

Université de Montréal

**Rôle des récepteurs vasculaires de l'angiotensine II dans la
régulation de l'expression des protéines de la matrice
extracellulaire, des intégrines et de l'activité des
métalloprotéinases de la matrice (MMPs)**

par

Pascal Brassard

Programme de Sciences Biomédicales

Faculté de Médecine

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

Août 2005



© Pascal Brassard, 2005

W

4

U58

2006

V.054

AVIS

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

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

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

NOTICE

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

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

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

Université de Montréal
Faculté des études supérieures

Cette thèse intitulée :

Rôle des récepteurs vasculaires de l'angiotensine II dans la régulation de l'expression des protéines de la matrice extracellulaire, des intégrines et de l'activité des métalloprotéinases de la matrice (MMPs)

présentée par :
Pascal Brassard

a été évaluée par un jury composé des personnes suivantes :

Dr Éric Thorin, président-rapporteur
Dr Ernesto L. Schiffrin, directeur de recherche
Dr Gaétan Thibault, membre du jury
Dr Pedro D'Orléans-Juste, examinateur externe
Dr , représentant du doyen de la FES

Résumé

Le but de cette thèse était de déterminer si les récepteurs à l'angiotensine (Ang) II étaient directement impliqués dans le processus d'activation ou de régulation de l'activité des métalloprotéinases de la matrice (MMPs) et voir s'ils pouvaient être impliqués directement dans les processus de remodelage vasculaire. Il est bien décrit que l'infusion d'Ang II altère la structure et la composition de la paroi artérielle. Ces effets sont largement atténués par le blocage des récepteurs AT₁, indépendamment de la pression artérielle (PA) car il n'y avait pas de changements dans le groupe traité à l'hydralazine, un vasodilatateur général. Notre étude suggère que le blocage des récepteurs AT₁ et AT₂ avec le Sar-Ile, réduit la lumière vasculaire et l'épaisseur de la média, mais la réduction de ces deux paramètres ne change en rien au ratio média : lumière. Au niveau mécanique, ces vaisseaux montrent une rigidité accrue. L'indice de croissance de ces vaisseaux n'indiquait à peu près pas d'augmentation, signifiant une diminution de la prolifération cellulaire. De plus, puisque ces vaisseaux avaient un module élastique augmenté par rapport aux autres groupes et comparé à un même stress, cette relation, indépendante de la géométrie vasculaire, laissait soupçonner une diminution des composants élastiques ou une augmentation des composants non élastiques fibrillaires. Nous avons donc étudié les principaux composants de la MEC au niveau des vaisseaux des animaux traités au Sar-Ile afin de voir si des changements à ce niveau pouvaient expliquer les différences dans la structure et les propriétés mécaniques de ces vaisseaux. Nous avons observé une diminution significative du collagène de type I et de l'élastine. Par conséquent, nous avons obtenu une diminution importante du ratio collagène : élastine. Nous avons également observé une augmentation de fibronectine dans ces vaisseaux. En ce qui concerne l'activité des gélatinases, nous avons observé une augmentation significative de l'activité de la forme active de la MMP-2 suite au blocage des récepteurs à l'Ang II. De plus, nous avons évalué les inhibiteurs des MMPs (TIMPs : « tissue inhibitors of metalloproteinases ») qui pouvaient se fixer à la MMP-2 et nous avons déterminé qu'il y avait une inhibition presque complète de la fixation de TIMP-2 à la MMP-2. Ceci vient confirmer qu'il est possible que l'augmentation de la dégradation du

collagène et de l'élastine puisse en partie être due à l'augmentation de l'activité de cette enzyme et puisse participer à l'augmentation de la rigidité vasculaire.

Nous avons également évalué l'expression de certaines intégrines. Nous avons démontré que l'Ang II augmentait l'expression des sous-unités α_8 , β_1 , β_3 ainsi que l'ostéopontine, qui sont toutes significativement réduites par le traitement avec losartan, Sar-Ile ou hydralazine. De plus, l'Ang II a augmenté l'expression de la sous-unité α_5 et il est important de noter que le traitement avec losartan l'a augmenté davantage. À l'opposé, nous avons démontré que le losartan était le seul traitement qui a augmenté l'expression de la sous-unité α_1 . Ces résultats nous démontrent une fois de plus que les récepteurs AT₁ et AT₂ ont des effets différents et que parfois l'un peut arriver à compenser les effets délétères de l'autre, de manière similaire à ce que l'on a observé au niveau de la structure et la composition de la MEC.

En conclusion, le blocage des récepteurs AT₁ et AT₂ par le Sar-Ile diminue la liaison de TIMP-2 à la MMP-2. De plus, le Sar-Ile augmente l'activité de la MMP-2, ce qui a pour effet de potentialiser considérablement l'activité de cette dernière. L'augmentation résultante de l'activité de cette gélatinase peut expliquer, en partie, l'augmentation de la dégradation du collagène de type I et de l'élastine. La diminution de ces deux composants de la MEC, accompagnée d'une augmentation du dépôt de fibronectine, et la diminution de la majorité des intégrines, peut participer, du moins en partie, à l'augmentation de la rigidité des petits vaisseaux de résistance mésentériques. Ceci explique, du moins en partie, le remodelage observé dans ce groupe de rats traités avec Sar-Ile et l'augmentation de la rigidité vasculaire résultante, suggérant que la stimulation des deux récepteurs à l'Ang II est nécessaire pour maintenir les fonctions contractiles des CMLV.

Mots-clés : Angiotensine II, matrice extracellulaire, collagène, élastine, fibronectine, MMPs, TIMPs, intégrine, remodelage vasculaire, résistance vasculaire.

Abstract

The aim of this thesis was to determine whether Ang II receptors were involved in the activation and regulation of MMP activity implicated in vascular remodeling. It has been well established that Ang II infusion induces changes in the structure and composition of the arterial wall. These effects were attenuated by AT₁ receptor blockade, independently of blood pressure as demonstrated by the lack of effect on remodeling of hydralazine despite efficacious blood pressure lowering. The concomitant blockade of both Ang II receptors by Sar-Ile reduced the vascular lumen and media thickness, without altering media/lumen ratio, mechanically, vessels were stiffer as indicated by decreased strain for a similar level of media stress when compared to vessels from Ang II-treated rats. The growth index of mesenteric resistance arteries was not increased, indicating that there was a decreased cellular proliferation. Because vessels from Sar-Ile treated group had an increased elastic modulus for the same media stress level, we assumed that a decrease in the elastic components or an increase in the non-elastic fibrillar components had occurred, since this relationship is independent of geometry of the vessel. We then evaluated the ECM components which could explain the differences observed in the structure and mechanical properties of these vessels. In Sar-Ile treated animals, we found significant decreases in type I collagen and elastin with subsequent decreased collagen : elastin ratio which could contribute in part to increased in the vascular stiffness. We also showed that fibronectin is increased in Sar-Ile treated Ang II-infused rats. Thereafter, we investigated the regulation and activation of gelatinases. We showed a significant increase in MMP-2 active form followed blockade of Ang II receptors with Sar-Ile. Moreover, we evaluated the activity of MMP inhibitors (TIMPs) which could affect MMP-2 activity. We determined that there was a nearly complete inhibition of TIMP-2 binding to MMP-2 following Sar-Ile treatment. When the enzyme : inhibitor ratio was considered, the relative MMP-2 activity in the Sar-Ile group was increased compared to other groups, which could explain increased elastin and collagen degradation and partly, the structural changes and increased stiffness of the resistance vessels.

We also evaluated the expression of integrins involved in the anchoring of ECM components in order to verify whether the increase in vessel wall stiffness in animals treated with Sar-Ile was attributable only to modification of ECM components. Ang II enhanced vascular α_8 , β_1 , β_3 integrins and osteopontin expression, which were significantly reduced by losartan, Sar-Ile and hydralazine. Although Ang II increased vascular α_5 subunit expression, this was increased further by losartan. Losartan was the only treatment that induced α_1 subunit expression. These results demonstrate that AT₁ and AT₂ receptors have countervailing effects on vascular integrin subunit expression, similarly to their effects on vascular remodeling, structure and ECM composition. Moreover, the decreased α_5 integrin which is implicated in the binding process (anchoring), showed decreased binding to the ECM in VSMC, suggesting that VSMCs may develop a migratory phenotype after AT₁ and AT₂ antagonism.

In conclusion, concomitant AT₁ and AT₂ receptor blockade decreased binding of TIMP-2 to MMP-2, and increased MMP-2 activity. The resultant increase in gelatinase activity can explain, in part, the increased degradation of type I collagen and elastin. These two ECM components, combined with increased fibronectin, participate, at least in part, in the increased stiffness of small resistance mesenteric vessels. Moreover, the observed decrease of most of the integrins, particularly affecting α_5 integrin, was associated with a decreased growth index and TIMP-2 in the Sar-Ile-treated group. This partially explains the vascular remodeling and resulting increased wall stiffening observed in animals treated with Sar-Ile, which suggests that both Ang II receptors are necessary to maintain the contractile functions of VSMC.

Keywords: Angiotensin II, ECM, collagen, elastin, fibronectin, MMPs, TIMPs, integrin, vascular remodeling, vascular stiffness.

Table des matières

Résumé.....	iii
Abstract.....	v
Table des matières.....	vii
Liste des tableaux.....	xi
Liste des figures.....	xii
Abréviations.....	xiv
Dédicace.....	xvii
Remerciements.....	xviii
1. Introduction.....	2
1.1. La paroi artérielle.....	3
1.1.1. Morphologie.....	3
1.1.1.1. Intima.....	4
1.1.1.2. Média.....	4
1.1.1.3. Adventice.....	4
1.1.1.4. Vasa-vasorum.....	4
1.2. Tension artérielle.....	6
1.2.1. Hypertension artérielle.....	7
1.2.1.1. Incidence de l'hypertension.....	9
1.3. Remodelage vasculaire.....	10
1.3.1. Modifications de la structure et de la géométrie des artères au cours de l'HTA.....	14
1.3.1.1. Modifications ultrastructurales.....	14
1.3.1.2. Modifications géométriques.....	17
1.3.1.2.1. Artères de gros et moyen calibre.....	17
1.3.1.2.2. Artères de résistance.....	19
1.3.1.2.2.1. Définitions des paramètres physiologiques utilisés pour caractériser le remodelage des artérioles de résistance.....	20

1.3.2. Conséquences fonctionnelles du remodelage artériel au cours de l'HTA	22
1.3.2.1. Au niveau des artères de gros et moyen calibre	22
1.3.2.1.1. Préservation des propriétés élastiques de la paroi artérielle.....	22
1.3.2.1.2. Remodelage artériel et dysfonctionnement endothélial	26
1.3.2.2. Au niveau des artérioles	26
1.3.2.2.1. Augmentation structurale des résistances vasculaires périphériques.....	26
1.3.2.2.2. Hyperréactivité artérielle aux stimuli.....	27
1.3.2.2.3. Diminution de la réserve de perfusion des organes cibles	27
1.3.2.2.4. Modification de l'autorégulation des débits régionaux	27
1.4. Système rénine angiotensine aldostérone.....	28
1.4.1. Modèle d'HTA induite par l'Ang II.....	33
1.4.2. Modèles d'HTA d'animaux transgéniques et d'inactivation allélique des gènes du SRAA	34
1.4.3. Les récepteurs de l'Ang II	35
1.4.3.1. Les récepteurs AT ₁	36
1.4.3.1.1. La régulation des récepteurs AT ₁	39
1.4.3.1.2. Les antagonistes des récepteurs AT ₁	40
1.4.3.1.2.1. Le (Sar ¹ , Ile ⁸)-Angiotensine II	42
1.4.3.1.3. Les voies de signalisation médiées par le récepteur AT ₁	43
1.4.3.1.4. Les fonctions physiologiques du récepteur AT ₁	46
1.4.3.1.5. Dimérisation des récepteurs AT ₁	50
1.4.3.2. Le récepteur AT ₂	51
1.4.3.2.1. La régulation des récepteurs AT ₂	52
1.4.3.2.2. Les mécanismes de signalisation du récepteur AT ₂	53
1.4.3.2.3. Le récepteur AT ₂ et la régulation de la PA	55
1.4.3.3. Le SRAA et la croissance dans les lésions vasculaires.....	55
1.5. Composition de la matrice extracellulaire.....	56
1.5.1. Matrice extracellulaire	56

1.5.2. Matrice interstitielle	57
1.5.3. Membrane basale	61
1.5.4. Interaction de la MEC et les CMLV	63
1.5.5. Remodelage de la MEC	64
1.6. Les métalloprotéinases de la matrice	65
1.6.1. Collagénases.....	67
1.6.2. Gélatinases	69
1.6.3. Stromélysines, matrilysines et autres MMPs	71
1.6.4. Les MMPs de type membranaire	71
1.6.5. Activation des zymogènes des MMPs	72
1.6.6. Les inhibiteurs endogènes des MMPs.....	77
1.6.7. Les MMPs et le remodelage vasculaire	82
1.7. Les intégrines	84
1.8. But et objectifs de l'étude.....	95
2. Chapitre II, article 1	98
3. Chapitre III, article 2	129
4. Chapitre IV, discussion et conclusion.....	159
4. Discussion	160
4.1. Les récepteurs à l'Ang II et leur importance dans le remodelage.....	160
4.2. Régulation des composants de la MEC de la paroi vasculaire par les récepteurs à l'Ang II	164
4.3. Rôle des récepteurs à l'Ang II dans la régulation de l'activité des MMPs et leurs inhibiteurs endogènes.....	167
4.4. Implication des récepteurs à l'Ang II au niveau de l'expression des intégrines	169
4.5. Les effets du Sar-Ile	174
5. Limites de nos études.....	175
6. Conclusion	175
7. Perspectives.....	176

8. Importance de cette étude et considérations thérapeutiques	177
9. Bibliographie.....	179
Annexe A : Tableau 1: Tableau récapitulatif des différentes composantes de la matrice extracellulaire	217

Liste des tableaux

Chapitre I

Tableau 1 : Classification de la tension artérielle chez un adulte de plus de 18 ans.....	9
Tableau 2 : Antagonistes des récepteurs AT ₁ utilisés dans le traitement de l'HTA	41
Tableau 3 : Différents substrats des gélatinases A et B	68
Tableau 4 : Expression vasculaire des MMPs.....	74
Tableau 5 : Inhibiteurs tissulaires des métalloprotéinases (TIMPs)	76
Tableau 6 : Protéines d'adhésion et intégrines dans le muscle lisse vasculaire.....	86

Chapitre II

Tableau 1 : Physiological and vascular morphological parameters	111
Tableau 2 : Relative amounts of media ECM components in percent	112

Annexe A

Tableau 1 : Tableau récapitulatif des différentes composantes de la matrice extracellulaire.....	217
---	-----

Liste des figures

Chapitre I

Figure 1. Structure des artères.....	5
Figure 2. Facteurs importants impliqués dans le contrôle de la pression artérielle	7
Figure 3. Modifications de la lumière artériolaire par le remodelage.....	12
Figure 4. Modifications fonctionnelles et structurales des artères de compliance et des artères de résistance au cours de l'HTA.....	21
Figure 5. Voies de synthèse de l'Ang II.....	29
Figure 6. Schéma des principaux signaux de transduction du récepteur AT ₁	42
Figure 7. Structure et sous-groupes des MMPs	64
Figure 8. Mécanismes de régulation de l'activité des MMPs	79
Figure 9. Structure hétérodimérique des intégrines	83
Figure 10. Les différents hétérodimères d'intégrines et leurs substrats.....	84

Chapitre II

Figure 1. Mechanical properties of mesenteric resistance arteries. Lumen diameter (A), media thickness (B), and M/L ratio (C) at different intraluminal pressures and media stress-strain relationship (D). E, Incremental elastic modulus plotted against media stress.....	113
Figure 2. Vascular AT ₁ expression	114
Figure 3. Immunohistochemical staining of fibronectin in mesenteric arteries.....	115
Figure 4. MMP-2 activity in aorta	116
Figure 5. Immunohistochemical staining of TIMP-2 in mesenteric arteries	117
Figure 6. TIMP-2 binding in aorta by reverse gel zymography.....	118
Figure 7. Relative MMP-2 activity in aorta	119

Liste des figures (suite)

Chapitre III

Figure 1. Vascular immunohistochemical staining of α_1 integrin subunits.....	138
Figure I. Representative images of vascular immunohistochemical staining of α_1 integrin subunits.....	139
Figure 2. Vascular immunohistochemical staining of α_5 integrin subunits.....	140
Figure II. Representative images of vascular immunohistochemical staining of α_5 integrin subunits.....	141
Figure 3. Vascular immunohistochemical staining of α_8 integrin subunits.....	142
Figure III. Representative images of vascular immunohistochemical staining of α_8 integrin subunits.....	143
Figure 4. Vascular immunohistochemical staining of β_1 integrin subunits.....	144
Figure IV. Representative images of vascular immunohistochemical staining of β_1 integrin subunits.....	145
Figure 5. Vascular immunohistochemical staining of β_3 integrin subunits.....	146
Figure V. Representative images of vascular immunohistochemical staining of β_3 integrin subunits.....	147
Figure 6. Vascular immunohistochemical staining of osteopontin.....	148
Figure VI. Representative images of vascular immunohistochemical staining of osteopontin.....	149

Abréviation

α 1-PI	<i>α1 proteinase inhibitor</i>
α 2M	<i>α2-Macroglobuline</i>
ADAMs	<i>Adamalysin-related Metalloproteinases</i>
ADN	Acide Désoxyribonucléique
ADNc	Acide Désoxyribonucléique complémentaire
Ang I	Angiotensine I
Ang II	Angiotensine II
AP-1	<i>Activator Protein-1</i>
APA	Aminopeptidase A
APB	Aminopeptidase B
APM	Aminopeptidase M
APN	Aminopeptidase N
ARA	Antagonistes des Récepteurs AT ₁ de l'Ang II
ARNm	Acide Ribonucléique messenger
AT ₁	<i>Angiotensin II type 1 receptor</i>
AT ₂	<i>Angiotensin II type 2 receptor</i>
AT ₃	<i>Angiotensin III receptor</i>
AT ₄	<i>Angiotensin IV receptor</i>
AVC	Accident vasculaire cérébral
Bax	<i>Bcl-2-associated X protein</i>
Bcl-2	<i>B-cell lymphoma-2 protein</i>
bFGF	<i>basic Fibroblast Growth Factor</i>
BK	Bradykinine
Ca ²⁺	Ion calcium divalent
CAGE	<i>Chymostatin-sensitive Angiotensin-II Generating Enzyme</i>
CA-MMP	<i>Cysteine Array Matrix Metalloproteinase</i>
GMPc	Guanosine Monophosphate cyclique
CHO	<i>Chinese Hamster Ovary cells</i>
CMLV	Cellule Musculaire Lisse Vasculaire
CTGF	<i>Connective Tissue Growth Factor</i>
DAG	Diacylglycérol
DANCE	<i>Developmental Arteries and Neural Crest EGF-like</i>
DOCA	Acétate de Déoxycorticostérone
DRO	Dérivés Réactifs de l'Oxygène
ECA1	Enzyme de Conversion de l'Angiotensine 1
ECA2	Enzyme de Conversion de l'Angiotensine 2
ecNOS	<i>endothelial cell Nitric Oxide Synthase</i>
EDRF	<i>Endothelium-Derived Relaxing Factor</i>
EGF	<i>Epidermal Growth Factor</i>
EIII A	Segment EIII A de la fibronectine

Einc	Module élastique incrémentiel
ERK1/2	<i>Extracellular signal-Regulated Kinase 1/2</i>
ET-1	Endothéline-1
FACIT	<i>Fibril-Associated Collagen with Interrupted Triple helix</i>
FAK	<i>Focal Adhesion Kinase</i>
FGF	<i>Fibroblast Growth Factor</i>
GAG	Glycoaminoglycan
GPCR	<i>G protein-coupled receptors</i>
GPI	glycosyl-phosphatidyl inositol
GPI RECK	<i>Revision-inducing cysteine-rich protein with kazal motifs</i>
Grb2	<i>Growth factor receptor bound protein 2</i>
HCO ³⁻	Bicarbonate
HTA	Hypertension Artérielle
ICAM-1	<i>Intercellular Adhesion Molecule 1 (CD 54)</i>
IECA	Inhibiteur de l'Enzyme de Conversion de l'Angiotensine II
IGF-1	<i>Insulin-like Growth Factor I</i>
IL-1, -1 β , -2, -3, -6	Interleukine-1, -1 β , -2, -3, -6
IP ₃	Inositol 1,4,5-triphosphate
IRF	<i>Interferon Regulating Factor</i>
JAK	<i>Janus Kinase</i>
kDa	KiloDalton
LDL	Lipoprotéines de faible densité
LEI	Limitante Élastique Interne
LIM kinase	<i>Paxillin LIM domain-associated serine threonine kinase</i>
LOX-1	<i>Low density lipoprotein Oxidized receptor-1</i>
LDV	Séquence Leu-Asp-Val
MAPK	<i>Mitogen activated Protein Kinase</i>
MB	Membrane Basale
MCP-1	<i>Monocyte Chemotactic Protein-1</i>
MDCK	<i>Madin-Darby Canine Kidney cells</i>
MEC	Matrice Extracellulaire
Mg ²⁺	Ion magnésium divalent
MKP-1	<i>MAPK phosphatase-1</i>
MMP	Métalloprotéinases de la Matrice
Mn ²⁺	Ion manganèse divalent
MT-MMPs	MMP ancrée à la membrane
mmHg	Millimètres de mercure
Na ⁺	Ion sodium
NBC	<i>Sodium Bicarbonate Cotransporter</i>
NC1	Domaines C-terminal Non Collagèneux
NCX1	<i>Sodium Calcium Exchanger 1</i>
NGF	<i>Nerve Growth Factor</i>

NHE1	<i>Na⁺/H⁺ Exchanger 1</i>
NEP	<i>Neutral Endopeptidase</i>
NF- κ B	<i>Nuclear factor-kappa B</i>
NF-AT	<i>Nuclear Factor of Activated T cells</i>
NO	<i>Monoxyde d'azote</i>
p130 ^{Cas}	<i>Crk-associated substrate</i>
PA	<i>Pression artérielle</i>
PAF	<i>Platelet Activating Factor</i>
PCP	<i>Prolyl Carboxypeptidase</i>
PDGF	<i>Plasma Derived Growth Factor</i>
PEP	<i>Prolyl Endopeptidase</i>
PEX	<i>a C-terminal hemopexin-like domain</i>
PG	<i>Protéoglycan</i>
PGI ₂	<i>Prostacycline I₂</i>
PI3 Kinase	<i>Phosphatidylinositol 3-kinase</i>
PKC	<i>Protein kinase C</i>
PLA ₂	<i>Phospholipase A₂</i>
PLC	<i>Phospholipase C</i>
PP2A	<i>Sérine/thréonine phosphatase</i>
pro-HB-EGF	<i>Pro-Heparin-Binding EGF-like growth factor</i>
PTPases	<i>Phosphotyrosines phosphatases</i>
Raf	<i>MAPK kinase kinase (sérine/thréonine kinase)</i>
Ras	<i>small GTP-binding domain include</i>
RANTES	<i>Regulated upon Activation, Normal T-cell Expressed and Secreted</i>
RGD	<i>Séquence Arg-Gly-Asp</i>
Sar-Ile	<i>Sar¹, Ile⁸-Angiotensine II</i>
SHR-SP	<i>Spontaneously Hypertensive Rat-Stroke Prone</i>
SHR	<i>Spontaneously Hypertensive Rat</i>
siRNA	<i>Short intereference RNA (ARN interférant)</i>
SPARC	<i>Secreted Protein Acidic and Rich in Cysteine</i>
SRAA	<i>Système Rénine Angiotensine Aldostérone</i>
Src	<i>Sarcoma virus kinase</i>
STAT	<i>Signal Transducer and Activators of Transcription</i>
TGF- β	<i>Transforming Growth Factor-β</i>
TIMP	<i>Tissue Inhibitor of Metalloproteinase</i>
TNF- α et β	<i>Tumor Necrosis Factor-α and β</i>
tPA	<i>Tissue Plasminogen Activator</i>
uPA	<i>Urokinase Plasminogen Activator</i>
VCAM-1	<i>Vascular Cell Adhesion Molecule-1</i>
VEGF	<i>Vascular Endothelial Growth Factor</i>
WKY	<i>Wistar-Kyoto</i>
Zfh _{ep}	<i>Zinc Finger Homeodomain Enhancer-binding Protein</i>

Dédicace

Cette thèse est dédiée à mon père, Michel, décédé au début de ma première année universitaire, un homme exceptionnel pour tous ceux qui ont eu la chance de le croiser. À ma mère, Loretta, la femme la plus courageuse et la plus généreuse qui puisse exister. Elle m'a toujours poussé et motivé dans mes études. À ma grand-mère, Madeleine, qui a toujours cru en moi. À France, la femme de ma vie, pour son aide, son amour et sa grande compréhension. Cette thèse représente donc l'aboutissement du soutien et des encouragements que m'ont prodigué ces gens tout au long de ma scolarité. Qu'ils en soient remerciés par cette trop modeste dédicace.

Remerciements

J'exprime mes sincères remerciements à :

Mon directeur de recherche Dr Ernesto L. Schiffrin pour m'avoir accueilli dans son laboratoire, pour son support financier et la confiance qu'il m'a témoignée en me proposant ce sujet de recherche. J'aimerais également le remercier pour son aide, ses compétences scientifiques de hauts calibres et l'expertise de l'étude des microvaisseaux qu'il a développée. De plus, les conseils qu'il m'a apportés tout au long de mon doctorat, ont toujours été clairs et succincts, me facilitant grandement la tâche et me permettant de mener à bien la rédaction de cette thèse. Finalement, j'aimerais le remercier pour m'avoir permis de présenter mes résultats dans d'excellents congrès et journaux.

Dr Farhad Amiri pour ton aide capitale lors de la rédaction, de la correction des articles, tes conseils personnels et bien entendu pour ton expertise scientifique.

Dr Gaétan Thibault pour son soutien technique et ses conseils à tous les niveaux ainsi que son expertise scientifique de grande qualité tout au long de mon Ph.D..

André Turgeon, Suzanne Diebold et Marie-France Lavoie, pour votre soutien technique d'une très grande qualité, pour votre aide et votre soutien à tous les niveaux et surtout pour votre amitié.

Dr Fatiha Bouzegrane et Annie Vallée, pour votre expertise scientifique de grande qualité, pour vos précieux conseils et pour votre amitié.

Isabelle Blain, pour ton aide administrative essentielle et ta bonne humeur.

Dr Danesh Javeshghani, Dr Carmine Savoia, Dr Dierk H. Endemman, Dr Marc Iglarz, Dr Mario F Neves, Dr Agostino Viridis, Dr Mohammed ElMabrouk, Dr Nihar Pandey, Dr Talin Ebrahimian, Dr Carolina De Ciuceis, Dr Rhian M. Touyz, Qian Pu, pour votre aide technique, vos conseils, votre expertise et l'ambiance positive que vous avez su mettre dans le laboratoire.

Nicole Campeau, Claudia Jones et Martine Lauzier, pour votre aide et le service ultrarapide, la qualité et l'efficacité de votre travail, ainsi que pour votre amitié.

L'institut de recherches cliniques de Montréal pour le support financier de l'année 2002.

Alice Ndayegamiye, Sébastien Larose, Marie-Josée Lacombe, Véronique Philibert et Michèle Dargis, pour votre amitié, vos conseils personnels et scientifiques, votre aide et surtout vos encouragements.

Karim Benkirane, pour ta sincérité, ta générosité, ton intégrité, ta folle bonne humeur, tes multiples conseils, nos conversations enrichissantes, ton aide personnel et scientifique et tes nombreux encouragements.

Dominique Lauzier, André, Alexandra et François Côté, pour votre amitié et votre chaleureux accueil.

J'aimerais finalement remercier les membres de mon comité de thèse qui ont bien accepté de lire, corriger et donner leurs impressions sur la rédaction de cette thèse ainsi que sur mes travaux en général tout au long de mon Ph.D..

Ma gratitude s'adresse à mes proches, amis, consoeurs et confrères pour leur soutien matériel et moral. Comme je ne peux écrire tous les noms, puisque la liste serait trop longue, je m'excuse auprès des personnes que je n'ai pas citées. Vous avez tous, à quelque part, contribué de différentes façons à la rédaction de cette thèse puisque ce n'est pas le travail d'une seule personne, mais le travail de toute une équipe. Je vous en remercie sincèrement.

CHAPITRE I : Introduction et objectifs de la thèse

1. Introduction

L'hypertension artérielle (HTA) est une maladie chronique marquée par une élévation de la pression artérielle (PA) au-delà d'un certain seuil. Selon la définition de l'Organisation Mondiale de la Santé et celle de la Société Internationale d'Hypertension, un patient est hypertendu lorsque sa PA systolique est supérieure à 140 mmHg et/ou sa pression diastolique est supérieure à 90 mmHg [1]. La PA est affectée par deux composantes hémodynamiques importantes, soit le débit cardiaque et la résistance vasculaire périphérique. Dans l'HTA, ces paramètres semblent être augmentés. Toutefois, l'augmentation de la résistance périphérique persiste même après une baisse du débit cardiaque, ce qui confère à la résistance vasculaire périphérique un rôle déterminant dans le développement de l'HTA. En effet, la résistance d'un vaisseau à l'écoulement du sang est donnée par la loi de Poiseuille (Équation 1).

Équation 1 : Loi de Poiseuille : $R = \frac{8}{\pi} \times \frac{\eta \times l}{r_i^4}$ (R est la résistance, l est la longueur du vaisseau, η est la viscosité sanguine et r_i est le rayon interne du vaisseau).

Donc, une petite variation du rayon vasculaire entraînera une augmentation significative de la résistance vasculaire. En effet, dans l'HTA, parmi les anomalies vasculaires rencontrées, il y a une réduction significative du rayon des petits vaisseaux. La connaissance précise du calibre vasculaire permettra de mesurer la contribution du lit vasculaire dans la diminution de la PA précapillaire. Les artères de conductance (dont le diamètre est supérieur à 300 μm tel que l'aorte et autres vaisseaux aussi bien que leurs branches incluant les artères musculaires de calibre moyen) ou les petites artères (dont le diamètre est compris entre 150 et 300 μm) contribuent à une baisse de la PA au long de l'arbre vasculaire et par conséquent à une augmentation de la résistance vasculaire de 10% ou 40%, respectivement [2].

