthanol 70% *RNase free* a été ajouté au volume de phase aqueuse des différents échantillons, puis ceux-ci ont été mélangés via pipetage *up and down*. Ces solutions ont ensuite été ajoutées dans des *RNeasy Mini spin column* (Qiagen), puis centrifugées à 10 000 RPM pendant 15 secondes. Par la suite, 350µL de *RWI wash buffer* ont été ajoutés aux colonnes, puis centrifugées à nouveau. Ensuite, 10µL de la solution *DNase free*

*RNase* et 70µL de solution *RDD buffer* ont été ajoutés à chacune des colonnes pendant une période de 15 minutes. Après la période d'attente, 350µL de *RW1 wash buffer* ont été ajoutés aux colonnes, puis centrifugées à 10 000 RPM pendant 15 secondes. À la suite de cette centrifugation, le *collection tube* a été changé pour chacune des colonnes. Ainsi, 500µL de solution *RPE* ont été ajoutés, puis centrifugées à 10 000 RPM pendant 15 secondes. Ensuite, 500µL de solution *RPE* ont à nouveau été ajoutés aux colonnes, suivi cette fois de deux centrifugations à 10 000 RMP : l'une pendant 2 minutes, l'autre pendant 1 minute. Enfin, les *collection tubes* ont été changés par des épendorfs *RNase free* et 50µL d'eau *RNase free* ont été ajoutés aux colonnes, puis centrifugés deux fois à 10 000 RPM pendant 1 minute. L'ARN total qui a été isolé à la suite de cette dernière centrifugation a alors été quantifié avec le ND-1000 Spectromètre (Nano Drop).

Par la suite, l'ARN a été converti en cDNA en réalisant le protocole *First Strand cDNA Synthesis* avec le *M-MLV Reverse Transcriptase Kit* (Invitrogen). Pour ce faire, 1µL d'*Oligo dT* 500ug/mL, 1µL de *dNTP Mix* (dATP, dGTP, dCTP, dTTP) et 1µL de *Random Primer* ont été ajoutés à des épendorfs *RNase free*. Puis, selon la quantification d'ARN faite précédemment, 1000ng d'ARN ont été ajoutés. Le volume a alors été complété à 13µL avec de l'eau *RNase free*. Ensuite, les épendorfs ont été centrifugés via *quick spin*. Par la suite, à l'aide de l'appareil *PTC-100 Programmable Thermal Controller*, les échantillons ont été chauffés à 65°C pendant 5 minutes et refroidis rapidement à 4°C. Puis, 4µL de *5X First Strand Buffer*, 2µL de 0,1M *DTT* et 1µL de *M-MLV RT* ont été ajoutés aux échantillons d'ARN. Un *quick spin* a à nouveau été fait et, à l'aide de l'appareil *PTC-100 Programmable Thermal Controller*, les échantillons ont été chauffés à 25°C pendant 10 minutes, puis à 37°C pendant 50 minutes, finalement à 70°C pendant 15 minutes et refroidis rapidement à 4°C.

Le cDNA obtenu a été utilisé pour réaliser un PCR en temps réel avec le *Platinum SYBR Green qPCR SuperMix-UDG Kit* (Invotrogen). Afin d'évaluer l'expression du gène de l'OPN dans les poumons, les oligos de rat du gène OPN *forward* [TCAGATGCTGTAGCCACTTG] et *reverse* [TTCACAGAATCCTCGCTCTC] et les oligos de rat du gène de ménage Cyclophiline A (Cyclo A) *forward* [CTGATGGCGAGCCCTTGG] et *reverse* [GCCACCAGTGCCATTATG] ont été

utilisés. Tout d'abord, les solutions *Primer Cyclo A* et *Primer OPN* ont été faites. Ainsi, pour le *Primer Cyclo A*, 4,5µL d'oligo Cyclo A forward (100uM), 4,5µL d'oligo Cyclo A Reverse (100uM), 45µL de ROX 1/1000 et 96µL eau *RNase free* ont été mélangés. La même chose a été faite pour la solution *Primer OPN* mais avec les oligos *forward* et *reverse* de l'OPN. Ensuite, des solutions *Master Cyclo A* et OPN ont été faites. Ainsi, pour la solution *Master Cyclo A*, 130µL *Primer Cyclo A* et 650µL de *SYBR Green Mix* ont été mélangés, alors que pour la solution *Master OPN*, 130µL *Primer OPN* et 650µL de *SYBR Green Mix* ont été mélangés. Ensuite, 15µL de la solution *Master Cyclo A* ont été répartis sur la moitié de une plaque 96 puits pour qPCR en polypropylène (Stratagene), alors que 15µL de la solution *Master OPN* ont été répartis sur l'autre moitié. Par la suite, 10µL de cDNA des différents échantillons, à concentration de 0,025ng/µL équivalent, ont été répartis de manière à ce que chaque échantillon aient été testé avec les 2 gènes en duplicata. Les lanières de capuchons plats ont ensuite été ajoutées sur la plaque et celle-ci a ensuite été vortexée pendant 2 minutes à 2 000 RPM. La lecture de la plaque a été faite avec l'appareil *MX3005P* (Stratagene) dont le profil thermal était le suivant : tout d'abord 1 cycle à 95°C pendant 10 minutes, par la suite 40 cycles (30 secondes à 95°C, 1 minute à 55°C et 1 minute à 72°C) et finalement un dernier cycle (1 minute à 95°C, 30 secondes à 55°C et 30 secondes à 95°C). Enfin, un calibrateur a été déterminé et répété sur chacune des plaques pour permettre la comparaison entre elles afin de déterminer si l'expression du gène de l'Ostéopontine était induite en situation d'IM, et si le traitement à l'Aldactone permettait de réduire cette augmentation d'expression.

## **2.2 In Vitro**

### ***2.2.1 Isolation et Prolifération de MYFs Pulmonaires***

Des MYFs pulmonaires ont été extraits chez des rats mâles Wistar d'environ 175g (Charles River). Pour ce faire, les rats ont été anesthésiés via l'injection intramusculaire d'un mélange de Kétamine (50 mg/kg, Ketalean, Bimeda-MTC) et Xylazine (10 mg/kg, Rompun, Bayer). Ensuite, la cavité thoracique des rats a été ouverte pour permettre l'isolation du complexe cœur/poumons. Ce faisant, le bord et l'apex des cinq lobes pulmonaires ont été disséqués, prélevés puis rincés dans un tampon phosphate à

pH 7.4 (PBS 1X) composé de 13.7mM de NaCl, 0.27mM de KCl, 0.43mM de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> et 0.14mM de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>. Puis, les tissus ont été conservés sur glace dans une solution de HBSS faite de *Hank's Balanced Salt Solution* (Gibco) contenant 0.5% de Ciprofloxacine (Hospira). Ensuite, sous une hotte biologique, les tissus pulmonaires ont été coupés en morceaux d'environ 3 à 5 mm et rincés 2 fois avec la solution d'HBSS. Ainsi, les tissus ont été digérés à 4°C sous agitation durant la nuit dans une solution de Trypsine (Gibco) 1 mg/mL diluée dans du HBSS. Le lendemain, la digestion à la trypsine a été arrêtée via l'ajout de 10mL de solution FBS faite avec du milieu *Dulbecco's modified Eagle's medium* (DMEM) (Sigma-Aldrich) contenant 6.7% de *Fetal Bovine Serum* (FBS, Gibco), 1.8% de Pénicilline Streptomycine (Gibco), 0.9% d'Amphotéricine B (Fungizone, Cambrex) et 0.5% de Ciprofloxacine (Hospira). Par la suite, les tissus ont à nouveau été digérés mais cette fois-ci avec des pipetages *up and down* dans une solution à 37°C de Collagénase de type II (Gibco) 1mg/mL diluée dans la solution de HBSS, et ce, jusqu'à ce que la solution devienne trouble. Ce faisant, la solution a été centrifugée à 3 000 RPM pendant 3 minutes à 4°C. Puis le surnageant a été jeté et le culot a été rincé et suspendu avec la solution de HBSS et recentrifugé à 3 000 RPM pendant 3 minutes à 4°C, le tout deux fois. Le culot final a été dissout dans 50mL de milieu de culture constitué de la solution de FBS. Enfin, 10ml de cette solution a été introduit dans 5 flasques T-75 permettant la mise en culture des cellules dans un incubateur (Sanyo Scientifique) dont la température est maintenue à 37°C et le pourcentage en CO<sub>2</sub> est de 5%, puisqu'il s'agit des conditions idéales pour stimuler la prolifération cellulaire. Par la suite, les milieux de culture (FBS) ont été changés à tous les deux jours jusqu'à l'atteinte de la confluence des MYFs pulmonaires. Pour ce faire, le milieu présent a été aspiré, les flasques ont été rincés avec un volume de 5ml de PBS 1X à 37°C, le milieu a à nouveau été aspiré et finalement 10ml de FBS à 37°C ont été ajoutés aux flasques.

Lorsque la confluence était atteinte, un passage a été réalisé. Il est à noter que seules les cellules de premier et de deuxième passage ont été utilisées pour ce projet. Pour réaliser le passage, le FBS a été retiré des flasques. Puis, ceux-ci ont été rincés deux fois avec 5mL de PBS 1X et le PBS 1X a été retiré des flasques. Ensuite, 4ml de Trypsine-EDTA 1X (Gibco) à 37°C ont été ajoutés aux flasques afin de traiter les cellules durant une période d'une minute dans l'incubateur. Par la suite, les flasques ont été frappés pour permettre aux MYFs pulmonaires de décoller des parois. Ensuite, un

volume de 6ml de FBS a été ajouté à chacun des flasques pour cesser l'action de la Trypsine-EDTA. Les cellules ont ensuite été récoltées pour chacun des animaux. Puis, un décompte cellulaire a été réalisé au microscope via l'ajout de 10 $\mu$ l de solution cellulaire sur un hémacytomètre. Il a alors été possible d'inoculer 2000 cellules dans un volume de 200 $\mu$ l à différents puits d'une plaque à 96 puits pour effectuer un test de prolifération CyQUANT. Également, du milieu cellulaire a été ajouté à 5 flasques T-75, pour permettre un second passage.

### ***2.2.2 Analyse de Prolifération Cellulaire via la Méthode CyQUANT***

Lorsque la confluence était atteinte dans les puits des plaques à 96 puits (soit environ 24h après le passage), la solution cellulaire a été aspirée. Ensuite, les plaques ont été rincées avec 5mL de PBS 1X à 37°C, puis celui-ci a été retiré. Par la suite, les cellules ont été rendues quiescentes pour une période de 24h via l'ajout de milieu de culture ITS ne possédant aucun nutriment, soit un milieu DMEM à 37°C comprenant 0,2% d'Insuline Transferrine Sélénium (ITS, BD Biosciences), 2% de Pénicilline Streptomycine (Gibco) et 0.5% de Ciprofloxacine (Hospira). Après cette période de jeûne, les cellules ont été traitées pendant une période de 48h avec l'une des trois solutions suivantes : un contrôle positif (FBS), un contrôle négatif (ITS) ou de l'Aldostérone (Sigma) 10<sup>-7</sup>M (N=26) ou 10<sup>-6</sup>M (N=23). Après cette période de traitement, les milieux de cultures ont été retirés des puits, puis les plaques à 96 puits ont été congelées à -80°C pendant au moins 72h. Ensuite, le *CyQUANT Cell Proliferation Assay Kit* (Invotrogen) a été utilisé pour comparer la prolifération des MYFs pulmonaires induite par les différents traitements. Pour ce faire, 1mL de la solution *Cell-lysis buffer* (20X) a été mélangé à 19mL d'eau distillée *nuclease free* et 50  $\mu$ L de la solution *CyQUANT GR dye* pour produire la Solution Finale. Par la suite, des culots de cellules, dont la quantité de cellules était déjà connue via un hémacytomètre, ont été dilués avec la Solution Finale, puis vortexés. Cela a permis de créer une courbe standard linéaire allant de 250 à 5000 cellules. Ensuite, 200  $\mu$ L de la Solution Finale ont été ajoutés à chaque puits contenant des cellules, ainsi qu'à 4 autres puits non utilisés afin de créer un blanc. La solution *CyQUANT GR dye* est faite d'un fluorescent vert qui se lie aux acides nucléiques cellulaires permettant ainsi leur détection. Plus le signal était fort et plus la prolifération des MYFs pulmonaires était importante. Enfin, la fluorescence

des échantillons a été mesurée via un lecteur de plaque dont l'excitation était à 480nm et l'émission à 520nm.

### **2.3 Analyse Statistique**

Les effets de l'Aldostérone et de l'Aldactone ont été évalués par une analyse de variance de type *one-way ANOVA* suivie, lorsqu'une interaction significative était observée ( $P < 0.05$ ), par le *Fisher's post hoc test* pour des comparaisons multiples. Toutes les valeurs ont été exprimées via la moyenne  $\pm$  ESM et les valeurs considérées statistiquement significatives sont celles dont la valeur de  $P$  est inférieure à 0.05.



### 3. Résultats

## **Role of aldosterone on lung structural remodelling and right ventricular function in congestive heart failure**

Andréanne Chabot<sup>1</sup>, Bao Hua Jiang<sup>1</sup>, Yanfen Shi<sup>1</sup>, Jean-Claude Tardif<sup>1,2</sup>, and Jocelyn Dupuis<sup>1,2\*</sup>

<sup>1</sup>Research Center, Montreal Heart Institute/Université de Montréal, 5000 Bélanger Street, Montreal, Quebec, H1T 1C8, Canada; and <sup>2</sup>Department of Medicine, Université de Montréal, 2910 boul. Edouard-Montpetit, Montreal, Quebec, H3T 1J7, Canada.

**Short title:** Aldosterone in heart failure

BMC Cardiovascular Disorders

Accepté formellement et publié en version électronique seulement

\*Correspondence: Dr. Jocelyn Dupuis

## Abstract

**Background:** The mechanisms of benefit of mineralocorticoid receptors antagonists in congestive heart failure (CHF) are still debated. We hypothesized that aldosterone contributes to pulmonary remodelling and right ventricular (RV) dysfunction associated with CHF by stimulation of lung myofibroblasts (MYFs) proliferation.

**Methods:** Rats with moderate to large myocardial infarcts (MI) and CHF were studied. Two weeks after MI, spironolactone 100 mg/kg/day (n = 21) or no treatment (n = 24) were given for 3 weeks and compared to sham (n = 8).

**Results:** Infarct size was similar by ultrasound and pathologic measures in both MI groups. The MI-untreated group developed important lung remodelling with nearly doubling of dry lung weight ( $p < 0.01$ ), reduced left ventricular (LV) fractional shortening ( $16 \pm 2\%$  vs.  $53 \pm 1\%$ ; mean  $\pm$  SEM,  $p < 0.0001$ ), pulmonary hypertension (RV systolic pressure:  $40 \pm 3$  mmHg vs.  $27 \pm 1$  mmHg,  $p < 0.01$ ) and RV hypertrophy (RV/(LV + septum):  $38 \pm 3\%$  vs.  $24 \pm 1\%$ ,  $p < 0.05$ ). Spironolactone had no effect on these parameters and did not improve LV or RV performance (tricuspid annular plane systolic excursion and RV myocardial performance index) measured by echocardiography. CHF induced a restrictive respiratory syndrome with histological lung fibrosis: this was also unaffected by spironolactone. Finally, isolated lung MYFs did not proliferate after exposure to aldosterone.

**Conclusion:** Aldosterone does not significantly contribute to pulmonary remodelling and RV dysfunction associated with CHF. Other mechanisms are responsible for the beneficial effects of spironolactone in CHF.