L'augmentation de la PA engendre un remodelage de la structure vasculaire, caractérisé par un changement des constituants et du calibre de la paroi vasculaire ainsi que par une altération fonctionnelle des cellules constituant cette paroi, telles que les cellules endothéliales et musculaires lisses. Subséquemment, ces altérations contribuent au déséquilibre de la résultante des stimuli vasoconstricteurs/vasodilatateurs et à l'élévation du tonus vasculaire, ce qui entraîne une élévation persistante de résistance périphérique. Cependant, un traitement avec des antihypertenseurs, tels que les inhibiteurs de l'enzyme de conversion de l'Ang II (IECA), les antagonistes des récepteurs AT_1 de l'Ang II (ARA) et les bloqueurs des canaux calciques de type L, baissent la PA et régressent le remodelage vasculaire [3-5]. Le système rénine-angiotensine aldostérone (SRAA) joue un rôle important dans la régulation de la PA. Les perturbations du SRAA contribuent à la physiopathologie de l'HTA.

1.1. La paroi artérielle

1.1.1. Morphologie

Les artères peuvent être grossièrement subdivisées en deux groupes, selon leurs structures : élastiques et musculaires. Les artères élastiques ont relativement un grand diamètre et sont retrouvées en périphérie du cœur. Ce type d'artères est appelé élastique puisqu'elles contiennent de petites cellules musculaires lisses vasculaires (CMLV). Les artères musculaires, par contre, contiennent une grande quantité de cellules musculaires et, en général, elles sont localisées en périphérie. Au niveau microscopique, la paroi artérielle est constituée de trois couches qui se nomment (de l'intérieur vers l'extérieur) : tunica intima, tunica media et tunica adventitia (Figure 1). Les propriétés de chaque couche sont discutées brièvement [6].

1.1.1.1. Intima

La couche la plus interne consiste en fait en une mono-couche de cellules endothéliales séparées de la couche sous-endothéliale par une fine membrane basale. C'est l'interface entre le sang et la paroi du vaisseau. L'intima est très mince et elle ne contribue pas de manière significative aux propriétés mécaniques de la paroi artérielle. Cependant, elle joue un rôle important dans les pathologies telles l'athérosclérose et la resténose, puisque l'épaississement de cette couche pourrait mener à l'occlusion de la lumière [6].

1.1.1.2. Média

La couche au centre de la paroi consiste en un réseau de fibres d'élastine, de collagène et de CMLV. La média est séparée en plusieurs couches par des lames élastiques fenestrées, créant une couche fibreuse concentrique dans le but de renforcer la paroi. Le nombre de lamelles présentes, diminue en direction de la périphérie et sont absentes chez les petites artères. Les lamelles sont interconnectées par de fibrilles élastiques desquelles donnent de la force et de l'élasticité à la média. Les CMLV sont présentes dans ce réseau et elles sont interconnectées avec les fibres d'élastine et de collagène [6].

1.1.1.3. Adventice

La couche la plus externe compose uniquement une petite partie de la paroi artérielle et consiste principalement en une épaisse collection de fibres de collagène, principalement sécrétées par les fibroblastes adventitiels. L'adventice contribue à la résistance du vaisseau et limite sa déformation à de hautes pressions intraluminales [6].

1.1.1.4. Vasa-vasorum

Les vasa vasorum forment un réseau microvasculaire dans la courche adventitielle des artères de grand calibre, et aussi au niveau des coronaires. Ces petits vaisseaux ne

franchissent la frontière externe de la média (lame limitante élastique externe) que dans l'aorte thoracique. La média (comme l'intima) de toutes les autres artères est normalement avasculaire: la nutrition du seul tiers externe y dépend des vasa vasorum, alors que celle des deux tiers internes dépend de ce qui diffuse depuis la lumière artérielle au travers de l'intima. Il existe une corrélation entre l'étendue de la néovascularisation par les vasa vasorum et la sévérité de l'athérosclérose dans les coronaires humaines. De plus, l'induction d'une hypercholestérolémie chez le porc résulte en une augmentation de la néovascularisation des vasa vasorum des coronaires. Une étude utilisant un scanner microscopique révèle que les microvaisseaux de 2^e ordre sont plus nombreux et désorganisés. Il a été démontré que cette néovascularisation peut jouer un rôle dans le remodelage athéromateux [7]. L'hypertension artérielle expérimentale conduit également à un accroissement de la néovascularisation adventitielle et il a été démontré que ce processus implique la voie HIF-1 α /VEGF [8].

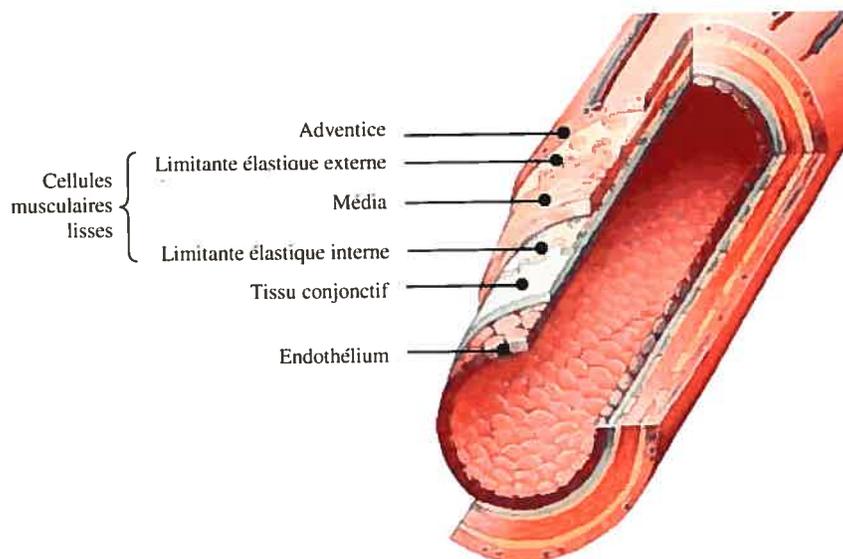


Figure 1. Structure des artères.

1.2. Tension artérielle

La tension artérielle communément appelée pression artérielle (PA) est la pression qui règne à l'intérieur des artères. Elle est exercée par le sang sur la paroi des artères et elle est exprimée en millimètres de mercure (mmHg). Le niveau de la PA est contrôlé, entre autres, par le système nerveux central et il est adapté en permanence à la situation momentanée au moyen de messages transmis par les voies nerveuses. La PA varie chez l'adulte, elle dépend de divers facteurs et surtout de la force de projection du sang dans les vaisseaux sanguins, par le cœur, et du diamètre des vaisseaux; ceux-ci opposant une résistance, par « frottement », à la circulation du sang.

La PA n'est pas uniforme, elle est donc plus forte dans de gros vaisseaux (tronc, tête, bras et jambes) et moins importante dans les vaisseaux sanguins ayant une section plus petite (vaisseaux capillaires). La pression est plus élevée dans les artères que dans les veines. On distingue 2 phases : la première phase correspond à la contraction du cœur (pression systolique ou maximale), lorsque le cœur se contracte la pression augmente brusquement dans les artères, c'est le chiffre le plus élevé et il correspond à la pression systolique. Il est normalement inférieur à 140 mmHg. La deuxième phase coïncide avec la phase de repos du cœur, durant cette phase, il reste toujours dans les vaisseaux une pression résiduelle (pression diastolique minimale). Cette pression correspond au chiffre le plus bas et il correspond à la pression diastolique. Il est en général compris entre 50 et 90 mmHg. Ainsi chez un sujet jeune et en santé, on trouvera une PA systolique de 120 mmHg et une pression diastolique de 80 mmHg. Plusieurs autres facteurs au niveau cardiovasculaire sont également impliqués dans le contrôle de la pression artérielle. Je vous suggère de consulter la Figure 2 afin de connaître ces facteurs et constater à quels niveaux ils peuvent agir.

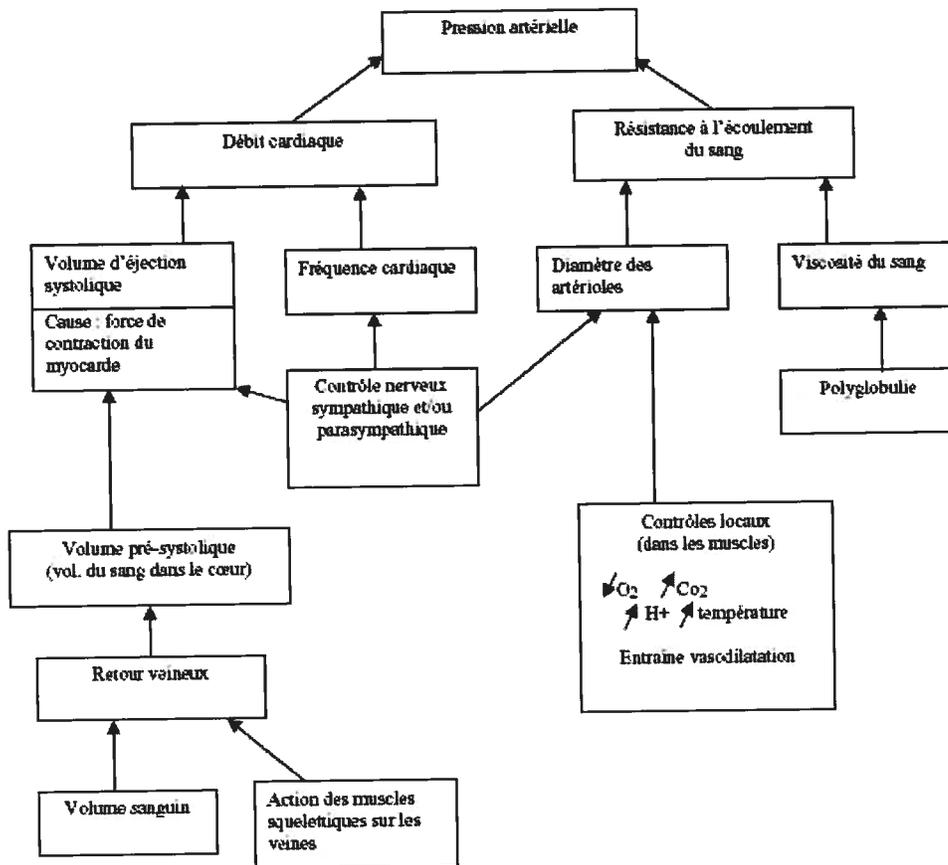


Figure 2. Facteurs importants impliqués dans le contrôle de la pression artérielle.

1.2.1. Hypertension artérielle

L'HTA essentielle constitue un risque sérieux pour la santé, en raison des complications graves qu'elle entraîne, telles que l'insuffisance cardiaque congestive, la maladie coronarienne, l'insuffisance rénale et les accidents vasculaires cérébraux (AVC) [9;10]. Un dépistage précoce auprès de la population, l'adhésion à un régime de vie plus sain et le recours à la pharmacothérapie sont autant de mesures efficaces pour lutter contre cette maladie. Par contre, les succès obtenus jusqu'ici sont minces par rapport aux défis qui restent à relever. L'HTA toucherait aujourd'hui près d'un milliard de personnes, ce qui en fait une des principales causes de mortalité dans le monde, et aucun traitement curatif n'a

encore été mis au point [9]. Confronté à traiter de façon permanente les personnes qui souffrent d'HTA, le clinicien a la tâche difficile de choisir le meilleur traitement possible. Ce choix dépend de nombreux facteurs, liés notamment aux caractéristiques du malade et à celles des médicaments disponibles sur le marché. Depuis les 10 dernières années, la pharmacopée antihypertensive s'est complexifiée et de nouvelles classes pharmacologiques ont fait leur apparition. Durant la même période, la population du Québec n'a cessé de prendre de l'âge, le taux de vieillissement étant un des plus élevés du monde [11]. À ces considérations démographiques s'ajoutent d'autres problèmes de santé, comme le diabète de type 2 et l'obésité, dont les répercussions sur la santé cardiovasculaire des populations des pays industrialisés se font de plus en plus sentir. Le choix d'un traitement antihypertenseur est donc devenu un véritable défi. Chez le patient, il faut, d'une part, abaisser efficacement la tension artérielle et, d'autre part, améliorer les autres facteurs de risque ou de comorbidité en présence.

Après avoir étudié les valeurs de la tension artérielle dans la population en général, Pickering a remarqué que leur distribution était virtuellement normale (ou gaussienne) et ce, en incluant les valeurs mesurées chez les hypertendus [12]. Les sujets hypertendus ne se démarquent donc pas de façon franche du reste de la population, sinon qu'ils se retrouvent graduellement et constamment, à une extrémité de la courbe de distribution. Par conséquent, il serait difficile de définir avec précision une valeur de PA au-delà de laquelle on dit qu'une personne devient hypertendue. Les différents organismes et sociétés s'intéressant au problème de l'HTA proposent néanmoins aux cliniciens une définition diagnostique. Généralement, on dit qu'une personne souffre d'hypertension lorsque la mesure de sa PA au repos montre des valeurs supérieures ou égales à 90 mmHg, pour la tension diastolique ou à 140 mmHg, pour la pression systolique et ce, à différentes reprises durant une période d'au moins six mois [9;13-15]. Cette définition se base sur les résultats d'études longitudinales démontrant, d'une part, une incidence accrue de complications cardiovasculaires dans les populations où la PA moyenne s'élève au-delà de l'une ou

l'autre de ces deux valeurs et, d'autre part, une diminution d'un tel risque lorsque la tension est abaissée au-dessous de ces mêmes chiffres.

Les catégories de PA chez l'adulte, publiées à la suite du dernier consensus du « *National Heart, Lung, and Blood Institute* » américain, le 7^e rapport du « *Joint National Committee 2003 (JNC-7)* » [9](Tableau I). Cette classification se base sur la moyenne de deux ou de trois lectures de la tension artérielle, prise en position assise, lors d'au moins deux visites médicales distinctes.

Catégorie	Valeurs de pression artérielle (mmHg)		
	Systolique		Diastolique
Normale	< 120	et	< 80
Pré-hypertension	120-139	ou	80-89
Hypertension de stade 1	140-159	ou	90-99
Hypertension de stade 2	> 160	ou	> 100

Tableau 1. Classification de la tension artérielle chez un adulte de plus de 18 ans [9]

1.2.1.1. Incidence de l'hypertension

Dans les pays occidentaux, la prévalence de l'HTA se situe autour de 20%, et elle est inextricablement liée à l'âge [9;10;16]. Au Canada et au Québec, les statistiques montrent en effet qu'une majorité de gens âgés de plus de 70 ans présentent une pression systolique supérieure à 140 mmHg ou une pression diastolique supérieure à 90 mmHg [16]. Si l'HTA touche autant les hommes que les femmes entre l'âge de 55 et 64 ans, sa prévalence s'accroît de manière inégale entre les deux sexes après cette période. En effet, après l'âge de 75 ans, environ 75% des femmes souffrent d'HTA contre 66% d'hommes. En Amérique du Nord, l'hypertension systolique élevée touche environ 8% des personnes dans l'ensemble de la population. Chez les hypertendus âgés de plus de 60 ans, près des deux tiers sont atteints de cette forme d'HTA [9;16].

1.3. Remodelage vasculaire

Dans l'HTA, les changements structuraux affectant la paroi vasculaire décrivent des états intermédiaires entre deux types de remodelage extrême tels que le remodelage hypertrophique ou hypotrophique, interne ou externe (en fonction de la réduction ou de l'augmentation de la lumière vasculaire et de la surface de la média) (Figure 2) [17]. Seules les formes principales de remodelage rencontrées dans les modèles d'HTA expérimentale et humaine seront présentées dans cette thèse.

Le remodelage vasculaire a été initialement proposé par Baumbach et Heistad [18] pour expliquer comment la lumière des artéριοles cérébrales pouvait être réduite, sans augmentation de la surface de section de la paroi. L'originalité de cette approche a été de dissocier, dans les modifications de la géométrie artériolaire, deux processus souvent associés : d'une part, un processus hypertrophique (augmentation de la quantité de matériau, donc de la surface sectionnelle) et, d'autre part, un processus de réarrangement du matériau en quantité inchangée autour d'un plus petit diamètre interne, donc sans modification de la surface de section pariétale (Figure 2). Ces anomalies de la géométrie artériolaire, observées dans des SHR (« *spontaneously hypertensive rats* ») particulièrement vulnérables AVC et aux accidents vasculaires cérébraux (SHR-SP : « *SHR-stroke prone* »), se caractérisaient par une diminution des diamètres internes et externes des artéριοles, et une augmentation de l'épaisseur et de la surface de section de la paroi [18]. Un calcul permettait d'estimer que l'hypertrophie pariétale (augmentation de la surface de section) ne contribuait que pour le quart à la réduction de la lumière, et qu'il fallait donc faire intervenir la réduction du diamètre externe pour expliquer la majeure partie de la réduction du diamètre interne. Les altérations observées au niveau des vaisseaux, décrites comme étant un épaississement de la paroi vasculaire, représentent une forme d'adaptation hypertrophique en réponse à l'élévation de la PA et à d'autres facteurs liés directement ou indirectement à cette élévation de pression. Cette première forme d'adaptation vasculaire, appelée remodelage hypertrophique, est caractérisée par une diminution de la lumière

vasculaire et une augmentation du rapport média : lumière vasculaire ainsi que de la surface de section de la média [17]. Ce remodelage est observé dans des modèles d'HTA maligne où le système de l'endothéline-1 (ET-1) semble être impliqué [19]. Les mécanismes responsables de ces remaniements de la paroi vasculaire sont attribuables à la croissance des CMLV. Celles-ci subissent une hypertrophie et/ou une hyperplasie, ainsi qu'une augmentation de l'accumulation de MEC.

La deuxième forme de remodelage observé dans le cas d'une augmentation de la PA où le SRAA est impliqué, est appelée remodelage vasculaire eutrophique. Celui-ci est caractérisé par une réduction du diamètre de la lumière vasculaire accompagnée d'une augmentation du rapport média/lumière vasculaire, et ceci, sans affecter la surface de section de la média, ce qui signifie qu'il n'y a pas de croissance nette [3;17]. Un des mécanismes impliqués dans le remodelage eutrophique, est la mort cellulaire programmée ou apoptose. C'est un mécanisme compensateur et modulateur suite à une augmentation de la croissance des CMLV. Le remodelage eutrophique pourrait également résulter d'un réarrangement des CMLV autour d'une plus petite lumière vasculaire. Un changement de la composition de la MEC pourrait être impliqué dans ce remodelage vasculaire, que ce soit au niveau des glycoaminoglycans ou du matériel fibrillaire tels que le collagène, l'élastine, la fibronectine ou d'autres constituants de la MEC. Les molécules d'adhésion des CMLV telles les intégrines, agissant comme des récepteurs du collagène, de la fibronectine et de la laminine, pourraient aussi être altérées, ce qui entraînerait différents réarrangements des composantes de la paroi vasculaire et, par conséquent, le remodelage vasculaire observé dans l'HTA. Baumbach et Heistad [18] suggéraient qu'une réorganisation des matériaux de la paroi autour d'une lumière réduite pourrait représenter, au cours de l'HTA, un mécanisme important de l'augmentation des résistances périphériques, en plus de l'hypertrophie pariétale. Ils suggéraient ainsi deux mécanismes de réduction de la lumière artériolaire : un premier mécanisme largement décrit, l'hypertrophie, caractérisée par une augmentation de la surface de section pariétale et du diamètre externe ; et un second,

nouveau, le « remodelage », caractérisé par une surface de section pariétale inchangée et une diminution du diamètre externe (Figure 2). Ces modifications initialement décrites sous le terme général de « remodelage », correspondent en fait au remodelage « eutrophique interne » détaillé plus loin (Figure 2). Les conditions et les mécanismes moléculaires qui engendrent ces deux types de changements dans la structure des vaisseaux associés aux différents remodelages précipités, ne sont pas bien élucidés. Des études *in vivo* et *in vitro* s'imposent donc pour connaître les modifications ultrastructurales et mécanistiques des CMLV afin de modifier les stratégies thérapeutiques contre des nouvelles cibles pharmacologiques ou géniques des CMLV.

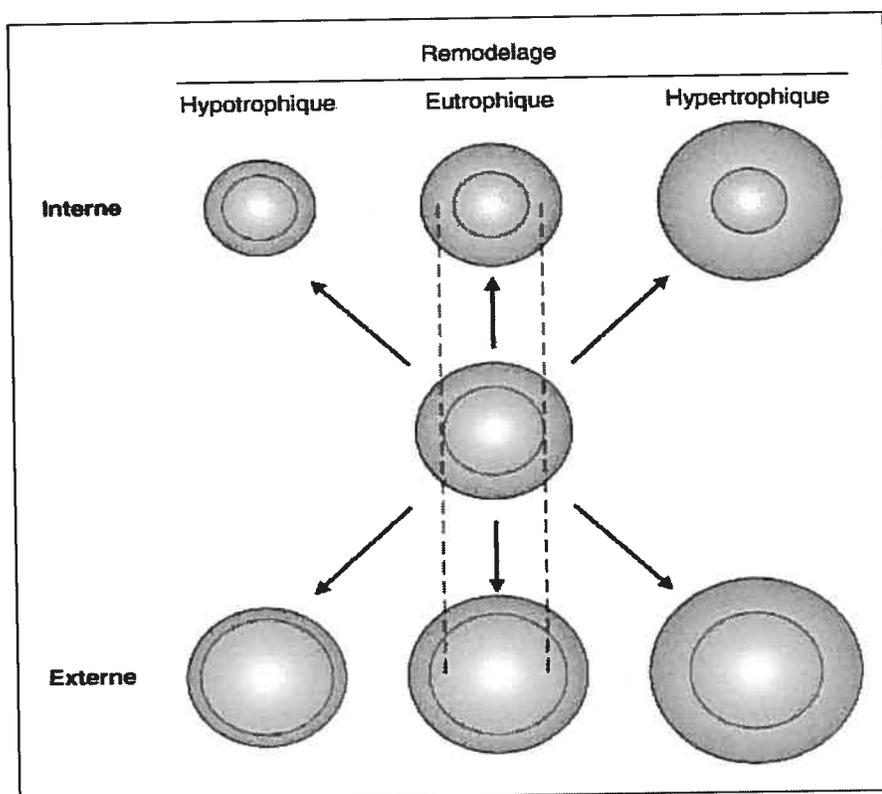


Figure 3. Modifications de la lumière artériolaire par le remodelage.

Le terme de « remodelage », initialement utilisé pour décrire des modifications géométriques et structurales des artérioles cérébrales du rat SHR, a été ensuite étendu par

Mulvany et Heagerty [20;21] aux artérioles périphériques humaines, pour désigner toute augmentation du rapport épaisseur : rayon des artérioles survenant en l'absence d'augmentation de la surface de section pariétale. Pour différencier le remodelage de la vasoconstriction, il était nécessaire d'observer ces modifications en l'absence de tonus musculaire lisse.

Le concept de remodelage a bénéficié d'une large diffusion pour plusieurs raisons [18]. Il était implicite à l'hypothèse physiopathologique de l'HTA énoncée par Folkow [22], selon laquelle une augmentation de l'épaisseur de la paroi vasculaire peut entraîner une diminution de la lumière artériolaire et donc une augmentation des résistances périphériques, même en l'absence de vasoconstriction. Mulvany et Heagerty [20;21] suggéraient que la seule diminution du diamètre externe, sans augmentation de la masse pariétale, pourrait réduire la lumière artériolaire et expliquer l'augmentation des résistances vasculaires observée au cours de l'HTA. Ainsi, le remodelage, comme l'hypertrophie, ne nécessitait pas de faire intervenir une anomalie du couplage excitation-contraction de la CMLV, pour expliquer l'augmentation des résistances artériolaires. Cela était en accord avec les résultats de la majorité des études *in vitro*, qui ne retrouvaient pas d'augmentation de la réactivité artériolaire chez l'hypertendu [17;20-22]. Ce réarrangement des matériaux de la paroi autour d'une lumière réduite modifiant les contraintes pariétales auxquelles ces matériaux sont soumis, permettait d'expliquer des observations apparemment paradoxales, comme l'augmentation de la distensibilité des artérioles cérébrales chez le SHR-SP malgré l'augmentation de la masse pariétale [18;20]. Enfin, ce concept introduisait la notion que l'HTA s'accompagne, non seulement, de modifications quantitatives des matériaux de la paroi artérielle (augmentation des protéines de la MEC), mais aussi de modifications qualitatives (nouvelle organisation spatiale des CMLV et de la MEC). Une récente modification a été proposée par les principaux groupes de recherche sur le remodelage artériolaire [17], pour tenir compte des diverses possibilités physiopathologiques et pharmacologiques des modifications structurales. L'utilisation du terme de « remodelage »

devrait ainsi être restreinte aux situations au cours desquelles la lumière artériolaire est modifiée, dans des conditions de complète relaxation, et indépendamment d'éventuelles modifications des propriétés élastiques du matériau constituant la paroi [21]. Une classification en six sections est proposée : selon que la lumière est réduite ou augmentée et que la section pariétale est augmentée, inchangée ou réduite, [20;23-27] (Figure 2). Au cours du remodelage « eutrophique » [20;23;26;28], le rapport média : lumière est modifié sans changement de la quantité ou des caractéristiques du matériau pariétal, tandis que la quantité de matériau est augmentée au cours du remodelage « hypertrophique » [26]. Lorsque la lumière est réduite, il s'agit de remodelage « interne » (*inward remodeling*) et lorsque la lumière est augmentée, il s'agit de remodelage « externe » (*outward remodeling*) [20]. La quantification des modifications de la lumière vasculaire peut être établie selon un « index de remodelage », définissant le pourcentage de modification lié au remodelage eutrophique, et selon un « indice de croissance » (*growth index*), définissant le pourcentage de modification lié à l'augmentation de la section pariétale. Parallèlement, le terme de « remodelage » vasculaire a été utilisé pour désigner tout phénomène survenant au niveau de la paroi artérielle qui implique au moins quatre processus cellulaires (croissance, apoptose et migration cellulaire, production ou dégradation de la MEC) dépendants d'interactions dynamiques entre les facteurs de croissance produits localement [17]. Ce type de remodelage peut ainsi s'observer sur tous les sites vasculaires, qu'il s'agisse d'artérioles ou de gros troncs artériels, non seulement au cours de l'HTA, mais aussi de l'insuffisance cardiaque, de l'athérosclérose, et de la resténose après angioplastie.

1.3.1. Modifications de la structure et de la géométrie des artères au cours de l'HTA

1.3.1.1. Modifications ultrastructurales

La média des artères élastiques contient plusieurs lames élastiques circulaires. Entre chacune d'elles se trouvent des cellules musculaires lisses, des fibres de collagène, des

microfibrilles d'élastine et les glycosaminoglycans de la substance fondamentale. L'ensemble constitue ce que Wolinski et Glagov dénomment des « unités lamellaires », définition qui fut complétée par celle de « feuillet musculoélastique » [29]. Chaque feuillet est constitué d'un groupe de cellules enveloppées dans un tapis de fibres élastiques très serrées, orientées suivant le grand axe des CMLV. À l'intérieur de ce réseau élastique dense se trouve une matrice interstitielle composée de fibrilles de collagène de type III et IV et une lame basale composée de collagène de type IV, orientée dans le sens circonférentiel qui recouvre les cellules et en assure la cohésion.

Au cours du développement, chez l'animal et chez l'homme, le nombre de CMLV augmente rapidement dans la média, parallèlement à l'augmentation de la PA. Chez les adultes de nombreuses espèces, le nombre d'unités lamellaires, l'épaisseur de la média et le rapport collagène : élastine sont caractéristiques de la taille de l'animal et du diamètre de l'artère [29]. La contrainte circonférentielle, calculée selon l'équation de Lamé (Équation 2) pour chaque unité lamellaire, est relativement constante d'une artère à l'autre et d'une espèce à l'autre [29].

Équation 2 : Équation de Lamé : $\theta\sigma = P \times \frac{R}{h}$ ($\theta\sigma$ = contrainte circonférentielle, P = pression, R = rayon et h = épaisseur) équation dérivée de la loi de Laplace (Équation 3).

Équation 3 : Loi de Laplace : $T = P \times R$ (T = tension, P = pression et R = rayon).

L'HTA entraîne une augmentation de l'épaisseur de la média qui permet de normaliser la contrainte circonférentielle malgré l'augmentation de la pression intraluminale. Au cours de l'HTA, le nombre d'unités lamellaires reste relativement constant et l'augmentation de l'épaisseur pariétale est obtenue grâce aux modifications des CMLV et de la MEC. Chez l'hypertendu comme chez le normotendu, le nombre d'unités lamellaires décroît graduellement vers la périphérie du système artériel, mais l'espace entre les deux lames

reste relativement constant (10-15 μm quand le vaisseau est dans un état relâché), quelles que soient l'artère et l'espèce. Au cours de l'HTA permanente, certains territoires artériels sont l'objet d'un remodelage « eutrophique interne » et d'autres d'une hypertrophie. Dans ce dernier cas, l'augmentation de la masse vasculaire peut concerner les artères de toute taille, des gros troncs artériels aux artérioles et faire intervenir des modifications cellulaires et de la MEC. Il s'agit, soit d'une augmentation de la taille cellulaire (hypertrophie), soit d'une augmentation du nombre de cellules (hyperplasie) [30]. Dans des modèles d'HTA expérimentale, où le développement de l'HTA est progressif (HTA de type rénovasculaire ou de type DOCA-sel (« *deoxycorticosterone acetate* »), l'hypertrophie ou polyploïdie prédomine au niveau des artères de gros calibre, et l'hyperplasie au niveau des artérioles [31]. L'HTA expérimentale entraîne une augmentation du collagène, de l'élastine et des protéoglycans [29-31] par stimulation de leur production par les CMLV. Les contenus en élastine et en collagène sont en général augmentés, probablement en raison de l'hypertrophie de la paroi artérielle qui s'associe, pour le collagène, à une activité de synthèse accrue [32]. Fait remarquable, les densités en élastine et en collagène, qui conditionnent les propriétés élastiques du tissu artériel ne sont pas modifiées, et en général, le rapport collagène : élastine reste le plus souvent inchangé [33].

La MEC ne doit pas être considérée du seul point de vue de ses propriétés quantitatives élastiques, mais aussi en tenant compte de deux autres de ses propriétés. Souvent, les modifications quantitatives (contenu, densité) de ses composants (collagène, élastine, etc.) ne permettent pas d'expliquer les conséquences des modifications structurales sur les propriétés élastiques, en réponse à une intervention pharmacologique ou pour une situation physiopathologique particulière. Il est donc nécessaire de faire intervenir, d'une part, les modifications d'organisation spatiale de chacun de ces composants et d'autre part, des changements au niveau d'autres protéines constitutives de la MEC, comme la fibronectine ou la laminine. En effet, la fibronectine peut non seulement lier les CMLV aux protéines de la MEC, mais aussi contrôler le phénotype des CMLV et moduler ainsi leur action

mitogène [34]. Des variations quantitatives de la fibronectine pourraient ainsi modifier la transmission des contraintes au sein de la paroi artérielle, et donc ses propriétés élastiques. De ce point de vue, la fibronectine pourrait représenter un facteur de remodelage au sens strict, pouvant redistribuer les constituants de la paroi autour d'une lumière réduite.

1.3.1.2. Modifications géométriques

Quel que soit le territoire artériel, l'HTA se caractérise par une augmentation de l'épaisseur intima-média. Il est important de préciser s'il s'agit d'un remodelage « eutrophique interne » ou d'une hypertrophie, car cela conditionne les modifications des propriétés fonctionnelles. Par ailleurs, ces propriétés dépendent du calibre de l'artère : fonction de conduction du sang et d'amortissement de la pulsativité artérielle pour les artères de gros calibre ; fonction de distribution du débit sanguin et de résistance à l'écoulement pour les artéριοles. L'influence du vieillissement est telle que l'âge est une variable incontournable lors de la comparaison de l'hypertendu au normotendu.

1.3.1.2.1. Artères de gros et moyen calibre

Les artères de gros calibre, à prédominance élastique et de siège proximal par rapport au cœur, comme l'aorte thoracique ou abdominale, la carotide commune, subissent, avec le développement de l'HTA expérimentale, un élargissement progressif de leur diamètre interne et un épaississement de leur paroi. L'hypertrophie pariétale est, en grande partie, un mécanisme adaptatif à l'augmentation de la contrainte circonférentielle et, à un moindre degré, influencée par les modifications neurohumorales et génétique. L'élargissement du diamètre est lié aux dommages du tissu de soutien, en particulier aux fractures des lames élastiques qui distendent [35], et à l'élastolyse, liée à la diminution de la synthèse de l'élastine ou à l'augmentation de sa dégradation enzymatique. Ces fractures sont essentiellement d'origine mécanique. Selon les lois de la mécanique physique, la « fatigue » des biomatériaux est proportionnelle au nombre de contraintes cycliques, la plus importante étant la pression pulsée (PA systolique - PA diastolique) [36]. Ces notions

confèrent à l'âge et à l'HTA des rôles essentiels, conditionnant pour le premier le nombre de cycles, et pour le second, l'amplitude des contraintes lors de chaque cycle. Par ailleurs, les artères de gros calibre et de structure élastique comme la carotide s'élargissent plus rapidement avec le vieillissement et l'HTA que les artères de moyen calibre, plus musculaires, comme l'artère radiale [37].

Chez l'homme, le développement des méthodologies non invasives de mesure du diamètre d'une artère et de son épaisseur intima-média a permis de définir les caractéristiques géométriques des artères de gros et moyen calibre dans les conditions physiologiques de flux, d'innervation, et de tonus musculaire lisse. En effet, de nombreuses descriptions de la géométrie des gros troncs artériels chez l'animal et chez l'homme ont été effectuées à partir de prélèvements artériels et de constatations lors d'autopsies, dans des conditions où la pression de distension artérielle, lors de la fixation, n'était pas normalisée et où le tonus musculaire lisse artériel était supprimé.

Il est possible d'utiliser des appareils échographiques utilisant l'analyse du signal radiofréquence pour mesurer les distances entre les interfaces acoustiques « sang-intima » et « média-adventice » [37-39]. Cette approche non-invasive, permet de calculer le diamètre interne et l'épaisseur intima-média d'artères superficielles ou profondes, avec une précision de quelques micromètres et une reproductibilité compatible avec des études physiopathologiques et pharmacologiques. Ainsi au même âge, le diamètre interne de l'artère carotide commune et celui de l'aorte thoracique et abdominale sont plus grands chez l'hypertendu essentiel et permanent chez le sujet normotendu; le diamètre d'artères plus musculaires distales, comme les artères fémorales communes, humérales et radiales, reste inchangé [37;39;40]. Quel que soit le territoire artériel, l'épaisseur intima-média est accrue chez l'hypertendu, comparée à celle du normotendu de même âge. L'augmentation de l'épaisseur pariétale compense l'augmentation de la pression et permet de normaliser la contrainte circonférentielle (Équation 2) [37;40], qui est un facteur d'hypertrophie. S'il

fallait nommer ces modifications géométriques selon la terminologie utilisée pour les artérioles par Mulvany et coll. [17], on parlerait de remodelage « hypertrophique externe » pour les artères proximales et d'hypertrophie sans remodelage pour les artères distales.

1.3.1.2.2. Artères de résistance

Mulvany et Aalkjaer [17] ont défini la notion « d'artère de résistance » à partir d'un diamètre artériel interne inférieur à 500 μm (petites artères). Mais il semble que des artérioles de plus petit calibre (inférieur à 100 μm) représentent la majeure partie de la résistance au débit sanguin. Un diamètre interne inférieur à 150 μm (artérioles) constituerait ainsi pour Heagerty [20] une limite plus appropriée. D'après la loi de Poiseuille (Équation 1), les deux types d'artères (petites artères et artérioles) contribuent de façon majeure à la résistance à l'écoulement sanguin. Les profils de pression varient largement d'un lit vasculaire à l'autre, et il est difficile de caractériser une artère comme étant une artère de résistance ou de conduction sur la simple valeur de son diamètre interne, dans cet intervalle de 150 à 500 μm , sans tenir compte du lit vasculaire d'origine. Nous considérons que les petites artères de résistance sont des vaisseaux ayant un diamètre de lumière situé entre 100 et 300 μm [22;41;42] qui sont les plus importants sites de résistance au débit sanguin [43].

Les conditions méthodologiques ont une grande importance lorsqu'il s'agit de comparer la géométrie artériolaire chez les animaux normotendus et hypertendus, et les modèles utilisés conditionnent l'interprétation des résultats. Le modèle d'HTA essentielle humaine (c'est-à-dire dont la cause n'est pas retrouvée, et qui représente plus de 95% des hypertensions artérielles) est certainement l'hypertension génétique, qu'il s'agisse de SHR ou de SHR-SP, correspondant respectivement à l'HTA légère et à l'HTA sévère compliquée. Chez le SHR-SP, le remodelage « eutrophique interne » est prédominant au niveau des artérioles cérébrales, avec peu d'hypertrophie [18;44] (Figure 2). La comparaison des divers modèles d'HTA permet de conclure que l'hyperplasie prédomine lorsque la masse vasculaire est augmentée, tandis qu'aucune forme particulière d'hypertrophie ou d'hyperplasie n'est

observée lors du remodelage [17;30]. Chez l'homme, les modifications géométriques des artérioles du tissu sous-cutané sont de type remodelage « eutrophique interne », car la lumière artérielle est réduite sans augmentation de la section pariétale. L'étude ultrastructurale montre qu'il n'y a ni hypertrophie ni hyperplasie cellulaire [17;27;45]. En résumé, à la différence des gros troncs artériels où le remodelage « interne » n'est jamais observé, les artérioles comportent, selon les modèles d'HTA et les territoires des parts variables de remodelage « eutrophique interne » et d'hypertrophie.

1.3.1.2.3. Définitions de paramètres physiologiques utilisés pour caractériser le remodelage des artérioles de résistance.

La tension circonférentielle (ϵ) se calcule comme suit : $\epsilon=(D-D_0)/D_0$ où D représente le diamètre de la lumière à un niveau de pression donné et D_0 représente le diamètre de la lumière original, mesuré à 3 mmHg.

De façon générale, le stress correspond à une force divisée par une surface au carré et son unité est le $N.m^{-2}$. Le stress radial est un stress qui s'applique parallèlement à la paroi des vaisseaux. De plus, la pression s'exerçant longitudinalement sur les cellules endothéliales tapissant la paroi des vaisseaux est la pression sanguine. Dans notre cas, le stress circonférentiel (σ) se calcule comme suit : $\sigma = [(PD)/(2M)]$ où P représente la pression intraluminale (dyn/cm^2), D représente le diamètre de la lumière à un niveau de pression donné et M est l'épaisseur de la média.

Le module élastique, s'appelle également le module de Young, provenant du nom du physicien anglais Thomas Young. De manière générale, ce physicien avait remarqué que le rapport entre la contrainte de traction appliquée à un matériau et la déformation qui en résulte (un allongement relatif) est constant, tant que cette déformation reste petite et que la limite d'élasticité du matériau n'est pas atteinte. Cette constante est appelée le module d'Young ou module d'élasticité longitudinal. La loi d'élasticité provient en fait de la loi de

Hooke : $\sigma = E\varepsilon$ où σ est la contrainte, E est le module de Young et ε est la déformation. Le module d'Young est la contrainte mécanique qui engendrerait un allongement de 100 % de la longueur initiale d'un matériau (il doublerait donc cette longueur), si on pouvait l'appliquer réellement : dans les faits, le matériau se déforme de façon permanente, ou se rompt, bien avant que cette valeur soit atteinte. Puisque nous n'utilisons pas de matériau unique, mais plutôt un tissu biologique qui est constitué de différents matériaux, nous utilisons l'équation du module élastique de Young pour les tissus biologiques, soit : $\sigma = \sigma_0 e^{\beta\varepsilon}$ où σ (la contrainte) représente le stress circonférentiel, σ_0 représente le stress circonférentiel au diamètre original D_0 , e est le module de Young. En fait, le module élastique incrémentiel représente la pente de l'équation non-linéaire de la relation stress-déformabilité et nous donne une mesure de la rigidité du vaisseau. L'équation exponentielle a été différenciée et β représente une constante reliée au degré d'augmentation de la courbe stress-déformabilité du vaisseau et ε représente la tension circonférentielle. La relation du module élastique incrémentiel avec le stress de la média nous donne des informations sur la constitution de la paroi vasculaire et cette relation est indépendante de la géométrie du vaisseau et est un excellent indice de la rigidité vasculaire.

Il est important de mentionner qu' Il existe une relation linéaire entre le stress et le module de Young (E), plus E (module de Young) est élevé, plus la contrainte doit être élevée pour créer une déformation donnée. Du fait de la relation linéaire existant dans les corps élastiques, la déformation est immédiatement obtenue quand on applique un stress.

L'indice de croissance représente le ratio de croissance cellulaire entre les groupes, comparés au groupe contrôle. Ce module a été calculé comme suit : $[(SS_h/AV_h) - (SS_n/AV_n)]/(SS_n/AV_n)$ où SS_h et AV_h représentent respectivement la surface de section des groupes traités et l'aire du vaisseau du même groupe et SS_n et AV_n représentent respectivement la surface de section du groupe contrôle et l'aire du vaisseau du groupe contrôle.

1.3.2. Conséquences fonctionnelles du remodelage artériel au cours de l'HTA

Il est important de dissocier les artères de gros et moyen calibre des artérioles, car leurs fonctions sont très différentes : conduction et amortissement de la pulsativité pour les premières, distribution et résistance à l'écoulement pour les dernières.

1.3.2.1. Au niveau des artères de gros et moyen calibre

Au cours de l'HTA essentielle, les deux conséquences fonctionnelles majeures du remodelage artériel, à pression de distension identique, sont : à court et moyen termes, la préservation des propriétés élastiques de la paroi artérielle et, à long terme, la potentialisation de l'athérosclérose.

1.3.2.1.1. Préservation des propriétés élastiques de la paroi artérielle

Les propriétés élastiques des gros troncs artériels jouent un rôle fondamental et leur altération conditionne l'atteinte des organes cibles : cœur, artères de conduction, cerveau et rein. Au cours de l'HTA, l'augmentation de la rigidité des gros troncs artériels contribue à l'augmentation de la pression pulsée. Cette hyperpulsabilité est, indépendamment de la PA moyenne, un facteur de développement de l'hypertrophie ventriculaire gauche et l'hypertrophie artériolaire (artères de gros calibre et artérioles). L'hypertrophie ventriculaire gauche est un facteur de risque de morbidité et de mortalité cardiovasculaire indépendant du niveau de la PA. L'hypertrophie artériolaire est un facteur « structural » d'augmentation des résistances périphériques, et donc de la PA moyenne (Figure 3).

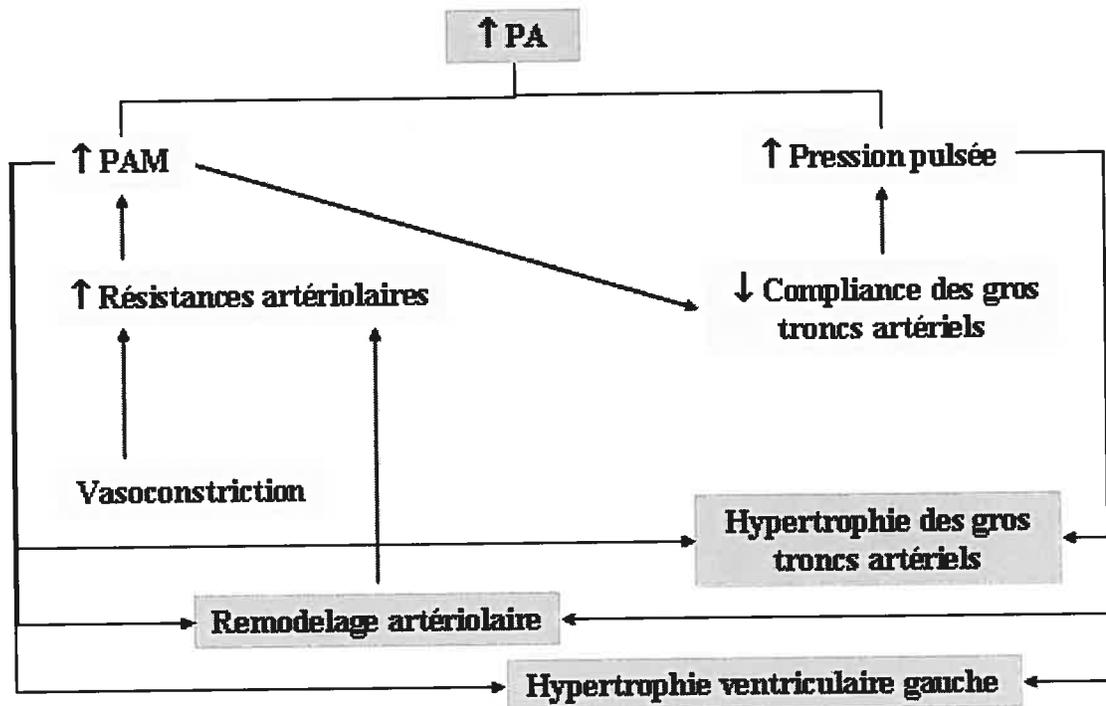


Figure 4. Modifications fonctionnelles et structurales des artères de compliance et des artères de résistance au cours de l'HTA. PA : pression artérielle; PAM : pression artérielle moyenne.

Quel est le mécanisme de l'augmentation de rigidité des gros troncs artériels au cours de l'HTA? Consiste-t-il en une augmentation de la pression de distension ou en des anomalies structurales de la paroi, ou encore des deux? En effet, l'augmentation de la pression de distension augmente la rigidité artérielle (ou diminue la distensibilité), en raison du recrutement successif, avec l'étirement, des fibres de collagène, peu distensibles [32;46;47]. Par ailleurs, il est couramment admis qu'à pression de distension égale, l'augmentation de l'épaisseur pariétale est un facteur supplémentaire de rigidité artérielle. En effet, selon les lois de la physique mécanique, la rigidité d'une artère est proportionnelle à l'épaisseur de sa paroi et à la rigidité du matériau « homogène équivalent » qui la compose. Utiliser le terme de matériau « homogène équivalent » permet de tenir compte à la fois de la complexité architecturale de la paroi artérielle et de la variété des matériaux qui la composent. Comme

nous l'avions déjà vu, le rapport collagène : élastine (élément peu distensible/élément distensible) n'est pas diminué au cours de l'HTA, et la densité en collagène n'est que peu ou pas augmentée. En effet, le module élastique du matériau de la paroi artérielle est indépendant de la géométrie artérielle et n'est conditionné que par la densité en protéine fibreuse et non par son contenu. Il n'y a donc pas d'arguments histologiques, en terme de densité d'élastine et de collagène, en faveur d'une rigidité accrue du matériau « homogène équivalent » : seule l'augmentation de l'épaisseur intima-média pourrait rendre l'artère plus rigide. Cependant, l'équivalence « hypertrophie-rigidité » n'a jamais été montrée dans les conditions physiopathologiques de flux (contraintes de cisaillement) et d'innervation (tonus musculaire lisse vasculaire) et en s'affranchissant de l'augmentation de la pression de distension (c'est-à-dire pour une contrainte circonférentielle égale).

Nous savons que l'épaississement intima-média de la paroi des gros troncs artériels, tel qu'il est observé au cours de l'HTA essentielle, n'est pas un facteur de rigidité artérielle. C'est l'augmentation de la pression de distension de l'artère qui augmente sa rigidité (ou diminue sa distensibilité), en raison du recrutement successif, avec l'étirement, des fibres de collagène, peu distensibles. On suppose donc que surviennent, au cours de « l'hypertrophie artérielle associée à l'HTA », des modifications qualitatives des composants pariétaux et/ou des modifications architecturales. Celles-ci redistribuent ces composants dans une configuration permettant de conserver inchangées les propriétés élastiques du matériau global (la paroi), au même niveau de contrainte circonférentielle. Pour le démontrer, il a été nécessaire de calculer le module élastique de la paroi artérielle (ou module de Young, ou module incrémentiel : E_{inc}), qui prend en compte l'épaisseur intima-média. Celui-ci renseigne sur les propriétés élastiques du matériau constituant la paroi, la distensibilité et la compliance renseignant sur les propriétés de l'artère en tant qu'organe creux [37;47]. Ces résultats ont été retrouvés : [18] chez l'homme, au niveau des deux sites artériels : une artère élastique proximale siège de lésions d'athérosclérose, l'artère carotide commune [37] et une artère distale musculaire dépourvue de lésions

d'athérosclérose, l'artère radiale [21;37;39]; chez le SHR, au niveau de la carotide et de l'aorte [46;47]. Les effets de l'hypertrophie artérielle, associée à l'HTA, sur les propriétés élastiques des gros troncs artériels s'opposent donc à ceux du vieillissement, connus pour augmenter la rigidité artérielle [47]. Cela montre bien que le matériau « homogène équivalent » constituant la paroi de l'artère de l'hypertendu est non seulement plus abondant, mais aussi plus « élastique ».

Ces résultats ont permis de formuler l'hypothèse d'une autorégulation de la compliance artérielle au cours de l'HTA essentielle, grâce aux modifications structurales de matériau constituant la paroi artérielle [47]. Ainsi, chez l'hypertendu, au niveau des artères proximales élastiques de gros calibre comme la carotide, la compliance est diminuée proportionnellement à l'augmentation de la pression de distension. Cette diminution de compliance proximale contribue pour une large part à la réduction de la compliance systémique. Au niveau des artères distales musculaires comme l'artère radiale, l'absence de diminution de la compliance permet de diminuer le gradient de compliance entre artères proximales et distales (par exemple, entre les artères carotides et radiales) et d'atténuer ainsi les ondes de réflexion, facteur d'augmentation de la pression pulsée (Figure 3). Par ailleurs, malgré leur faible niveau de compliance, les artères distales peuvent contribuer de façon modeste, mais significative à la compliance systémique, car elles sont plus nombreuses et plus longues que les artères proximales. On conçoit ainsi que l'absence de diminution de la compliance des artères distales permet d'atténuer celle de la compliance systémique.

Cependant, en cas d'anomalie des systèmes neurohumoraux, comme l'activation du SRAA dans l'HTA réno-vasculaire, l'association à l'élévation de la PA peut entraîner à long terme le développement d'anomalies intrinsèques de la paroi artérielle responsables d'une rigidité accrue, pour une pression de distension égale. De la même façon que l'hypertrophie de la paroi artérielle est un facteur de développement de l'athérosclérose, l'augmentation de la

tension pariétale pourrait rendre la paroi plus vulnérable à certains stimuli neurohumoraux et potentialiser les altérations structurales et fonctionnelles. Ainsi, la distensibilité artérielle est réduite chez l'hypertendu porteur de l'allèle C du gène codant pour le récepteur AT₁ de l'Ang II, par rapport à son contrôle hypertendu porteur du génotype AA, de même PA et de même âge, une telle différence n'étant pas retrouvée en l'absence d'HTA [48].

1.3.2.1.2. Remodelage artériel et dysfonctionnement endothélial

Le dysfonctionnement endothélial affecte la fonction de conduction des gros troncs artériels en diminuant ou supprimant leurs possibilités de vasodilatation. Les conséquences en sont majeures au niveau de certaines circulations, comme la circulation coronaire. Les relations entre le remodelage artériel et le dysfonctionnement endothélial sont difficiles à déterminer, et peuvent être envisagées en termes de cause et de conséquence, étant donné les nombreux processus cellulaires impliqués.

1.3.2.2. Au niveau des artérioles

L'augmentation du rapport média : lumière a plusieurs conséquences fonctionnelles, les trois premières étant délétères tandis que la quatrième est plutôt compensatrice :

1.3.2.2.1. Augmentation structurale des résistances vasculaires périphériques

Celles-ci s'élèvent de façon inversement proportionnelle à la puissance quatrième du rayon interne des artérioles. Or, le rayon interne diminue en cas de remodelage « interne ». Par ailleurs, à l'intérêt du traitement antihypertenseur, l'augmentation à nouveau de la PA est fonction du degré de correction du rapport média : lumière. Sa normalisation s'accompagne d'une lente remontée tensionnelle, une remontée rapide étant observée quand le rapport n'a pas été corrigé [49].

1.3.2.2.2. Hyperréactivité artérielle aux stimuli

La vasoconstriction observée en réponse aux agents vasopresseurs est potentialisée par la concentration de la masse musculaire lisse autour d'une plus petite surface luminale, comme au cours du remodelage « interne », qu'il soit « eutrophique » ou « hypertrophique » (Figure 2). La force maximale développée par les artéριοles d'hypertendus essentiels en réponse à la noradrénaline est supérieure à celle développée par les artéριοles des sujets normotendus [17;50], la sensibilité à la noradrénaline n'étant pas modifiée et la sensibilité au Ca^{2+} étant, au contraire, diminuée. Une exagération de la force maximale développée a aussi été retrouvée en réponse à l'Ang II, à la vasopressine et à la sérotonine [17;50]. Fait intéressant, rapportée à l'unité de volume pariétal, la force maximale développée par l'artère de l'hypertendu n'est pas augmentée par rapport à celle du sujet normotendu, confirmant le caractère « structural » de l'hyperréactivité artérielle de l'hypertendu, et excluant une exagération du couplage excitation-contraction au niveau de la CMLV qui pourrait, au contraire, être diminué.

1.3.2.2.3. Diminution de la réserve de perfusion des organes cibles

En effet, les résistances vasculaires minimales, calculées dans des conditions de vasodilatation maximales ischémiques, chez les sujets hypertendus restent élevées par rapport à celles des sujets normotendus [17].

1.3.2.2.4. Modification de l'autorégulation des débits régionaux

La réduction de la lumière artériolaire dans des conditions de vasodilatation maximale augmente les résistances vasculaires minimales et déplace vers la droite la courbe d'autorégulation du débit local. Cela permet à cette circulation locale de s'autorégler pour des niveaux de pression systémique plus élevés, et de protéger ses microvaisseaux en aval de la surcharge de pression qu'il y a en amont.

Au niveau cérébral, une des conséquences inattendues du remodelage « eutrophique interne » des artérioles des SHR-SP est l'augmentation de la distensibilité artérielle [18], dont les conséquences sont mal connues; il est difficile de savoir si elles sont favorables ou non. Cette augmentation de distensibilité pourrait conduire à diminuer la pulsativité de la pression, facteur d'hypertrophie et de fibrose à ce niveau, mais elle ne semble pas conditionner la mortalité des SHR-SP [51].

Ces dernières années, le remodelage artériel vasculaire a émergé comme un concept clé de la physiopathologie de l'HTA, source de multiples applications pharmacologiques. La meilleure connaissance des processus cellulaires impliqués a modifié l'approche thérapeutique en offrant de nouvelles cibles pharmacologiques: récepteurs spécifiques des ligands endogènes au niveau des CMLV, mais également au niveau des cellules endothéliales; facteurs prolifératifs des CMLV, récepteurs et enzymes de la MEC.

Un des buts du traitement antihypertenseur est de corriger le remodelage vasculaire, entendu ici au sens large, pour en prévenir les conséquences non-favorables. Théoriquement, la correction du remodelage devrait ralentir le développement de l'athérosclérose au niveau des gros troncs artériels, indépendamment des effets propres des substances pharmacologiques sur les mécanismes cellulaires de l'athérosclérose, tout en préservant les propriétés élastiques de la paroi artérielle. Elle devrait aussi diminuer « structurellement » les résistances périphériques, diminuer l'hyperréactivité des artérioles aux stimulus, et augmenter la réserve de perfusion des organes cibles.

1.4. Système rénine angiotensine aldostérone

Il existe deux types de production de l'Ang II : une production systémique par le système rénine-angiotensine aldostérone (SRAA) « rénal » et une production locale par le SRAA tissulaire. L'enzyme de conversion de l'Ang I (ECA) clive la portion carboxyterminale de Ang I aboutissant à la formation d'un peptide actif, l'Ang II, qui agit par l'intermédiaire de

ses deux récepteurs, soit AT₁ et AT₂ (Figure 4). Outre la conversion de l'Ang I en Ang II, l'ECA dégrade la bradykinine (BK) et d'autres peptides. Ainsi l'activité de l'ECA aboutit à une augmentation du taux d'Ang II et à une diminution du taux de BK. Cette dernière est générée par l'action des kallikréines sur leur substrat, le kininogène, et agit par l'intermédiaire d'au moins deux sous-types de récepteurs, soit B₁ et B₂. L'activation du récepteur B₂ module de nombreuses fonctions biologiques [52]. La BK exerce ses effets sur l'endothélium en activant la conversion de l'acide arachidonique en prostacycline ainsi qu'en stimulant le relargage de l'*endothelium-derived relaxing factor* (EDRF) ou du monoxyde d'azote (NO).

L'ECA est caractérisée par une distribution ubiquitaire et est retrouvée dans de nombreux tissus ainsi que dans les parois vasculaires. L'ECA est présente d'une façon prédominante sur les cellules endothéliales vasculaires limitant tous les tissus vasculaires et elle est exprimée de façon variable le long de l'arbre vasculaire. Des taux élevés de cette enzyme sont retrouvés dans la microcirculation précapillaire coronaire, alors que ses concentrations décroissent dans les capillaires et le système veineux [53]. L'ECA a été détectée entre autres dans le coeur, la médullo- et la corticosurrénale, les reins et les testicules. L'ECA tissulaire est actuellement reconnue comme un acteur clé dans les maladies cardiovasculaires et rénales. La dysfonction endothéliale, qui résulte de lésions variées telles que l'HTA, le diabète et l'hypercholestérolémie, modifie la balance entre vasodilatation et vasoconstriction, la croissance des CMLV, l'état inflammatoire et oxydatif de la paroi vasculaire. Cette dysfonction endothéliale est associée à l'activation de l'ECA tissulaire [54]. Cette rupture d'équilibre résultant de l'augmentation de la formation locale d'Ang II et de l'augmentation de la dégradation de la BK favorise le développement des maladies cardiovasculaires. Les mécanismes moléculaires impliqués dans les interactions de l'Ang II avec l'endothélium ainsi que les facteurs sécrétés par les CMLV jouent un rôle déterminant dans le remodelage de la structure vasculaire au cours de l'hypertension et des lésions vasculaires. Selon les conditions locales et l'expression de l'un ou de l'autre des

sous-types de récepteurs de l'Ang II (AT₁ et AT₂), la réponse vasculaire peut-être soit une stimulation de l'hypertrophie/hyperplasie vasculaire ou à l'opposé, une inhibition de la croissance cellulaire. Des études expérimentales et cliniques utilisant des médicaments qui interfèrent avec le SRAA, tels que les IECA et les ARA, montrent que l'Ang II jouerait un rôle dans le développement de la dysfonction endothéliale, de l'hypertrophie de la média vasculaire et du ventricule gauche, du remodelage après infarctus du myocarde et de l'athérosclérose.

En 1989, l'existence de plus d'un récepteur à l'Ang II a été démontré pour la première fois [55]. Par la suite, deux ans plus tard, la nomenclature des récepteurs à l'Ang II a été établie que AT₁ était le récepteur qui était inhibé par le losartan et que AT₂ était le récepteur inhibé par le PD123177 [56]. Jusqu'à maintenant, quatre types de récepteur à l'Ang sont connus (AT₁, AT₂, AT₃ et AT₄). Un récepteur AT₃, également appelé « non-AT₁-non-AT₂ » découvert dans des cellules de neuroblastome [57], mais son existence est encore controversé. Le récepteur AT₄ a été démontré dans le cerveau humain [57] et dans les reins [58], mais pas dans les tissus au niveau cardiovasculaire, contrairement aux cellules endothéliales bovines [59]. De plus, le récepteur AT₄ semble être spécifique à l'Ang IV (c'est-à-dire l'Ang (3-8)) plutôt que l'Ang II.

Plusieurs études ont démontré que l'Ang II, en agissant sur ses récepteurs AT₁ et AT₂, fonctionne non seulement comme un vasoconstricteur, mais aussi comme un facteur de croissance cellulaire, voir même un facteur inflammatoire. Le SRAA régule la PA et l'homéostasie au niveau volume/électrolyte [60]. Le premier précurseur de l'Ang II biologiquement active est l'angiotensinogène d'origine hépatique, qui est clivé par une aspartyl protéase, la rénine, afin de former un décapeptide inactif l'Ang I. L'Ang I est par la suite processée principalement par la métallopeptidase ACE ce qui donne naissance à l'octapeptide Ang II. La rénine circulante provient majoritairement de l'appareil juxtaglomérulaire des reins. La conversion de l'angiotensine I en Ang II peut se produire

partiellement au niveau des poumons où il y a un niveau très élevé d'ECA endothéliale ou au niveau tissulaire par l'action de l'ECA vasculaire [61]. La formation de l'Ang II peut aussi faire suite à l'action successive de la rénine rénale suite à son adsorption dans la paroi vasculaire où elle peut agir sur l'angiotensinogène, produite en grande partie au niveau de l'adventice. Or, il y a peu de données montrant la production de l'Ang II par d'autres enzymes au niveau des parois vasculaires (Figure 4). Toutefois, des études *in vitro* sur des CMLV en culture ont révélé que la chaîne enzymatique angiotensinogène-cathepsine-D-ECA est fonctionnelle et produit de l'Ang II tissulaire de façon para, auto ou intracrine [62].