**Key words:** spironolactone, pulmonary heart disease, pulmonary hypertension, myofibroblasts

## **Background**

Pulmonary hypertension (PH) is a frequent complication of congestive heart failure (CHF). Conversely, left heart disease represents the single most prevalent causative factor for PH. PH, especially when associated with right ventricular (RV) dysfunction, reduces exercise capacity and represents an important independent prognostic factor in CHF [1]. At the core of pulmonary adaptations to CHF lies pulmonary structural remodelling with abundant proliferation of alveolar wall myofibroblasts (MYFs) [2-5]. MYFs are star-shaped cells that have a physiological role in growth, development and repair of tissue, and express morphological characteristics of both fibroblasts and smooth muscle cells [3]. The proliferation of MYFs is also associated with collagen and reticulin deposition in the alveolar septa, leading to thickening of capillary endothelial and alveolar epithelial cell basement membranes, which results in reduced lung compliance [3-7]. Although these adaptive mechanisms provide protection against alveolar oedema formation, they induce a maladaptive restrictive lung syndrome, affecting lung mechanics and gas exchange and contributing to the loss of functional capacity of CHF subjects [5, 6]. The reduction of total lung capacity is proportional to the severity of heart disease as measured from cardiopulmonary exercise testing [8]. Unfortunately, the biologic determinants of lung structural remodelling associated with CHF are currently unknown.

The aldosterone antagonists eplerenone and spironolactone are currently approved for the therapy of CHF [9-11] and constitute a class I recommendation (useful and recommended) according to the guidelines of the American College of Cardiology/American Heart Association (ACC/AHA) [12]. Despite proven benefits on reducing morbidity and mortality, the exact mechanisms of action of aldosterone inhibition remains debated and several investigators have reported on the underuse of these agents [13]. One of the potential beneficial extra-renal effects of aldosterone inhibition is the reduction of cardiac remodelling [14, 15]. Furthermore, the use of spironolactone in CHF has shown positive effects on lung tissues by improving gas diffusion and exercise capacity [16], suggesting that spironolactone could also have some beneficial effect on lung remodelling associated with CHF. Pre-clinical studies have also revealed that aldosterone could play a role in the development of lung fibrosis [17].

Against this background, we hypothesized that aldosterone contributes to lung structural remodelling and the ensuing pulmonary hypertension and RV dysfunction associated with CHF by promoting lung MYFs proliferation and fibrosis. As a corollary, a mechanism of benefit of spironolactone therapy would be to improve lung remodelling, secondary PH and RV dysfunction.

## **Methods**

The animal ethics committee of the Montreal Heart Institute approved the study protocol. It was implemented following the guidelines of the Canadian Council on Animal research in accordance with the *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals* [18].

### **Experimental protocol**

Myocardial infarction (MI) or sham surgery was performed on male Wistar rats as previously described [2-4, 7, 19-21]. Briefly, rats were anaesthetized, intubated and put on a rodent ventilator (Harvard Apparatus). Then, a left-sided thoracotomy was realized in order to expose the heart and a ligation of the proximal left anterior descending coronary artery was performed. The sham group underwent the same procedure with the exception of the ligation of the artery.

This study was designed to evaluate animals with CHF and lung remodelling using a previously validated approach based on troponin T measurement 24 hours after coronary ligation [7, 19]. Plasma troponin-T  $\geq 5.1$   $\mu\text{g/L}$  predicts moderate to large infarct size ( $\geq 30\%$  left ventricular (LV) wall motion abnormality) with a sensitivity of 91% and a specificity of 84% [7, 19]. Using this approach we previously demonstrated that these animals develop lung remodelling, PH and RV dysfunction. Blood samples were collected via the subclavian vein, centrifuged and then analyzed by standard electrochemiluminescence immunoassay using the Cobas e 601 (Roche). Two weeks after surgery, the selected rats were randomly divided into 2 groups: MI+spironolactone (Novopharm, 100 mg/kg/day in food; n = 21) and MI-untreated (n = 24). The sham group (n = 8) did not receive treatment. These therapies lasted for 3 weeks and the animals were studied 5 weeks after MI.

### **Transthoracic echocardiographic study**

Each rat was anaesthetized with 2% of isoflurane to determine LV wall motion score abnormality and LV and RV functions and geometries using a phased-array probe 10S (4.5-11.5 Megahertz) linked to a Vivid 7 system (GE Healthcare Ultrasound) [2].

### **In vivo respiratory function tests and hemodynamic measurements**

Ketamine (50 mg/kg) and xylazine (10 mg/kg) were administered and the trachea was isolated. A tracheotomy was performed and an endotracheal tube was installed. To determine lung compliance, lung elastance and measure respiratory function, rats were connected to a computer-controlled small-animal ventilator (FlexiVent, Scireq) as previously described [2]. Respiratory pressure-volume (P-V) loops were produced for each animal and analyzed using the Salazar-Knowles equation:  $V = A - B \cdot e^{-KP}$ . Where, **A** is the estimate of the inspiratory capacity, **B** is the estimate of total lung capacity ( $P=0$ ), **K** is the curvature parameter of P V loop, **P** is the pressure and **V** is the volume.

Using a Powerlab polygraph system (AD Instruments), LV and RV hemodynamic parameters were measured by the isolation and incision of the right jugular vein and carotid artery followed by the insertion of high fidelity pressure catheters (Millar Instruments) in the RV and LV.

### **Lung and heart morphometric and histological measurements**

Morphometric measurements were performed as previously described [2]. First, the right middle lung was isolated and weighed (wet weight). The lobe was dried for two weeks before measuring dry weight. Pulmonary oedema was determined by the ratio of dry/wet lung weights. The left lung was perfused and fixed with optimal cutting temperature compound (OCT, Sakura), then snap-frozen in liquid nitrogen to finally be frozen in 2-methylbutane for later study.

The hearts were isolated and dissected to separate the left and right ventricles in order to assess RV hypertrophy (RVH) by weight. LV scars were dissected and weighed and their surface area determined by planimetry.

Histological slides of lung and LV tissue from sham ( $n = 8$ ), MI-untreated ( $n = 10$ ) and MI+spironolactone ( $n = 10$ ) were stained with Masson's trichrome. For each slide, 10 random visual fields (10X) were analyzed with the Image-pro Plus 6.2 software (Media Cybernetics) to determine the collagen-staining ratio.

### **RT-PCR for osteopontin (OPN) gene expression**

Lung samples from sham (n = 8), MI-untreated (n = 10) and MI+spironolactone (n = 10) were prepared and studied. Real-time PCR was performed with the Platinum SYBR Green qPCR Kit SuperMix-UDG (Invitrogen) with use of the MX3005P device (Stratagene). To evaluate the expression of OPN gene in the lungs, the oligos of rat OPN forward [TCAGATGCTGTAGCCACTTG]; rat OPN reverse [TTCACAGAATCCTCGCTCTC]; rat cyclo A housekeeping gene forward [CTGATGGCGAGCCCTTGG] and rat cyclo A reverse [GCCACCAGTGCCATTATG] were used.

### **Lung MYFs isolation and proliferation**

Lung MYFs of male Wistar rats (175-200 g) were isolated as previously described [2, 4]. Briefly, rats were anaesthetized with intramuscular injection of a ketamine/xylazine solution (1 ml/kg). After thoracotomy, the peripheral regions of each lung lobe were dissected and cut into pieces of about 3-5 mm and washed twice in a Hank's Balanced Salt Solution (HBSS) containing 0.5% Ciprofloxacin. Subsequently, tissues were placed in a 0.1% trypsin solution overnight at 4°C with stirring to be digested. The next day, lung tissues were digested some more by up and down pipetting motion in a 0.1% collagenase II solution until solution appeared cloudy, then it was centrifuged at 3000 RPM for 3 minutes at 4°C. The pellets were re-suspended in HBSS and re-centrifuged twice. The final pellet was dissolved in 50 ml of Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) containing 6.7% Fetal Bovine Serum (FBS), 1.8% Penicillin-Streptomycin, 0.9% Amphotericin B and 0.5% Ciprofloxacin. Lung cells were then plated in T-75 flasks in an incubator (Sanyo Scientific) maintained at 37°C and 5% CO<sub>2</sub>. These are ideal conditions to stimulate cell proliferation. The culture medium (FBS) was changed every 2 days until confluence. MYFs were passaged with Trypsin-EDTA 1X at 37°C and plated in 96-wells plates (1500 cells/200 ul) for CyQUANT cell proliferation assay.

### **CyQUANT cell proliferation assay**

After reaching confluence again (around 24 hours), the first-pass lung MYFs in 96-wells plate were starved for 24 hours with a serum-free media made of DMEM containing 0.2% ITS (Insulin, Transferrine and Selenium) and 2% Penicillin-

Streptomycin. Thereafter, the cells were treated for 48 hours with one of the following three solutions: FBS positive control, ITS negative control and aldosterone (Sigma)  $10^{-7}$ M (n = 26) or  $10^{-6}$ M (n = 23). After treatment, the culture medium was removed and the 96-wells plates were frozen for at least 72 hours. Cellular proliferation was then determined using the CyQUANT Cell proliferation Assay Kit (Invitrogen) following the manufacturer's instructions.

### **Statistical analysis**

Parameters from the 3 experimental groups were evaluated by a one-way analysis of variance (ANOVA) followed, when a significant interaction was found ( $p < 0.05$ ), by the Fisher's post hoc test for multiple groups comparisons. All values were expressed as mean $\pm$ SEM and values of  $p < 0.05$  were considered to be statistically significant.

### **Results**

From the moment of randomization to treatment (2 weeks post MI) until the end of study (5 weeks), there was no mortality in any group. Plasma troponin-T concentrations measured 24h after infarct was similar in the MI-untreated ( $8.5 \pm 0.4$   $\mu$ g/l) and the MI+spironolactone ( $9.1 \pm 0.3$   $\mu$ g/l) groups indicating comparable myocardial injury prior to treatment allocation (Table 1). Five weeks after MI, this translated into moderate to severe CHF as evaluated from hemodynamics and echocardiography.

#### **Effects of spironolactone on LV function and LV remodelling**

Echocardiographic LV wall motion abnormality ( $50 \pm 4\%$  vs.  $50 \pm 5\%$ ) and wall motion score index (WMSI) were similar in the MI-untreated and MI+spironolactone groups (table 1). The LV was dilated with increases in LV end-diastolic and end-systolic dimensions and LV end-diastolic and end-systolic areas ( $p < 0.0001$ ) with no effect of spironolactone treatment (table 1). Compared to sham, LV fractional shortening (FS,  $16 \pm 2\%$  vs.  $53 \pm 1\%$ ;  $p < 0.0001$ , figure 1A) and fractional area change (FAC,  $32 \pm 2\%$  vs.  $77 \pm 2\%$ ;  $p < 0.0001$ , figure 1B) were decreased, also without significant effect of spironolactone therapy.

Hemodynamic parameters are presented in table 2. LV end-diastolic pressure (LVEDP) similarly increased in both MI groups but did not reach statistical significance. Indices of LV contractility (LV(+) dP/dt) and relaxation (LV(-) dP/dt) were importantly reduced after MI ( $p < 0.0001$ ) with no beneficial effect of MR antagonism.

Pathologic LV scar evaluations were performed. Scar weight, scar weight/BW ratio, scar surface and scar weight/scar surface ratio were similar in the MI-untreated and MI-spirolactone groups (table 3). Finally, LV histological study revealed that LV collagen fractional area was highly and similarly increased in MI-untreated and MI+spironolactone groups ( $17 \pm 2\%$ ,  $19 \pm 2\%$ ;  $p < 0.0001$ ) compared to the sham group ( $2.9 \pm 0.3\%$ , figure 2).

### **Effects of spironolactone on PH and the development of RV dysfunction and hypertrophy**

MI-untreated rats developed moderate PH evidenced by a significant increase in RV systolic pressure ( $40 \pm 3$  mmHg) compared to sham ( $27 \pm 1$  mmHg,  $p < 0.01$ ). Spirolactone therapy did not modify this increase in RV systolic pressure that remained similarly elevated at  $38 \pm 3$  mmHg (figure 3A). This elevation of pulmonary pressure in CHF animals was associated with RV hypertrophy revealed by a significant rise of RV/(LV+Septum) weights ratio from  $23 \pm 1\%$  in sham rats to  $38 \pm 3\%$  ( $p < 0.05$ ) in the MI-untreated group. Spirolactone also did not reduce RV hypertrophy ( $39 \pm 3\%$ ;  $p < 0.01$ , figure 3B).

Parameters from the echocardiographic examinations of the RV are presented in table 1. There was a non-significant increase of tricuspid valve closing to opening time (TVc-o) in the CHF groups compared to the control group. Similar findings were found for RV myocardial performance index (MPI, figure 1C). The tricuspid annulus plane systolic excursion (TAPSE), estimating RV systolic function, was significantly and similarly diminished in the CHF groups (figure 1D).

As previously demonstrated in this model, RV hemodynamic measurements revealed an increase of indices of RV contractility (RV(+) dP/dt,  $p = ns$ ) and relaxation (RV(-) dP/dt,  $p < 0.05$ ) in the MI-untreated group, with no effect of spironolactone (Table 2).



### **Effects of spironolactone on lung structural remodelling and respiratory function**

CHF almost doubled the ratio of the wet lung weight/BW from  $0.08 \pm 0.01\%$  in sham rats to  $0.17 \pm 0.02\%$  in the MI-untreated group (figure 4A). This increase was the result of important lung structural remodelling since the ratio of the dry lung weight/BW also doubled from  $0.018 \pm 0.002\%$  in sham rats to  $0.037 \pm 0.003\%$  in MI-untreated group (figure 4B). Consequently, there was no significant change in dry/wet lung weight ratio (around 22% for the 3 groups) confirming that no pulmonary oedema was present at this stage of CHF (figure 4C). Once again, spironolactone therapy did not modify lung structural remodelling. Further evidence of lung remodelling was found at histological studies (figure 5). Collagen fractional area doubled in the MI-untreated and MI+spironolactone animals ( $23 \pm 3\%$  and  $21 \pm 3\%$ , respectively) compared to sham ( $11 \pm 1\%$ ,  $p < 0.05$ ).

Respiratory function studies revealed that CHF caused a restrictive lung syndrome (figure 6). There was a decrease ( $p < 0.01$ ) in respiratory compliance, from  $1.30 \pm 0.05$  ml/cmH<sub>2</sub>O in sham to  $0.98 \pm 0.06$  ml/cmH<sub>2</sub>O in the MI group (figure 6A). However, MR antagonism could not restore lung compliance ( $0.94 \pm 0.06$  ml/cmH<sub>2</sub>O). Unsurprisingly, CHF significantly increased respiratory elastance (the inverse of compliance,  $p < 0.05$  vs. sham), which was not reversed by spironolactone (table 3). The respiratory pressure-volume loop depicts this restrictive syndrome with a downward and rightward shift of the curve in CHF (Figure 6B), indicative of lower respiratory volumes at higher inflation pressures. The fitted Salazar-Knowles parameters (A, B and K) were consequently reduced compared to the sham group (table 3). Spironolactone therapy did not reverse the adverse effects of CHF on respiratory function.

Finally, RT-PCR analysis revealed that CHF induced a 5-fold augmentation of OPN gene expression in the lung ( $1.5 \pm 0.1$  relative units, figure 7) compared to control group ( $0.3 \pm 0.1$  relative units,  $p < 0.0001$ ). MR antagonism succeeded to significantly reduce OPN gene expression in the lung ( $1.1 \pm 0.1$  relative units;  $p < 0.05$  vs. MI). Isolated lung MYFs in cell culture revealed that aldosterone treatments for 48 h did not increase lung MYFs proliferation rate (figure 8).

### **Discussion**

We evaluated the effects of MR antagonism on pulmonary hypertension, lung

structural remodelling and RV function in CHF. After moderate to large MI, rats developed CHF with PH, RV dysfunction, RV hypertrophy and important lung structural remodelling characterized by alveolar wall collagen deposition causing a restrictive respiratory syndrome. Contrary to our hypothesis however, spironolactone therapy had no significant impact on these pathologic modifications. Mechanistically, lung tissue gene expression of the pro-fibrotic mediator OPN was increased in CHF, and reduced in spironolactone-treated animals, but isolated lung MYFs failed to proliferate after aldosterone stimulation. Taken together, these data indicate that aldosterone does not play a central role in promoting lung MYFs proliferation and in contributing to lung structural remodelling and RV dysfunction associated to CHF.

Major clinical trials (RALES, EPHEBUS and EMPHASIS-HF) have convincingly demonstrated that the aldosterone antagonists eplerenone and spironolactone reduce mortality and morbidity when added to optimal medical therapy [9-11]. Antagonism of MR is useful, effective and recommended in moderate to severe CHF according to the ACC and AHA guidelines [12,13]. With this study, we had the opportunity to find one possible and as yet unexplored mechanism of the deleterious actions of aldosterone in CHF: its potential effect on lung remodelling and RV function.