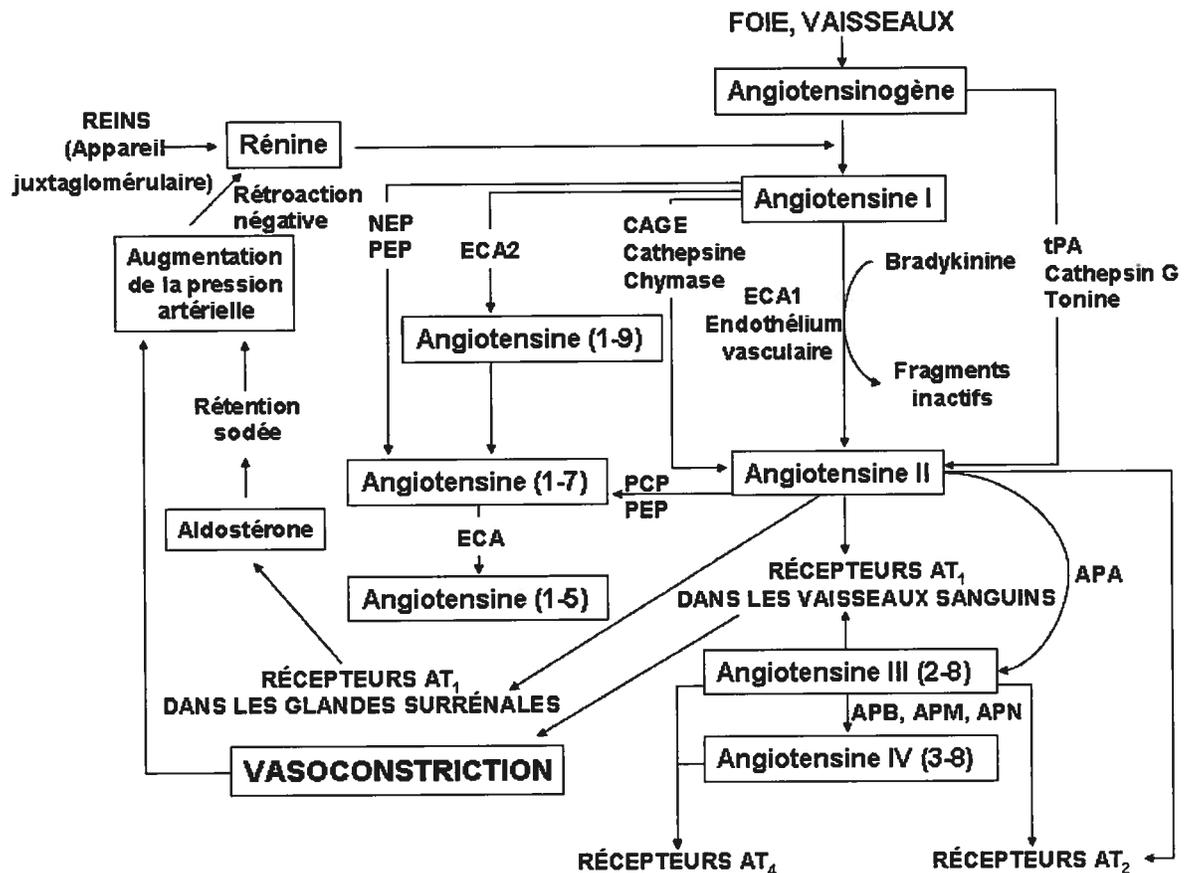


Figure 5. Voies de synthèse de l'Ang II.

Plusieurs études ont rapporté l'existence du SRAA au niveau vasculaire. L'angiotensinogène, le précurseur de l'Ang I, est produit par les cellules endothéliales, les CMLV et les cellules adipeuses péri-vasculaires [63]. De plus, il a été démontré que l'Ang II était également produite par l'action d'autres enzymes telles que la chymase, retrouvée au niveau des CMLV, des mastocytes et des cellules myocardiques [64]. Des études récentes ont démontré l'implication de la chymase dans la génération de l'Ang II et le développement de l'HTA. En effet, des souris transgéniques surexprimant la chymase vasculaire du rat au niveau des CMLV développent l'HTA associée à une hypertrophie vasculaire [65]. De plus, l'expression de cette enzyme semble être augmentée chez les SHR comparativement aux rats Wistar Kyoto (WKY) [64].

L'Ang II peut subir un catabolisme par des peptidases générant ainsi de nouveaux peptides vasoactifs tels que l'heptapeptide, Ang III et l'hexapeptide, Ang IV par l'action des aminopeptidases et peut aussi être dégradée en heptapeptide, Ang-(1-7) par la prolyl endopeptidase (PEP) et la prolyl carboxypeptidase (PCP) (Figure 4). Ce mécanisme diminuerait non seulement le taux plasmatique ou tissulaire de l'Ang II et ses effets, mais favoriserait l'augmentation de peptides reconnus pour contrer les effets de l'Ang II, tels que l'Ang-(1-7) et l'Ang IV [66]. Il est important de mentionner que le protooncogène MAS est aussi un récepteur pour l'Ang-(1-7). De plus, il devient plus évident aujourd'hui qu'il existe un mécanisme de contre-régulation du SRAA et l'Ang-(1-7) ainsi que le récepteur MAS semblent jouer un rôle important à ce niveau [67]. Cependant, l'importance de ces peptides demeure incertaine.

L'Ang III est également nommé comme [des-Asp¹]-Ang II et a un effet sur la PA dix fois moins puissante que l'Ang II malgré le fait que son activité stéroïdogénique est équivalente à celle de l'Ang II [68]. L'Ang III est dégradée par l'aminopeptidase N en Ang IV, également connu sous le nom d'Ang (3-8). L'Ang IV est également biologiquement active et aurait ses effets via le récepteur AT₄ exclusivement [69].

Originellement, le SRAA a été considéré comme étant un système exclusivement endocrinien, dans lequel l'Ang II circulant, fonctionnait comme une hormone effectrice [70]. Cependant, il a été démontré que le SRAA réside au niveau de plusieurs organes et cellules, comme le cœur, les reins, les poumons, le cerveau, les myocytes cardiaques, les fibroblastes, les cellules endothéliales et les CMLV, où il est connu pour agir comme facteur paracrine/autocrine [71]. Malgré cela, toutes les enzymes et les substrats du SRAA et les récepteurs à l'Ang II sont exprimés dans le myocarde [71].

Plusieurs études ont démontré le rôle important que joue l'Ang II dans le développement de l'HTA. En effet, l'Ang II est impliquée dans l'hyperréactivité vasculaire dans des modèles expérimentaux d'HTA et elle est directement associée à l'élévation de la PA chez les patients ayant une forte activité de la rénine plasmatique. Toutefois, depuis longtemps l'Ang II a été impliquée dans l'HTA humaine avec un taux de la rénine normal ou à la baisse, ce qui a été démontré par la diminution de la PA avec les IECA et les ARA. La production locale de l'Ang II, due à la présence du SRAA au sein de la paroi vasculaire, joue un rôle très important dans la régulation de l'homéostasie vasculaire et dans le contrôle de la croissance des CMLV, indépendamment de l'Ang II circulante. Ceci contribuerait au développement de la pathologie vasculaire associée à l'HTA indépendamment du niveau de la rénine plasmatique. En fait, les composants de ce système peuvent être produits en forte concentration par les CMLV chez les SHR [62]. Le traitement des SHR durant le développement ou après l'établissement de l'HTA avec les IECA ou des ARA, normalise non seulement la PA, mais régresse également le remodelage vasculaire [72;73].

1.4.1. Modèle d'HTA induite par l'Ang II

L'augmentation de la production de l'Ang II entraîne une élévation de la PA impliquant plusieurs mécanismes tels qu'une action directe vasoconstrictrice et trophique au niveau des CMLV entraînant une rétention sodique rénale et une augmentation de la production de

l'aldostérone au niveau surrénalien ainsi qu'une activation du système nerveux central et périphérique. L'infusion de l'Ang II à des rats conduit au développement de l'HTA qui est considérée comme un modèle d'hypertension rénovasculaire humaine où la concentration de la rénine est très élevée. Dans ce modèle expérimental d'HTA, une hypertrophie cardiaque et vasculaire ainsi que des lésions rénales ont été rapportées [74-76]. Ces études ont démontré que ces phénomènes sont seulement partiellement dépendants de l'effet vasoconstricteur de l'Ang II. Une hypersensibilité des artères de rats perfusés avec de l'Ang II ou d'autres agents vasoconstricteurs tels que la vasopressine et la noradrénaline a également été observée [74].

Ce modèle ainsi que plusieurs autres sont caractérisés par une hypertrophie cardiaque et des altérations de la fonction endothéliale et rénale, mais seulement certains modèles développent des lésions tissulaires très sévères telles que l'insuffisance cardiaque, rénale ainsi que des AVC. En effet, des différences dans l'étiologie de l'HTA des patients Caucasiens de celles des Afro-Américains sont observables; d'où la nécessité de créer des modèles animaux d'HTA qui ressemblent le plus aux différentes formes d'HTA chez l'homme. Les études *in vivo* sur ces modèles expérimentaux permettent de comprendre les mécanismes du remodelage vasculaire et sa régression par des antihypertenseurs. Par ailleurs, les études *in vitro* sur des cellules en culture permettent de mettre en évidence certains mécanismes moléculaires impliqués dans ce remodelage et l'identification de certaines voies de transmission des signaux intracellulaires des agents vasoconstricteurs endogènes impliqués dans l'HTA tel que l'Ang II.

1.4.2. Modèles d'HTA d'animaux transgéniques et d'invalidation alléliques des gènes du SRAA

Les facteurs génétiques jouent un rôle très important dans le développement de l'HTA. Bien que les études génétiques réalisées chez l'homme et l'animal permettent d'étudier le rôle de certains gènes (ou leurs mutations) dans l'HTA, des études biochimiques et

physiologiques s'avèrent être nécessaires pour caractériser les fonctions biochimiques et physiologiques. Ceci est rendu possible grâce à la création de souris ou de rats transgéniques pour un ou plusieurs gènes qui peuvent être exprimés ubiquitairement dans tout le corps ou dans un organe spécifique (le cœur, les reins ou les vaisseaux). Le SRAA correspond à un système candidat impliqué dans l'HTA. Des modèles de souris et de rats exprimant les gènes humains de la rénine et de l'angiotensinogène ont été largement étudiés. Les rats ou les souris exprimant l'un des deux gènes humains sont normotendus parce que la rénine humaine est hautement spécifique pour l'angiotensinogène humain. D'où la nécessité de créer des souris ou des rats doublement transgéniques portant à la fois les gènes de la rénine et de l'angiotensinogène. Ces animaux développent rapidement (à la sixième semaine) de l'HTA maligne avec des altérations cardiaques et rénales [77] ainsi qu'une dysfonction vasodilatatrice endothéliale [78].

Une autre approche utilisée pour étudier les gènes cibles impliqués dans l'HTA est l'invalidation allélique « knock out » de ces gènes. Les invalidations des gènes de l'angiotensinogène, de la rénine, de l'ECA ainsi que des récepteurs AT₁ et AT₂ ont été réalisées afin de déterminer le rôle de ces derniers dans le contrôle normal de la PA. Les PA des souris angiotensinogène *-/-*, rénine *-/-* ou ACE *-/-* sont réduits d'environ 25 à 50% par rapport aux souris sauvages *+/+* ou hétérozygotes *+/-*. Ces souris possèdent des malformations rénales et un taux de mortalité très élevé [79-81]. Donc, les outils de la biologie moléculaire ont permis à la communauté scientifique de mieux comprendre le rôle de certains acteurs majeurs du SRAA.

1.4.3. Les récepteurs de l'Ang II

Les effets majeurs de l'Ang II sont médiés par deux sous-types de récepteurs couplés aux protéines G, le récepteur AT₁ et le récepteur AT₂ qui sont des glycoprotéines à sept domaines transmembranaires avec seulement 32 à 34% d'homologie de séquence en acides aminés. Les récepteurs AT₁ sont inhibés sélectivement par les médicaments de la classe des

« sartans », alors que les récepteurs AT₂ sont inhibés par le PD 123177 et le PD 123319, et les composés similaires à l'Ang II comme le [Sar¹Ile⁸]-Ang II (antagoniste non spécifique des récepteurs AT₁ et AT₂). Durant les cinq dernières années, notre connaissance de la structure, de la fonction et de la localisation des récepteurs de l'Ang II a été enrichie par l'application des méthodes de biologie moléculaire. La détermination de la structure génique chez le rongeur, des récepteurs AT_{1A}, AT_{1B}, et AT₂, leur localisation et régulation, ainsi que la création de souris invalidées pour le gène de l'angiotensine ont permis une meilleure compréhension du rôle physiologique de chacun des sous-types des récepteurs de l'Ang II. Deux des quatre types de récepteurs à l'Ang II connus, les récepteurs AT₁ et AT₂, ont été clonés et caractérisés comme étant des récepteurs membranaires glycosylés, couplés aux protéines G (GPCR) hétérotrimériques, consistant en sept domaines transmembranaires. La majorité des actions classiques de l'Ang II (vasoconstriction, stimulation de la sécrétion d'aldostérone, stimulation du système sympathique, migration, croissance, apoptose et différenciation cellulaire) sont médiées par les récepteurs AT₁. L'avancée majeure dans la compréhension du SRAA a été amorcée par le développement des ARA actifs *per os*.

1.4.3.1. Les récepteurs AT₁

Le récepteur AT₁ est impliqué dans les actions physiologiques classiques de l'Ang II, soit la régulation de la PA, la balance entre l'eau et les électrolytes, la soif, les sécrétions hormonales et la fonction rénale. Le récepteur AT₁ appartient à la superfamille des récepteurs couplés aux protéines G (GPCR) qui, typiquement, activent la phospholipase C (PLC) (par l'intermédiaire de l'hétérotrimère de la protéine G_q) et possède peu d'activité tyrosine kinase intrinsèque. Le clonage du récepteur AT₁ en 1991 [82;83] a permis le développement de nombreux travaux concernant la structure et la fonction de ce récepteur. Le récepteur AT₁ possède deux isotypes chez les rongeurs, les récepteurs AT_{1A} et AT_{1B}. Chez les rats, ce récepteur est codé par deux gènes différents localisés au niveau des chromosomes 17 et 2, respectivement [84]. Ces deux récepteurs montrent une forte

homologie au niveau des séquences en acides aminés (96%) ou en acides nucléiques (92%) [82-84]. Il y a peut-être d'autres isotypes de récepteurs, mais avec le séquençage des génomes, il est peu probable que ce soit le cas, il semble que ces deux isotypes soient les plus importants, et les seuls qui sont à ce jour identifiés, clonés et caractérisés pharmacologiquement. Chez l'homme, il n'y a qu'un seul gène du récepteur AT₁ qui est localisé sur le chromosome 3 [84]. Ce gène code pour une protéine de 359 acides aminés, formant un récepteur à sept domaines transmembranaires. L'activation du récepteur AT₁ entraîne son couplage avec les protéines G hétérotrimériques ainsi qu'avec d'autres voies de signalisation intracellulaires. Plusieurs études ont démontré que l'expression et la densité des isotypes des récepteurs AT_{1A} et/ou AT_{1B} dépendent du type cellulaire. Chez le rat, les CMLV expriment les deux isotypes avec une prédominance pour le récepteur AT_{1A} [84]. Chez les rongeurs adultes, le récepteur AT_{1A} est exprimé dans les CMLV, les cellules endothéliales, le rein, le foie, les glandes surrénales, les ovaires, le cerveau, les testicules, le poumon, le coeur et le tissu adipeux [85]. Dans le coeur, les densités les plus élevées des récepteurs AT₁ sont retrouvées au niveau du système de conduction et des ganglions au niveau vagal ; dans le rein, dans les cellules interstitielles de la médullaire. Dans le système nerveux central, des densités élevées du récepteur AT₁ existent dans différentes zones encéphaliques suggérant un rôle de neuromédiateur pour l'Ang provenant des neurones [84]. Le sous-type AT_{1B} est retrouvé dans les glandes surrénales, le cerveau, les testicules, l'antéhypophyse, les cellules mésangiales et juxtaglomérulaires [84]. Chez l'homme, les récepteurs AT₁ sont présents en quantité élevée dans les CMLV et à des taux plus faibles dans l'adventice [84]. Des études récentes de ciblage génique et des études pharmacologiques ont montré que le SRAA est essentiel pour le développement du rein et du système urinaire des mammifères. L'existence de taux élevés d'ECA et des récepteurs AT₁ et/ou AT₂ dans l'adventice des vaisseaux, suggère un rôle paracrine important du SRAA vasculaire [86].

Il n'existe pas d'antagoniste spécifique pour différencier les deux sous types de récepteurs AT_1 de l'angiotensine II. Il est, par conséquent, plus difficile d'étudier leurs densités et leurs fonctions spécifiques. De plus, les deux récepteurs ont la même affinité pour l'Ang II [87]. Cependant, les techniques d'inactivation des gènes AT_{1A} et AT_{1B} ont aidé à mieux comprendre le rôle de chaque récepteur et leur contribution à la régulation de la PA. Le récepteur AT_{1A} est le plus étudié dans le système cardiovasculaire, principalement au niveau des CMLV où il semble être prédominant. En effet, la PA des souris $AT_{1A}^{-/-}$, possédant une inactivation allélique du gène récepteur AT_{1A} , est significativement plus basse par rapport aux souris $AT_{1A}^{+/+}$ ou hétérozygote $AT_{1A}^{+/-}$ [88]. L'infusion d'Ang II ou un traitement avec le losartan (un ARA) aux souris $AT_{1A}^{-/-}$ entraîne respectivement une augmentation et une baisse de la PA. Ces études démontrent la contribution redondante des récepteurs AT_{1B} dans la régulation de la PA en absence de récepteurs AT_{1A} [88]. Dans les CMLV des souris $AT_{1A}^{-/-}$, la mobilisation du calcium Ca^{2+} intracellulaire $[Ca^{2+}]_i$ stimulée par l'Ang II est presque identique à celle observée chez les CMLV des souris sauvages. Cette mobilisation du $[Ca^{2+}]_i$ est médiée par le récepteur AT_{1B} [89], ce qui suggère que les récepteurs AT_{1A} et AT_{1B} puissent être couplés aux mêmes voies de signalisation intracellulaires dans les CMLV.

L'inactivation allélique du gène du récepteur AT_{1B} n'a pas donné beaucoup d'informations sur l'existence d'une fonction particulière de ce récepteur. En effet, les souris $AT_{1B}^{-/-}$ ont une PA identique à celles des souris sauvages. De plus, elles sont dépourvues de phénotypes particuliers [90;91]. D'après ces études, la fonction du récepteur AT_{1B} , dans ces conditions d'inactivation allélique, est prise en charge par le récepteur AT_{1A} . Par contre, l'inactivation allélique simultanée des gènes des récepteurs AT_{1A} et AT_{1B} engendrent une diminution de la PA accompagnée de certaines anomalies de croissance. Ces souris ont un poids corporel, rénal et cardiaque significativement plus bas que les souris sauvages. Par contre, des études histochimiques ont révélé que les anomalies de croissance affectent uniquement le rein et ses vaisseaux [91]. Paradoxalement, on retrouve une hypertrophie

vasculaire considérée comme une adaptation probablement pour minimiser le degré de l'augmentation de la PA et son impact au niveau glomérulaire. Une étude récente effectuée par Igase et coll. démontre que le blocage des récepteurs AT₁ chez le SHR, augmente l'expression aortique de l'ECA2 ainsi que l'Ang-(1-7) accompagné de l'inhibition du remodelage vasculaire [92].

1.4.3.1.1. La régulation des récepteurs AT₁

L'expression des récepteurs AT₁ est dynamiquement régulée par des mécanismes cellulaires et moléculaires qui ne sont pas encore entièrement bien compris. La régulation peut survenir à deux niveaux, soit au niveau transcriptionnel et au niveau posttranscriptionnel.

L'Ang lui-même diminue l'expression des récepteurs AT₁ des différents types cellulaires comme les CMLV [93], les cellules mésangiales [94], les cellules adrénergiques fasciculées et réticulées. Dans un récent modèle de lignée de rats transgéniques avec un niveau d'angiotensinogène diminué au niveau du cerveau, l'expression du récepteur AT₁ dans la majorité des régions à l'intérieur de la barrière hémato-encéphalique était significativement plus élevée, comparée aux rats contrôles Sprague-Dawley [95]. Clark et coll. ont étudié la régulation des récepteurs à l'angiotensine dans les cellules CHO, transfectées de manière stable avec le récepteur AT_{1A} [96]. Le prétraitement à l'Ang-(1-7) a causé une diminution significative de l'affinité de l'Ang II-[¹²⁵I] pour le récepteur AT_{1A} et une réduction dans le nombre total de sites de liaison.

La régulation de l'expression du récepteur AT₁ dépend de différents types de stimuli tels que les gluco- et minéralocorticoïdes, l'insuline, l'*insulin-like growth factor* I (IGF-1), le NO, l'*epidermal growth factor* (EGF) [97-99]. L'expression vasculaire du récepteur AT₁ est régulée par les taux locaux de noradrénaline; cette dernière régule négativement le récepteur AT₁, au niveau de l'expression de l'ARNm et de la synthèse de la protéine, au moins en partie par l'activation du récepteur adrénergique de type α-1 [100].

L'expression du récepteur AT₁ est également modifiée dans différentes conditions physiopathologiques : l'hypertension rénovasculaire, l'infarctus du myocarde, l'hypertrophie ventriculaire, la néphrectomie bilatérale, l'hypercholestérolémie et la septicémie [101-104]. Le cholestérol associé aux lipoprotéines de faible densité (LDL) mène à une augmentation importante de l'expression des récepteurs AT₁ dans les CMLV en culture comme dans les lapins hypercholestérolémiques. La surexpression vasculaire du récepteur AT₁ peut aussi être observée chez les hommes hypercholestérolémiques. Ces résultats peuvent aider à expliquer pourquoi l'hypercholestérolémie est fréquemment associée avec l'HTA et pourquoi le blocage du SRAA atténue la progression de l'athérosclérose [104]. Plus récemment, il a été démontré que la septicémie pouvait causer une diminution systémique des récepteurs AT₁ et que ce serait médié via les cytokines pro-inflammatoires et le NO. Cette diminution des récepteurs AT₁ est la principale raison pour l'atténuation de la réponse de la PA et de la formation d'aldostérone à l'Ang II et donc peut contribuer aux caractéristiques du choc septique.

Ces découvertes peuvent aider à définir la contribution potentielle du SRAA dans la pathogenèse de diverses maladies.

1.4.3.1.2. Les antagonistes des récepteurs AT₁

Un des traitements de l'HTA est l'utilisation des inhibiteurs du SRAA, particulièrement avec les IECA. Toutefois, cette approche a démontré certains effets secondaires tels que la toux et exceptionnellement l'œdème angionévrotique. De plus, l'inhibition de l'ECA entraîne non seulement l'inhibition de la synthèse de l'Ang II, mais également celle du métabolisme de la bradykinine. L'accumulation de la bradykinine dans le larynx est probablement responsable de la toux sèche qu'occasionne la prise d'inhibiteurs de l'ECA. En outre, l'existence d'autres voies de synthèse de l'Ang II telles que la cathepsine G, la chymase et la CAGE (*Chymostatin-sensitive Angiotensin-II Generating Enzyme*) a imposé la nécessité de développer des approches plus sélectives ciblant les récepteurs de l'Ang II

pour contrôler les effets néfastes de l'Ang II. Le développement des antagonistes hautement sélectifs des récepteurs AT₁ a permis de découvrir et d'identifier les différents isotypes des récepteurs de l'Ang II.

Le développement des premiers antagonistes peptidiques des récepteurs AT₁, tels que saralasin, sarilesin et sarmesin a été basé sur la modification de la séquence de l'Ang II. Ces analogues peptidiques de l'Ang II présentaient plusieurs inconvénients majeurs dont le premier était qu'ils étaient rapidement dégradés par le système digestif, donc ils ne pouvaient pas être administrés oralement. De plus, leur courte durée d'action, leur activité d'agoniste partiel et leur manque de spécificité faisaient en sorte qu'ils bloquaient les deux récepteurs AT₁ et AT₂ ce qui constituait également d'importants inconvénients [105]. Plusieurs antagonistes non-peptidiques des récepteurs de l'Ang II, notamment les ARA, ont été développés et possèdent une spécificité pour le récepteur AT₁. Toutefois six, uniquement, ont été approuvés pour le traitement de l'HTA (au Canada) : losartan (Cozaar[®]), valsartan (Diovan[®]), irbesartan (Avapro[®]), candesartan (Atacand[®]), telmisartan (Micardis[®]), et eprosartan (Teveten[®]) (Tableau 2).

Les antagonistes non-peptidiques des récepteurs AT₁ sont subdivisés en antagonistes surmontables et insurmontables. Les antagonistes surmontables sont compétitifs et réversibles entraînant un déplacement de la courbe dose-réponse vers la droite sans affecter l'effet maximal de l'Ang II (losartan, eprosartan et telmisartan). Les antagonistes insurmontables par contre sont non-compétitifs, irréversibles et induisent une diminution de l'effet maximal de l'Ang II (le métabolite actif du losartan (EXP3174), candesartan cilexetil, valsartan et irbesartan) [106]. Certains antagonistes tels que l'irbesartan, le valsartan, l'eprosartan et le telmisartan sont administrés sous leurs formes actives, alors que, le losartan et le candesartan cilexetil sont administrés sous leurs formes inactives. Ces deux derniers sont ensuite transformés en formes actives au niveau hépatique et de la paroi intestinale respectivement [106]. La particularité du losartan, L'EXP3174 possède les

caractéristiques des antagonistes insurmontables [107]. Le losartan a été le premier antagoniste des récepteurs AT₁ à être utilisé dans le traitement de l'HTA [107], ce qui nous a incité à l'utiliser au début de nos études.

L'effet commun des différents antagonistes des récepteurs AT₁ est d'inhiber l'action de l'Ang II. Toutefois, ils diffèrent par certaines propriétés pharmacocinétiques telles que l'affinité, la durée de leur action et leur perméabilité tissulaire, ce qui pourrait expliquer certaines différences dans leur efficacité [106].

Antagonistes	Affinité (nmol/L)	Demi-vie (heures)
Candesartan cilexil (CV 11974)	K _i 0.6	3-11
Eprosartan	IC ₅₀ 1.4-3.9	5-7
Irbesartan	IC ₅₀ 1.3	11-15
Losartan (EXP3174)	IC ₅₀ 20	2 (6-9)
Telmisartan	K _i 3.7	24
Valsartan	IC ₅₀ 2.7	9

Tableau 2. Antagonistes des récepteurs AT₁ utilisés dans le traitement de l'HTA.

1.4.3.1.2.1. Le (Sar¹, Ile⁸)-Angiotensine II

Dans l'objectif de bloquer le SRAA de manière plus sélective au niveau des récepteurs, des antagonistes peptidiques analogues à l'Ang II ont été développés. Le premier de sa classe a été la saralasin (Sar¹Ala⁸-angiotensine II), cet analogue peptidique a été introduit en 1971 [108]. Cependant, outre la saralasin, il y eu plusieurs autres antagonistes, tel que la sarilesine ou la sarmesine. Ces agents avaient été développés sur une la base d'une même structure permettant l'administration orale. Néanmoins, mais la faible biodisponibilité et la courte durée d'action de ces peptides basés sur l'antagonisme des récepteurs de l'Ang II est très rapidement devenu un désavantage. De plus, ces agents étaient incapables de

discriminer sélectivement les différents sous-types de récepteurs à l'Ang II et ils bloquaient non-sélectivement tous les types de récepteurs à l'Ang II (AT₁ et AT₂). Le remplacement de l'acide aspartique (Asp) en position 1 par la sarcosine (Sar) résulte en un analogue possédant une activité agonistique augmentée. De plus, des études sur la structure et l'activité de l'Ang II et de ses analogues ont démontré l'importance du résidu phénylalanine (Phe) en C-terminal et du carboxylate dans l'activité agonistique de ce peptide. Le remplacement du résidu aromatique Phe à la position 8 avec un résidu aliphatique, comme l'isoleucine (Ile) a résulté en un antagoniste, la sarilesin (Sar¹Ile⁸-Ang II) [109;110]. De plus, ces modifications de l'Ang II ont créé une grande différence conformationnelle entre l'Ang II et le Sar¹Ile⁸-Ang II. Bref, ce qui est important de retenir est que le Sar¹Ile⁸-angiotensine II (sarilesin) est un antagoniste peptidique analogue à l'Ang II. Cet antagoniste possède la propriété de bloquer de manière non-spécifique, les récepteurs AT₁ et AT₂. Il existe beaucoup d'autres analogues peptidiques, c'est pourquoi il ne faut pas le confondre avec la saralasin (Sar¹Ala⁸-angiotensine II), qui possède également la propriété d'un agoniste partiel. Cet antagoniste possède une très bonne activité antagonistique [111].

1.4.3.1.3. Les voies de signalisation médiées par le récepteur AT₁

Les récepteurs AT₁ sont couplés à de multiples voies de transduction du signal aboutissant à des actions biologiques diverses [112]. L'activation de la phospholipase C (PLC) médiée par la protéine G aboutit à l'hydrolyse du phosphatidylinositol, la formation d'inositol triphosphate (IP₃) et l'accumulation de diacylglycérol (DAG) (Figure 5). L'IP₃ induit une augmentation du calcium intracellulaire aboutissant à la contraction des cellules musculaires lisses et à la sécrétion d'aldostérone dans la corticosurrénale. L'activation de la protéine kinase C (PKC) par le DAG aboutit à la phosphorylation de protéines-clés qui sont impliquées dans la vasoconstriction, ainsi que dans la croissance cellulaire.

De plus, l'Ang II induit ses actions par l'activation de tyrosine kinases qui à leur tour phosphorylent de nombreuses cibles en aval, incluant la cascade *ras/raf/mitogen-activated*

protein kinase (MAPK) et la translocation des MAPK dans le noyau (Figure 5). Les voies de transduction dépendantes de MAPK ont été associées à des phénomènes cellulaires divers tels que la croissance cellulaire, l'apoptose, la différenciation, la transformation et la vasoconstriction (Figure 5) [112].

À l'instar des récepteurs aux cytokines, le récepteur AT₁ peut activer la voie de signalisation JAK/STAT impliquant ainsi une transduction du signal de surface dans le cytoplasme cellulaire et le noyau (Figure 5) [112]. La voie de signalisation JAK/STAT ainsi que d'autres voies activent l'expression de nombreux proto-oncogènes, incluant c-fos, c-jun, c-myc, erg-1 et le complexe proto-oncogène/protéine activatrice (Figure 5) [112].

La stimulation de ces gènes par l'Ang II est associée à l'augmentation de l'expression de facteurs de croissance (PDGF, EGF, TGF- β , IGF-1, bFGF, PAF) [113], d'agents vasoconstricteurs tels que l'endothéline 1 [114], des molécules d'adhésion (ICAM-1, VCAM-1, E-sélectine), des intégrines et du TNF- α [112;114]. Ainsi, l'Ang II contrôle la prolifération, l'adhésion, la migration cellulaire et l'accumulation de la MEC, modifiant par conséquent la croissance cellulaire cardiaque et vasculaire, la réparation et le remodelage tissulaire, ainsi que l'athérosclérose.