Some specific points must be considered when interpreting this negative study by comparison to previous pre-clinical trials evaluating MR antagonism in this CHF model. We were very careful in the timing of therapy and the severity of CHF studied. First, we used a treatment strategy rather than a preventive approach since we started treatment 2 weeks after MI, at a time when CHF is well established and when PH and lung remodelling is already present. Second, we prospectively selected medium to large MIs based on 24h troponin T measurements. Using this previously validated approach, we randomized rats with established CHF and already evident lung remodelling. Third, we specifically evaluated lung and RV pathology and functions as end-points.

Other investigators previously evaluated MR antagonists after MI in rats. Two important distinguishing points should be noted: first, none of these studies selected animals with more severe CHF, PH and lung remodelling and; second, none specifically studied lung pathology and function. Lal et al. administered spironolactone (80 mg/kg/day) starting 1 to 3 days only after MI for 6 weeks [22]. This “prevention” study found that early administration could restore heart function by improving LV hemodynamics and preventing LV and RV dilatation. In another prevention study,

Takeda et al. used 100 mg/kg/day of spironolactone started immediately after MI for 2 weeks and also found that treatment significantly improved LV function and reduced interstitial myocardial fibrosis [23]. Another study using a lower dose of spironolactone (20 mg/kg/day) started immediately after MI for 1 month demonstrated no significant impact on LV function and infarct size [24]. These previous prevention studies therefore suggest that early therapy after MI is beneficial, at least in part, by preventing LV remodelling and improving LV function but that the lower dosage of 20 mg/kg/day is ineffective in rats.

There was only one previous “treatment” study in the rat MI model: Mulder et al. used 80 mg/kg/day of spironolactone started 8 days after MI for a duration 90 days [25]. This is the only study, aside from ours, which left some time for CHF to develop and their results were in agreement with some of our findings. The authors found no effect of therapy on LV hemodynamics and function, although there was a significant effect on LV collagen density measured by Sirius Red staining. A potential explanation for the difference with our study on this aspect might be that the LV collagen deposition can be reduced after 8 days, but not after 14 days and that infarct size may play an important role as large infarct may be less influenced by MR blockade due to a more important activation of other pro-fibrotic mediators. In conclusion, our results do not contradict the pre-clinical evidence suggesting the importance of early MR antagonism in ischemic CHF to prevent LV remodelling and dysfunction. Our results confirm little if any benefit of administration on LV remodelling and function when administered later in the disease process and establish for the first time the lack of effect on established lung remodelling and function and on RV dysfunction.

A negative study always raises the possibility of methodological difficulties that would render the study inconclusive. The dosing of spironolactone was chosen based of previously demonstrated effective dosing regimens. We in fact did find a significant biological effect of spironolactone since lung OPN gene expression was reduced by therapy. OPN is a glycosylated phosphoprotein playing a role in tissue repair and remodelling. OPN is expressed constitutively in healthy lungs and there is prominent OPN expression in lung fibrosis [26]. The expression of OPN has been shown essential for MYFs differentiation [27]. The reduction of OPN expression by spironolactone in our model was evidently insufficient to reverse remodelling suggesting that other pathways would be predominant. Furthermore, we previously demonstrated, using the

same model and temporal strategy, that the HMG-CoA reductase inhibitor Atorvastatin could importantly reduce lung remodelling and fibrosis in this model while reducing isolated lung MYF proliferation. Atorvastatin also increased total lung eNOS protein expression compared to CHF suggesting that structural remodelling could be modulated through Rho-kinase and eNOS pathways. On the other hand, the endothelin receptor antagonist Bosentan, used at a dosage effective in models of pulmonary arterial hypertension, also failed to improve lung structural remodelling and PH in our CHF model. Taken together, these results suggest that in advanced stages of CHF with established lung remodelling and fibrosis, blockade of MR receptors provides no significant benefit on respiratory function and PH. Therefore, other pro-fibrotic and proliferation pathways are more important than aldosterone in the maintenance of pathological lung remodelling in CHF.

Our results are not generalizable and must be interpreted in the particular context of the study design. In particular, spironolactone was tested alone to isolate the effect of MR blockade. In human chronic CHF, spironolactone or eplerenone are generally used as add-on therapy on top of angiotensin-converting enzyme inhibitors or angiotensin receptor antagonists, beta-blockers, diuretics and sometimes digitalis. Although we deem this unlikely, MR antagonist as add-on therapy may benefit from synergistic effects and provide some benefit on lung remodelling if tested in that context. Our results are evidently not applicable to patients receiving MR antagonism started early after MI, at a time when myocardial remodelling is occurring and prior to lung remodelling. As discussed above, pre-clinical studies would suggest maximal benefit to these patients. Furthermore, we previously demonstrated that irbesartan, an angiotensin II receptor antagonist, had completely reversed the PH, RVH and lung remodelling consequent to CHF when started immediately after MI [3].

## **Conclusions**

Chronic moderate to severe CHF in rats causes lung structural remodelling with interstitial fibrosis producing a restrictive respiratory syndrome contributing to RV dysfunction. MR antagonism with spironolactone does not reduce these pathologic modifications. Consequently, aldosterone does not significantly contribute to pulmonary remodelling and RV dysfunction associated with CHF. Other mechanisms of action must be responsible for the beneficial effects of spironolactone in chronic CHF.

### Acknowledgements

The authors would like to thank Emma Dedelis and Quang Trinh Nguyen for expert technical assistance. Dr. J-C. Tardif holds the Université de Montréal endowed research chair in atherosclerosis This work was supported by the Canadian Institutes for Health Research (MOP208611) and the Fondation de l'Institut de Cardiologie de Montréal.

### Competing interests

The authors declare that they have no competing interest.

### Authors' contribution

AC contributed to the technical realization of all phases of the project and to data analysis and writing of the first draft of this manuscript. BHJ supervised the histological studies, the lung function studies and the molecular biology experiments. YFS performed the echocardiographic studies. JCT supervised and analysed the echocardiographic studies. JD designed the study, coordinated the research team and contributed to data analysis and final draft of the manuscript.

### References

1. Ghio S, Gavazzi A, Campana C, Inserra C, Klersy C, Sebastiani R, Arbustini E, Recusani F, Tavazzi L: **Independent and additive prognostic value of right ventricular systolic function and pulmonary artery pressure in patients with chronic heart failure.** *J Am Coll Cardiol* 2001, **37**:183-188.
2. Jiang BH, Tardif JC, Sauvageau S, Ducharme A, Shi Y, Martin JG, Dupuis J: **Beneficial effects of atorvastatin on lung structural remodeling and function in ischemic heart failure.** *J Card Fail* 2010, **16**:679-688.
3. Jasmin JF, Calderone A, Leung TK, Villeneuve L, Dupuis J: **Lung structural remodeling and pulmonary hypertension after myocardial infarction: complete reversal with irbesartan.** *Cardiovasc Res* 2003, **58**:621-631.
4. Prefontaine A, Calderone A, Dupuis J: **Role of endothelin receptors on basal and endothelin-1-stimulated lung myofibroblast proliferation.** *Can J Physiol Pharmacol* 2008, **86**:337-342.

5. Kingsbury MP, Huang W, Donnelly JL, Jackson E, Needham E, Turner MA, Sheridan DJ: **Structural remodelling of lungs in chronic heart failure.** *Basic Res Cardiol* 2003, **98**:295-303.
6. Gehlbach BK, Geppert E: **The pulmonary manifestations of left heart failure.** *Chest* 2004, **125**, 669-682.
7. Jiang BH, Tardif JC, Shi Y, Dupuis J: **Bosentan does not improve pulmonary hypertension and lung remodeling in heart failure.** *Eur Respir J* 2011, **37**:578-586.
8. Dimopoulou I, Daganou M, Tsintzas OK, Tzelepis GE: **Effects of severity of long-standing congestive heart failure on pulmonary function.** *Respir Med* 1998, **92**:1321-1325.
9. Pitt B, Zannad F, Remme WJ, Cody R, Castaigne A, Perez A, Palensky J, Wittes J: **The effect of spironolactone on morbidity and mortality in patients with severe heart failure. Randomized aldactone evaluation study investigators.** *N Engl J Med* 1999, **341**:709-717.
10. Pitt B, Remme W, Zannad F, Neaton J, Martinez F, Roniker B, Bittman R, Hurley S, Kleiman J, Gatlin M; Eplerenone Post-Acute Myocardial Infarction Heart Failure Efficacy and Survival Study Investigators: **Eplerenone, a selective aldosterone blocker, in patients with left ventricular dysfunction after myocardial infarction.** *N Engl J Med* 2003, **348**:1309-1321.
11. Zannad F, McMurray JJ, Krum H, van Veldhuisen DJ, Swedberg K, Shi H, Vincent J, Pocock SJ, Pitt B; EMPHASIS-HF Study Group: **Eplerenone in patients with systolic heart failure and mild symptoms.** *N Engl J Med* 2011, **364**:11-21.
12. Hunt SA, Abraham WT, Chin MH, Feldman AM, Francis GS, Ganiats TG, Jessup M, Konstam MA, Mancini DM, Michl K, Oates JA, Rahko PS, Silver MA, Stevenson LW, Yancy CW: **Focused update incorporated into the ACC/AHA 2005 guidelines for the diagnosis and management of heart failure in adults a report of the American College of Cardiology Foundation/American Heart Association task force on practice guidelines developed in collaboration with the International Society for Heart and Lung Transplantation.** *J Am Coll Cardiol* 2009, **53**:e1-e90.

13. Albert NM, Yancy CW, Liang L, Zhao X, Hernandez AF, Peterson ED, Cannon CP, Fonarow GC: **Use of aldosterone antagonists in heart failure.** *JAMA* 2009, **302**:1658-1665.
14. Zannad F, Dousset B, Alla F: **Treatment of congestive heart failure: interfering the aldosterone-cardiac extracellular matrix relationship.** *Hypertension* 2001, **38**:1227-1232.
15. Silvestre JS, Heymes C, Oubenaissa A, Robert V, Aupetit-Faisant B, Carayon A, Swynghedauw B, Delcayre C: **Activation of cardiac aldosterone production in rat myocardial infarction: effect of angiotensin II receptor blockade and role in cardiac fibrosis.** *Circulation* 1999, **99**:2694-2701.
16. Agostoni P, Magini A, Andreini D, Contini M, Apostolo A, Bussotti M, Cattadori G, Palermo P: **Spironolactone improves lung diffusion in chronic heart failure.** *Eur Heart J* 2005, **26**:159-164.
17. Zhao L, Zhao M, Fang Q: **Spironolactone ameliorates rat pulmonary fibrosis induced by Sbleomycin a5.** *Zhonghua. Jie. He. He. Hu. Xi. Za. Zhi* 1998, **21**:300-302.
18. Institute of Laboratory Animal Research CoLS, National Research Council: *Guide for the care and use of laboratory animals.* Washington D.C.: National Academy Press; 1996.
19. Jiang BH, Nguyen QT, Tardif JC, Shi Y, Dupuis J: **Single measurement of troponin T for early prediction of infarct size, congestive heart failure, and pulmonary hypertension in an animal model of myocardial infarction.** *Cardiovasc Pathol* 2011, **20**:e85-89.
20. Lefebvre F, Prefontaine A, Calderone A, Caron A, Jasmin JF, Villeneuve L, Dupuis J: **Modification of the pulmonary renin-angiotensin system and lung structural remodelling in congestive heart failure.** *Clin Sci (Lond)* 2006, **111**:217-224.
21. Nguyen QT, Colombo F, Rouleau JL, Dupuis J, Calderone A: **Lu135252, an endothelin(A) receptor antagonist did not prevent pulmonary vascular remodelling or lung fibrosis in a rat model of myocardial infarction.** *Br J Pharmacol* 2000, **130**: 1525-1530.

22. Lal A, Veinot JP, Leenen FH: **Critical role of CNS effects of aldosterone in cardiac remodeling post-myocardial infarction in rats.** *Cardiovasc Res* 2004, **64**:437-447.
23. Takeda M, Tatsumi T, Matsunaga S, Hayashi H, Kimata M, Honsho S, Nishikawa S, Mano A, Shiraishi J, Yamada H, Takahashi T, Matoba S, Kobara M, Matsubara H: **Spironolactone modulates expressions of cardiac mineralocorticoid receptor and 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase 2 and prevents ventricular remodeling in post-infarct rat hearts.** *Hypertens Res* 2007, **30**:427-437.
24. Mill JG, Milanez Mda C, de Resende MM, Gomes Mda G, Leite CM: **Spironolactone prevents cardiac collagen proliferation after myocardial infarction in rats.** *Clin Exp Pharmacol Physiol* 2003, **30**:739-744.
25. Mulder P, Mellin V, Favre J, Vercauteren M, Remy-Jouet I, Monteil C, Richard V, Renet S, Henry JP, Jeng AY, Webb RL, Thuillez C: **Aldosterone synthase inhibition improves cardiovascular function and structure in rats with heart failure: a comparison with spironolactone.** *Eur Heart J* 2008, **29**:2171-2179.
26. O'Regan A. **The role of osteopontin in lung disease.** *Cytokine Growth Factor Rev* 2003, **14**:479-488.
27. Lenga Y, Koh A, Perera AS, McCulloch CA, Sodek J, Zohar, R. **Osteopontin expression is required for myofibroblast differentiation.** *Circ Res* 2008, **102**:319-327.



**Table 1 LV and RV echocardiographic parameters**

	<b>Sham</b>	<b>MI-untreated</b>	<b>MI+spironolactone</b>
LV wall motion abnormality (%)	0	50 ± 5*	50 ± 4*
LV wall motion score index	1 ± 0	1.95 ± 0.06*	1.79 ± 0.07*
LV end-diastolic dimension (mm)	8.2 ± 0.1	11.2 ± 0.2*	10.8 ± 0.2*
LV end-systolic dimension (mm)	3.9 ± 0.1	9.5 ± 0.3*	9.0 ± 0.3*
LV end-diastolic area (mm <sup>2</sup> )	49 ± 1	92 ± 3*	85 ± 3*
LV end-systolic area (mm <sup>2</sup> )	11 ± 1	64 ± 4*	58 ± 4*
TVc-o (msec)	103 ± 10	119 ± 6	121 ± 6
RV end-diastolic dimension (mm)	3.2 ± 0.1	3.4 ± 0.1	3.3 ± 0.2

LV, left ventricular; RV, right ventricular; TVc-o, tricuspid valve closing to opening.

\*p < 0.0001 vs. Sham.

**Table 2 Hemodynamic parameters**

	<b>Sham</b>	<b>MI-untreated</b>	<b>MI+spironolactone</b>
Heart Rate (bpm)	280 ± 12	244 ± 8**	238 ± 6**
MAP (mmHg)	97 ± 7	89 ± 4	84 ± 2†
LVEDP (mmHg)	10 ± 1	16 ± 2	16 ± 2
LV (+) dP/dt (mmHg/s)	7843 ± 491	5121 ± 317*	5156 ± 152*
LV (-) dP/dt (mmHg/s)	-6214 ± 357	-3205 ± 238*	-3164 ± 187*
RV (+) dP/dt (mmHg/s)	1387 ± 92	1688 ± 99	1538 ± 124
RV (-) dP/dt (mmHg/s)	-928 ± 67	-1248 ± 72†	-1133 ± 92

MAP, mean arterial pressure; LV, left ventricular; LVEDP, LV end diastolic pressure; RV, right ventricular.