L'Ang II stimule l'activité de la PLA₂ qui est responsable du relargage de l'acide arachidonique à partir des phospholipides de la membrane cellulaire [112;114]. Dans les CMLV et dans les cellules endothéliales, ces effets sont médiés par le récepteur AT₁ [112;115;116]. L'acide arachidonique est métabolisé par les cyclo-oxygénases, les lipo-oxygénases, ou les oxygénases du cytochrome P450 ou de différents éicosanoïdes. Il régule d'importants mécanismes vasculaires et rénaux impliqués dans la régulation de la PA et de la croissance cellulaire, probablement par l'activation de la voie sensible au potentiel redox [116].

Une autre caractéristique intéressante de l'Ang II est sa capacité via le récepteur AT₁ à stimuler la production de radicaux libres dans différents types cellulaires [117]. Touyz et coll. ont démontré que l'Ang II active la production d'anions superoxydes dépendant de la voie NAD(P)H, dans les CMLV (Figure 5). Les effets physiologiques de l'Ang II qui apparaissent au moins en partie médiés par les dérivés réactifs de l'oxygène (DRO) incluent son activité vasopressive, l'hypertrophie des CMLV [117], l'induction de l'expression du récepteur de l'IGF-1 [112], la production d'IL-6 [118] et l'expression endothéliale de VCAM-1 qui joue un rôle important dans les interactions intercellulaires et dans l'athérosclérose [119].

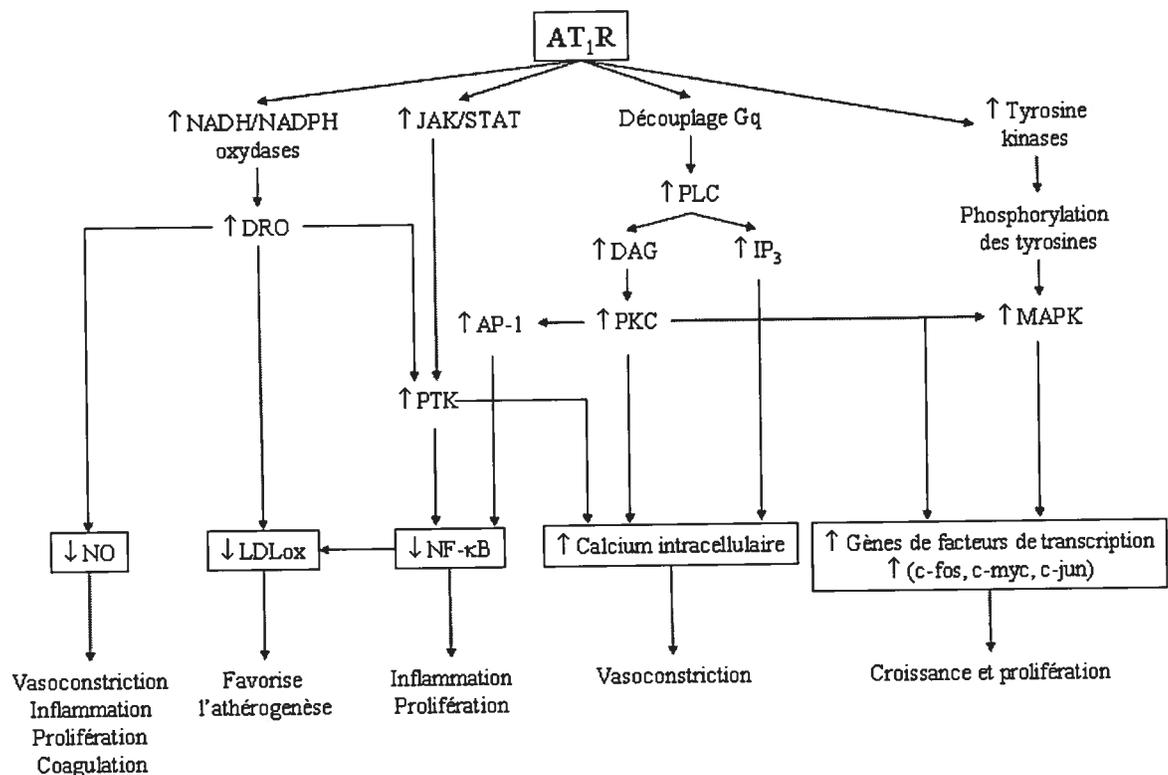


Figure 6. Schéma des principaux signaux de transduction du récepteur AT₁ [120].

1.4.3.1.4. Les fonctions physiologiques du récepteur AT₁

Les actions classiques du récepteur AT₁ incluent la vasoconstriction généralisée, l'augmentation du relargage de la noradrénaline des terminaisons nerveuses sympathiques, le réenforcement de la vasoconstriction et l'augmentation de la fréquence et de la force de contraction du cœur, la stimulation de la réabsorption des ions sodium à partir des tubules proximaux, la sécrétion d'aldostérone à partir du cortex adrénorgique, la croissance cellulaire au niveau du ventricule gauche et de la paroi artérielle [121].

L'Ang II contracte les artérioles pré-capillaires et, moindrement, les vénules post-capillaires, en activant les récepteurs AT₁ localisés sur les CMLV. Une vasoconstriction directe et plus forte est ressentie au niveau des reins et beaucoup moindre dans les vaisseaux du cerveau, des poumons et des muscles squelettiques. Cette action peut être causée par l'Ang II circulante, mais aussi par l'Ang II tissulaire [122]. L'expression d'endothéline-1, en réponse à l'Ang II peut également contribuer aux effets vasoconstricteur de l'Ang II [123].

Pour examiner spécifiquement les fonctions génétiques et physiologiques du récepteur AT₁, Ito et coll. [91] ont interrompu l'expression du gène codant pour les récepteurs AT_{1A} et AT_{1B} dans des cellules souches d'embryons de souris. Les souris *-/-* sont caractérisées par une survie normale *in utero* mais leur survie diminue *ex utero*. Après la naissance, elles sont caractérisées par un faible gain en poids corporel, une hypotension marquée et une morphologie anormale des reins, incluant une maturité retardée au niveau de la croissance glomérulaire, une hypoplasie de la papille et une hypertrophie artérielle rénale [88].

Il a été bien établi que l'Ang II était synthétisée dans le cerveau, indépendamment des sources périphériques. En agissant sur les récepteurs AT₁ dans l'hypothalamus et le tronc cérébral, l'Ang II influence plusieurs réponses physiologiques, incluant la PA, la soif, l'ingestion de sel, la natriurèse et le relargage de vasopressine [124].

L'augmentation de l'ingestion de sel et l'augmentation de la sensibilité au sel sont impliquées dans la pathogénèse de l'HTA et dans le contrôle du régulateur majeur de la PA, le récepteur AT₁. Récemment, Szabo et coll. [125], en utilisant la tomographie à émission de positron *in vivo*, ont mesuré la liaison au récepteur AT₁ et ont démontré que le récepteur AT₁ rénal est inversement relié à l'activité du SRAA, qui peut produire un mécanisme compensatoire pour prévenir les fluctuations inappropriées de la PA.

L'Ang II, via le récepteur AT₁ exerce de nombreuses actions sur la fonction rénale et la structure : modulation de la filtration glomérulaire, facilitation de la rétention de sodium au niveau rénal et régulation de la croissance et la différenciation cellulaire. Les ARA tout comme des IECA ont démontré pouvoir diminuer la progression de dommages glomérulaires et diminuer la protéinurie chez les patients hypertendus avec insuffisance rénale chronique [126]. À part l'unique effet hémodynamique au niveau des reins, l'Ang II a démontré avoir une action directe sur les cellules mésangiales qui expriment les récepteurs AT₁ et jouent un rôle clé dans la progression de la glomérulosclérose [60]. La glomérulosclérose due à l'Ang II, est à son tour liée de façon très étroite au TGF-β1 [126].

L'Ang II facilite la neurotransmission périphérique noradrénergique en augmentant le relargage de la norépinéphrine des synapses nerveuses terminales et en augmentant la réponse vasculaire à la norépinéphrine. L'effet facilitant de l'Ang II sur la neurotransmission noradrénergique est médié par les récepteurs AT₁ localisés au niveau présynaptique [127]. Inversement, cet effet facilitant peut-être contrebalancé de manière dose-dépendante par le blocage de ces récepteurs. Les propriétés sympathoinhibitrices viennent contribuer à l'effet thérapeutique du blocage des récepteurs AT₁, particulièrement dans les conditions où le système nerveux sympathique est activé, comme dans l'insuffisance cardiaque aiguë et l'HTA. Par exemple, dans le cas de lapins avec une insuffisance cardiaque induite par *pacing*, l'administration de losartan retarde la

progression de la dysfonction du ventricule gauche et atténue les anomalies liées aux terminaisons des nerfs sympathiques cardiaques.

L'Ang II est un mitogène bien caractérisé pour les CMLV et stimule l'accumulation de MEC directement et indirectement en stimulant la production de facteurs de croissance. Il existe des évidences qui montrent que le récepteur AT₁ peut être impliqué dans le développement d'hypertrophie et du remodelage cardiaque et la régulation de la production de MEC par les fibroblastes cardiaques. L'habileté des ARA à prévenir le développement de l'hypertrophie cardiaque dans les modèles animaux [128], et à promouvoir sa régression chez les patients hypertendus [129], a démontré le rôle des récepteurs AT₁ dans l'hypertrophie ventriculaire. L'Ang II augmente l'expression et la production de fibronectine, de collagène de type I, de tenascine, de glycoaminoglycans, de sulfates de dermatan et de chondroïtine, ainsi que de protéoglycans, la majorité des constituants de la MEC composant la paroi des vaisseaux [113]. Les protéoglycans constituant une composante importante de la MEC jouent de multiples rôles dans le remodelage cardiaque et rénal, ainsi que dans la modulation de l'activité de diverses cytokines et facteurs de croissance, sont connus pour être également modulés par le récepteur AT₁ [130].

Des données *in vitro* et *in vivo* nous donne des évidences pour une interaction entre le SRAA et la thrombose. L'Ang II stimule la production de l'inhibiteur de l'activateur du plasminogène (PAI-1) via les récepteurs AT₁ [131], sensibilise les plaquettes, favorise la production de DRO qui séquestrent le NO libre et induit l'expression du facteur tissulaire. De plus, les ARA peuvent influencer sur la fonction plaquettaire [132] et réduisent dramatiquement l'expression de PAI-1 dans le cœur et l'aorte des SHR [131]. L'antagonisme aiguë des récepteurs AT₁ chez les patients souffrant d'insuffisance cardiaque, est associé avec une amélioration significative des paramètres fibrinolytiques plasmatiques [132]. Ces découvertes peuvent être très importantes pour une variété d'applications cliniques.

À chaque niveau de développement bien défini d'athérosclérose, l'Ang II a une contribution potentielle pour cette pathophysiologie vasculaire. Dans la formation des cellules spumeuses, l'Ang II facilite le recrutement des monocytes/macrophages dans la paroi des vaisseaux, en stimulant la production de MCP-1 par les CMLV. Le stress oxydant induit par l'Ang II peut contribuer à augmenter l'oxydation des LDL et la dégradation de NO. Une perte de NO a plusieurs conséquences biologiques vasculaires, puisque le NO est largement considéré comme une molécule qui protège les vaisseaux et qui retarde le développement de l'athérosclérose. L'Ang II augmente les modifications des LDL et l'expression de ses récepteurs semblables aux lectines (LOX-1) en activant les récepteurs AT₁. Le traitement à l'aide du losartan diminue de façon marquée cette augmentation de l'expression de LOX-1 dans la néointima des aortes de lapins. Récemment, Strawn et coll. [133] ont démontré des effets du losartan sur le développement de l'athérosclérose chez des singes cynomolgus nourries avec une diète riche en cholestérol [133]. Le losartan a eu des effets intéressants en réduisant l'étendue de la formation des dépôts de graisses par environ 50% dans l'aorte. À partir de ces études, il est devenu clair que l'inhibition du SRAA peut être important, pas seulement pour traiter l'HTA et les dommages aux organes cibles, mais également pour un grand nombre de syndrômes pathologiques, tels que l'insuffisance cardiaque, le remodelage cardiaque, la thrombose et l'athérosclérose.

Il y a bon nombre d'évidences qui s'accumulent et qui indiquent que l'inflammation de la paroi vasculaire joue un rôle clé dans la pathogenèse des maladies vasculaires et du processus athérosclérotique. L'inflammation vasculaire est également présente dans l'HTA, le diabète mellitus et autres conditions qui sont associés aux dommages vasculaires [134]. L'atténuation de la réponse inflammatoire vasculaire peut avoir des effets bénéfiques dans la prévention de complications cardiovasculaires liés à l'HTA [135]. Comme on vient de le voir, traditionnellement, l'Ang II, joue un rôle central dans la régulation du tonus vasculaire, la PA et l'homéostasie électrolytique. Fait intéressant, il y a maintenant un nombre croissant d'évidences qui indiquent que l'Ang II est également capable d'induire

une réponse inflammatoire dans la paroi vasculaire. L'Ang II induit l'inflammation de par des mécanismes dépendants et indépendants de la PA [136].

L'inflammation vasculaire induite par l'Ang II est principalement médiée par la stimulation du récepteur AT₁ [137-139]. Il a été récemment démontré que les ARA sont capables de prévenir l'induction de l'inflammation périvasculaire par l'Ang II et des changements morphologiques dans le cœur et les reins [140;141]. On sait qu'au niveau vasculaire, les voies de signalisation qui participeraient à l'induction de l'inflammation vasculaire par l'Ang II impliqueraient les facteurs de transcription NF-κB (« *Nuclear transcription Factor kappa B* »), AP-1 (« *Activator Protein-1* ») et NF-AT (« *Nuclear Factor of Activated T cells* »), pourrait impliquer l'action de la petite protéine G Rac et de la tyrosine kinase Src. De plus, on rapporte que l'Ang II est capable d'induire l'expression de plusieurs médiateurs inflammatoires au niveau vasculaire tel que des molécules d'adhésion : ICAM-1, VCAM-1, sélectines, intégrines; des chimiokines : MCP-1, IL-8, RANTES, ostéopontine; des cytokines inflammatoires : IL-6, IL-12, IL-1, TNF-α; et des facteurs de croissance : VEGF, bFGF, TGF-β, PDGF et CTGF [142]. Ceci sans compter l'effet modulateur de l'Ang II sur la réponse inflammatoire induite par le NO, la BK, la cyclo-oxygénase-2, l'endothéline-1 et les acides epoxyeicosatriénoïcs [142]. De plus, le potentiel effet protecteur du récepteur AT₂ au niveau de l'inflammation induite par l'Ang II nécessite des clarifications.

1.4.3.1.5. Dimérisation des récepteurs AT₁

Durant la dernière décennie, plusieurs ont suggéré la formation d'homo- ou hétérodimères de GPCR dans le cas des récepteurs δ des opioïdes, B₂ de la BK, D₂ de la dopamine et β₂-adrénergiques [143]. En ce qui concerne les récepteurs de l'Ang II, Monnot et coll. [143] ont démontré que lors de la co-expression de deux types de récepteurs AT_{1A} mutés et non fonctionnels (lys¹⁰² au niveau de la 3^e boucle et lys¹⁹⁹ au niveau de la 5^e hélice), ils retrouvent leur pouvoir de liaison avec l'Ang II. Ces auteurs suggèrent que les récepteurs AT_{1A} peuvent interagir entre eux et se compléter pour former une entité fonctionnelle

identique à celle de l'état sauvage. Toutefois, ces récepteurs sont dépourvus de pouvoir de transduction des signaux intracellulaires. Récemment, l'hétérodimérisation des récepteurs AT_1 et B_2 de la BK a été rapportée au niveau des CMLV des artères mésentériques et des lignées cellulaires A10 [144]. Cependant, cette interaction semble être indépendante des stimulations par l'Ang II ou la BK. En revanche, la stimulation de l'hétérodimère par l'Ang II augmente l'activation des protéines G_q et G_i . Ces auteurs suggèrent que la signalisation médiée par le récepteur AT_1 nécessite la présence et l'interaction du récepteur B_2 de la BK. D'autres études ont démontré que l'hétérodimérisation des récepteurs AT_1 et AT_2 peut engendrer l'inhibition des signaux médiés par les récepteurs AT_1 . Cet antagonisme du récepteur AT_1 par le récepteur AT_2 est indépendant de l'activation de ces récepteurs [144].

1.4.3.2. Le récepteur AT_2

Jusqu'à tout récemment, la majorité des actions biologiques de l'Ang II étaient reconnues pour être médiées par le récepteur AT_1 . Depuis les 10 dernières années, notre compréhension du rôle fonctionnel du récepteur AT_2 a été davantage développée. Ce récepteur apparaît comme agissant comme un modulateur d'un programme biologique complexe impliqué dans le développement embryonnaire, la différenciation cellulaire, la réparation tissulaire et le programme de mort cellulaire [145]. Le récepteur AT_2 est également une GPCR à 7 domaines transmembranaires et il est constitué de 363 acides aminés. Le gène qui code pour le récepteur AT_2 est localisé sur le chromosome X [145]. Il est exprimé dans les tissus fœtaux, mais son expression diminue après la naissance et réapparaît chez l'adulte de façon importante dans des conditions physiopathologiques engendrant le remodelage tissulaire, telles que l'infarctus du myocarde, l'hypertrophie, l'insuffisance cardiaque et les lésions vasculaires. Cependant, chez l'adulte, certains tissus sains montrent une expression des récepteurs AT_2 tels que les glandes surrénales, le cœur, l'aorte, les artères mésentériques, le cerveau et l'utérus [145-147]. Au niveau vasculaire, le récepteur AT_2 est exprimé au niveau des cellules endothéliales et des CMLV, et son expression est induite par l'Ang II, l'insuline et l'IGF-1 et -2 [148], mais est inhibée par le

PDGF-BB au niveau des CMLV. La fonction exacte et les voies de signalisation intracellulaires médiées par le récepteur AT₂ sont encore mal élucidées.

Le récepteur AT₂ est exprimé dans les tissus fœtaux [149], alors que son expression est nettement diminuée après la naissance pour être restreinte à quelques organes tels que le cerveau, les surrénales, le coeur, les reins, le myomètre et les ovaires. L'expression prédominante des récepteurs AT₂ dans les mésenchymes différenciés [150], indique que l'Ang II pourrait utiliser ces récepteurs pour le processus de développement et de différenciation. La protéine AT₂ est présente dans le coeur, les artères coronaires, et dans les cardiomyocytes [151]. Des études récentes ont montré que dans le rein, la présence d'ARNm codant pour le récepteur AT₂ était essentiellement localisée dans les artères interlobulaires [151], dans les tubes contournés proximaux, dans les canaux collecteurs, les artères arquées, dans les artérioles afférentes et dans les vasa recta de la médullaire externe [152]. Dans le tissu pulmonaire humain, l'ARNm du récepteur AT₂ et la protéine correspondante ont été mis en évidence dans les cellules épithéliales et endothéliales. Bien que le récepteur AT₁ soit le sous-type prédominant dans l'organisme de l'adulte, une augmentation de l'expression du récepteur AT₂ a été observée dans des conditions pathologiques telles que les lésions vasculaires [153], l'infarctus du myocarde [102], l'insuffisance cardiaque [154], l'insuffisance rénale [155], l'ischémie cérébrale et des sections du nerf sciatique ou du nerf optique.

1.4.3.2.1. La régulation des récepteurs AT₂

L'expression du gène des récepteurs AT₂ est régulée par de multiples facteurs. La majorité des études qui ont été faites sur la régulation du récepteur AT₂ ont été faites sur des cultures de cellules *in vitro*. L'Ang II et la norépinéphrine diminuent l'expression du récepteur AT₂ dans les cardiomyocytes [156]. Des facteurs de croissance tels l'EGF, le NGF et le PDGF ainsi que les glucocorticoïdes, diminuent l'expression du récepteur AT₂ dans différents types cellulaires [157]. Le bFGF, l'acide lysophosphatidique et l'ester de phorbol

suppriment de façon marquée l'expression d'ARNm du récepteur AT₂ chez la souris [145]. Les facteurs qui stimulent l'AT₂ incluent l'insuline, l'IGF-1, le facteur régulant l'interferon (IRF-1 et l'IRF-2) ainsi que l'IL-1 β [145].

Des études *in vivo* sur la régulation du récepteur AT₂ sont limitées. Il a été démontré que l'œstrogène augmentait le niveau de récepteur AT₂ dans le myomètre humain [158], tandis que l'aldostérone diminue l'expression du récepteur AT₂ dans la médulla adrénérique [159]. De récentes investigations ont montré une augmentation des récepteurs AT₂ dans les artères mésentériques de rats, suivant l'infusion d'Ang II et la diminution de manière dépendante du NO dans la glande surrénale d'un modèle de septicémie.

Il est établi que le nombre de facteurs extracellulaires, particulièrement des facteurs de croissance et des hormones, peuvent influencer l'expression des récepteurs AT₂.

1.4.3.2.2. Les mécanismes de signalisation du récepteur AT₂

Les voies de signalisation du récepteur AT₂ sont diverses et peu de ces voies ont été bien caractérisées [112]. Dans certains cas ces récepteurs sont couplés aux protéines G_i. Une voie de transduction dans les neurones (probablement dans d'autres tissus) implique l'activation d'une phosphatase sérine/thréonine PP2A qui aboutit à l'activation du canal potassium à rectification tardive (courant potassique sortant dans les cellules neuronales). Ceci résulte en une hyperpolarisation des membranes plasmiques qui supprime les activités cellulaires stimulées par la dépolarisation.

Une deuxième voie de signalisation implique l'activation des phosphotyrosines phosphatases (PTPases) qui sont importantes dans la prévention ou l'inhibition rapide de la croissance cellulaire inappropriée ou non contrôlée dans les tissus normaux. Le récepteur AT₂ active MAPK phosphatase-1 (MKP-1) et inactive les MAPK ERK1/2, induisant une déphosphorylation de Bcl-2 et une régulation à la hausse de Bax.

Les études *in vivo* ont montré que l'Ang II active la PLA₂ via son récepteur AT₂ [160]. Le relargage de l'acide arachidonique qui en résulte pourrait contribuer à l'activation du système de transport Na⁺/HCO³⁻ (NBC) qui régule le pH intracellulaire [161]. Le récepteur AT₂ semble jouer aussi un rôle important dans la régulation de l'acidose intracellulaire résultant d'une lésion cellulaire. Dans le myocarde ischémique, l'échangeur Na⁺/H⁺ (NHE) est régulé positivement par le récepteur AT₁ alors que Na⁺/HCO³⁻ est régulé positivement par le récepteur AT₂ [161]. Les ARA interfèrent avec les mécanismes de récupération de l'acidose myocardique induite par l'ischémie par la mise en jeu de mécanismes d'alcalinisation médiés par Na⁺/HCO³⁻, dépendant du récepteur AT₂, au détriment d'autres mécanismes médiés par NHE1. Ceci pourrait éviter la surcharge en calcium (par la stimulation de NCX1) dans la zone ischémique.

Une autre voie de transduction du signal du récepteur AT₂ implique les céramides [124], qui peuvent induire l'apoptose par l'activation des kinases de stress ou des caspases telle que la caspase 3, et peuvent servir comme des médiateurs potentiels, de voies de signalisation dépendant du récepteur AT₂ et de NF-κB [162]. L'activation du système BK/NO/cGMP par le récepteur AT₂ a été observée dans les cellules endothéliales [163], le cœur [163], rein [164] et dans l'aorte de SHR-SP recevant une perfusion d'Ang II [165]. Des études récentes ont confirmé le rôle des récepteurs AT₂ dans le relargage de la BK et de NO [166]. À la vue de ces études, il semble que les récepteurs AT₂ stimulent la production de NO, qui aboutit à une augmentation de la formation du second messager cGMP. Ce dernier médie à son tour de nombreuses actions biologiques du NO telles que la vasodilatation, la natriurèse ou l'inhibition de la prolifération par l'activation de protéines kinases dépendant du cGMP.

L'expression d'une protéine activatrice d'un homéodomaine en doigt de zinc (Zfh_{ep}) qui est impliquée dans la régulation de la différenciation cellulaire, est induite par l'activation du récepteur AT₂ dans les cellules vasculaires et neuronales [167].

1.4.3.2.3. Le récepteur AT₂ et la régulation de la PA

Le rôle du récepteur AT₂ dans la régulation de la PA a été mis en évidence par les études d'inactivation des gènes des récepteurs de l'Ang II. Un traitement des souris AT_{1A}^{-/-}, AT_{1B}^{-/-} avec des IECA induit une augmentation de la PA. Ce phénomène paradoxal pourrait être expliqué par l'implication du récepteur AT₂ dans la régulation de la PA [91]. En revanche, la PA des souris ayant subi une inactivation allélique du récepteur AT₂ est normale ou légèrement élevée par rapport aux souris sauvages [168;169]. Toutefois, ces souris montrent une hypersensibilité à l'Ang II. Ces études suggèrent que le récepteur AT₂ joue un rôle important dans la régulation de la PA [169-171]. Or, l'hypersensibilité à l'Ang II des souris AT₂^{-/-} est due, en partie, à une augmentation de l'expression des récepteurs AT₁ au niveau des CMLV [172]. Les études de Tsutsumi et coll. [173] ont démontré en détail le mécanisme moléculaire vasodilatateur médié par le récepteur AT₂ au niveau des CMLV. Barber et coll. [174] ont démontré que chez les SHR, l'Ang II induit une vasodilatation des artères mésentériques après un blocage des récepteurs AT₁ avec le losartan. Cette vasodilatation est inhibée par un traitement avec un antagoniste des récepteurs AT₂, le PD123319. Ce phénomène n'est pas observé chez les jeunes SHR, où le récepteur AT₂ contribue à la contraction des artères mésentériques induite par l'Ang II, autant que les récepteurs AT₁ [146].

1.4.3.3. Le SRAA et la croissance dans les lésions vasculaires

L'hyperplasie myo-intimale survient dans diverses conditions pathologiques induisant une lésion endothéliale. Un important pré-requis pour le développement de l'hyperplasie myo-intimale est la destruction de la couche endothéliale. Après la lésion de la paroi artérielle et l'abrasion de l'endothélium, les plaquettes activées et les cellules endothéliales lésées libèrent différents stimuli pour les cellules musculaires lisses. Les facteurs de croissance des cellules musculaires lisses vasculaires incluent l'Ang II, l'endothéline, le FGF et le PDGF. Les inhibiteurs incluent le TGF-β₁, la prostacycline I₂ (PGI₂) et l'*endothelium-derived relaxing factor* (EDRF), comprenant le NO, les acides eicosatriénoïques et

l'anandamide. Ces facteurs de croissance initient le processus d'activation des CMLV, leur réplication, leur migration et leur prolifération aboutissant à l'hyperplasie intinale. La contribution de l'Ang II au processus de formation de la néointima après lésion vasculaire a été suggérée dans des études montrant que les IECA permettaient la diminution de l'hyperplasie myo-intinale après abrasion endothéliale [175]. Le traitement par les ARA réduit de façon significative la formation de la néointima.

Alors que les récepteurs AT_1 stimulent la prolifération cellulaire, les récepteurs AT_2 inhibent la prolifération et la croissance cellulaire et induisent la différenciation cellulaire [145]. L'effet anti-prolifératif des récepteurs AT_2 a d'abord été observé dans des cultures de cellules endothéliales provenant d'artères coronaires. Les effets antiprolifératifs induits par les récepteurs AT_2 ont été observés dans d'autres types cellulaires, tels que les cellules NG 108-15 [176], les cellules PC12W [177], les cellules R3T3 [178], les cellules mésangiales rénales [179] ainsi que dans des modèles *in vivo* étudiant la croissance des cellules de la microcirculation [180]. Une étude menée par Fischer et coll. a évalué l'effet sur les cellules endothéliales des deux types de récepteurs de l'Ang II quant à l'expression des composants de la MEC, tels que la thrombospondine-I et la fibronectine. Les résultats suggèrent que le récepteur AT_2 médie l'inhibition de la prolifération ainsi que le remodelage de la MEC en augmentant l'expression de la thrombospondine I dans les cellules endothéliales [130].

1.5. Composition de la matrice extracellulaire

1.5.1. Matrice extracellulaire

La matrice extracellulaire (MEC) est constituée de collagènes, glycoprotéines, protéoglycans et glycoaminoglycans [181]. C'est un réseau fibrillaire hautement organisé, qui sert comme substratum pour l'adhésion et la migration des cellules. La MEC constitue également une barrière qui protège l'intégrité tissulaire, empêche la migration cellulaire et régule moléculairement la diffusion et le transfert de stimuli. De plus, la MEC forme un

microenvironnement cellulaire dynamique qui joue un important rôle dans la détermination du phénotype cellulaire [182]. Elle médie l'information aux cellules, à partir des cellules directement de par ses composants, en emmagasinant et en modulant la fonction des facteurs de croissance et des cytokines inflammatoires ainsi que d'autres facteurs de régulation incluant la maturation moléculaire d'enzymes et leurs inhibiteurs.

Il existe deux catégories de MEC distinctes et fonctionnelles qui sont spécialisées, soit le tissu interstitiel conjonctif et la membrane basale. Un bon exemple est celui de la fibrine du caillot sanguin, qui représente une forme temporaire de tissus conjonctifs durant la phase de réparation tissulaire, sa formation étant initiée par le clivage du fibrinogène en fibrine induite par le clivage par la thrombine.

1.5.2. Matrice interstitielle

La matrice interstitielle entoure et est formée par des cellules qui produisent le tissu conjonctif tels que les fibroblastes, les ostéoclastes, les chondrocytes et les macrophages. Elle consiste en un réseau de protéines fibreuses incluses dans une substance de glycoaminoglycan/protéoglycan amorphe [181]. La composition et l'architecture moléculaire de la matrice diffèrent substantiellement selon le tissu, comme par exemple, les os, le cartilage, les tendons, les ligaments, le derme, la paroi des vaisseaux sanguins et le corps des organes du parenchyme.