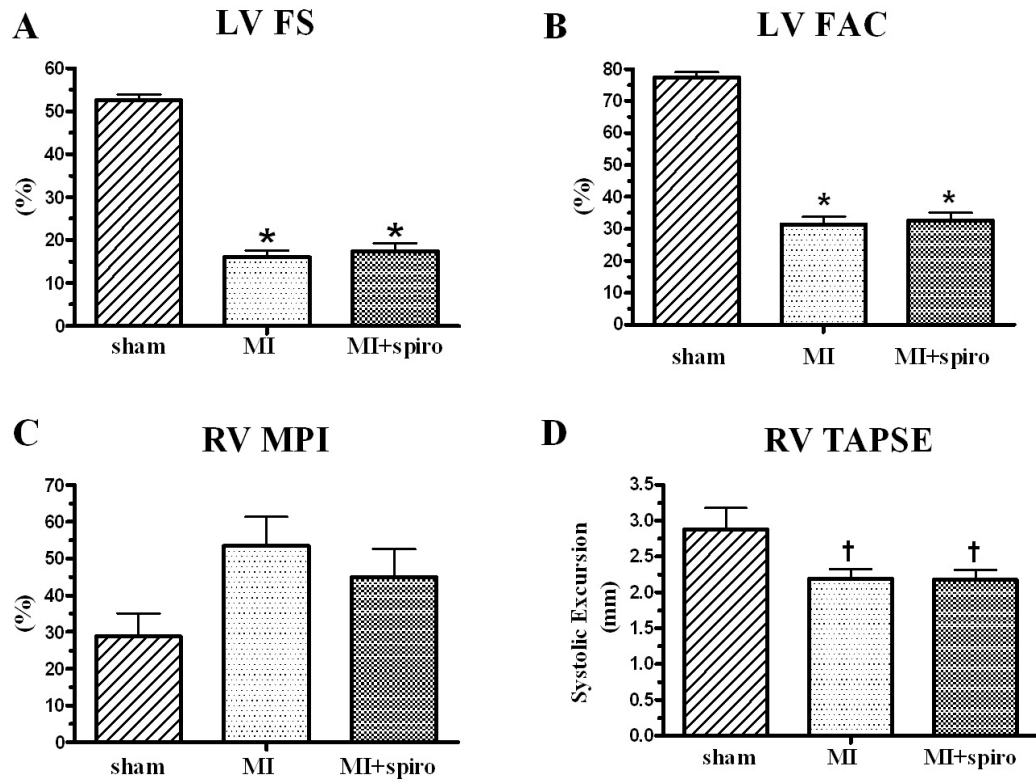
\*p < 0.0001 vs. Sham; \*\*p < 0.01 vs. Sham; †p < 0.05 vs. Sham.

**Table 3 Effect of spironolactone on BW, heart morphometric and respiratory function parameters**

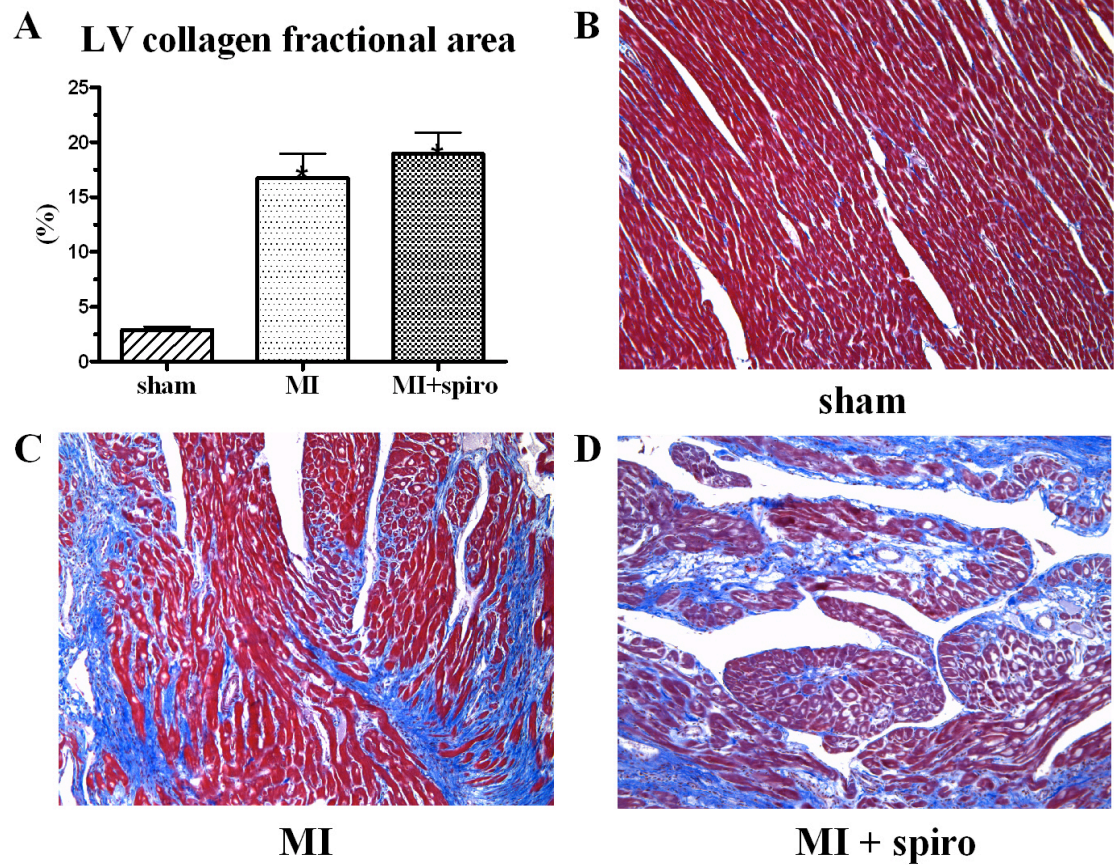
	<b>Sham</b>	<b>MI</b>	<b>MI+spironolactone</b>
Body Weight (g)	431 ± 9	417 ± 8	392 ± 6**‡
Scar Weight (g)	N/A	0.14 ± 0.02*	0.12 ± 0.02**
Scar Weight / Body Weight (%)	N/A	0.033 ± 0.005†	0.04 ± 0.01†
Scar Surface (mm <sup>2</sup> )	N/A	115 ± 9*	111 ± 8*
Scar Weight/ Scar Surface (g/mm <sup>2</sup> )	N/A	0.111 ± 0.008*	0.097 ± 0.008*
Respiratory elastance (cmH <sub>2</sub> O/ml)	0.78 ± 0.03	1.2 ± 0.1†	1.2 ± 0.1†
A Parameter, Salazar-Knowles	11.0 ± 0.2	9.6 ± 0.3†	9.3 ± 0.4**
B Parameter, Salazar-Knowles	17.9 ± 0.7	13.8 ± 0.8**	13.5 ± 0.8**
K Parameter, Salazar-Knowles	0.173 ± 0.005	0.148 ± 0.006†	0.145 ± 0.006†

A, estimate of the inspiratory capacity; B, estimate of total lung capacity (p = 0); K, curvature parameter of P-V loop.

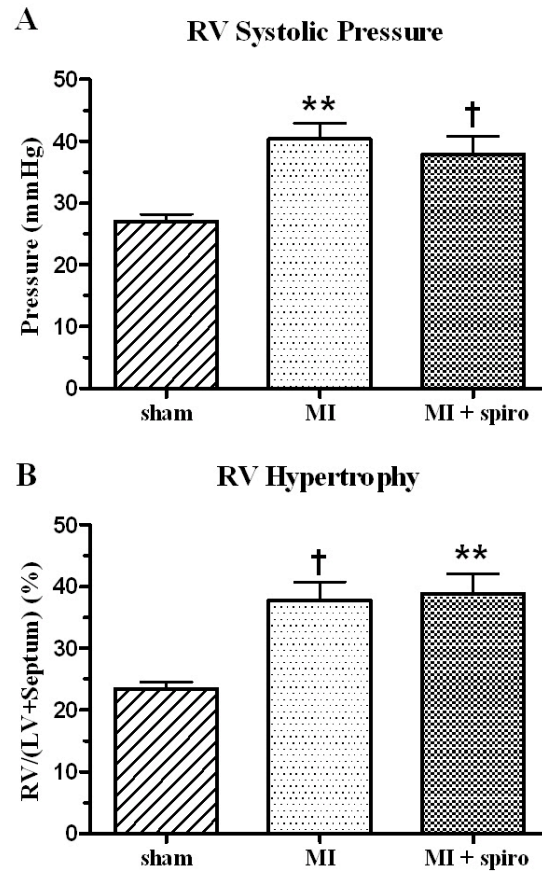
\*p < 0.0001 vs. Sham; \*\*p < 0.01 vs. Sham; †p < 0.05 vs. Sham; ‡p < 0.05 vs. MI.



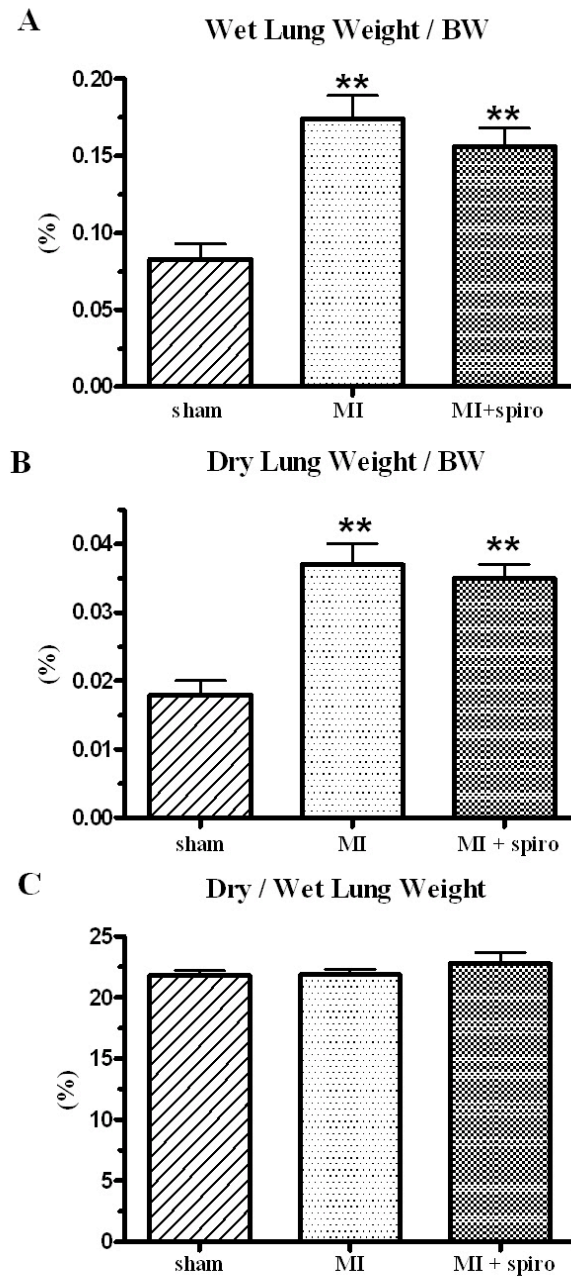
**Figure 1.** Effect of spironolactone on echocardiographic left ventricular function in sham, myocardial infarct (MI) and MI+spironolactone rats. (A) left ventricular fractional shortening (LV FS), (B) LV fractional area change (LV FAC), (C) Right ventricular myocardial performance index (RV MPI) and (D) Right ventricular tricuspid annulus plane systolic excursion (RV TAPSE). Results are expressed as mean±SEM. \* $p < 0.0001$  vs. Sham; † $p < 0.05$  vs. Sham.



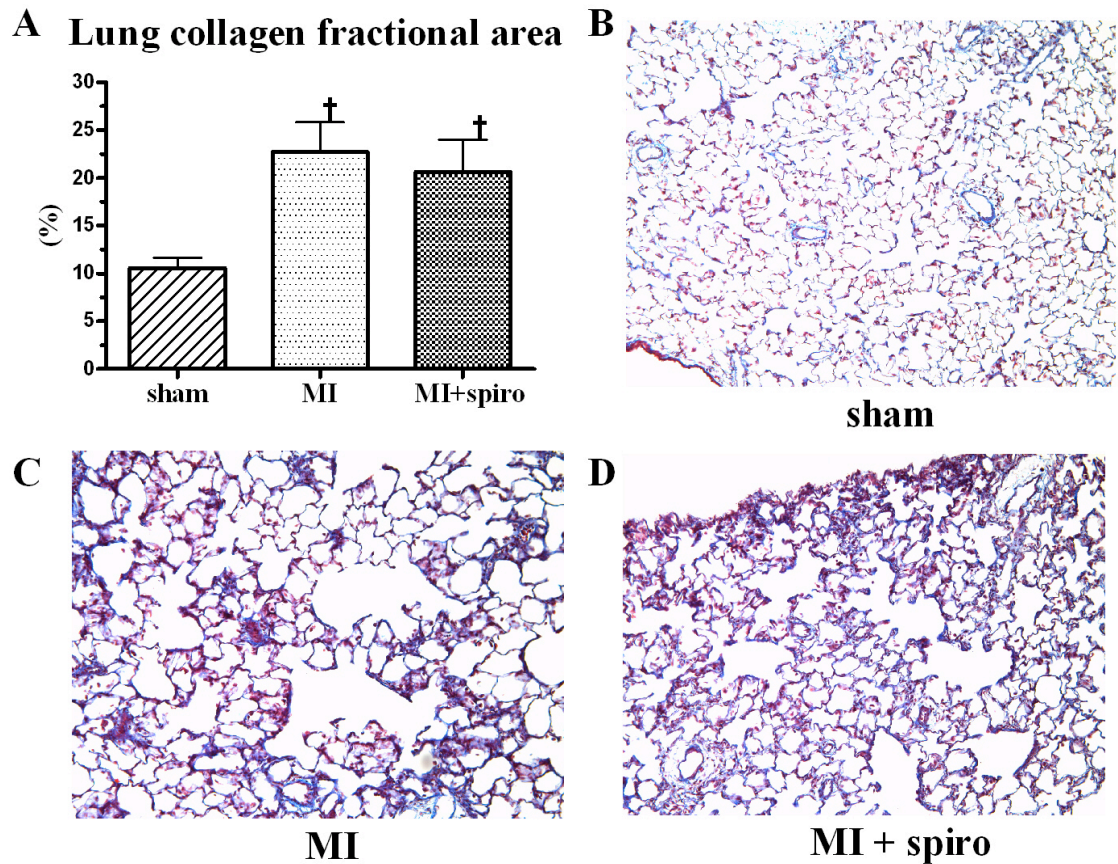
**Figure 2. Effect of spironolactone of myocardial fibrosis in sham, myocardial infarction (MI) and MI+spironolactone rats. Quantitative analysis of LV collagen fractional area (A) and histological LV section with Masson's trichrome staining where blue represent collagen in sham (B), MI (C) and MI+spironolactone (D) groups. Results are expressed as mean $\pm$ SEM. \* $p < 0.0001$  vs. Sham.**



**Figure 3. Pulmonary hypertension and RV hypertrophy in sham, myocardial infarct (MI) and MI+spironolactone. (A) right ventricular systolic pressure (RVSP) and (B) right ventricular hypertrophy (RVH). Results are expressed as mean±SEM. \*\*p < 0.01 vs. Sham; †p < 0.05 vs. Sham.**

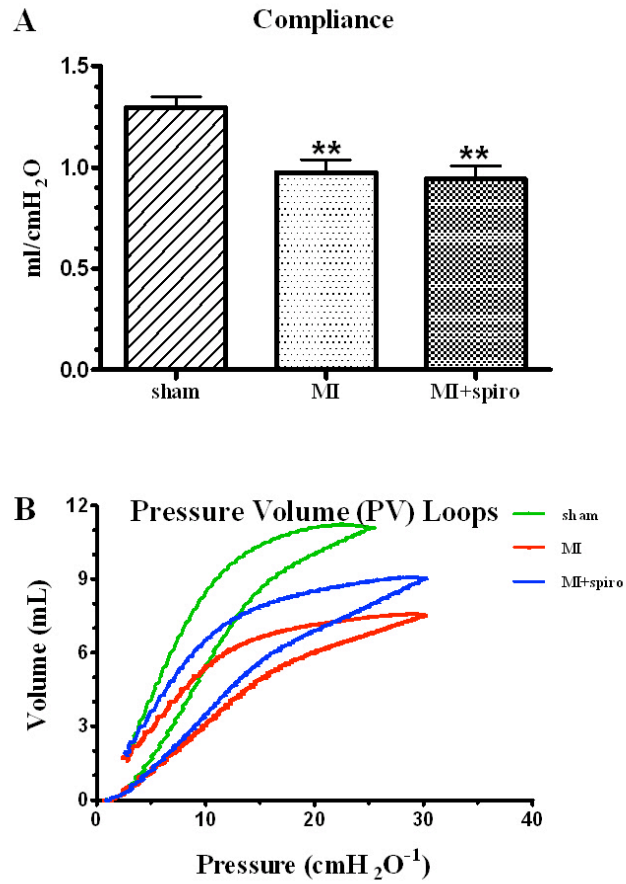


**Figure 4. Lung remodelling in sham, myocardial infarct (MI) and MI+spironolactone rats. (A) wet lung weight/body weight (BW), (B) dry lung weight/body weight (BW) and (C) dry/wet lung weights. Results are expressed as mean±SEM. \*\*p < 0.01 vs. Sham.**

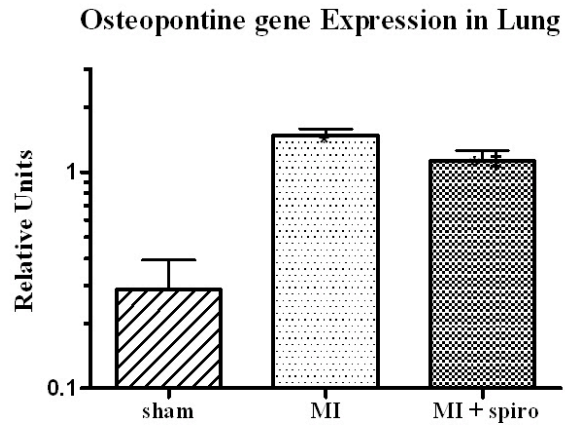


**Figure 5. Lung fibrosis in sham, myocardial infarction (MI) and MI+spironolactone rats. quantitative analysis of lung collagen fractional area (A) and histological lung section with Masson's trichrome staining where blue represent collagen in sham (B), MI (C) and MI+spironolactone (D) groups. Results are expressed as mean $\pm$ SEM. †p < 0.05 vs. Sham.**

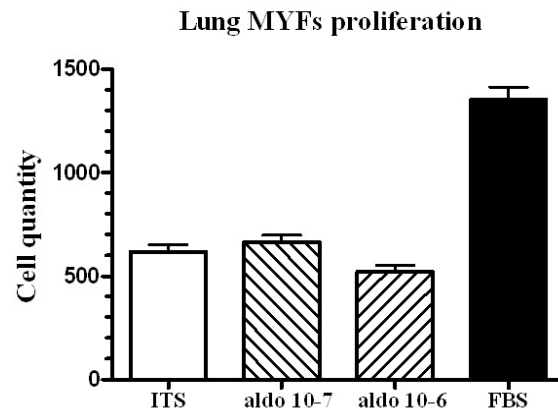




**Figure 6. Respiratory function testing in sham, myocardial infarct (MI) and MI+spironolactone rats. (A) lung compliance and (B) respiratory pressure-volume loops. Results are expressed as mean±SEM. \*\*p < 0.01 vs. Sham.**



**Figure 7. Effect of spironolactone on lung tissue Osteopontine (OPN) expression in sham, myocardial infarction (MI) and MI+spironolactone rats assessed by T-qPCR. Results are expressed as mean $\pm$ SEM. \* $p < 0.0001$  vs. Sham and ‡ $p < 0.05$  vs. MI.**



**Figure 8. Lung myofibroblasts (MYFs) proliferation with insulin transferrine selenium (ITS) negative control, aldosterone  $10^{-7}$  M (A), aldosterone  $10^{-6}$  M (B) and fetal bovine serum (FBS) positive control. Results are expressed as mean $\pm$ SEM. §p < 0.0001 vs. aldosterone and #p < 0.0001 vs. ITS.**

## 4. Discussion

Cette étude avait pour objectif de découvrir un traitement spécifique à l'hypertension pulmonaire, au remodelage pulmonaire et à la dysfonction ventriculaire droite associées à l'insuffisance cardiaque congestive. L'IC est un problème majeur de santé nord-américain induisant morbidité, avec un million d'hospitalisations annuellement aux États-Unis, mortalité et une élévation des coûts de la santé [35]. L'incidence de l'IC augmente avec l'âge et au Canada, en 2004, 85% des patients hospitalisés ont 65 ans ou plus [37]. Dû à notre population vieillissante, il est d'autant plus important actuellement d'identifier des thérapies permettant d'améliorer la qualité de vie des patients atteints d'ICC.

Nous avons décidé d'étudier les antagonistes des récepteurs minéralocorticoïdes en tant que traitement potentiel permettant de diminuer l'hypertension pulmonaire et d'améliorer la santé cardiovasculaire générale des patients atteints d'ICC, puisque la littérature confère diverses actions extra-rénales à l'Aldostérone. Tout d'abord, chez les patients ICC, la concentration d'Aldostérone dans le plasma et l'urine est augmentée [27, 79]. Ensuite, cette neurohormone est également impliquée dans la progression de l'IC et de ses symptômes via la promotion du développement de la fibrose myocardique [35, 58]. Par ailleurs, l'antagonisme des RM permet la réduction du remodelage cardiaque [59, 73, 74, 79]. Également, la littérature dénote que l'utilisation de l'Aldactone induit des effets positifs sur les tissus pulmonaires en améliorant la diffusion de gaz et la capacité à l'exercice en IC [79]. Des études précliniques ont d'ailleurs révélé que l'Aldostérone pourrait jouer un rôle dans le développement de la fibrose pulmonaire [75].

Ainsi, nous avons évalué les effets de l'antagonisme des RM sur l'hypertension pulmonaire, le remodelage structurel pulmonaire et la fonction VD en ICC. Pour ce faire, des infarctus du myocarde de taille modérée à élevée ont été induits chez des rats, amenant le développement d'ICC avec de l'hypertension pulmonaire, une dysfonction VG et VD, de l'hypertrophie VD et un remodelage structurel pulmonaire important caractérisé par un dépôt de collagène dans les parois alvéolaires provoquant un syndrome respiratoire restrictif. Cependant, contrairement à notre hypothèse, la thérapie

d'Aldactone 100mg/kg/jour durant 3 semaines n'a eu aucun impact significatif pour freiner ces modifications pathologiques associées à l'ICC. Cette étude a aussi démontré que l'expression du gène de l'Ostéopontine, un médiateur pro-fibrotique, est augmentée significativement dans les tissus pulmonaires de rats IM et que cette expression est réduite chez les rats souffrant d'ICC ayant reçu un traitement à l'Aldactone. Toutefois, le traitement à l'Aldostérone a échoué pour stimuler la prolifération des MYFs pulmonaires isolés. Ainsi, ces données indiquent ensemble que l'Aldostérone ne joue pas un rôle central dans la promotion de la prolifération des myofibroblastes pulmonaires, ainsi qu'à contribuer au remodelage structurel pulmonaire et à induire une dysfonction VD associée à l'ICC.

#### **4.1 Les Antagonistes des RM ont des Impacts Positifs en Clinique**

Trois études cliniques majeures, RALES (*Randomized Aldactone Evaluation Study*) en 1999, EPHEBUS (*Eplerenone Post-acute myocardial infarction Heart failure Efficacy and Survival Study*) en 2003 et EMPHASIS-HF (*Eplerenone in Mild Patients Hospitalization And Survival Study in Heart Failure*) en 2011 ont démontré de manière convaincante que les antagonistes des RM, tel que l'Aldactone ou l'Éplérénone, permettent de diminuer la mortalité et la morbidité chez les patients IC lorsqu'ils sont ajoutés aux thérapies standards pour cette maladie [42, 61, 153]. Tout d'abord, en ce qui concerne l'étude EMPHASIS-HF, celle-ci avait comme critères d'inclusion à l'étude : être âgé d'au moins 55 ans et faire partie de la classe II dans la classification NYHA (New York Heart Association), correspondant à une insuffisance cardiaque légère à modérée dont les symptômes cliniques sont visibles lors d'un effort important quotidien (monter les escaliers). De plus, pour être éligibles, les patients devaient avoir les traitements suivant : un inhibiteur de l'enzyme de conversion de l'Angiotensine II (IECA), un antagoniste des récepteurs de l'angiotensine (ARA), ou les deux, ainsi qu'un bêta-bloquant (sauf lors de contre-indication). Enfin, la randomisation devait se produire dans les 6 mois suivants une hospitalisation pour une raison cardiovasculaire. Ensuite, en ce qui concerne l'étude EPHEBUS, la randomisation avait lieu 3 à 14 jours après un infarctus aigu du myocarde. De plus, les patients recevaient un traitement médical optimal, incluant les IECA, les ARA, les diurétiques, les bêta-bloquants, ainsi qu'une thérapie de reperfusion coronaire. Cependant, dans cette étude, il n'y avait aucun critère

d'inclusion concernant l'ampleur de l'insuffisance cardiaque. Ainsi, si l'on compare ces études cliniques à notre étude préclinique, on constate que le traitement d'Éplérénone n'était pas employé seul, que le traitement était débuté rapidement à la suite d'un événement cardiovasculaire et que le type d'insuffisance cardiaque était faible à modérée. Ce sont donc trois facteurs considérables qui pourraient expliquer la disparité entre les résultats de ces études cliniques et notre étude. Enfin, en ce qui concerne l'étude RALES, celle-ci acceptait des patients ayant une classe IV de la classification NYHA, soit une insuffisance cardiaque sévère. De plus, l'insuffisance cardiaque devait avoir débuté six semaines avant le début de l'étude. Les patients acceptés devaient être traités avec un IECA et un diurétique de l'anse, mais la digitaline et les vasodilatateurs étaient également autorisés. On constate donc que le facteur de sévérité de l'insuffisance cardiaque est le même dans cette étude et la nôtre, mais il en demeure tout de même que le traitement était débuté rapidement à la suite du diagnostic d'insuffisance cardiaque sévère et que le traitement était utilisé en concomitance avec les thérapies usuelles (en 1999). Entre autre, on doit se souvenir qu'ici le traitement de l'Aldactone a été employé seul, alors qu'en étude clinique portant sur l'ICC les traitements d'Aldactone ou d'Éplérénone sont ajoutés, donc utilisés en tant que traitement d'appoint, à la médication usuellement prescrite à la suite d'un infarctus du myocarde, tel que les inhibiteurs de l'enzyme de conversion de l'Angiotensine II (IECA) ou les antagonistes des récepteurs de l'angiotensine (ARA), auxquels on ajoute des bêta-bloquants, des diurétiques et parfois même de la digitaline. Ainsi, il serait possible qu'il existe un mécanisme de synergisme entre les antagonistes de l'Aldostérone et la médication usuelle permettant d'améliorer la condition pulmonaire. Les bénéfices de l'utilisation précoce de l'Aldactone ou de l'Éplérénone, en tant que traitement d'appoint, sur la mortalité et la morbidité en ICC doivent être plutôt attribuables aux impacts de cette médication sur la fonction hémodynamique et le remodelage cardiaque, tel que démontré par les études fondamentales. Bref, nos résultats ne sont évidemment pas applicables à des patients recevant une médication d'antagonisme des RM débutée peu de temps à la suite d'un infarctus du myocarde, lorsque l'insuffisance cardiaque congestive commence tout juste à se développer et que le remodelage structurel pulmonaire n'a pas débuté encore.

De plus, l'antagonisme des RM est jugé utile, efficace et recommandé en IC modérée à sévère selon les recommandations de l'ACC (*American College of*

*Cardiology*) et l'AHA (*American Heart Association*) et la SCC (Société Canadienne en Cardiologie) [154-156]. Cependant, malgré les bénéfices prouvés, il y a une sous-utilisation reconnue des antagonistes de l'Aldostérone [154]. En effet, la littérature rapporte qu'aussi peu qu'un tiers des patients, répondant aux critères actuels des lignes directrices pour la thérapie constituée d'antagonistes des RM et sans contre-indications documentées, sont traités avec cette médication [154]. Le faible taux de prescription de ces agents peut être expliqué par plusieurs raisons. Tout d'abord, parmi les principaux facteurs, cette thérapie peut risquer d'induire une hyperkaliémie. Cependant, une contre-indication claire a été établie avant de permettre l'utilisation de ce médicament, c'est-à-dire que le potassium sérique doit être inférieur à 5.0mEq/L avant l'utilisation [36, 154, 155]. Ensuite, il y a un manque de connaissances sur le mécanisme d'action systémique de l'Aldostérone. En effet, il y a une mauvaise compréhension à utiliser l'Aldactone en tant qu'antagoniste des RM sur différents tissus, plutôt que comme un simple diurétique qui diminue la réabsorption hydrosodique en inhibant, entre autre, la pompe  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase au niveau du tubule contourné distal et du tube collecteur du néphron [154]. Avec cette étude, nous aurions pu découvrir un des mécanismes systémiques induisant les actions délétères de l'Aldostérone en ICC. Toutefois, nos résultats sont allés à l'encontre de notre hypothèse.

## **4.2 Les Antagonistes des RM ont des Impacts Variés en Préclinique**

Afin d'interpréter adéquatement les résultats de cette étude négative par rapport aux autres études précliniques utilisant l'antagonisme des RM dans un model d'ICC, il est essentiel de mettre en relief quelques points spécifiques. Tout d'abord, notre étude possède une caractéristique bien particulière, c'est-à-dire la sélection des rats ayant uniquement des infarctus de taille modérée à élevée avant la randomisation et le début du traitement. Ceci a été fait via une approche précédemment validée qui consiste à mesurer le taux de troponine-T plasmatique 24h post chirurgie [172, 173]. Si ce taux est supérieur ou égal à 5,1  $\mu\text{g/L}$ , alors l'anormalité du mouvement des parois du VG est supérieure ou égale à 30%, ce qui correspond à un infarctus de taille modéré à élevé. En fait, l'anomalie du mouvement des parois du VG révèle quelle proportion du VG est demeurée immobile durant l'échocardiographie. Dans cette étude, cette valeur était très élevée, soit une moyenne de 50% pour les groupes IM et IM+Aldactone,

comparativement aux autres études fondamentales où elle n'était que d'environ 30%, ce qui explique potentiellement pourquoi ces études pourraient obtenir des résultats positifs puisque l'atteinte cardiaque de ces rats est bien inférieure [90, 168]. Bref, notre étude est constituée de rats avec des dommages cardiaques importants ce qui permet le développement d'ICC évidente menant à l'établissement de remodelage pulmonaire avant le début du traitement. Un deuxième point important à prendre en considération pour comparer nos résultats aux autres études précliniques est la composante temporelle de l'étude. En effet, nous avons utilisé une stratégie de traitement, plutôt qu'une approche préventive, en débutant le traitement 2 semaines après la création des infarctus du myocarde. De cette façon, l'ICC, le remodelage pulmonaire et l'hypertension pulmonaire sont déjà bien instaurés. Enfin, notre étude se distingue des autres puisqu'elle est la seule à évaluer spécifiquement la fonction VD et le remodelage structurel pulmonaire.

Voici donc un résumé des principales études fondamentales utilisant l'antagonisme des RM en ICC. Tout d'abord, Lal et al. ont administré un traitement d'une durée 6 semaines de 80 mg/kg/jour de Spironolactone 1 à 3 jours à la suite de l'induction des infarctus du myocarde aux rats [90]. Cette étude, que l'on peut qualifier de préventive, a révélé que l'administration précoce de Spironolactone permet de rétablir la fonction cardiaque en améliorant la pression artérielle moyenne, la dilatation du VG et du VD et les facteurs de la fonction hémodynamique du VG, tel que le LVSP, le LVEDP et le LV dP/dt max. Dans une autre étude préventive, Takeda et al. ont utilisé 100 mg/kg/jour de Spironolactone et ce traitement de 2 semaines a été commencé immédiatement après l'induction de l'infarctus [168]. Encore une fois, on constate que le traitement a corrigé de façon significative la fonction ventriculaire gauche (LVSP, LVEDP et LV dP/dt max) et a réduit la fibrose myocardique interstitielle de ces rats. Aussi, Mill et al. ont réalisé une étude utilisant une dose plus faible de 20mg/kg/jour de Spironolactone débuté immédiatement après l'IM, et ce, pendant une période d'un mois [162]. Cependant, le traitement n'a eu aucun impact significatif sur la taille de l'infarctus, la pression artérielle moyenne, le battement cardiaque, le RVSP, le RVEDP, le LVSP, le LVEDP ou encore l'hypertrophie du VD et du VG. Bref, ces études de type préventives suggèrent que le traitement précoce est bénéfique après un IM et permet d'empêcher le remodelage ventriculaire, améliore la fonction hémodynamique des VG



et VD et restaure une pression artérielle moyenne normale. Cependant, un dosage inférieur, de 20 mg/kg/jour, est inefficace chez les rats.