Le collagène est le composant le plus abondant de la MEC interstitiel dans tous les tissus [181;183]. Les collagènes fibrillaires (types I, II, III, V et VI) sont les molécules les plus importantes pour conférer une résistance mécanique. Ils sont synthétisés et sécrétés comme procollagènes avec un très grand propeptide globulaire amino- et carboxy-terminal qui sont clivés protéolytiquement afin de devenir une molécule de collagène mature. Ces molécules à triples hélices, composées de trois chaînes α avec une série de séquences triples Gly-X-Y, sont hautement résistantes à la protéolyse. Dans les tissus, des molécules de collagène de 2

nm d'épaisseur s'assemblent pour former des fibrilles de 20 à 200 nm de diamètre. Des doubles liaisons covalentes viennent stabiliser ces fibrilles et peuvent s'associer latéralement pour former des fibres. Le collagène de type I est le principal composant des fibrilles de collagène dans plusieurs tissus tels les os, la peau, les tendons et autres tissus fibreux. C'est un hétérodimère de deux chaînes $\alpha 1(I)$ et une $\alpha 2(I)$. Le collagène de type II, est le principal composant du cartilage et est formé par un hétérodimère $\alpha 1(II)_3$. Le collagène de type III [$\alpha 1(III)_3$] et le collagène de type V [$\alpha 1(V)$, $\alpha 2(V)$, $\alpha 3(V)$] forment des fibrilles hétérotypiques avec le collagène de type I dans les tissus conjonctifs mous. Dans les os, le collagène de type I est accompagné par les collagènes types V et le XI [$\alpha 1(XI)$, $\alpha 2(V)$, $\alpha 3(XI)$]. Le collagène de type XI forme également des fibrilles hétérotypiques avec le collagène de type II.

Les collagènes non fibrillaires forment un groupe hétérogène [181;183]. Les fibrilles de collagènes peuvent être associées avec des triples hélices interrompues (collagène FACIT, type IX, XII, XIV, XVI et XIX). Le collagène de type VI forme des microfibrilles dans la majorité des tissus conjonctifs. Le réseau de collagènes est retrouvé dans le cartilage hypertrophique (type X), la matrice sous-endothéliale (type VIII) et la membrane basale (type IV). Les longues chaînes de collagène (type VII) sont des composantes d'ancrage des fibrilles, ce qui a pour effet de stabiliser l'attachement de la membrane basale à l'épithélium sous-jacent. De plus, certains collagènes ont des domaines transmembranaires (type XIII et XVII), la multiplexine « *multiple triple-helix domain and interruptions* », les collagènes de type XV et XVIII et autres protéines contenant des domaines à triples hélices ont été caractérisés [183].

L'élastine est un autre composant de grande importance de la MEC. Elle est la protéine principale des fibres élastiques des artères, des veines, du poumon, de la peau, etc. L'élastine est synthétisée au cours de la deuxième moitié de la grossesse et de la croissance de l'enfant. Elle représente 40% du poids sec de l'aorte et confère la propriété d'élasticité

aux organes qui la contiennent. La délétion des deux copies du gène de l'élastine chez la souris conduit à la mort des animaux peu après leur naissance.

Plusieurs maladies génétiques conduisent à la formation de fibres élastiques altérées : le syndrome de Williams, la sténose supra- valvulaire aortique, le cutis laxa, le syndrome de Marfan, le syndrome de Menkes, le *pseudoxanthoma elasticum*, pour ne nommer que celles-ci; le syndrome de Williams étant du à la délétion d'une copie de plusieurs gènes dont celui de l'élastine, la sténose supra- valvulaire aortique et le cutis laxa (forme autosomale dominante), à une mutation dans le même gène. Les fibres élastiques s'altèrent également au cours du vieillissement et des maladies acquises que sont l'artériosclérose, l'athérosclérose et les anévrismes. Chez les patients atteints du syndrome de Williams, les malformations cardiovasculaires les plus fréquentes sont la sténose supra- valvulaire aortique et l'épaississement plus ou moins diffus des artères avec rétrécissement de la lumière artérielle. L'altération des fibres élastiques liée au défaut du gène de l'élastine pourrait être corrigée en stimulant l'expression de la copie saine du gène. Tout l'art de cette thérapie serait de stimuler cette synthèse de façon optimale dans le temps (au cours du développement *in utero* et au cours de la croissance de l'enfant) et dans les organes concernés. De nombreux programmes de recherche analysent actuellement les mécanismes moléculaires de formation des fibres élastiques.

Les fibres élastiques sont responsables des propriétés élastiques des tissus comme les poumons, le derme et les vaisseaux sanguins [184]. L'élastine est le principal composant des fibres élastiques. C'est une protéine hydrophobe et hautement associée (*cross-linked*) qui est très résistante aux traitements physiques et à la majorité des protéinases. Les fibres élastiques interagissent avec des microfibrilles contenant de la fibrilline, d'autres glycoprotéines et des protéoglycans [185]. Les propriétés mécaniques passives des artères est principalement conféré par les fibres élastiques et les fibres de collagène, les CMLV étant reconnus comme l'élément actif [186]. Les fibres élastiques sont des constituants de la

MEC constitués d'élastine assemblée, de microfibrilles et de d'autres protéines associées [187], qui donnent l'habileté aux vaisseaux d'être élastique, tandis que le collagène est une protéine plus rigide, qui limite davantage la distension des vaisseaux.

Les grosses artères (artères élastiques, artères de conductance) ont un haut degré d'élasticité puisque l'élastine est le principal composant de la paroi de ces vaisseaux [188]. Cette propriété est essentielle pour la fonction cardiovasculaire. En tempérant les variations de pression durant le cycle cardiaque, cela permet un débit sanguin relativement constant et une irrigation suffisante des divers organes [189]. En contrepartie, dans les artères de résistance, l'élastine est un composant mineur et le collagène compte pour la plus grande proportion de la MEC. L'élastine est restreinte à une limitante élastique interne (LEI) et à un réseau de fibres élastiques à travers la média et l'adventice [190]. Le fait que dans les artères de résistance, l'élastine est difficile à trouver a mené à la conclusion que cette protéine n'a pas un rôle majeur dans les propriétés mécaniques de ces vaisseaux. Cette présomption n'a été basé que sur le fait que l'élastine est difficile à quantifier à l'aide des mêmes méthodes qui sont utilisés pour les artères de conductance, basé sur des traitements chimiques très puissants, qui demandent une grande quantité de tissu [191].

Plusieurs glycoprotéines sont présentes dans la MEC interstitielle. La fibronectine et la vitronectine sont deux glycoprotéines structurales de la MEC et sont également présentes dans le plasma sanguin, et jouent un rôle dans l'attachement des cellules à la MEC [192]. Les fibronectines sont des glycoprotéines à haut poids moléculaire (235-270 kDa) qui forment des dimères liés par un pont disulfure ainsi qu'une structure fibrillaire. L'épissage alternatif d'un seul gène peut générer différentes formes de fibronectine. Elles sont composées de trois types de répétitions et autres domaines fonctionnels. Les fibronectines interagissent avec les intégrines à la surface des cellules, principalement via le motif RGD. Elles lient également différents composants de la matrice tels les collagènes, la fibrine et les protéoglycans. Durant le développement, la fibronectine est essentielle à l'adhésion des

cellules embryonnaires pour leur migration de par une matrice riche en fibronectine [193]. Au-delà de la transformation, une diminution de la synthèse et une augmentation de sa dégradation protéolytique, diminue l'expression à la surface des cellules et dans la MEC [192].

Les protéoglycans (PGs) et les glycoaminoglycans (GAG) constituent la substance amorphe de la MEC interstitielle. Les PGs contiennent une chaîne centrale polypeptidique dans laquelle les résidus sérine et thréonine ont une chaîne GAG lié (*O-linked*) de sulfate d'héparan, de kératan, de dermatan ou de chondroïtine [194]. Le métabolisme des PGs est plus rapide que celui des collagènes, avec des demi-vies tissulaires de quelques jours à plusieurs semaines. Les PGs forment une charpente structurante et agissent sur l'organisation de la matrice. Comme molécules hydrophiles, elles sont importantes pour retenir l'eau et maintenir un volume tissulaire. De plus, les PGs peuvent jouer un rôle dans la modulation d'une variété de processus biologiques incluant la croissance, l'adhésion et l'invasion cellulaire [195]. Il existe plusieurs facteurs de croissance qui sont associés à la MEC, tels le FGF et les membres de la famille du VEGF peuvent lier le sulfate d'héparan des PGs [196]. De petits PGs riches en leucine, tels la décorine et la fibromoduline lient les composants de la MEC et participent dans la régulation de la fibrillogénèse du collagène et l'organisation de la matrice [197]. Ils lient également le TGF- β et peuvent donc moduler les effets biologiques de ce facteur de croissance [198].

1.5.3. Membrane basale

Les membranes basales (MB) sont des feuilles de MEC spécialisées qui séparent les couches de cellules épithéliales et endothéliales du stroma collagèneux [192;199]. La MB est produite et assemblée en coopération avec les cellules situées sur chaque côté d'elle. Les principaux composants de la MB incluent le collagène de type IV, la laminine, l'entacine/nidogène et les PGs sulfate d'héparan et de chondroïtine. Les PGs sont présents dans toutes les structures de la MB où ils peuvent fonctionner de façon charge-dépendante

comme un tamis moléculaire. Ils immobilisent les facteurs de croissance comme le FGF-2 et le VEGF, qui peuvent se lier au perlecan, le principal sulfate d'héparan de la MB [200]. D'autres composants, comme SPARC (*secreted protein, acidic and rich in cysteine*), la fibuline et les collagènes de types XV et XVIII ont également été trouvés en association avec la MB. La fibronectine est abondante dans les MBs à la période foetale.

Le collagène de type IV est une protéine trimérique (~540 kDa) composée de trois chaînes parallèles $\alpha(\text{IV})$, qui forment une structure en triple hélice partielle avec de nombreuses interruptions [199]. Six différentes chaînes ont été clonées ($\alpha 1(\text{IV})$ à $\alpha 6(\text{IV})$). Les chaînes $\alpha 1(\text{IV})$ et $\alpha 2(\text{IV})$ sont retrouvées dans la majorité des MBs, tandis que l'expression des chaînes $\alpha 3-6(\text{IV})$ est plus restreinte [201;202]. Le trimère le plus commun est l' $\alpha 1(\text{IV})_2\alpha 2(\text{IV})$. Les trimères de collagène de type IV peuvent s'assembler en un réseau tridimensionnel par trois types d'interactions [199;202]. Quatre molécules peuvent se lier l'une à l'autre au niveau du domaine N-terminal riche en cystéine (7S) pour former un tétramère, qui est joint à un réseau par une interaction dimérique entre les domaines C-terminal non collagèneux (NC1). Des associations latérales additionnelles de molécules de collagène aident à la formation de réseaux tridimensionnels irréguliers, qui sont stabilisés par des ponts disulfures et des liens covalents.

Les laminines sont un groupe de grosses glycoprotéines hétérodimériques (~400-900 kDa) formées de trois chaînes polypeptidiques distinctes : α , β et γ [203]. Au moins 12 différentes isoformes hétérodimériques de laminine, assemblées à partir de cinq chaînes α , trois chaînes β et trois chaînes γ ont été caractérisées avec différentes distributions tissulaires et différentes fonctions [204]. Comme le collagène de type IV, les laminines s'assemblent elles-mêmes par une interaction calcium-dépendante impliquant le domaine terminal de trois chaînes afin de former un réseau polymérique *in vitro* [199;202].

Les réseaux de collagène de type IV et laminine sont connectés à travers une diversité d'interactions. Par exemple, le nidogène est une glycoprotéine sulfatée (150 kDa) qui fait le pont entre ces molécules [204]. Il contient un site de liaison pour le motif de répétition pour l'EGF de la laminine de chaîne γ en C-terminal, qui est localisée près du centre du trimère de laminine et un site de liaison en N terminal pour le collagène de type IV. De plus, le perlecan contient des sites de liaison aussi bien pour le collagène de type IV et la laminine [205]. Le domaine NC1 des collagènes types XV et XVIII peut se lier au perlecan et au complexe laminine/nidogène [206].

La majorité des informations requises pour l'assemblage de molécules de la MEC de structure compliquée, incluant les fibrilles de collagène, le collagène de type IV et les réseaux de laminine, apparaît être intrinsèque aux molécules. Malgré tout, ces composants peuvent être induits à un auto-assemblage *in vitro* dans des systèmes sans cellules pour former des structures qui ressemblent à celles retrouvées *in vivo* [202]. Par contre, les intégrines de surface et les composants du cytosquelette peuvent contrôler la fibrillogenèse de la fibronectine [207], et dans les tissus, l'assemblage des constituants de la MB peut être régulé par des interactions cellulaires.

1.5.4. Interaction de la MEC et les CMLV

Le remodelage vasculaire affecte non seulement les cellules de la paroi vasculaire, mais entraîne également des changements très importants dans la composition de la MEC. Comme nous venons de le voir, la MEC est un réseau constitué de plusieurs protéines comme l'élastine, les collagènes de types I, III, IV, V, VI, la fibronectine, la thrombospondine, la ténacine, l'ostéopontine, la laminine et la vimentine [182]. La MEC est aussi un véritable réservoir de facteurs de croissance et de cytokines qui sont responsables de la modulation de la croissance cellulaire (par exemple, les héparines fixent le PDGF AA, le FGF, l'EGF et les IL-1, -2, -3 et -6 ; la fibronectine lie les différents TGF- β et les collagènes de type I et VI lient les PDGF AA/BB/AB, les IL-2 et -4, ainsi que le

TNF α et β) [182]. Des variations dans la composition de cette matrice sont impliquées dans le développement de l'HTA. En effet, la production de fibronectine semble être plus importante chez les SHR que chez les rats WKY âgés de 12 mois [208]. Une augmentation de la production du collagène par rapport à l'élastine a été observée au niveau des petites artères mésentériques de jeunes SHR (10 semaines) et adultes (20 semaines) comparativement aux rats WKY des mêmes âges [4;5]. L'augmentation du ratio collagène : élastine a été corrigée par certains agents antihypertenseurs tels que les IECA et les ARA, suggérant que l'Ang II joue un rôle dans le dépôt du collagène dans l'HTA [4;5]. Le ratio collagène : élastine est un bon indice du degré d'élasticité du vaisseau, puisqu'il nous renseigne sur la quantité relative d'un composant fibrillaire/composant élastique. Une augmentation de la production de la fibronectine a été également observée au niveau des CMLV des rats infusés avec l'Ang II [209]. Cette augmentation semble être médiée par le récepteur AT_1 de façon dépendante de la PKC et des tyrosines kinases [210].

1.5.5. Remodelage de la MEC

La coordination de la dégradation de la MEC est impliquée dans des processus physiologiques de remodelage tissulaire variés tels que la morphogenèse et la croissance tissulaire, l'angiogenèse, l'implantation du trophoblaste, le remodelage osseux, la cicatrisation et la réduction de la taille de l'utérus post-partum et de la glande mammaire post-lactation [211]. La déficience ou l'excès de protéolyse sont associés avec un bon nombre de conditions pathologiques comme l'arthrite, la périodontite, l'ulcération chronique et la sclérodermie [211]. Pendant l'invasion tumorale, les cellules néoplasiques utilisent des mécanismes protéolytiques et invasifs de façon contrôlée, mais anormalement régulée pour permettre l'attachement cellulaire, localiser la dégradation de la MEC et la migration à travers la barrière digérée.

Le remodelage de la MEC différenciée de plusieurs organes et des régions subépithéliales ou subendothéliales ou de la membrane basale est dépendant de l'action concertée de

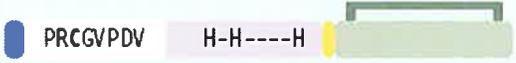
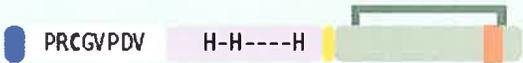
plusieurs protéinases de différentes familles de protéinases. Les protéinases sont classifiées soit en exopeptidases ou en endopeptidases, selon le site de clivage terminal ou interne de la protéine cible [212]. Les endopeptidases sont divisées en les classes majeures soit sérine, cystéine, aspartique et métalloprotéinase basé selon les séquences d'acide aminé et des cofacteurs déterminant leur mécanisme ou leur activité catalytique. La superfamille des metzincines est distinguée par un motif hautement conservé, contenant trois résidus histidines qui lient un atome de zinc au niveau de leur site catalytique et ont également un résidu méthionine qui est située en dessous de site actif contenant l'atome de zinc. La famille des metzincins est subdivisée en quatre familles, les serralysines, astacines, ADAMs/adamalsines et les métalloprotéinases de la matrice (MMPs). Les MMPs forment donc une des quatre sous-familles au-delà des metzincins, duquel est l'une des principales de la superfamille des métalloprotéinases.MMPs.

1.6. Les métalloprotéinases de la matrice

La famille des MMPs consiste actuellement en 26 enzymes distinctes, mais apparentées structurellement, des vertébrés et 21 sont des homologues caractérisés chez l'homme, avec en commun, une spécificité partielle pour certains substrats (Tableau 3) [212]. Ce sont des endopeptidases neutres dépendantes du zinc, desquels l'activation requiert le clivage du pro-peptide en N-terminal (Figure 6). La principale fonction des MMPs est de remodeler et dégrader les différentes protéines de la MEC et les protéoglycans. Cependant, des études récentes suggèrent différents rôles pour ces enzymes. Par exemple, les MMPs peuvent cliver et donc moduler l'assemblage et l'activité membranaire ou la MEC liée aux précurseurs des cytokines, chimiokines, facteurs de croissance, récepteurs d'hormones, protéines liant les facteurs de croissance et les inhibiteurs de protéinases [211;212]. L'activité des MMPs est régulée par divers mécanismes au niveau de la transcription des gènes, la stabilité des ARNm, la sécrétion et la liaison de l'enzyme, l'activation des

zymogènes et l'inhibition par des inhibiteurs endogènes pour permettre une protéolyse précise durant le remodelage tissulaire normal (Figure 7) [212]. L'activité dé-régulée des MMPs est caractéristique d'un bon nombre de conditions pathologiques telles que l'ulcération chronique, la périodontite, les maladies cardiovasculaires et les cancers.

Les MMPs peuvent être divisés en sous-groupes, en se basant sur des critères structuraux et fonctionnels (Figure 6). Elles sont autant des protéines solubles ou des protéines membranaires ancrées à la membrane cellulaire par un domaine transmembranaire de type I ou de type II ou par un ancrage de type glycosyl-phosphatidyl inositol (GPI). Les MMPs solubles sécrétées ont été classifiées dans plusieurs sous-groupes comme les collagénases, qui peuvent dégrader les collagènes fibrillaires, les gélatinases, qui ont une haute activité contre la gélatine et le collagène de type IV ainsi que les stromelysines, les matrilysines et autres MMPs, qui peuvent dégrader une variété de composants de la MEC. Les MMPs qui sont ancrées à la membrane forment le groupe des MMPs ancrées à la membrane (MT-MMPs).

Classe	Numérotation	Structure
Matrilysines	MMP7 (matrilysine-1) MMP26 (matrilysine-2)	
Collagénases interstitielles	MMP1 (collagénase interstitielle) MMP8 (collagénase neutrophile) MMP13 (collagénase-3)	
Stromélysines	MMP3 (stromélysine-1) MMP10 (stromélysine-2) MMP11 (stromélysine-3)	
Gélatinases	MMP2 (gélatinase-A) MMP9 (gélatinase-B)	
Métallo-protéinases de type membranaire	MMP14, MMP15, MMP16, MMP17, MMP24 et MMP25 (de MT1-MMP à MT6-MMP)	
Autres	MMP12 (métallo-élastase), MMP18, MMP19, MMP20 (énamélysine), MMP21, MMP22, MMP23a/b, MMP27, MMP28	

 Pré-domaine

 Séquence analogue à la fibronectine

 Domaine catalytique avec 3 résidus histidine (H)

 Site hydrophobe transmembranaire

 Région charnière riche en proline

 Domaine homologue de l'hémopexine

Figure 7. Structure et sous-groupes des MMPs. [213]

1.6.1. Collagénases

Les collagénases-1, -2 et -3 (MMP-1, MMP-8 et MMP-13, respectivement) sont les principales protéinases neutres sécrétées, qui peuvent initier la dégradation d'hélices natives du collagène fibrillaire [214]. Le domaine hémopexine de ces MMPs est essentiel

pour une liaison spécifique et le clivage de ce substrat [215]. Ces trois collagénases peuvent cliver le site spécifique (Gly⁷⁷⁵-Ile/Leu⁷⁷⁶) situé à chaque chaîne α de la molécule de collagène trimérique. Les fragments résultants $\frac{3}{4}$ N-terminal et $\frac{1}{4}$ C-terminal sont spontanément dénaturés à 37 °C en gélatine, lequel peut être dégradé davantage par d'autres protéinases. Trois collagénases ont des activités en chevauchement sur les collagènes fibrillaires de type I, II et III, mais leurs préférences pour les substrats sont différentes. La MMP-1 montre la plus haute efficacité catalytique contre le collagène de type III, relativement au collagène de type I, tandis que la MMP-8 a la préférence inverse et la MMP-13 préfère cliver le collagène de type II. La MMP-13 montre également une plus haute activité gélatinase et a une spécificité plus vaste pour les substrats que les MMPs-1 et -8. Les MT-MMPs [216] et la MMP-2 [217] sont également capable de dégrader les collagènes fibrillaire en fragments $\frac{3}{4}$ et $\frac{1}{4}$.

La MMP-1 fut la première MMP à être découverte sur la base de son activité dans la queue du têtard en métamorphose [218]. Elle a également été la première MMP à être purifiée de façon homogène [219] et à être clonée sous forme d'ADNc [220]. Les fibroblastes de plusieurs origines, les chondrocytes, les ostéoblastes, les cellules endothéliales, les kératinocytes, les hépatocytes, les macrophages et monocytes, les éosinophiles et les cellules tumorales sécrètent la MMP-1 *in vitro* [214]. La MMP-8 est synthétisée par les cellules leucocytaires polymorphonuclées durant leur maturation dans la moelle osseuse, emmagasinée dans les granules intracellulaires et relarguée en réponse à des stimuli externes [221]. En plus, les chondrocytes, les fibroblastes synoviaux, les fibroblastes gingivaux, les cellules épithéliales bronchiques, les cellules du mélanome, expriment la MMP-8 [222]. La MMP-13 est exprimée durant le développement foetal des os, le remodelage post-natal des os et la réparation cicatricielle des gencives [223]. De plus, l'expression de la MMP-13 a été associée à des conditions pathologiques comme l'inflammation sévère chronique et l'invasion de tumeurs malignes [224].

1.6.2. Gélatinases

La MMP-2 (gélatinase A ou gélatinase de 72 kDa) et la MMP-9 (gélatinase B ou gélatinase de 92 kDa) diffèrent des autres MMPs en contenant trois suites de répétitions qui sont homologues à la répétition de type II du domaine liant le collagène et la fibronectine [225]. Ces domaines sont requis pour les gélatinases, afin qu'elles puissent se lier et cliver le collagène [226] et l'élastine [227] (Tableau 3). Le domaine hémapexine n'effecte pas la liaison de la MMP-2 au collagène [228], mais comme pour les collagénases, il est crucial pour le clivage initial de la triple hélice du collagène de type I. La région charnière de la MMP-9 contient un site additionnel inséré « *collagène-like* » de type V [229]. Contrairement à d'autres MMPs, les pro-enzymes des MMP-2 et -9 peuvent lier les TIMP-2 et -1 [230].

Un large spectre de cellules normales et transformées d'origines fibroblastique, endothéliale et épithéliale expriment constitutivement la MMP-2 [225;231-234]. Durant le développement, elle est largement exprimée par les cellules stromales [235]. L'expression de la MMP-9 est plus restreinte et est souvent très faible dans les tissus normaux, mais elle peut être induite lorsque le remodelage tissulaire survient durant le développement, la cicatrisation et l'invasion de métastases tumorales. La MMP-9 est sécrétée par les macrophages alvéolaires, les leucocytes polymorphonucléés, les kératinocytes et les trophoblastes invasifs ainsi que par plusieurs lignées de cellules transformées, mais pas par les cellules fibroblastiques [233;236]. *In vitro*, les deux gélatinases peuvent dégrader une variété de protéines, mais les substrats *in vivo* sont largement inconnus [211]. Basé sur leur habilité à dégrader le collagène de type IV et la laminine, les principaux composants de la membrane basale et la corrélation entre le niveau d'expression et l'activité de la MMP-2 et le potentiel invasif de certaines cellules cancéreuses, les gélatinases et spécialement la MMP-2 a été suggérée pour dégrader les composants de la membrane basale *in vivo* [192]. Les deux gélatinases peuvent également dégrader efficacement le collagène partiellement dénaturé de tous les genres génétiques, suivant le clivage initial par les collagénases [237].

La MMP-2, mais pas la MMP-9 clive sélectivement la chaîne $\gamma 2$ de la laminine 5 et promouvoit la migration cellulaire dans un modèle de cellules épithéliales mammaires [238]. Il a été suggéré que la MMP-9 affecte l'angiogenèse en relarguant le VEGF lié à la MEC [239]. L'inhibiteur des protéinases ($\alpha 1$ -PI) est un substrat *in vivo* pour la MMP-9 dans les cloques de la peau [240]. Finalement, il a été démontré que les gélatinases (MMP-2 et -9) [241], comme d'autres MMPs (MMP-3 et -7) [242;243], sont impliquées dans le clivage du pro-HB-EGF en HB-EGF actif, pouvant ainsi transactiver le récepteur à l'EGF et participer aux effets médiés par la stimulation à l'Ang II.

Enzyme	MMP-	Substrat de la MEC	Autres substrats
Gélatinases			
Gélatinase A	2	Collagènes (I, II, III, IV, V, VII, X, XI), gélatine, élastine, tenascine, fibronectine, vitronectine, laminine, entactine, SPARC, agrécane, « link protein », galectine-3, versicane, décorine, protéine de base de la myéline	$\alpha 1$ -PI, $\alpha 2$ -macroglobuline, $\alpha 1$ -antichymotrypsine, IL-1 β , proTNF- α , IGFBP-3, IGFBP-5, substance P, amyloïde sérique A, TGF- β latent, MCP-3, FGFR1, « big » enthothéline-1, plasminogène
Gélatinase B	9	Collagènes (IV, V, XI, XIV), gélatine, élastine, vitronectine, laminine, galectine-3, SPARC, agrécane, « link protein », versicane, décorine, protéine de base de la myéline	$\alpha 2$ -macroglobuline, ovostatine, $\alpha 1$ -PI, IL-1 β , proTNF- α , substance P, caséine, transférine, carboxyméthylée, angiotensine-I et II, plasminogène, pro-TGF- $\beta 2$, IL-2R α , libération du VEGF (substrat inconnu)

Tableau 3. Différents substrats des gélatinases A et B.

1.6.3. Stromélysines, matrilysines et autres MMPs

Les stromélysines incluent la stromélysine-1, -2 et -3 (MMP-3, MMP-10 et la MMP-11, respectivement). Les matrilysines-1 et -2 (MMP-7 et MMP-26, respectivement) et la métalloélastase (MMP-12) sont d'autres MMPs qui ont une vaste spécificité pour les substrats. Les matrilysines sont les plus petites MMPs (~28 kDa) qui ne contiennent pas le domaine homologue à l'hémopexine présent sur les autres MMPs. La structure et les domaines des stromélysines ressemblent à celles des collagénases. Cependant, ils sont incapables de dégrader le collagène fibrillaire. La stromélysine-3 est inactive contre plusieurs composants de la MEC, malgré cela, elle peut cliver les inhibiteurs de protéases α 2-macroglobuline et α 1-PI [244] ainsi que la protéine liant l'insuline (IGF-BPs) [245]. Elles diffèrent également de la majorité des MMPs sécrétées en ayant une séquence de reconnaissance des proprotéines convertases entre les domaines pro- et catalytique. Quelques MMPs plus récemment caractérisées incluant la CA-MMP (MMP-23) et l'épilyisine (MMP-28) contiennent également des insertions avec une séquence similaire [212;246].

1.6.4. Les MMPs de type membranaire

La découverte que les membranes plasmiques provenant de cellules tumorales variées contenant des activateurs de proMMP-2 sensibles aux inhibiteurs des MMPs ont premièrement suggéré l'existence de MMPs liées à la membrane [247]. Sato et coll. [248] ont cloné l'ADNc de la MT1-MMP (MMP-14), codant pour une protéine transmembranaire de type I de 63 kDa qui peut activer la proMMP-2 et permettre l'invasion cellulaire. Jusqu'à présent, six ADNc de MT-MMPs ont été clonés. Le produit de la traduction de ces gènes ont été nommés MT-MMPs-2, -3, -4, -5 et -6, et CA-MMP (MMP-14, -15, -16, -17, -24, -25 et -23, respectivement) [212;246;249]. Les MT-MMPs ont récemment gagné une attention considérable, en partie parce qu'il a été démontré qu'il y avait plusieurs anomalies associées à l'inactivation de ce gène chez la souris, en opposition des phénotypes des souris déficientes en MMPs sécrétoires [250]. La MT1-MMP est également

plus active pour dégrader la MEC et promouvoir l'invasion cellulaire dans les modèles expérimentaux que les formes solubles ou les MMPs sécrétoires, soulignant l'importance de la localisation à la surface et la régulation cellulaire de ces enzymes [251].

La MMP-23 diffère de toutes les autres MMPs caractérisées en ayant un domaine unique riche en cystéine, riche en proline et un domaine similaire au récepteur de type II de l'IL-1, au lieu d'un domaine homologue à l'hémopexine [212;246]. Elle contient également un pro-domaine atypique en N-terminal qui ne contient plus la séquence conservée « commutation de cystéine », mais contient une région potentielle transmembranaire. Un seul clivage protéolytique entre les pro-domaines et le domaine catalytique par la furine, active la pro-enzyme et la relargue du même coup sous une forme soluble activée [252].

1.6.5. Activation des zymogènes des MMPs

Toutes les MMPs sont synthétisées comme zymogènes latents contenant un pro-domaine (pro-peptide) globulaire ~10 kDa au niveau amino-terminal qui s'insère dans le site actif de l'enzyme et maintient sa latence [253]. Un lien cystéine-zinc lie le résidu cystéine du pro-domaine à l'atome de zinc au site catalytique, prévenant l'accès d'une molécule d'eau, qui est nécessaire à la catalyse [254]. La séquence qui entoure le résidu cystéine du pro-domaine, (K)PRCGV/NPD(V), et la séquence qui lie l'atome de zinc dans le domaine catalytique, HEXGHXXGXXH, sont les deux séquences les mieux conservées dans les MMPs [212]. L'activation des pro-MMPs solubles peut être fait *in vitro* par des détergents, des agents chaotropiques, des agents oxydants, des produits contenant du mercure, des réactifs sulfhydryl, un pH acide, qui expose le pro-domaine cystéine à un changement conformationnel et cause la dissociation du lien cystéine-zinc (appelé : « *cystein switch* » ou commutation de la cystéine) [255]. De plus, le clivage du pro-domaine par une variété de sérine, cystéine et métalloprotéinases mène à un changement de conformation « dépliage » et l'exposition de la partie résiduelle du pro-peptide et la dissociation du lien cystéine-zinc. Le clivage initial survient habituellement dans la partie flexible exposée des boucles α I- α II

qui est suivie par une série de clivage auto-catalytiques menant à la génération de l'enzyme sous sa forme active mature.