Il n'y a eu antérieurement qu'une seule étude de type traitement réalisée avec le modèle de rat IM : soit l'étude réalisée par Mulder et al. où un dosage de 80 mg/kg/jour de Spironolactone a été commencé 8 jours après l'IM pour une durée de 90 jours [167]. Cette étude est donc la seule, en dehors de la nôtre, à avoir laissé le temps à l'insuffisance cardiaque congestive de se développer et leurs résultats étaient en accord avec certaines de nos conclusions. Cette équipe n'a trouvé aucun effet de la thérapie sur la fonction hémodynamique du VG et la pression artérielle moyenne. Toutefois, dans leur étude, il y a eu un effet significatif sur la densité de collagène du VG mesurée via une coloration au rouge Sirius. Une explication possible de cette distinction sur cet aspect d'avec notre étude pourrait être que le dépôt de collagène dans le VG peut être diminué après 8 jours, mais pas après 14 jours comme le démontre notre étude. Aussi, nous croyons que la taille de l'infarctus peut jouer un rôle considérable, et donc qu'un infarctus de taille modéré à élevé peut être moins facilement influencé par le blocage des récepteurs minéralocorticoïdes dû à une activation plus importante de divers médiateurs profibrotiques impliqués dans le processus pathologique. En conclusion, nos résultats ne contredisent pas les résultats des autres études précliniques, qui soulignent à quel point il est primordial d'utiliser les antagonistes de l'Aldostérone dès le début de l'implantation de l'insuffisance cardiaque congestive afin d'empêcher le développement du remodelage ventriculaire menant à son dysfonctionnement. Aussi, nos résultats et l'étude de Mulder confirment qu'il y a peu ou pas de bénéfice à administrer tardivement de l'Aldactone, afin de diminuer le remodelage ventriculaire ou encore pour améliorer la fonction cardiaque en générale, puisque la pathophysiologie de l'insuffisance cardiaque est déjà trop bien instaurée pour parvenir à se résorber. Cependant, nous avons été les premiers à établir l'absence d'effet de l'antagonisme des RM sur une dysfonction VD ou encore sur un remodelage structurel pulmonaire déjà présent.

### **4.3 Limites de l'Étude du Modèle IM**

Lorsque l'on est en présence d'une étude négative il est facile de penser que l'étude est non concluante en raison de diverses difficultés méthodologiques. Cependant,

nous croyons pouvoir affirmer avoir contrôlé tous les paramètres de cette étude permettant ainsi d'éviter ces erreurs. Tout d'abord, la dose de 100 mg/kg/jour d'Aldactone administrée aux rats a été choisie en fonction des posologies précédemment démontrées efficaces dans la littérature, c'est à dire des doses allant de 10 à 100 mg/kg/jour [75, 90, 162, 167, 168, 174, 175]. Ensuite, nous savons que la manière d'administrer le traitement, en l'ajoutant à la nourriture en poudre, est une méthode efficace, puisqu'elle a déjà été validée auparavant dans d'autres études [95, 173]. De plus, le traitement a effectivement agi, puisque nous avons découvert un effet biologique significatif de l'Aldactone, soit une réduction de l'expression du gène de l'Ostéopontine dans les tissus pulmonaires, ce qui est possible dû à la présence des RM dans ces tissus [41]. L'OPN est une phosphoprotéine glycosylée jouant un rôle dans la réparation tissulaire et le remodelage [58, 140, 141]. L'OPN est exprimé de façon constitutive dans les poumons sains et il y a une expression proéminente de l'Ostéopontine lors de fibrose pulmonaire [140]. L'expression de l'OPN a également été démontrée comme étant essentielle à la différenciation des MYFs [136]. Cependant, la réduction de l'expression de l'Ostéopontine via l'Aldactone n'a pas eu de conséquences directes sur la pathophysiologie des rats IM. Ainsi, cette réduction de l'expression de l'OPN a été insuffisante pour inverser le remodelage pulmonaire, et donc nous croyons que l'OPN n'est pas un facteur déterminant dans ce tissu, alors qu'il s'est révélé comme étant essentiel au processus de fibrose rénale, ce qui suggère que d'autres voies seraient prédominantes pour induire la pathophysiologie de l'ICC [141].

Par ailleurs, en ce qui concerne la composante temporelle de l'étude, celle-ci a été validée au préalable avec une étude réalisée antérieurement au sein de notre laboratoire par Bao Hua Jiang [95]. En effet, cette étude avait également pour objectif d'établir une insuffisance cardiaque congestive menant à l'hypertension pulmonaire. Ainsi, la composante temporelle établie était la suivante : délais de 2 semaines entre l'induction de l'IM et le début du traitement avec l'Atorvastatine, introduit dans la nourriture, afin de permettre le développement de la physiopathologie de l'HP. La durée du traitement avait également été établie à 3 semaines. Cette étude a démontré qu'une dose de 100mg/kg/jour d'Atorvastatine, un inhibiteur de l'HMG-CoA réductase, réduit de manière importante le remodelage et la fibrose pulmonaire ainsi que la prolifération des MYFs pulmonaires isolés. L'Atorvastatine a également augmenté l'expression de la

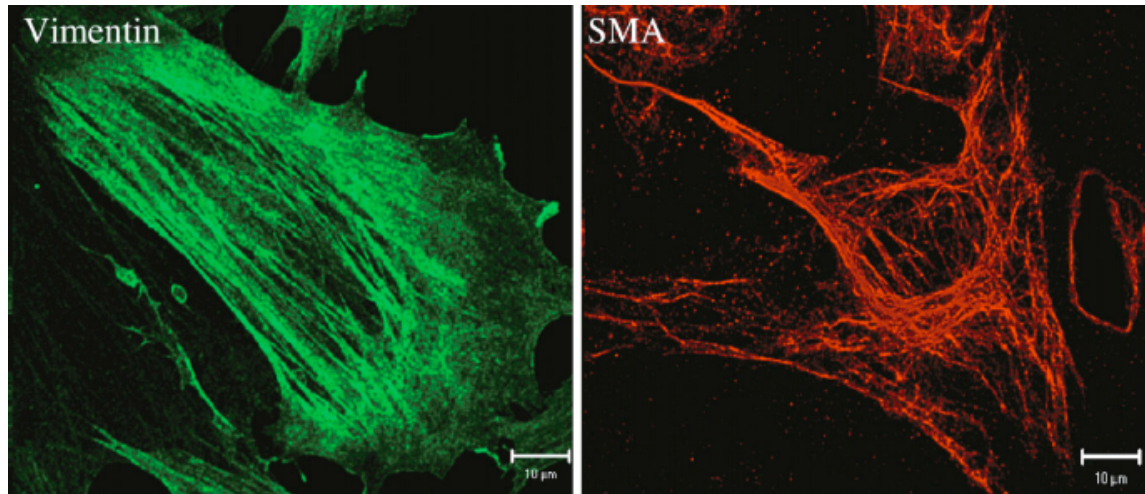
protéine eNOS pulmonaire, suggérant que le remodelage structurel pulmonaire pourrait être modulé par le biais des voies Rho-kinase et eNOS. De plus, dans cette étude, l'atteinte cardiaque des rats était similaire à celle présente dans notre étude, puisque seuls les infarctus de taille modérée à élevée, déterminé via des échocardiographies réalisées à 2 semaines post chirurgie, ont été conservés avant la randomisation. Ainsi, les études de l'Atorvastatine et de l'Aldactone sont tout à fait comparables en terme de modèle d'IM, de taille d'infarctus, de manière d'administrer la médication et de stratégie temporelle de traitement. Puisque l'étude de l'Atorvastatine a démontré des résultats positifs, il est alors indéniable que la composante temporelle et la manière d'administrer la médication sont adéquates dans notre étude. C'est pourquoi nous considérons que l'utilisation tardive de l'Aldactone à un temps de traitement plus long n'aurait pas d'importance thérapeutique, puisque le traitement à l'Atorvastatine dans ces mêmes conditions s'est révélé avoir un impact positif. Par conséquent, nous sommes convaincus que le protocole de l'étude est adéquat tant au niveau de la dose utilisée (Voir section 4.2), du temps de traitement ou encore pour la façon d'administrer l'Aldactone aux animaux. Cependant, nous n'excluons pas qu'une administration plus précoce de l'Aldactone dans le développement de la pathologie de l'ICC peut avoir un impact. Ces résultats démontrent donc que lors d'un stage avancé d'ICC, caractérisé par de la fibrose et du remodelage pulmonaire déjà bien installés, l'antagonisme des récepteurs minéralocorticoïdes ne permet pas d'améliorer la fonction respiratoire et l'HP.

Par ailleurs, une étude réalisée précédemment dans notre laboratoire a révélé qu'un traitement d'Irbésartan, un antagoniste des récepteurs de l'Angiotensine II, débuté dès l'induction de l'IM permet d'inverser complètement l'HP, l'hypertrophie du VD et le remodelage structurel pulmonaire conséquent à l'ICC sur un modèle d'IM identique au notre [101]. Toutefois, lors d'une autre étude menée avec un modèle identique d'infarctus du myocarde et réalisé avec la même stratégie temporelle que notre étude, le Bosentan, un antagoniste du récepteur de l'endothéline (ERA), a échoué à améliorer le remodelage structurel pulmonaire et l'hypertension pulmonaire lorsqu'il a été utilisé à une dose efficace dans des modèles d'hypertension artérielle pulmonaire [173]. Ainsi, d'autres voies profibrotiques ont donc une plus grande importance que l'Aldostérone dans le processus pathologique de l'ICC, tel que l'Angiotensine II ou encore les voies eNOS et Rho-kinase.

Enfin, il est important de souligner que les résultats de cette étude ne sont pas généralisables à toute situation et doivent être interprétés uniquement dans le contexte particulier qui a permis de produire les conclusions de cette étude. Entre autre, on doit se souvenir qu'ici le traitement de l'Aldactone a été employé seul, alors qu'en étude clinique portant sur l'ICC les traitements d'Aldactone ou d'Éplérénone sont ajoutés, donc utilisés en tant que traitement d'appoint, à la médication usuellement prescrite à la suite d'un événement cardiovasculaire. Ainsi, il serait possible qu'il existe un mécanisme de synergisme entre les antagonistes de l'Aldostérone et la médication usuelle permettant d'améliorer la condition pulmonaire. Les bénéfices de l'utilisation précoce de l'Aldactone ou de l'Éplérénone, en tant que traitement d'appoint, sur la mortalité et la morbidité en ICC doivent être plutôt attribuables aux impacts de cette médication sur la fonction hémodynamique et le remodelage cardiaque, tel que démontré par les études fondamentales. Bref, nos résultats ne sont évidemment pas applicables à des patients recevant une médication d'antagonisme des RM débutée peu de temps à la suite d'un infarctus du myocarde, lorsque l'insuffisance cardiaque congestive commence tout juste à se développer et que le remodelage structurel pulmonaire n'a pas débuté encore.

#### **4.4 Limites de l'Étude de la Culture Cellulaire**

La méthode de culture cellulaire utilisée a été préalablement validée au cours d'une autre étude réalisée au sein de notre laboratoire par Annick Préfontaine [102]. Lors de cette étude, le protocole de mise en culture de myofibroblastes pulmonaires de rats a été développé afin d'obtenir le type cellulaire recherché. De plus, des expériences d'immunofluorescence ont été réalisées afin de confirmer la nature des cellules passagées. Ainsi, les niveaux d'expression de différents marqueurs des MYFs, tel que l' $\alpha$ -actine des muscles lisses ainsi que la vimentine, ont été comparés entre des MYFs fraîchement isolés et des MYFs de premier passage. Ces expérimentations ont permises de constater qu'il n'y avait aucune différence dans le niveau d'expression des différents marqueurs des deux types de MYFs pulmonaires (fraîchement isolés ou passagés). La présence d' $\alpha$ -actine des muscles lisses (SMA) et de vimentine dans les MYFs pulmonaires de rats passagés est démontrée à la Figure 14 et permet de confirmer le phénotype de ce type cellulaire.



**Figure 14 : Étude d’immunofluorescence de myofibroblastes de rats mis en culture démontrant la présence de vimentine et d’ $\alpha$ -actine des muscles lisses dans les cellules passagées [102].**

Malgré le fait que nous ayons suivi en tout point le protocole établi par cette étude, la culture cellulaire demeure une méthode *in vitro* où des changements rapides du phénotype cellulaire peuvent survenir. C’est pourquoi nous avons favorisé l’utilisation de myofibroblastes pulmonaires isolés de premier et deuxième passage, permettant ainsi de conserver la morphologie cellulaire initiale de manière optimale. Malgré la réalisation de la culture cellulaire de manière rigoureuse et stérile, il n’est cependant pas possible d’exclure que les MYFs pulmonaires passagés peuvent avoir un comportement prolifératoire distinct de cellules *in vivo*.

## 5. Conclusion

De l'insuffisance cardiaque congestive modérée à élevée induit chez les rats du remodelage structurel pulmonaire caractérisé par de la fibrose interstitielle, sous la forme d'un dépôt de collagène dans les parois alvéolaires, ce qui provoque un syndrome respiratoire restrictif contribuant l'hypertension pulmonaire et à la dysfonction VD. Cependant, le traitement de trois semaines de 100mg/kg/jour d'Aldactone n'a pas réussi à renverser ces modifications pathologiques. Toutefois, le traitement avec l'antagoniste des RM a réussi à diminuer l'expression du gène de l'Ostéopontine, un médiateur pro-fibrotique, dans les tissus pulmonaire de rats insuffisants cardiaques. L'Aldostérone n'a pourtant pas augmenté la prolifération des myofibroblastes pulmonaires isolés, ni la quantité de protéines. En conséquence, l'Aldostérone ne contribue pas sensiblement au remodelage pulmonaire et à la dysfonction VD associés à l'ICC. D'autres mécanismes d'action doivent alors être responsables des effets bénéfiques de l'Aldactone chez les patients atteints d'insuffisance cardiaque congestive, tel qu'un phénomène de synergisme entre les antagonistes des RM et les médicaments prescrits de manière standard à la suite d'un infarctus du myocarde.

## 6. Bibliographie

1. Marieb, E.N., *Anatomie et physiologie humaines*. 3ième ed. 2005, Canada: ERPI. 1288.
2. Guyton, A.C. and J.E. Hall, *Textbook of Medical Physiology*. 11th ed, ed. Elsevier. 2006, Philadelphia, USA. 1116.
3. Kutsky, R.J., *Handbook of Vitamins, Minerals and Hormones* second ed. 1981, United States of America: Van Nostrand Reinhold. 492.
4. Wikipedia. *Aldosterone*. June 2nd 2011.
5. Glaz, E. and P. Vecsei, *Aldosterone*. 1971, Hungary: Pergamon Press. 626.
6. Williams, G.H., *Aldosterone biosynthesis, regulation, and classical mechanism of action*. Heart Fail Rev, 2005. **10**(1): p. 7-13.
7. Williams, J.S. and G.H. Williams, *50th anniversary of aldosterone*. J Clin Endocrinol Metab, 2003. **88**(6): p. 2364-72.
8. Deane, H.W., J.H. Shaw, and R.O. Greep, *The effect of altered sodium or potassium intake on the width and cytochemistry of the zona glomerulosa of the rat's adrenal cortex*. Endocrinology, 1948. **43**(3): p. 133-53.
9. Tait, S.A., J.F. Tait, and J.P. Coghlan, *The discovery, isolation and identification of aldosterone: reflections on emerging regulation and function*. Mol Cell Endocrinol, 2004. **217**(1-2): p. 1-21.
10. Simpson, S.A., et al., [*Isolation from the adrenals of a new crystalline hormone with especially high effectiveness on mineral metabolism*]. Experientia, 1953. **9**(9): p. 333-5.
11. Heikkilä, M., *Development of the adreno-genital system Female sex determination, ovarian and adrenal gland ontogeny regulated by Wnt-4 in mice*, in *Department of Biochemistry*. 2002, University of Oulu: Oulu.
12. Stocco, D.M., *StAR protein and the regulation of steroid hormone biosynthesis*. Annu Rev Physiol, 2001. **63**: p. 193-213.
13. Connell, J.M. and E. Davies, *The new biology of aldosterone*. J Endocrinol, 2005. **186**(1): p. 1-20.
14. Schulster, D., S. Burstein, and B.A. Cooke, *Molecular Endocrinology of the Steroid Hormones*. 1976, Great Britain: John Wiley & Sons. 321.

15. Norman, A.W. and G. Litwack, *Hormones*. 1987, United States of America: Academic Press. 806.
16. Muller, J., *Regulation of Aldosterone Biosynthesis*. 1971, Germany: Spinger-Verlag. 137.
17. Arai, K., T. Shibasaki, and G.P. Chrousos. *Adrenal Disease and Function Chapter 24 - Aldosterone Deficiency and Resistance*. 28 April 2010; Available from: [www.endotext.com](http://www.endotext.com).
18. Stocco, D.M., *Tracking the role of a star in the sky of the new millennium*. Mol Endocrinol, 2001. **15**(8): p. 1245-54.
19. Stocco, D.M., *Intramitochondrial cholesterol transfer*. Biochim Biophys Acta, 2000. **1486**(1): p. 184-97.
20. Manna, P.R., M.T. Dyson, and D.M. Stocco, *Regulation of the steroidogenic acute regulatory protein gene expression: present and future perspectives*. Mol Hum Reprod, 2009. **15**(6): p. 321-33.
21. Dyson, M.T., et al., *The differential regulation of steroidogenic acute regulatory protein-mediated steroidogenesis by type I and type II PKA in MA-10 cells*. Mol Cell Endocrinol, 2009. **300**(1-2): p. 94-103.
22. Manna, P.R., et al., *Regulation of steroidogenesis and the steroidogenic acute regulatory protein by a member of the cAMP response-element binding protein family*. Mol Endocrinol, 2002. **16**(1): p. 184-99.
23. Manna, P.R., et al., *Mechanisms of epidermal growth factor signaling: regulation of steroid biosynthesis and the steroidogenic acute regulatory protein in mouse Leydig tumor cells*. Biol Reprod, 2002. **67**(5): p. 1393-404.
24. Makin, H.L.J., *Biochemistry of Steroid Hormones*. First ed. 1975, Great Britain: Blackwell Scientific Publications. 358.
25. Makin, H.L.J., *Biochemistry of Steroid Hormones*. second ed. 1984, Great Britain: Blackwell scientific Publications. 714.
26. Mehta, P.K. and K.K. Griendling, *Angiotensin II cell signaling: physiological and pathological effects in the cardiovascular system*. Am J Physiol Cell Physiol, 2007. **292**(1): p. C82-97.
27. Weber, K.T., *Aldosterone in congestive heart failure*. N Engl J Med, 2001. **345**(23): p. 1689-97.



28. Doucet, A. and G. el Mernissi, [*Site and mechanism of tubular Na-K-ATPase regulation by aldosterone*]. *Nephrologie*, 1985. **6**(3): p. 119-22.
29. Verrey, F., J. Beron, and B. Spindler, *Corticosteroid regulation of renal Na,K-ATPase*. *Miner Electrolyte Metab*, 1996. **22**(5-6): p. 279-92.
30. Spelsberg, T.C. and R. Kumar, *Steroid and Sterol Hormone Action*. 1987, United States of America: Martinus Nijhoff Publishing. 417.
31. Pasqualini, J.R., *Receptors and mechanism of action of steroid hormones Part II*. 1977, United States of America: Marcel Dekker. 736.
32. Flood, C., et al., *An investigation of the urinary metabolites and secretion rates of aldosterone and cortisol in man and a description of methods for their measurement*. *Acta Endocrinol (Copenh)*, 1961. **36**: p. 237-64.
33. McDermott, M., S. Latif, and D.J. Morris, *The metabolism of aldosterone in kidney*. *J Steroid Biochem*, 1983. **19**(2): p. 1205-11.
34. Bonow, R.O., et al., *Braunwald's heart disease a textbook of cardiovascular medicine*. 9th ed, ed. E. Saunders. 2012, China. 1961.
35. Miller, A.B., *Aldosterone antagonism in heart failure*. *Vasc Health Risk Manag*, 2007. **3**(5): p. 605-9.
36. Palmieri, E.A., B. Biondi, and S. Fazio, *Aldosterone receptor blockade in the management of heart failure*. *Heart Fail Rev*, 2002. **7**(2): p. 205-19.
37. Lee, D.S., et al., *Regional outcomes of heart failure in Canada*. *Can J Cardiol*, 2004. **20**(6): p. 599-607.
38. McMurray, J.J. and M.A. Pfeffer, *Heart failure*. *Lancet*, 2005. **365**(9474): p. 1877-89.
39. Mann, D.L. and M.R. Bristow, *Mechanisms and models in heart failure: the biomechanical model and beyond*. *Circulation*, 2005. **111**(21): p. 2837-49.
40. Nappi, J.M. and A. Sieg, *Aldosterone and aldosterone receptor antagonists in patients with chronic heart failure*. *Vasc Health Risk Manag*, 2011. **7**: p. 353-63.
41. Agarwal, M.K. and M. Mirshahi, *Rat lung possesses the mineralocorticoid receptor*. *Biochem Biophys Res Commun*, 1992. **183**(2): p. 405-10.
42. Zannad, F., et al., *Eplerenone in patients with systolic heart failure and mild symptoms*. *N Engl J Med*, 2011. **364**(1): p. 11-21.
43. Funder, J.W., *Reconsidering the roles of the mineralocorticoid receptor*. *Hypertension*, 2009. **53**(2): p. 286-90.

44. Chai, W. and A.H. Danser, *Why are mineralocorticoid receptor antagonists cardioprotective?* Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol, 2006. **374**(3): p. 153-62.
45. Lombes, M., et al., *Immunohistochemical and biochemical evidence for a cardiovascular mineralocorticoid receptor.* Circ Res, 1992. **71**(3): p. 503-10.
46. Glorioso, N., et al., *11beta-Hydroxysteroid dehydrogenase type 2 activity is associated with left ventricular mass in essential hypertension.* Eur Heart J, 2005. **26**(5): p. 498-504.
47. Hatakeyama, H., S. Inaba, and I. Miyamori, *11beta-hydroxysteroid dehydrogenase activity in human aortic smooth muscle cells.* Hypertens Res, 2001. **24**(1): p. 33-7.
48. Hatakeyama, H., et al., *11beta-hydroxysteroid dehydrogenase in human vascular cells.* Kidney Int, 2000. **57**(4): p. 1352-7.
49. Slight, S.H., et al., *Inhibition of tissue repair by spironolactone: role of mineralocorticoids in fibrous tissue formation.* Mol Cell Biochem, 1998. **189**(1-2): p. 47-54.
50. Lombes, M., et al., *Prerequisite for cardiac aldosterone action. Mineralocorticoid receptor and 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase in the human heart.* Circulation, 1995. **92**(2): p. 175-82.
51. Jaffe, I.Z. and M.E. Mendelsohn, *Angiotensin II and aldosterone regulate gene transcription via functional mineralocorticoid receptors in human coronary artery smooth muscle cells.* Circ Res, 2005. **96**(6): p. 643-50.
52. Edwards, C.R., et al., *Localisation of 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase--tissue specific protector of the mineralocorticoid receptor.* Lancet, 1988. **2**(8618): p. 986-9.
53. Lombes, M., et al., *The mineralocorticoid receptor discriminates aldosterone from glucocorticoids independently of the 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase.* Endocrinology, 1994. **135**(3): p. 834-40.
54. Arriza, J.L., et al., *Cloning of human mineralocorticoid receptor complementary DNA: structural and functional kinship with the glucocorticoid receptor.* Science, 1987. **237**(4812): p. 268-75.

55. Alzamora, R., L. Michea, and E.T. Marusic, *Role of 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase in nongenomic aldosterone effects in human arteries*. *Hypertension*, 2000. **35**(5): p. 1099-104.
56. Delyani, J.A., E.L. Robinson, and A.E. Rudolph, *Effect of a selective aldosterone receptor antagonist in myocardial infarction*. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2001. **281**(2): p. H647-54.
57. Blasi, E.R., et al., *Aldosterone/salt induces renal inflammation and fibrosis in hypertensive rats*. *Kidney Int*, 2003. **63**(5): p. 1791-800.
58. Sugiyama, T., et al., *Aldosterone increases osteopontin gene expression in rat endothelial cells*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2005. **336**(1): p. 163-7.
59. Silvestre, J.S., et al., *Activation of cardiac aldosterone production in rat myocardial infarction: effect of angiotensin II receptor blockade and role in cardiac fibrosis*. *Circulation*, 1999. **99**(20): p. 2694-701.
60. Brilla, C.G. and K.T. Weber, *Reactive and reparative myocardial fibrosis in arterial hypertension in the rat*. *Cardiovasc Res*, 1992. **26**(7): p. 671-7.
61. Pitt, B., et al., *The effect of spironolactone on morbidity and mortality in patients with severe heart failure. Randomized Aldactone Evaluation Study Investigators*. *N Engl J Med*, 1999. **341**(10): p. 709-17.
62. Rocha, R., et al., *Mineralocorticoid blockade reduces vascular injury in stroke-prone hypertensive rats*. *Hypertension*, 1998. **31**(1 Pt 2): p. 451-8.
63. Ahokas, R.A., et al., *Aldosteronism and a proinflammatory vascular phenotype: role of Mg<sup>2+</sup>, Ca<sup>2+</sup>, and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in peripheral blood mononuclear cells*. *Circulation*, 2005. **111**(1): p. 51-7.
64. Sun, Y., et al., *Aldosterone-induced inflammation in the rat heart : role of oxidative stress*. *Am J Pathol*, 2002. **161**(5): p. 1773-81.
65. Mazak, I., et al., *Aldosterone potentiates angiotensin II-induced signaling in vascular smooth muscle cells*. *Circulation*, 2004. **109**(22): p. 2792-800.
66. Calo, L.A., et al., *Effect of aldosterone and glycyrrhetic acid on the protein expression of PAI-1 and p22(phox) in human mononuclear leukocytes*. *J Clin Endocrinol Metab*, 2004. **89**(4): p. 1973-6.
67. Ouvrard-Pascaud, A., et al., *Conditional mineralocorticoid receptor expression in the heart leads to life-threatening arrhythmias*. *Circulation*, 2005. **111**(23): p. 3025-33.

68. Farquharson, C.A. and A.D. Struthers, *Spironolactone increases nitric oxide bioactivity, improves endothelial vasodilator dysfunction, and suppresses vascular angiotensin I/angiotensin II conversion in patients with chronic heart failure*. *Circulation*, 2000. **101**(6): p. 594-7.
69. Struthers, A.D. and T.M. MacDonald, *Review of aldosterone- and angiotensin II-induced target organ damage and prevention*. *Cardiovasc Res*, 2004. **61**(4): p. 663-70.
70. Brilla, C.G., et al., *Collagen metabolism in cultured adult rat cardiac fibroblasts: response to angiotensin II and aldosterone*. *J Mol Cell Cardiol*, 1994. **26**(7): p. 809-20.
71. Weber, K.T., *Cardiac interstitium in health and disease: the fibrillar collagen network*. *J Am Coll Cardiol*, 1989. **13**(7): p. 1637-52.
72. Weber, K.T. and C.G. Brilla, *Pathological hypertrophy and cardiac interstitium. Fibrosis and renin-angiotensin-aldosterone system*. *Circulation*, 1991. **83**(6): p. 1849-65.
73. Zannad, F., et al., *Limitation of excessive extracellular matrix turnover may contribute to survival benefit of spironolactone therapy in patients with congestive heart failure: insights from the randomized aldactone evaluation study (RALES)*. *Rales Investigators*. *Circulation*, 2000. **102**(22): p. 2700-6.
74. Zannad, F., B. Dousset, and F. Alla, *Treatment of congestive heart failure: interfering the aldosterone-cardiac extracellular matrix relationship*. *Hypertension*, 2001. **38**(5): p. 1227-32.
75. Zhao, L., M. Zhao, and Q. Fang, *[Spironolactone ameliorates rat pulmonary fibrosis induced by bleomycin A5]*. *Zhonghua Jie He He Hu Xi Za Zhi*, 1998. **21**(5): p. 300-2.
76. Oberleithner, H., et al., *Human endothelium: target for aldosterone*. *Hypertension*, 2004. **43**(5): p. 952-6.
77. Oberleithner, H., *Aldosterone makes human endothelium stiff and vulnerable*. *Kidney Int*, 2005. **67**(5): p. 1680-2.
78. Levine, T.B., et al., *Activity of the sympathetic nervous system and renin-angiotensin system assessed by plasma hormone levels and their relation to hemodynamic abnormalities in congestive heart failure*. *Am J Cardiol*, 1982. **49**(7): p. 1659-66.

79. Agostoni, P., et al., *Spironolactone improves lung diffusion in chronic heart failure*. Eur Heart J, 2005. **26**(2): p. 159-64.
80. Anker, S.D., et al., *Hormonal changes and catabolic/anabolic imbalance in chronic heart failure and their importance for cardiac cachexia*. Circulation, 1997. **96**(2): p. 526-34.
81. Swedberg, K., et al., *Hormones regulating cardiovascular function in patients with severe congestive heart failure and their relation to mortality. CONSENSUS Trial Study Group*. Circulation, 1990. **82**(5): p. 1730-6.
82. Yoshida, M., et al., *Mineralocorticoid receptor is overexpressed in cardiomyocytes of patients with congestive heart failure*. Congest Heart Fail, 2005. **11**(1): p. 12-6.
83. Silvestre, J.S., et al., *Myocardial production of aldosterone and corticosterone in the rat. Physiological regulation*. J Biol Chem, 1998. **273**(9): p. 4883-91.
84. Hatakeyama, H., et al., *Vascular aldosterone. Biosynthesis and a link to angiotensin II-induced hypertrophy of vascular smooth muscle cells*. J Biol Chem, 1994. **269**(39): p. 24316-20.
85. Takeda, Y., et al., *Production of aldosterone in isolated rat blood vessels*. Hypertension, 1995. **25**(2): p. 170-3.
86. Takeda, Y., et al., *Regulation of aldosterone synthase in human vascular endothelial cells by angiotensin II and adrenocorticotropin*. J Clin Endocrinol Metab, 1996. **81**(8): p. 2797-800.
87. Cittadini, A., et al., *Aldosterone receptor blockade improves left ventricular remodeling and increases ventricular fibrillation threshold in experimental heart failure*. Cardiovasc Res, 2003. **58**(3): p. 555-64.
88. Mizuno, Y., et al., *Aldosterone production is activated in failing ventricle in humans*. Circulation, 2001. **103**(1): p. 72-7.
89. Fraccarollo, D., et al., *Additive amelioration of left ventricular remodeling and molecular alterations by combined aldosterone and angiotensin receptor blockade after myocardial infarction*. Cardiovasc Res, 2005. **67**(1): p. 97-105.
90. Lal, A., J.P. Veinot, and F.H. Leenen, *Critical role of CNS effects of aldosterone in cardiac remodeling post-myocardial infarction in rats*. Cardiovasc Res, 2004. **64**(3): p. 437-47.