Dans la majorité des cas, l'activation protéolytique des pro-MMPs se produit au niveau extracellulaire. Puisque plusieurs enzymes solubles peuvent activer la majorité des MMPs sécrétées, *in vivo* leur disponibilité peut être aussi important que le type d'enzyme qui peut les activer [256]. Le manque d'activation de plusieurs MMPs (MMP-3, MMP-9, MMP-12 et MMP-13) dans les macrophages des souris déficientes en uPA, suggère un important rôle de l'activateur du plasminogène à la surface cellulaire sur l'activation de quelques MMPs sécrétées *in vivo* [257].

La caractérisation de l'activation constitutive intracellulaire de la pro-stromelysine-3 (MMP-11) par la furine, une endopeptidase associée au Golgi, décrit un nouveau mécanisme d'activation des MMPs [258]. Une séquence RXXKKR est présente dans le pro-domaine et a montré permettre le clivage, ce qui a été démontré par mutagenèse dirigée, par délétion de mutants et la commutation de cette région pour la MMP-1, où elle cause également l'activation intracellulaire de cette MMP. Toutes les MT-MMPs contiennent une séquence similaire de reconnaissance (RXX/RR) au niveau de l'extrémité C-terminal du pro-domaine, et ces MMPs apparaissent comme étant activées durant leur transport à la surface cellulaire. En effet, co-exprimée avec la furine intracellulaire, la furine active la MT1-MMP tronquée qui n'a pas de domaine cytoplasmique transmembranaire. Un inhibiteur irréversible de la furine, le mutant Pittsburgh de l' α 1-PI prévient cette activation [259]. La MT1-MMP soluble peut également être activée par la plasmine. Cependant, le clivage initial par la plasmine survient après la séquence RRK qui, après le traitement (*processing*), mène seulement partiellement au même N-terminal que la MT1-MMP activée de type sauvage [260]. En plus, l'ajout extracellulaire d'inhibiteurs de sérine protéinases n'apparaît avoir aucun effet sur l'activité de la MT1-MMP. De plus, le traitement de cellules fibroblastiques ou de fibrosarcome humains tout comme plusieurs

cellules de mélanome avec l'inhibiteur synthétique de la furine Dec-RVKR-CH₂Cl inhibe le traitement de la pleine longueur de la MT1-MMP et l'activation de la MMP-2 [261] Yana et Weiss décrivent des voies dépendantes et indépendantes de la furine pour le traitement de la MT1-MMP, qui ont été affectées par l'attachement de l'enzyme à la membrane [262]. Ils ont également identifiés des motifs basiques comme substrats potentiels des pro-protéines convertases dans le pro-domaine de la MT1-MMP. La MT3-MMP est également activée par la furine dans le réseau du trans-Golgi des cellules MDCK [263]. Cependant, la régulation potentiellement cellule spécifique de l'activation des MT-MMPs par différentes pro-protéines convertases semblables à la furine durant certains événements qui ne sont pas bien caractérisés concernant les voies d'acheminement du réticulum endoplasmique à la surface cellulaire est encore mal compris. De plus, Cao et coll., [264] se sont questionnés sur la réelle nécessité de ce clivage protéolytique et l'enlèvement du pro-domaine. En fait, ils ont suggéré que le pro-domaine est requis pour la liaison de TIMP-2 au domaine catalytique ainsi que pour l'activité catalytique de la MT1-MMP [264]. Une explication possible pour la nécessité du pro-domaine peut être sa fonction de chaperone qui est essentielle pour le repliement et l'acheminement de l'enzyme [264]. Cette fonction est dépendante de la séquence conservée Y⁴²GYL⁴⁵ dans le domaine du pro-peptide [265]. Le niveau d'activité catalytique de la MMP obtenue par le changement conformationnel sans l'enlèvement du pro-domaine n'est présentement pas clair [266].

Toutes les évidences acquises jusqu'à ce jour indiquent que les principaux facteurs qui agissent sur le remodelage vasculaire, l'hémodynamie, le dommage vasculaire, l'inflammation et le stress oxydant, régulent aussi l'expression et l'activation des MMPs. De plus, il est important de mettre l'accent sur la distinction entre la régulation de l'expression des gènes des MMPs et la régulation de l'activité enzymatique de ces dernières. Celui-ci est un détail qui n'est que très peu clairement mentionné dans la majorité des études qui portent sur l'implication des MMPs dans le remodelage vasculaire et pourtant l'activité des MMPs est davantage relié aux effets biologiques des enzymes.

L'élévation de la pression transmurale *ex vivo* dans les artères de porc, induit la dégradation de la MEC par les gélatinases MMP-2 et -9 [267], suggérant que les MMPs sont impliquées dans le remodelage vasculaire associé à l'HTA. Des changements hémodynamiques sont connus pour être d'importants régulateurs des MMP-2 et -9 dans les greffes de veines saphènes au niveau des carotides chez le porc [268]. Il a également été suggéré que le NO pouvait avoir un rôle à jouer dans la modulation de l'expression des MMPs [269]. *In vitro*, le transfert du gène de la NOS endothéliale dans les CMLV a démontré diminuer l'expression des MMP-2 et -9. Cependant, il est devenu évident que les effets biologiques du NO peuvent être modifiés en présence des DRO et endommager les vaisseaux par des cellules inflammatoires infiltrantes [270]. De plus, la production simultanée de NO et d'ions superoxyde génère des peroxynitrites, qui ont été démontrés pour activer les MMPs latentes [271] et dégrader TIMP-1 [272]. En conséquence, dans les conditions normales de production de NO dans les vaisseaux intègres, ce phénomène peut aider à garder l'expression et l'activité des MMPs en équilibre avec les inhibiteurs endogènes. En contrepartie, dans les vaisseaux endommagés, la production de réactions secondaires avec le NO peut perturber la balance MMP/TIMP en faveur d'une dégradation de la MEC. D'autres dérivés réactifs comme le peroxyde d'hydrogène, qui peut être généré à partir de l'action de dismutases, peut également moduler l'activité des MMPs [271]. Les cellules inflammatoires sont d'importantes sources de MMPs et d'autres protéases, comme les cathepsines, qui dégradent la matrice vasculaire. Finalement, les macrophages activés peuvent aussi sécréter des cytokines qui augmentent l'expression des MMPs dans les cellules vasculaires [273;274].

<i>MMP</i>	<i>Espèce</i>	<i>Type de cellules</i>	<i>Localisation</i>	<i>Stimulus</i>
MMP-1 (collagénase interstitielle)	Homme	CMLV	<i>In vitro</i>	TNF- α et IL-1
	Homme	Cellule spumeuse, CMLV	Surexpression dans le coude d'une plaque de la carotide	TNF- α et IL-1
	Homme	CMLV, CE	Plaque carotide	...
	Homme	Macrophage	<i>In vitro</i>	...
	Homme	Macrophage	Plaque carotide	...
	Homme	CE	Aorte, veine ombilicale	LDL-ox
	Homme	Macrophage	Carotide	Dégranulation de mastocyte
	Lapin	Cellule spumeuse	Lésion expérimentale	...
	Lapin	Macrophage	Lésion expérimentale	Hypercholestérolémie
	Rat	Macrophage	Lésion expérimentale	Hypercholestérolémie
MMP-2 (gélatinase 72 kDa, gélatinase A)	Homme	CMLV	<i>In vitro</i>	...
	Homme	Cellule spumeuse, CMLV	Carotide normale	...
	Homme	Macrophage	<i>In vitro</i>	...
	Homme	...	Niveau plasmatique, syndrome coronarien aiguë	...
	Homme	CMLV	Anévrisme aortique abdominal	...
	Homme	...	Anévrisme cérébral	...
	Homme, Lapin, Porc	CMLV	<i>In vitro</i>	Thrombine
	Lapin	...	Veine saphéine greffée dans carotide	Haut débit
	Porc	...	Carotide	Pression transmurale élevée
	Lapin	Cellule spumeuse	Lésion expérimentale	...
MMP-3 (stromelysine-1)	Lapin	Cellule spumeuse	<i>In vitro</i>	DRO
	Lapin	Cellule spumeuse	Lésion expérimentale	Hypercholestérolémie
	Lapin	Cellule spumeuse	Carotide	Angioplastie et bas débit
	Lapin	...	Carotide	Angioplastie
	Rat	...	Lésion expérimentale	Hypercholestérolémie
	Rat	Macrophage	<i>In vitro</i>	TNF- α et IL-1
	Homme	CMLV	Surexpression dans le coude d'une plaque de la carotide	TNF- α et IL-1
	Homme	Cellule spumeuse	Carotide	Dégranulation de mastocyte
	Homme	Macrophage	Lésion expérimentale de l'aorte	...
	Lapin	Cellule spumeuse	Lésion expérimentale	Hypercholestérolémie
MMP-7 (matrilysine)	Lapin	Macrophage	Lésion expérimentale	Hypercholestérolémie
	Rat	Macrophage	<i>In vitro</i>	Plasmine
	Souris	Macrophage	Carotide	...
	Homme	Cellule spumeuse	Lésion expérimentale	Hypercholestérolémie
MMP-9 (gélatinase 92 kDa, gélatinase B)	Rat	Macrophage	<i>In vitro</i>	TNF- α et IL-1
	Homme	CMLV	Surexpression dans le coude d'une plaque de la carotide	TNF- α et IL-1
MMP-9 (gélatinase 92 kDa, gélatinase B)	Homme	Cellule spumeuse, CMLV	Surexpression dans le coude d'une plaque de la carotide	...
	Homme	Macrophage, CMLV	Athérectomie coronaire d'un patient souffrant d'angine instable	...
	Homme	Macrophage	<i>In vitro</i>	LDL-ox
	Homme	Monocyte (PBMC)	<i>In vitro</i>	LDL-ox

	Homme	...	Niveau plasmatique, syndrome coronarien aiguë	...
	Homme	CMLV	Anévrisme aortique abdominal	...
	Porc	CMLV	Veine saphéine greffée dans carotide	Débit élevé
	Porc	...	Carotide	Pression transmurale élevée
	Lapin	Cellule spumeuse	<i>In vitro</i>	DRO
	Lapin	Cellule spumeuse	<i>In vitro</i>	DRO
	Lapin	Cellule spumeuse	Lésion expérimentale	...
	Lapin	Macrophage	Lésion expérimentale	Hypercholestérolémie
	Rat	...	Carotide	Angioplastie
	Rat	Macrophage	Lésion expérimentale	Hypercholestérolémie
	Souris	...	Carotide	Cessation de débit
	Souris	...	Aorte	Hypercholestérolémie
	Souris	Macrophage	<i>In vitro</i>	Plasmine
MMP-12 (métalloélastase)	Homme, recombinant	Macrophage	<i>In vitro</i>	...
	Souris	Macrophage	<i>In vitro</i>	Plasmine
MMP-13 (collagénase-3 interstitielle)	Homme	Macrophage	Carotide	...
	Souris	Macrophage	<i>In vitro</i>	Plasmine
MMP-14 (MT1-MMP)	Homme	Macrophage, CMLV	Carotide	TNF- α , IL-1 β , LDL-ox
	Homme	CE	<i>In vitro</i>	TNF- α , IL-1 α , IL-1 β , LDL-ox
	Homme	...	Anévrisme cérébral	...

Tableau 4: Expression vasculaire des MMPs [275].

1.6.6. Les inhibiteurs endogènes des MMPs

Les inhibiteurs endogènes comme les inhibiteurs tissulaires des metalloprotéinases et l' α_2 -macroglobuline (α_2 M) sérique peuvent inhiber les MMPs activées *in vivo*. L' α_2 M est un inhibiteur sérique abondant de plusieurs protéinases [276]. En plus, les thrombospondines peuvent inhiber l'activation des MMP-2 et -9 et induisent leur élimination par une endocytose médiée par un récepteur séquestrant [277]. De nouvelles évidences sur la régulation de la protéolyse à la surface des cellules ont été démontrées par la caractérisation de la glycoprotéine membranaire ancrée GPI RECK (*revision-inducing cysteine-rich protein with kazal motifs*), qui a montré une diminution de la régulation des MT1-MMP, MMP-2 et MMP-9 ainsi que de l'angiogenèse tumorale et la formation de métastases [278]. Les inhibiteurs spécifiques, les TIMPs, sont considérés comme étant des régulateurs clés des MMPs, localement dans les tissus. La famille des TIMPs consiste chez l'homme, de quatre TIMPs : TIMP-1, -2, -3 et -4, qui partagent 30 à 50% d'identité au niveau de leur

séquence (Tableau 5) [279-281]. Ils sont composés de domaines N- et C-terminal, qui sont tous deux stabilisés par trois ponts disulfure entre six résidues cystéines conservés [254;282]. L'élimination du domaine C-terminal n'a que des effets mineurs sur l'inhibition des MMPs par les domaines N-terminaux des TIMPs [283;284]. Ce plus grand domaine N-terminal se plie en forme de cylindre- β , similaire à certaines protéines liant l'ADN et se liant aux oligonucléotides/oligosaccharides [254;282]. Un étirement augmenté du segment N-terminal, important pour l'inhibition des MMPs, se lie au corps du cylindre par deux ponts disulfure. Le plus petit domaine C-terminal contient des motifs parallèles de boucle en épingle à cheveux- β torsadées et une β -boucle- β . Les hélices- α des domaines N- et C-terminaux forment un centre en hélice de la protéine et le dernier résidu C-terminal acide forme une queue flexible à la surface du TIMP [282].

Inhibiteur	Taille	Glycosylation	Solubilité	Liaison aux Pro-MMPs	Inhibition de la MT1-MMP/activation de la pro-MMP-2	L'expression du gène est augmenté par
TIMP-1	28 kDa (184 aa)	Oui	Soluble	Pro-MMP-9	Non / non	TGF- β ; FGF-2; EGF; TNF- α ; PDGF; IL-1, -6; PMA; acide rétinoïque; progestérone; oncostatine M
TIMP-2	21 kDa (194 aa)	Non	Soluble	Pro-MMP-2	Oui / oui	AMPc; LPS; acide rétinoïque; progestérone
TIMP-3	21-24 kDa (188 aa)	Oui	Lié à la MEC	Pro-MMP-2 Pro-MMP-9	Oui / non	TGF- β ; PMA
TIMP-4	22 kDa (195 aa)	Non	Soluble	Pro-MMP-2	Oui / non	?

Tableau 5. Inhibiteurs tissulaires des métalloprotéinases (TIMPs). Modifié à partir de (Henriet et coll., 1999, [285])

Toutes les TIMPs peuvent inhiber la majorité des MMPs par une liaison non-covalente à leur site actif dans un ratio stoïchiométrique de 1:1 [286]. Les MT-MMPs sont des exceptions, puisque TIMP-1 est un faible inhibiteur des MT1-, MT2-, MT3- et MT5-MMP [287;288]. En contrepartie, les MT4- et MT6-MMP sont efficacement inhibées par TIMP-1

[289;290]. Contrairement à d'autres MMPs, TIMP-3 est un bon inhibiteur des « *adamalysin-related metalloproteinases* » (ADAMs) [291]. Les TIMPs ont également différentes habiletés à former des complexes avec des pro-gélatinases par des interactions entre leur domaines carboxy-terminal et les domaines carboxy-terminal des pro-gélatinases similaire à l'hémopexine (Tableau 5) [230;292].

Les TIMPs sont reconnus comme étant principalement régulés au niveau de l'expression des gènes. Une variété de cellules en culture expriment TIMP-2, tandis que plusieurs facteurs de croissance et cytokines ainsi que des composés chimiques augmentent l'expression de TIMP-1 (Tableau 5) [286]. L'expression de TIMP-3 est induite dans des cellules en culture par la stimulation à l'aide de l'EGF et le TGF- β contenu dans le sérum. Contrairement à d'autres TIMPs, TIMP-3 est insoluble et se lie à la MEC autant *in vitro* qu'*in vivo*. De manière générale, les TIMPs sont très stables. Malgré tout, ils peuvent être inactivés par protéolyse par des sérine protéinases comme la trypsine et l'élastase [293;294]. Plus récemment, Maquoi et coll., [295] ont démontré que l'internalisation par un mécanisme dépendant de la MT1-MMP et une subséquente dégradation, diminuait TIMP-2 dans des cellules tumorales en culture.

Dues à leur habileté à inhiber la dégradation protéolytique requise pour l'invasion cellulaire, les TIMPs ont été identifiés comme des régulateurs négatifs de processus comme l'angiogénèse et l'invasion par le cancer [286]. De plus, TIMP-1 et TIMP-2 inhibent la migration des cellules endothéliales et des CMLV [296;297]. TIMP-2 réduit l'invasion de cellules de mélanome, la croissance des tumeurs et l'angiogénèse *in-vivo* [298]. TIMP-2 peut se fixer sur le site actif de MT1-MMP et sur le domaine PEX de MMP-2 pour former un complexe tri-moléculaire. Si cela se produit à proximité d'une autre molécule de MT1-MMP, la modification protéolytique du pro-fragment initie l'activation de MMP-2 (Figure 7). Cette protéine est donc à la fois inhibitrice et activatrice de la MMP-2. Les effets contradictoires du TIMP-2 reliés à la croissance tumorale et à l'apoptose ne peuvent

qu'ajouter au paradoxe du TIMP-2, reflétant ainsi notre manque de compréhension actuelle du système des MMPs et de leurs inhibiteurs [299]. MMP-2 peut ainsi se dissocier de la surface cellulaire et participer à la dégradation de la MEC, prérequis indispensable à l'infiltration des cellules endothéliales. La livraison de TIMP-3, médiée par des adénovirus, inhibe l'invasion de cellules de mélanome [300] et la surexpression de TIMP-4 inhibe l'invasion *in-vitro* de cellules de cancer du sein et la croissance des tumeurs, ainsi que la formation de métastases *in-vivo*. D'autres parts, TIMP-1, -2 et -3 stimulent la croissance de plusieurs types cellulaires [285]. TIMP-2 peut supprimer la signalisation mitogénique médiée par l'EGF [301], et TIMP-3 peut induire l'apoptose de cellules normales et malignes [300;302]. Des données récentes proposent l'implication des TIMPs dans des processus invasifs comme l'invasion placentaire [285].

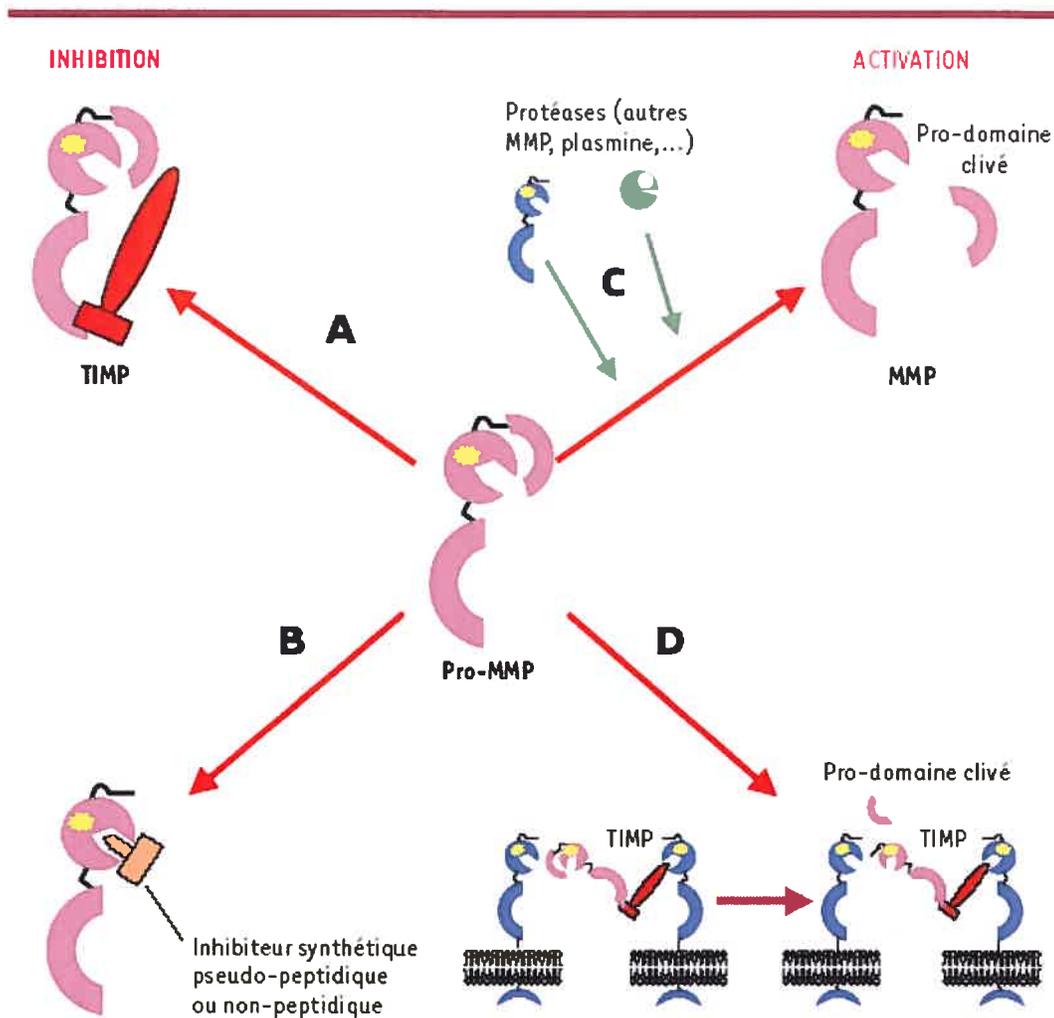


Figure 8. Mécanismes de régulation de l'activité des MMPs. Les MMPs sont inhibées par la formation d'un complexe équimolaire avec les TIMPs (A) ou par des inhibiteurs synthétiques pseudo-peptidiques ou non-peptidiques qui entrent en compétition au niveau du site catalytique avec le substrat naturel (B). Les MMPs sont aussi sécrétées sous forme de pro-enzyme et doivent être activées par clivage protéolytique du pro-domaine. Ce clivage se produit soit dans le milieu extracellulaire par l'action d'une autre MMP ou de la plasmine (C), soit à la surface cellulaire comme c'est le cas pour la pro-MMP2 (violet) qui est activée par la MT1-MMP (bleu) à laquelle elle se lie après avoir formé un complexe avec le TIMP-2 (rouge) (D) [213].

1.6.7. Les MMPs et le remodelage vasculaire

La formation de nouveaux vaisseaux sanguins à partir de vaisseaux existants (processus d'angiogenèse) est requise pour le développement des tissus et le processus de réparation et la croissance des tumeurs solides. Les MMPs contribuent à l'angiogenèse au moins de trois façons. Elles peuvent permettre la migration de cellules endothéliales à partir des tissus environnants en détruisant la barrière formée par la MEC. Elles peuvent favoriser ce processus par la libération de facteurs angiogéniques séquestrés ou elles peuvent défier ce processus en générant des produits de dégradation anti-angiogéniques. De plus, la balance entre les MMPs et leurs inhibiteurs doit être restaurée durant la maturation de vaisseaux sanguins nouvellement formés pour favoriser l'assemblage de la membrane basale et la différenciation ainsi que la quiescence des cellules endothéliales [303].

La fibrine insoluble est une des barrières que les cellules endothéliales angiogéniques doivent pénétrer durant la formation de nouveaux vaisseaux sanguins. Les MMPs produites par les cellules endothéliales sont requises pour le processus de néovascularisation de la fibrine à survenir en culture et *in vivo*, tandis que de façon surprenante, le système fibrinolytique plasminogène/activateur du plasminogène n'est pas requis [251]. De plus, la puissante fibrinolyse péricellulaire, MT1-MMP permet également à des cellules non-invasives de pénétrer les gels de fibrine et former des structures tubulaires. L'invasion et la tubulogenèse surviennent également en absence de MMP-2, mais sont bloquées par des inhibiteurs naturels ou synthétiques des MMPs et échouent à s'initier si une forme délétée transmembranaire de la MT1-MMP est exprimée au lieu de la forme associée à la membrane complète. C'est pourquoi les MMPs associées à la membrane jouent un rôle critique au niveau de l'angiogenèse, entre autres, de par leur activité fibrinolytique péricellulaire. Sans aucun doute, ils jouent également un rôle similaire pour permettre aux cellules endothéliales de traverser la barrière de MEC.

Durant le développement précoce de cancers solides, une commutation angiogénique « angiogenic switch » initie la formation de nouveaux vaisseaux sanguins, avant l'émergence de tumeurs invasives [304]. Une possibilité est qu'une variété de stimuli induit l'expression de gènes pro-angiogéniques qui activent par la suite cette commutation.

Il a été démontré que l'intégrine $\alpha_v\beta_3$, qui reconnaît le motif RGD de la vitronectine et autres molécules de la MEC, est hautement exprimée sur les cellules endothéliales angiogéniques et des anticorps ainsi que des peptides qui bloquent sa fonction, inhibe l'angiogénèse dans plusieurs modèles et systèmes [305]. De plus, le peu de souris déficientes en α_v qui survivent à terme, meurent rapidement avec de nombreuses anomalies vasculaires dans certains tissus. La liaison RGD-indépendante de la MMP-2 à l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ peut influencer l'angiogénèse en facilitant l'invasion vasculaire [306]. Cependant, les souris déficientes en MMP-2 n'ont pas montré de phénotype angiogénique, mais il a été démontré que ces souris démontraient moins d'angiogénèse induite par les tumeurs par rapport aux contrôles de type sauvage [307]. Parce que les sites RGD sont inaccessibles sur le collagène natif et qu'ils ne sont pas masqués suite au clivage dépendant des MMPs, la dégradation du collagène peut ne pas seulement enlever une barrière physique à l'invasion de cellules endothéliales, mais aussi favoriser la croissance médiée par l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ des cellules endothéliales et la migration de part la MEC dégradée. En faveur de cette hypothèse, la région hémapexine recombinante de la MMP-2 prévient la MMP-2 active de s'associer à l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ et inhibe l'angiogénèse en culture [308] et *in vivo* [309]. Un composé organique qui bloque la possibilité de l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ à lier la MMP-2 (mais pas la vitronectine) est également un puissant inhibiteur d'angiogénèse et de croissance tumorale *in vivo* [310]. Parce que ce composé n'apparaît pas altérer directement l'activation ou l'activité de la MMP-2, l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ peut influencer en partie l'angiogénèse en concentrant la MMP-2 à la surface cellulaire. Cependant, d'autres données indiquent que l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ favorise la maturation de la MMP-2 en une forme active suivant l'activation intermédiaire médiée par la MT1-MMP [311].

Les MMPs peuvent également réguler à la baisse l'angiogenèse en générant des peptides anti-angiogéniques. L'angiostatine est un produit de dégradation en N terminal du plasminogène qui peut être générée par les MMPs-2, 3, 7, 9 et 12 [312;313]; l'endostatine et la tumstatine sont des fragments protéiques anti-angiogénique provenant de portions C terminal des collagènes XVIII et IV, respectivement [314]; et le domaine hémapexine libre de la MMP-9 par lui-même peut agir comme un inhibiteur de l'angiogenèse [308], En plus, par le clivage du récepteur 1 du FGF, la MMP-2 génère une protéine circulante associée à la matrice qui module les puissants effets angiogéniques du FGF, en altérant sa disponibilité [315]. La perte du récepteur au FGF peut également réguler à la baisse la réponse au FGF de ces cellules qui ont perdu leurs récepteurs. Cependant, à ce jour, l'importance des MMPs dans la modulation à la baisse de l'angiogenèse est peu clair, par contre, ils sont clairement d'importants régulateurs de l'angiogenèse.

1.7. Les intégrines

Un des facteurs essentiels de l'organisation et de la cohésion tissulaire est représenté par les interactions entre les CMLV et la MEC. Ces interactions sont principalement médiées par des récepteurs transmembranaires hétéro-dimériques, les intégrines. Chaque hétérodimère est constitué d'une chaîne α et d'une chaîne β (Figure 8). Il y a au moins 17 sous-unités α et 8 sous-unités β différentes (Figure 9). Donc, plusieurs combinaisons de sous-unités α et β sont possibles, mais seulement quelques-une sont fonctionnelles. Les sous-unités α et β possèdent une extrémité N-terminale extracellulaire responsable de l'interaction avec le ligand et un domaine transmembranaire et un domaine cytosolique qui interagit avec les cytosquelettes et les protéines de signalisation intracellulaires [182;316]. L'extrémité N-terminale de la sous-unité α possède 3 à 4 sites de liaison des cations divalents (Ca^{2+} , Mg^{2+} et Mn^{2+}). Ces ions modulent l'interaction du ligand avec l'intégrine. Les intégrines interagissent avec des séquences spécifiques des composantes de la MEC telles que la

séquence Arg-Gly-Asp (RGD) retrouvée dans la laminine, le collagène de type I, l'ostéopontine et la fibronectine; et la séquence Leu-Asp-Val (LDV) retrouvée également dans la fibronectine et qui se fixe préférentiellement à l'intégrine $\alpha_5\beta_1$ [182]. La sous-unité β de l'intégrine est le site ciblé par plusieurs protéines cytosoliques aussi bien structurales que de signalisation. La chaîne α , responsable de la spécificité de la liaison avec son ligand, peut indifféremment se combiner avec plusieurs familles de chaînes β . En outre, un hétérodimère peut se lier avec différents ligands. De manière simplifiée, il est possible de différencier les intégrines impliquées dans les contacts cellule/cellule et celles impliquées dans les liaisons avec les protéines de la membrane basale.

Pour se lier à leur ligand, il est nécessaire que les deux sous-unités de l'intégrine soient associées selon des conformations très précises. Compte tenu de leur position transmembranaire, les intégrines jouent à la fois un rôle dans la transduction du signal de l'intérieur vers l'extérieur (« *inside-out* ») par exemple, lors de l'activation cellulaire par des cytokines et dans les modifications des composants extracellulaires qui vont induire des changements phénotypiques des cellules (« *outside-in* »). Il faut souligner la complexité des mécanismes mis en jeu au cours de ces deux phénomènes. Ces mécanismes font non seulement appel à la coopération des intégrines entre elles et avec des protéines liées à l'activation du cytosquelette (phosphorylation des tyrosines impliquées dans les points d'adhésion focaux), mais aussi à la coopération avec la structure tridimensionnelle des protéines de la MEC [317]. Les intégrines sont donc bien le lien entre la structure cellulaire, constituée du cytosquelette, et la MEC. Ces deux zones sont le siège de plusieurs remaniements affectés par les agents neuro-humoraux au niveau vasculaire. Les intégrines jouent un rôle crucial dans la transduction des signaux tels que la pression, l'étirement et la déformation de la MEC, vers les CMLV.