91. Albaghdadi, M., M. Gheorghiade, and B. Pitt, *Mineralocorticoid receptor antagonism: therapeutic potential in acute heart failure syndromes*. Eur Heart J, 2011.
92. Lourenco, A.P., et al., *Current pathophysiological concepts and management of pulmonary hypertension*. Int J Cardiol, 2011.
93. Simonneau, G., et al., *Updated clinical classification of pulmonary hypertension*. J Am Coll Cardiol, 2009. **54**(1 Suppl): p. S43-54.
94. Butler, J., D.B. Chomsky, and J.R. Wilson, *Pulmonary hypertension and exercise intolerance in patients with heart failure*. J Am Coll Cardiol, 1999. **34**(6): p. 1802-6.
95. Jiang, B.H., et al., *Beneficial effects of atorvastatin on lung structural remodeling and function in ischemic heart failure*. J Card Fail, 2010. **16**(8): p. 679-88.
96. Ghio, S., et al., *Independent and additive prognostic value of right ventricular systolic function and pulmonary artery pressure in patients with chronic heart failure*. J Am Coll Cardiol, 2001. **37**(1): p. 183-8.
97. Hoeper, M.M., et al., *Diagnosis, assessment, and treatment of non-pulmonary arterial hypertension pulmonary hypertension*. J Am Coll Cardiol, 2009. **54**(1 Suppl): p. S85-96.
98. McLaughlin, V.V., et al., *ACCF/AHA 2009 expert consensus document on pulmonary hypertension a report of the American College of Cardiology Foundation Task Force on Expert Consensus Documents and the American Heart Association developed in collaboration with the American College of Chest Physicians; American Thoracic Society, Inc.; and the Pulmonary Hypertension Association*. J Am Coll Cardiol, 2009. **53**(17): p. 1573-619.
99. Huang, W., et al., *Capillary filtration is reduced in lungs adapted to chronic heart failure: morphological and haemodynamic correlates*. Cardiovasc Res, 2001. **49**(1): p. 207-17.
100. Gehlbach, B.K. and E. Geppert, *The pulmonary manifestations of left heart failure*. Chest, 2004. **125**(2): p. 669-82.
101. Jasmin, J.F., et al., *Lung structural remodeling and pulmonary hypertension after myocardial infarction: complete reversal with irbesartan*. Cardiovasc Res, 2003. **58**(3): p. 621-31.

102. Prefontaine, A., A. Calderone, and J. Dupuis, *Role of endothelin receptors on basal and endothelin-1-stimulated lung myofibroblast proliferation*. Can J Physiol Pharmacol, 2008. **86**(6): p. 337-42.
103. Gross, T.J. and G.W. Hunninghake, *Idiopathic pulmonary fibrosis*. N Engl J Med, 2001. **345**(7): p. 517-25.
104. Mettauer, B., et al., *Lung membrane diffusing capacity, heart failure, and heart transplantation*. Am J Cardiol, 1999. **83**(1): p. 62-7.
105. Kingsbury, M.P., et al., *Structural remodelling of lungs in chronic heart failure*. Basic Res Cardiol, 2003. **98**(5): p. 295-303.
106. Al-Rawas, O.A., et al., *The alveolar-capillary membrane diffusing capacity and the pulmonary capillary blood volume in heart transplant candidates*. Heart, 2000. **83**(2): p. 156-60.
107. Dimopoulou, I., et al., *Effects of severity of long-standing congestive heart failure on pulmonary function*. Respir Med, 1998. **92**(12): p. 1321-5.
108. Puri, S., et al., *Reduced alveolar-capillary membrane diffusing capacity in chronic heart failure. Its pathophysiological relevance and relationship to exercise performance*. Circulation, 1995. **91**(11): p. 2769-74.
109. Vlahakos, D.V., et al., *Association between activation of the renin-angiotensin system and secondary erythrocytosis in patients with chronic obstructive pulmonary disease*. Am J Med, 1999. **106**(2): p. 158-64.
110. Martyniuk, T.V., et al., [*Activity of renin-angiotensin-aldosterone system (RAAS) and vasopressin level in patients with primary pulmonary hypertension*]. Ter Arkh, 1998. **70**(4): p. 33-6.
111. Zen, G.B., [*Hemodynamic changes and their relationship with the renin-angiotensin-aldosterone system in chronic obstructive pulmonary disease*]. Zhonghua Yi Xue Za Zhi, 1989. **69**(6): p. 311-4, 22.
112. Nagaya, N., et al., *Haemodynamic and hormonal effects of adrenomedullin in patients with pulmonary hypertension*. Heart, 2000. **84**(6): p. 653-8.
113. Ikram, H., et al., *Haemodynamic and hormonal effects of captopril in primary pulmonary hypertension*. Br Heart J, 1982. **48**(6): p. 541-5.
114. Califf, R.M., et al., *A randomized controlled trial of epoprostenol therapy for severe congestive heart failure: The Flolan International Randomized Survival Trial (FIRST)*. Am Heart J, 1997. **134**(1): p. 44-54.

115. Mylona, P. and J.G. Cleland, *Update of REACH-1 and MERIT-HF clinical trials in heart failure. Cardio.net Editorial Team. Eur J Heart Fail*, 1999. **1**(2): p. 197-200.
116. Teerlink, J.R., *Recent heart failure trials of neurohormonal modulation (OVERTURE and ENABLE): approaching the asymptote of efficacy? J Card Fail*, 2002. **8**(3): p. 124-7.
117. Lewis, G.D., et al., *Sildenafil improves exercise hemodynamics and oxygen uptake in patients with systolic heart failure. Circulation*, 2007. **115**(1): p. 59-66.
118. Lepore, J.J., et al., *Hemodynamic effects of sildenafil in patients with congestive heart failure and pulmonary hypertension: combined administration with inhaled nitric oxide. Chest*, 2005. **127**(5): p. 1647-53.
119. Alaeddini, J., et al., *Efficacy and safety of sildenafil in the evaluation of pulmonary hypertension in severe heart failure. Am J Cardiol*, 2004. **94**(11): p. 1475-7.
120. Powell, D.W., et al., *Myofibroblasts. I. Paracrine cells important in health and disease. Am J Physiol*, 1999. **277**(1 Pt 1): p. C1-9.
121. Gabbiani, G., G.B. Ryan, and G. Majne, *Presence of modified fibroblasts in granulation tissue and their possible role in wound contraction. Experientia*, 1971. **27**(5): p. 549-50.
122. Tomasek, J.J., et al., *Myofibroblasts and mechano-regulation of connective tissue remodelling. Nat Rev Mol Cell Biol*, 2002. **3**(5): p. 349-63.
123. Majno, G., et al., *Contraction of granulation tissue in vitro: similarity to smooth muscle. Science*, 1971. **173**(996): p. 548-50.
124. Gabbiani, G. and G. Majno, *Dupuytren's contracture: fibroblast contraction? An ultrastructural study. Am J Pathol*, 1972. **66**(1): p. 131-46.
125. Hirschi, K.K. and P.A. D'Amore, *Pericytes in the microvasculature. Cardiovasc Res*, 1996. **32**(4): p. 687-98.
126. Zhang, K., et al., *Myofibroblasts and their role in lung collagen gene expression during pulmonary fibrosis. A combined immunohistochemical and in situ hybridization study. Am J Pathol*, 1994. **145**(1): p. 114-25.
127. Kaartenaho-Wiik, R., P. Paakko, and R. Sormunen, *Ultrastructural features of lung fibroblast differentiation into myofibroblasts. Ultrastruct Pathol*, 2009. **33**(1): p. 6-15.



128. Shepro, D. and N.M. Morel, *Pericyte physiology*. FASEB J, 1993. **7**(11): p. 1031-8.
129. Cristia, E., et al., *Pericryptal myofibroblast growth in rat descending colon induced by low-sodium diets is mediated by aldosterone and not by angiotensin II*. J Membr Biol, 2005. **206**(1): p. 53-9.
130. Cristia, E., M. Moreto, and R.J. Naftalin, *Key role of aldosterone and pericryptal myofibroblast growth in colonic permeability*. J Pediatr Gastroenterol Nutr, 2007. **45 Suppl 2**: p. S127-30.
131. Neumann, S., et al., *Aldosterone and D-glucose stimulate the proliferation of human cardiac myofibroblasts in vitro*. Hypertension, 2002. **39**(3): p. 756-60.
132. Eyden, B., *Electron microscopy in the study of myofibroblastic lesions*. Semin Diagn Pathol, 2003. **20**(1): p. 13-24.
133. Ignatz, R.A. and J. Massague, *Transforming growth factor-beta stimulates the expression of fibronectin and collagen and their incorporation into the extracellular matrix*. J Biol Chem, 1986. **261**(9): p. 4337-45.
134. Serini, G., et al., *The fibronectin domain ED-A is crucial for myofibroblastic phenotype induction by transforming growth factor-beta1*. J Cell Biol, 1998. **142**(3): p. 873-81.
135. Weibel, E.R., *On pericytes, particularly their existence on lung capillaries*. Microvasc Res, 1974. **8**(2): p. 218-35.
136. Lenga, Y., et al., *Osteopontin expression is required for myofibroblast differentiation*. Circ Res, 2008. **102**(3): p. 319-27.
137. Takahashi, F., et al., *Role of osteopontin in the pathogenesis of bleomycin-induced pulmonary fibrosis*. Am J Respir Cell Mol Biol, 2001. **24**(3): p. 264-71.
138. Butler, W.T., *The nature and significance of osteopontin*. Connect Tissue Res, 1989. **23**(2-3): p. 123-36.
139. Takemoto, M., et al., *NK-104, a 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase inhibitor, reduces osteopontin expression by rat aortic smooth muscle cells*. Br J Pharmacol, 2001. **133**(1): p. 83-8.
140. O'Regan, A., *The role of osteopontin in lung disease*. Cytokine Growth Factor Rev, 2003. **14**(6): p. 479-88.
141. Irita, J., et al., *Osteopontin in rat renal fibroblasts: functional properties and transcriptional regulation by aldosterone*. Hypertension, 2008. **51**(2): p. 507-13.

142. Del Ry, S., et al., *Increased plasma levels of osteopontin are associated with activation of the renin-aldosterone system and with myocardial and coronary microvascular damage in dilated cardiomyopathy*. Cytokine, 2010. **49**(3): p. 325-30.
143. Matsui, Y., et al., *Role of osteopontin in cardiac fibrosis and remodeling in angiotensin II-induced cardiac hypertrophy*. Hypertension, 2004. **43**(6): p. 1195-201.
144. Rocha, R., et al., *Aldosterone induces a vascular inflammatory phenotype in the rat heart*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2002. **283**(5): p. H1802-10.
145. Chun, T.Y., et al., *Aldosterone, but not angiotensin II, increases profibrotic factors in kidney of adrenalectomized stroke-prone spontaneously hypertensive rats*. Am J Physiol Endocrinol Metab, 2008. **295**(2): p. E305-12.
146. Irita, J., et al., *Osteopontin deficiency protects against aldosterone-induced inflammation, oxidative stress, and interstitial fibrosis in the kidney*. Am J Physiol Renal Physiol, 2011.
147. Sam, F., et al., *Mice lacking osteopontin exhibit increased left ventricular dilation and reduced fibrosis after aldosterone infusion*. Am J Hypertens, 2004. **17**(2): p. 188-93.
148. Singh, K., et al., *Myocardial osteopontin expression coincides with the development of heart failure*. Hypertension, 1999. **33**(2): p. 663-70.
149. Zhang, Y.L., et al., *Blockades of angiotensin and aldosterone reduce osteopontin expression and interstitial fibrosis infiltration in rats with myocardial infarction*. Chin Med J (Engl), 2008. **121**(21): p. 2192-6.
150. Trueblood, N.A., et al., *Exaggerated left ventricular dilation and reduced collagen deposition after myocardial infarction in mice lacking osteopontin*. Circ Res, 2001. **88**(10): p. 1080-7.
151. Walsh, C.T. and R.D. Schwartz-Bloom, *Levine's pharmacology drug actions and reactions*. 7th ed. 2005, Italy: Taylor & Francis. 561.
152. Struthers, A., H. Krum, and G.H. Williams, *A comparison of the aldosterone-blocking agents eplerenone and spironolactone*. Clin Cardiol, 2008. **31**(4): p. 153-8.

153. Pitt, B., et al., *Eplerenone, a selective aldosterone blocker, in patients with left ventricular dysfunction after myocardial infarction*. N Engl J Med, 2003. **348**(14): p. 1309-21.
154. Albert, N.M., et al., *Use of aldosterone antagonists in heart failure*. JAMA, 2009. **302**(15): p. 1658-65.
155. Hunt, S.A., et al., *2009 Focused update incorporated into the ACC/AHA 2005 Guidelines for the Diagnosis and Management of Heart Failure in Adults A Report of the American College of Cardiology Foundation/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines Developed in Collaboration With the International Society for Heart and Lung Transplantation*. J Am Coll Cardiol, 2009. **53**(15): p. e1-e90.
156. Svendsen, A., *Heart failure: an overview of consensus guidelines and nursing implications*. Can J Cardiovasc Nurs, 2003. **13**(2): p. 30-4.
157. Suzuki, G., et al., *Effects of long-term monotherapy with eplerenone, a novel aldosterone blocker, on progression of left ventricular dysfunction and remodeling in dogs with heart failure*. Circulation, 2002. **106**(23): p. 2967-72.
158. Cicoira, M., et al., *Long-term, dose-dependent effects of spironolactone on left ventricular function and exercise tolerance in patients with chronic heart failure*. J Am Coll Cardiol, 2002. **40**(2): p. 304-10.
159. Modena, M.G., et al., *Aldosterone inhibition limits collagen synthesis and progressive left ventricular enlargement after anterior myocardial infarction*. Am Heart J, 2001. **141**(1): p. 41-6.
160. Brilla, C.G., et al., *Remodeling of the rat right and left ventricles in experimental hypertension*. Circ Res, 1990. **67**(6): p. 1355-64.
161. Brilla, C.G., L.S. Matsubara, and K.T. Weber, *Anti-aldosterone treatment and the prevention of myocardial fibrosis in primary and secondary hyperaldosteronism*. J Mol Cell Cardiol, 1993. **25**(5): p. 563-75.
162. Mill, J.G., et al., *Spironolactone prevents cardiac collagen proliferation after myocardial infarction in rats*. Clin Exp Pharmacol Physiol, 2003. **30**(10): p. 739-44.
163. Nishi, I., et al., *Addition of spironolactone to an angiotensin-converting enzyme inhibitor decreases lung congestion and edema in Dahl hypertensive rats*. Heart Vessels, 2006. **21**(4): p. 251-5.

164. Chai, W., et al., *Cardioprotective effects of eplerenone in the rat heart: interaction with locally synthesized or blood-derived aldosterone?* Hypertension, 2006. **47**(4): p. 665-70.
165. Chai, W., et al., *Genomic and nongenomic effects of aldosterone in the rat heart: why is spironolactone cardioprotective?* Br J Pharmacol, 2005. **145**(5): p. 664-71.
166. Yee, K.M., S.D. Pringle, and A.D. Struthers, *Circadian variation in the effects of aldosterone blockade on heart rate variability and QT dispersion in congestive heart failure.* J Am Coll Cardiol, 2001. **37**(7): p. 1800-7.
167. Mulder, P., et al., *Aldosterone synthase inhibition improves cardiovascular function and structure in rats with heart failure: a comparison with spironolactone.* Eur Heart J, 2008.
168. Takeda, M., et al., *Spironolactone modulates expressions of cardiac mineralocorticoid receptor and 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase 2 and prevents ventricular remodeling in post-infarct rat hearts.* Hypertens Res, 2007. **30**(5): p. 427-37.
169. Schafer, A., et al., *Inhibition of platelet activation in congestive heart failure by aldosterone receptor antagonism and ACE inhibition.* Thromb Haemost, 2003. **89**(6): p. 1024-30.
170. Fraccarollo, D., et al., *Additive improvement of left ventricular remodeling and neurohormonal activation by aldosterone receptor blockade with eplerenone and ACE inhibition in rats with myocardial infarction.* J Am Coll Cardiol, 2003. **42**(9): p. 1666-73.
171. Schafer, A., et al., *Addition of the selective aldosterone receptor antagonist eplerenone to ACE inhibition in heart failure: effect on endothelial dysfunction.* Cardiovasc Res, 2003. **58**(3): p. 655-62.
172. Jiang, B.H., et al., *Single measurement of troponin T for early prediction of infarct size, congestive heart failure, and pulmonary hypertension in an animal model of myocardial infarction.* Cardiovasc Pathol, 2010.
173. Jiang, B.H., et al., *Bosentan does not improve pulmonary hypertension and lung remodeling in heart failure.* Eur Respir J, 2011. **37**(3): p. 578-86.

174. Veliotis, D.G., et al., *Aldosterone receptor blockade prevents the transition to cardiac pump dysfunction induced by beta-adrenoreceptor activation*. Hypertension, 2005. **45**(5): p. 914-20.
175. Nehme, J.A., et al., *Spirolactone improves carotid artery fibrosis and distensibility in rat post-ischaemic heart failure*. J Mol Cell Cardiol, 2005. **39**(3): p. 511-9.