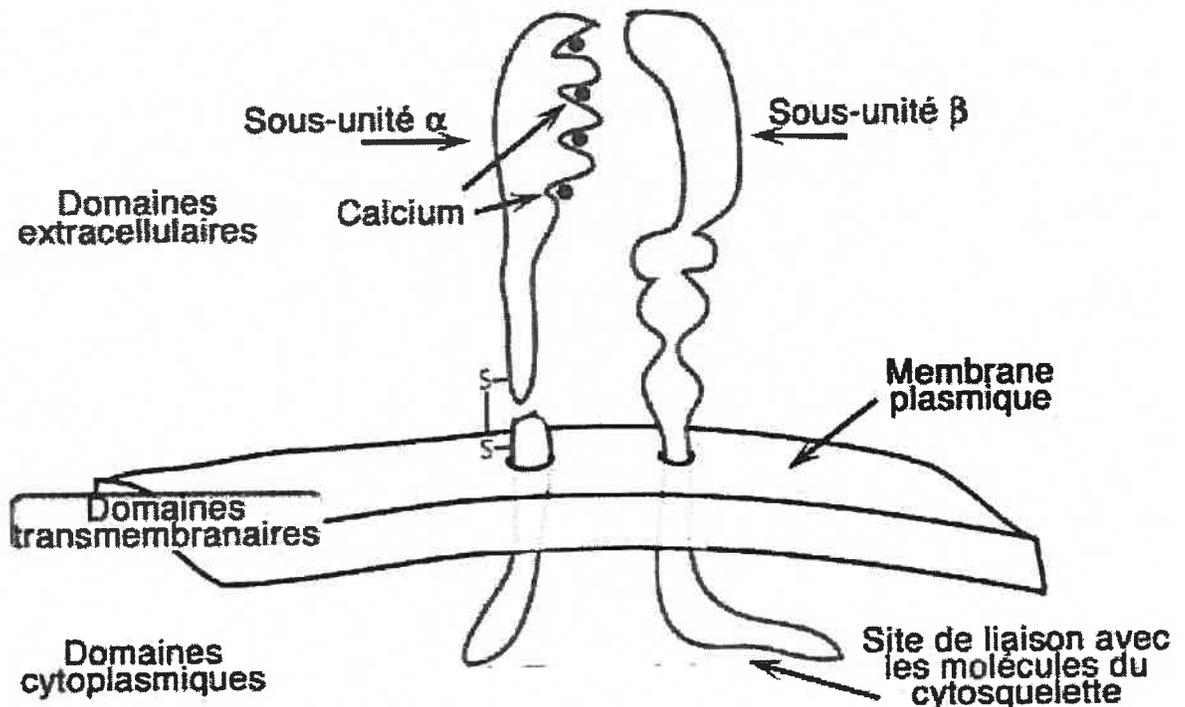


Figure 9. Structure hétérodimérique des intégrines.

L'activation des intégrines entraîne leur assemblage ainsi que le recrutement des protéines du cytosquelette à des zones spécialisées appelées zones d'adhésion focale. De plus, cette activation entraîne une augmentation de $[Ca^{2+}]_i$ et la phosphorylation d'une kinase étroitement liée à la zone d'adhésion focale, appelée FAK [318]. La FAK activée interagit avec plusieurs protéines, telles que la Src kinase, la paxilline, la LIM kinase (« *paxillin LIM domain-associated serine threonine kinase* ») et la Grb2 pour activer d'autres protéines telles que la $p130^{Cas}$, la PI3 Kinase et la Ras. Ces cascades enzymatiques aboutissent subséquentement à l'activation des MAPK [318;319]. La stimulation des CMLV avec l'Ang II entraîne une augmentation de la phosphorylation de la FAK, la paxilline, la LIM kinase et, par conséquent, une augmentation de la formation des zones d'adhésion focale [319].

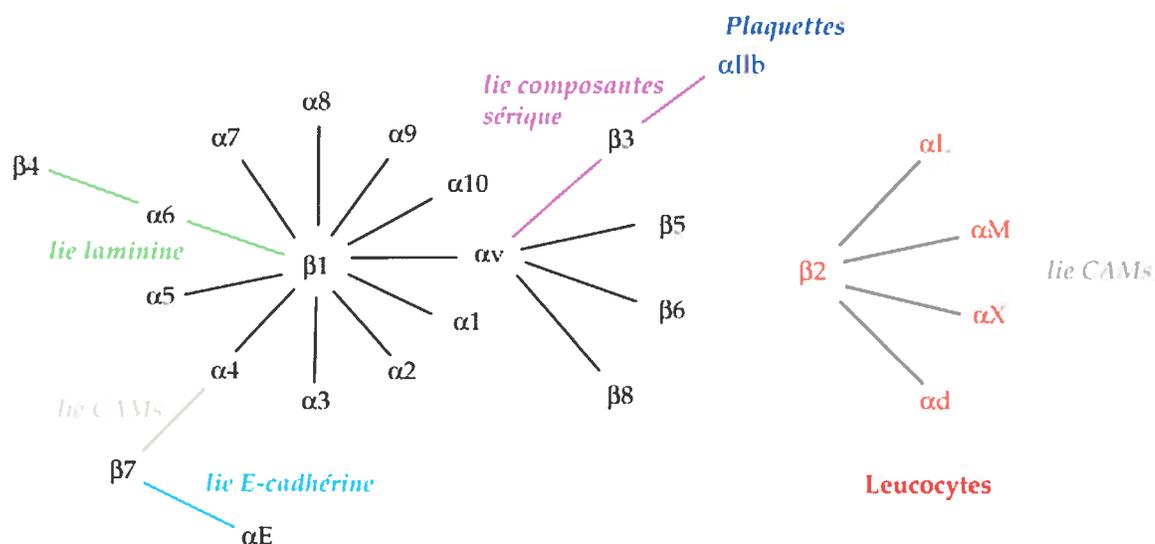


Figure 10. Les différents hétérodimères d'intégrines et leurs substrats.

Une relation étroite existe entre les différents constituants protéiques de la MEC, les intégrines et l'Ang II. En effet, chez les SHR, les CMLV surexpriment l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ et $\alpha_5\beta_1$ [5]. Parmi les ligands de l'intégrine $\alpha_v\beta_3$, il y a l'ostéopontine et la tenascine [320]. Ces composants de la MEC semblent être surexprimés au niveau des CMLV des artères méésentériques des rats infusés avec l'Ang II et au niveau des petits vaisseaux de SHR [321].

Il est vraisemblable que la composition de la MEC contrôle la croissance et la différenciation des CMLV. Hedin et coll. [322] ont observé que les CMLV mises en culture sur une matrice contenant de la fibronectine, contrairement à des CMLV mises en culture sur une matrice de laminine, acquièrent un phénotype prolifératif marqué par une augmentation de la formation de zones focales. De plus, une augmentation de l'incorporation de la thymidine tritiée a été observée au niveau des CMLV mises en culture sur une matrice de fibronectine suite à un stress d'étirement cyclique. Par contre, ce stimulus n'a aucun effet sur le phénotype de ces cellules mises en culture sur d'autres

composantes de la MEC telles que la laminine, l'élastine ou le collagène de type II [323]. L'inhibition du dépôt de fibronectine et, par conséquent, de l'assemblage de la fibronectine sous forme de fibres, par le peptide III₁-C, entraîne l'inhibition de la prolifération des CMLV de l'artère ombilicale humaine sans induire leur apoptose [324]. L'assemblage de la fibronectine est sous le contrôle de certaines formes d'intégrines, et par conséquent, ces dernières modulent la composition et la maturation de la MEC [325]. Ces données démontrent l'interaction critique qui existe entre les constituants de la MEC et les CMLV.

Ligands	Intégrines
Collagènes	$\alpha_1\beta_1, \alpha_3\beta_1$
Laminine	$\alpha_1\beta_1, \alpha_2\beta_2, \alpha_3\beta_1, \alpha_6\beta_1, \alpha_6\beta_4$
Fibronectine	$\alpha_3\beta_1, \alpha_4\beta_1, \alpha_5\beta_1, \alpha_8\beta_1$
Vitronectine	$\alpha_8\beta_1, \alpha_v\beta_1, \alpha_v\beta_3$
Tenascine	$\alpha_8\beta_1, \alpha_9\beta_1$
Thrombospondine	$\alpha_v\beta_3$

Tableau 6. Protéines d'adhésion et intégrines dans le muscle lisse vasculaire.

Les interactions entre les intégrines et certains récepteurs des facteurs de croissance par lesquels l'Ang II semble induire ses effets trophiques sur les CMLV ont également été rapportées. Contrairement à la laminine, les CMLV prolifèrent quand elles sont stimulées par l'Ang II et mises en culture sur une matrice de collagène ou de fibronectine. Ce phénomène est associé à une induction de l'expression des chaînes de PDGF de type A et à son effet autocrine sur les CMLV stimulées par l'Ang II [326]. Donc, l'effet autocrine du PDGF sur les CMLV stimulées par l'Ang II est facilité par la fibronectine et par le collagène. De plus, l'inhibition de l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ par le peptide RGD engendre l'inhibition de la migration des CMLV induite par le PDGF. Ceci est dû à l'inhibition de la Ca^{2+} /calmoduline kinase II [327]. L'activation de l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ entraîne une

augmentation de $[Ca^{2+}]_i$, en stimulant l'influx du Ca^{2+} du milieu extracellulaire sans activer la PLC. De plus, l'activation de l'intégrine $\alpha_5\beta_1$ induit également l'augmentation de $[Ca^{2+}]_i$ suite à l'ouverture des canaux calciques de type L voltage dépendants au niveau des CMLV [328].

Les études précitées suggèrent l'implication des intégrines dans la contraction des CMLV induite par l'Ang II. En effet, le peptide RGD inhibe la vasoconstriction des anneaux aortiques de rats induite par l'Ang II et par la noradrénaline [329]. De plus, ce peptide induit une relaxation soutenue des artères du muscle squelettique de rat de façon indépendante de l'endothélium [330]. Cette vasodilatation est médiée par l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ localisée au niveau des CMLV, puisqu'un pré-traitement des vaisseaux avec un anticorps dirigé contre la sous unité β_3 inhibe la vasodilatation induite par le peptide RGD [330]. Ce peptide a également permis de démontrer l'existence d'une vasoconstriction des mêmes artères par l'intégrine $\alpha_5\beta_1$ qui est dépendante d'un facteur endothélial, vraisemblablement l'endothéline-1 [331].

La présence de l'intégrine $\alpha_v\beta_3$, exprimée par les cellules en migration, a été mise en évidence dans des artères normales et athéroscléreuses. L'intégrine $\alpha_v\beta_3$ possède deux ligands préférentiels, la vitronectine et l'ostéopontine. La vitronectine, faiblement exprimée dans le média normal, est très présente dans les plaques. L'ostéopontine est exprimée très précocement après l'activation des CMLV [332]. De plus, l'ostéopontine étant une protéine soluble, agirait comme facteur occupant des intégrines de type RGD, enfin de réguler à la baisse les liens qu'elles feraient avec les autres composants fibrillaires de la MEC.

L'augmentation de l'isoforme E11A de la fibronectine et de son récepteur, l'intégrine $\alpha_5\beta_1$ spécifique du CMLV dans l'aorte abdominale du SHR, pourrait être la traduction d'un plus grand nombre d'attachements entre les cellules et la matrice et d'une réorganisation des fibres de collagène. Au plan mécanique, un grand nombre d'attachements entre les

différents composants d'une même structure lui confère une plus grande rigidité et une meilleure résistance aux sollicitations mécaniques. Par ailleurs, la fibronectine est associée à un processus de dédifférenciation cellulaire qui a également été retrouvé chez le SHR. Elle pourrait ainsi participer à l'adaptation des propriétés mécaniques artérielles du SHR par une augmentation du nombre d'attachements cellules-matrice et par des modifications phénotypiques des CMLV [208].

La microscopie électronique au niveau de l'aorte abdominale a permis d'observer une augmentation des connections des CMLV avec les lames élastiques au niveau des hémidesmosomes de la membrane plasmique [333]. Ces résultats montrent que le réseau d'élastine joue un rôle majeur dans l'adaptation mécanique de la paroi artérielle chez le SHR, non seulement par son contenu total au sein de la média, mais aussi par l'étendue de ses connections aux CMLV. Sur un plan strictement mécanique, l'augmentation des interactions cellule-matrice au sein de la média pourrait augmenter la résistance de la paroi en augmentant le seuil de contrainte maximale admissible. Des mécanismes conduisant à une nouvelle organisation des différentes zones d'adhésion focales pourraient contribuer à redistribuer les efforts au sein de la média et alléger le réseau de collagène d'une partie de sa charge [334].

Le remodelage de la paroi vasculaire résulte d'une série de changements dynamiques, fonctionnels et morphologiques qui surviennent durant le développement normal et dans la progression de plusieurs maladies vasculaires. Comme le remodelage nécessite le réarrangement de composants cellulaires et extracellulaires de la paroi vasculaire, les intégrines, des molécules qui permettent l'adhésion de ces composants, ont été impliquées dans plusieurs processus. Ces processus peuvent être divisés : 1- le dépôt, la rupture et les modifications structurales de la MEC, 2- la prolifération, l'apoptose, le changement de forme physique et des changements dans le phénotype des cellules vasculaires et 3- des changements dans les interactions entre les cellules et les composants de la MEC de la

paroi vasculaire. Cependant, il est important de reconnaître en premier lieu que les intégrines font partie d'un processus élaboré, impliquant un grand nombre de cytokines, l'action de forces mécaniques et une signalisation intracellulaire.

Afin d'adresser le processus impliqué dans le dépôt, la dégradation et les modifications structurales de la MEC, il faut d'abord reconnaître que toutes les cellules vasculaires participent à différents degrés, à la production, le recyclage et la formation de la matrice, ce qui donne un certain support aux composantes du vaisseau. Il existe de fortes évidences qui indiquent que les vaisseaux sanguins remodelent leur matrice en ajustant les propriétés mécaniques et cela en réponse à une lésion vasculaire, des hormones, des cytokines et des changements hémodynamiques.

Les intégrines paraissent être impliquées dans la perception des forces mécaniques et transforment ces signaux en une réponse cellulaire adaptative, qui incluse le remodelage de la MEC [335]. Dans cette optique, aussi tôt qu'en 1976, Leung et coll. [336] ont démontré que les CMLV poussaient sur des feuillets élastiques et étaient stimulées par des déformations cycliques qui augmentaient leur synthèse de collagène de type I et de type III. Donc les intégrines sont les meilleurs candidats pour être les mécanotransducteurs, capables de détecter des changements comme les stress et les déformations.

Les cellules de la paroi des vaisseaux sanguins contrôlent leur milieu extracellulaire, non seulement en produisant des protéines de la MEC, mais également par une production balancée de MMPs, de désintégrines et d'inhibiteurs de MMPs [337]. Ensemble, ces facteurs coordonnent la composition et la structure de la MEC de la paroi des vaisseaux. En plus de leur rôle comme stimulant de la production de MEC, les intégrines participent également dans le contrôle de la production de plusieurs MMPs. Le collagène de type VIII associé aux intégrines $\alpha_1\beta_1$ et $\alpha_2\beta_2$ stimulent l'expression et l'activité des MMP-2 et -9 dans les CMLV de la néointima [338], tandis que l'ostéopontine et la ténascine-C ont le

même effet lorsque liés à l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ [339;340]. L'intention apparaît être le remodelage conformationnel de la MEC et la dégradation de la matrice dans le but de favoriser la migration des cellules dans différentes régions de la paroi du vaisseau. Fait intéressant, le collagène de type VIII, l'ostéopontine et la ténascine-C sont des protéines de la MEC dont l'expression augmente après une lésion vasculaire, et tous ces composants ont été liés à la formation de néointima et leur capacité à induire ou être coexprimé avec les MMPs dans les CMLV.

Les intégrines $\alpha_v\beta_3$, $\alpha_1\beta_1$ et $\alpha_2\beta_1$ semblent jouer un rôle critique dans la régulation de la formation de la néointima, lorsque liés par des ligands spécifiques qui sont exprimés après une lésion vasculaire. Cependant, certaines questions demeurent toujours. Comment les intégrines reconnaissent-elles les différents ligands, et comment la liaison d'une même intégrine peut générer une réponse cellulaire différente?

Une partie des réponses peut dépendre des caractéristiques structurales des ligands se liant aux intégrines et à l'état d'activation des intégrines hétérodimériques, qui est reconnu pour modifier l'affinité des intégrines à leurs ligands [341;342]. Une autre possibilité est que différentes réponses cellulaires à une liaison d'une même intégrine peuvent en partie être médiées par différentes sous-unités des isoformes des intégrines qui ont des domaines cytoplasmiques variés, qui initient des voies de signalisation intracellulaire alternatives suite à l'activation de l'intégrine [343;344] ou initient des interactions entre les intégrines et des composantes de signalisation des récepteurs de facteurs de croissance pour interagir avec d'autres ligands.

En plus de réguler la synthèse, les intégrines ont été impliquées dans le réarrangement conformationnel et structural des protéines de la MEC. Les protéines de la MEC qui sont synthétisées et sécrétées par les cellules de la paroi vasculaire ont besoin d'être organisées de manière ordonnée afin de performer au niveau de leur rôle pour supporter la structure.

De récentes évidences suggèrent que les intégrines, peuvent être, en partie responsable de ce processus. Par exemple, des expériences menées sur des fibroblastes cutanés humains ont montré que les molécules de fibronectine solubles sont converties en matrice fibrillaire dans un processus qui requiert la participation des intégrines [345]. Les molécules de fibronectine solubles se lient à l'intégrine $\alpha_5\beta_1$ dans un contexte cellulaire complexe qui court le long des amas d'actine formant le cytosquelette. Une fois liée à l'intégrine $\alpha_5\beta_1$, la fibronectine peut être activement transloquée le long des fibres de stress. Les forces générées au niveau du cytosquelette par les filaments d'actine peuvent donc initier la fibrillogenèse de la fibronectine dans un processus qui requiert également que la cellule soit ancrée à l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ au niveau du complexe d'adhésion focal [345].

Au niveau cellulaire, le remodelage de la paroi vasculaire implique des changements dans la configuration de la cellule, la prolifération, l'apoptose et le phénotype cellulaire. Par exemple, durant la formation de néointima, comme dans le cas de la resténose post-angioplastie, les CMLV de la média sont transformées d'un phénotype contractile à un phénotype synthétique, prolifératif [346]. Cette transformation est, en partie, modulée par l'intégrine $\alpha_5\beta_1$ [347] et permet aux CMLV de synthétiser des MMPs. De manière intéressante, les intégrines $\alpha_1\beta_1$, $\alpha_2\beta_1$ et $\alpha_v\beta_3$ sont régulées à la hausse durant la transformation phénotypique [342;347;348] et comme je viens de le mentionner, la production de MMPs spécifiques a été directement reliée à ces intégrines. La modification et la dégradation enzymatique de la MEC par les MMPs permet aux CMLV de migrer à travers l'intima des vaisseaux. De plus, l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ est également un récepteur pour la MMP-2 dans les cellules endothéliales et aide dans l'activation de l'enzyme, menant à la migration des cellules [310;349]. C'est pourquoi un traitement avec un anticorps anti- $\alpha_v\beta_3$ est reconnu pour réduire la formation de la néointima après une lésion au niveau de l'endothélium en réduisant la production et l'activation des MMPs [350].

Durant la formation de la néointima, les intégrines peuvent également être responsables de l'arrêt du processus de migration. Une nouvelle molécule de la MEC contenant le motif RGD qui permet la liaison à certaines intégrines, DANCE (« *developmental arteries and neural crest epidermal growth factor-like* »), a été trouvée pour être exprimée dans des vaisseaux avec lésion par ballon en même temps que la prolifération des CMLV diminuait, ce qui suggère que ce peptide, suite à sa liaison avec des intégrines, peut être un signal d'arrêt pour la migration des CMLV dans l'intima [351]. Néanmoins, les intégrines pouvant médier ce processus n'ont pas encore été identifiées.

La régulation des interactions cellules-MEC au niveau de la formation du complexe d'adhésion focal est critique pour le remodelage de la MEC et l'architecture de la cellule [352]. Les deux types de signalisation, « *inside-out* » et « *outside-in* » prennent part dans la régulation de ces interactions. Par exemple, l'implication d'intégrines spécifiques par les protéines de la MEC permet l'association d'intégrines et la formation d'une adhésion focale [353]. D'autre part, les changements des composants du cytosquelette modifient la distribution et l'affinité des intégrines hétérodimériques [353]. Il y a de plus en plus d'évidences qui indiquent que la présence de cations spécifiques sur la MEC est une autre variable qui influence l'affinité d'une intégrine pour son ligand [342;354;355]. Il y a une observation qui montre l'augmentation de la synthèse d'ADN par les CMLV en réponse au stretch est dépendante du substrat sur lequel les cellules sontensemencées. Ceci met l'emphase sur la dépendance du remodelage par rapport aux interactions intégrines-MEC [356]. Il est possible que ces changements dans l'expression des intégrines, la distribution et leur affinité soient nécessaires pour guider l'association des intégrines aux composants de la MEC qui sont spontanément modifiées par les cellules de la paroi vasculaire. Si c'est le cas, un changement dans l'expression ou l'affinité des intégrines peut affecter l'implication de cellules avec leurs ligands, ce qui favorise aussi bien les changements cellulaires ou les modifications spécifiques des molécules de la MEC. Pour supporter cette idée, il y a des évidences qui indiquent que les CMLV favorisent le rétrécissement

vasculaire suite à une lésion et la contraction de gel, *in vitro*, par la contraction des protéines de la MEC. Les deux phénomènes sont dépendants de l'augmentation de l'expression d'intégrines qui à leur tour contractent et réorganisent la MEC. Les intégrines responsables de ces effets sont $\alpha_1\beta_1$ et $\alpha_2\beta_1$ pour le collagène et $\alpha_5\beta_1$ pour la fibronectine [357-360]. De plus, l'expression de la forme active et constitutive de l'intégrine β_3 dans les cellules CHO augmente significativement les interactions entre la fibrine et l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ et permet la rétraction de la fibrine [361]. Comme l'expression de l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ est augmentée dans les tissus vasculaires après une lésion et plusieurs facteurs qui activent cette intégrine sont présents dans le tissu vasculaire lésé, il a été suggéré que l'activation de l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ peut être impliquée dans les événements de remodelage de la MEC qui suit la lésion vasculaire. Par conséquent, un changement dans l'expression et l'affinité de l'intégrine viendrait changer les interactions cellules-MEC qui peuvent participer dans le remodelage de la paroi vasculaire en réponse à divers stimuli incluant la lésion elle-même. En plus de l'implication des composants de la MEC, l'HTA a été également associée à une altération de l'expression des intégrines. Par conséquent, les artères des SHR ont montré une augmentation des intégrines $\alpha_v\beta_3$ et $\alpha_5\beta_1$ de manière âge-dépendante [208]. Dans cette optique, Bishop et coll. ont rapporté que l'inhibition sélective des intégrines $\alpha_v\beta_3$ réduisait la pathologie vasculaire dans un modèle de resténose après angioplastie chez le lapin [362]. Il est par conséquent évident que la clé pour la compréhension du rôle des intégrines dans les maladies vasculaires est profondément reliée à ces molécules qui régulent l'adhésion et la fonction des cellules vasculaires normales.

1.8. But et objectifs de l'étude

L'Ang II est un puissant agent vasoactif et un facteur favorisant la croissance des CMLV. Il existe peu d'informations sur la contribution *in vivo* des effets sur le remodelage vasculaires de l'Ang II sur l'activation des récepteurs AT_1 et AT_2 . Par conséquent, nous avons investigué les effets médiés par le blocage des récepteurs AT_1 à l'aide du losartan et

des deux récepteurs AT₁ et AT₂ à l'aide du Sar-Ile, dans un modèle de rats hypertendus infusés à l'Ang II. De plus, lorsque j'ai débuté les travaux de cette thèse, et encore aujourd'hui, on constate qu'il y a peu d'études qui ont été effectuées sur l'implication directe des MMPs au niveau des mécanismes de remodelage vasculaire dans l'HTA. La majorité des connaissances sur les mécanismes de remodelage des vaisseaux étaient connues grâce à la caractérisation des MMPs au niveau du développement des plaques athérosclérotiques. De plus, le rôle du récepteur AT₂ au niveau du remodelage vasculaire demeure toujours controversé, même après notre étude. Cependant, nous sommes convaincus que nous avons apporté des arguments essentiels quant à la compréhension du rôle protecteur que ce récepteur peut jouer, lorsqu'il n'est pas bloqué, c'est-à-dire lors de l'utilisation d'un ARA.

Les objectifs de la première étude (Chapitre II, article 1) :

1. Déterminer si l'activation du récepteur AT₁ participait à l'activation ou la régulation de l'activité des gélatinases.
2. Caractériser morphologiquement et mécaniquement le remodelage vasculaire a niveau des vaisseaux de résistance au niveau mésentérique à l'aide du myographe pressurisé, dans notre modèle de rats infusés à l'Ang II.
3. Caractériser les composants de la MEC, dans le but de déterminer si les changements dans la composition de la MEC sont responsables des changements dans la structure et dans le comportement mécanique des vaisseaux de résistance au niveau mésentérique.
4. Caractériser le rôle des récepteurs AT₁ et AT₂ sur le dépôt de la MEC.
5. Déterminer si la régulation de l'activité des gélatinases est en hausse, afin d'expliquer les modifications de la composition de la MEC et des changements dans la structure et dans le comportement mécanique des vaisseaux de résistance au niveau mésentérique.

6. Caractériser le rôle des récepteurs AT₁ et AT₂ sur la régulation de l'activité des gélatinases.

Les objectifs de la deuxième étude (Chapitre III, article 2) :

1. Déterminer les différences dans la régulation de l'expression des intégrines α_1 , α_5 , α_8 , β_1 et β_3 ainsi que l'expression de l'ostéopontine, suite à l'antagonisme du récepteur AT₁ et à l'antagonisme simultané des récepteurs AT₁ et AT₂.
2. Déterminer si le niveau d'expression des intégrines affecte le remodelage vasculaire dans notre modèle de rats infusés à l'Ang II. Puis déterminer si l'antagonisme du récepteur AT₁ et l'antagonisme simultané des récepteurs AT₁ et AT₂, affectent l'expression des intégrines et s'il existe une corrélation entre cette expression et le remodelage des vaisseaux de résistance au niveau mésentérique.

CHAPITRE II : Article 1

Contribution personnelle dans cette étude :

- La mise au point des expériences et les quantifications pour cette étude
- La rédaction de l'article
- Les réponses aux commentaires des experts qui ont évalué cet article

**COMBINED AT₁ AND AT₂ ANGIOTENSIN RECEPTOR BLOCKADE ON
VASCULAR REMODELING AND MATRIX METALLOPROTEINASES IN
RESISTANCE ARTERIES**

Pascal Brassard, Farhad Amiri, Ernesto L. Schiffrin
CIHR Multidisciplinary Research Group on Hypertension,
Clinical Research Institute of Montreal, Montreal, Quebec, Canada.

Running Head: Ang II, MMPs and vascular remodeling

Word count: 6050 words

Abstract word count: 245 words

Total Number of Figures: 7

Conflict of Interest: None

Correspondence:

Ernesto L. Schiffrin, MD, PhD, FRCPC

Clinical Research Institute of Montreal

110 Pine Avenue West,

Montreal, Quebec, Canada H2W 1R7

Tel: (514) 987-5528

Fax: (514) 987-5602

E-mail: [REDACTED]

Abstract

We investigated the role of AT₁ and AT₂ receptors, matrix metalloproteinases (MMPs), and extracellular matrix (ECM) components involved in vascular remodeling of resistance arteries induced by angiotensin (Ang) II. Sprague-Dawley rats received Ang II (120 ng/kg/min s.c.) ± the AT₁ antagonist losartan (10mg/kg/day p.o.), the AT₁/AT₂ antagonist Sar¹-Ile⁸-Ang II (Sar-Ile, 10 µg/kg/min s.c.), or hydralazine (25 mg/kg/day p.o.) for 7 days. Structure and mechanical properties of small mesenteric arteries were evaluated on a pressurized myograph. Ang II increased growth index (+21%), which was partially decreased by losartan (-11%), and abrogated by Sar-Ile. Hydralazine markedly increased growth index (+32%) despite systolic blood pressure (BP) lowering, suggesting a BP-independent effect of Ang II on vascular growth. Elastic modulus was increased by Sar-Ile compared to Ang II and control. Vascular type I collagen was reduced ($P<0.05$) whereas fibronectin increased significantly with Sar-Ile. Vascular TIMP-2 binding to MMP-2 was abrogated by Sar-Ile but MMP-2 activity was significantly increased compared to losartan, Ang II and controls. Thus, AT₁ blockade exerted anti-growth effects and reduced stiffness of small resistance arteries by decreasing non-elastic fibrillar components (collagen and fibronectin). Concomitant AT₁/AT₂ blockade prevented growth, reduced collagen type I and elastin deposition but increased vascular stiffness, fibronectin and MMP-2 activity. These results demonstrate opposing roles of AT₁ receptors that increase fibronectin and vascular stiffness, and AT₂ receptors that decrease both and MMP-2, and increase elastin. Changes in vascular wall mechanics, ECM deposition and MMP activity are thus modulated differentially by Ang II receptors.

Keywords: Collagen, elastin, TIMPs, extracellular matrix, hypertension, renin-angiotensin system.

Introduction

Angiotensin (Ang) II, a potent vasoconstrictor of small resistance arteries, induces hypertrophy and hyperplasia of vascular smooth muscle cells (VSMC) mainly via AT₁ receptors, and has been implicated in the development and maintenance of hypertension.¹ Most of the biological effects of Ang II are mediated through AT₁ receptors. AT₂ receptor function is less well defined. Despite low AT₂ receptor expression in adult tissues, their abundance is increased after blood vessel injury,² and can equal or exceed that of AT₁ in pathophysiological conditions.³ The functional significance of AT₂ receptors remains uncertain. However, a recent study demonstrated that intra-brachial infusion of the AT₂ receptor antagonist PD123319 had significant systemic effects on mean arterial pressure during both placebo and therapy with the AT₁ receptor antagonist telmisartan without affecting forearm blood flow, suggesting the presence of functionally effective AT₂ receptors.⁴ Additionally, the AT₁ receptor antagonist candesartan unmasked the vasodilatory response to Ang II suggesting that AT₂ receptor blockade is responsible for increased forearm vascular resistance.⁵

In experimental models of hypertension, AT₁ receptor antagonism with losartan decreased systolic blood pressure (SBP) also potentially through stimulation of AT₂ receptors, the latter by increased circulating Ang II.⁶ Vascular AT₂ receptors stimulate vasodilator cascades including bradykinin and NO.¹ While the growth-promoting effects of Ang II appear to be mediated primarily via AT₁ receptors,¹ anti-proliferative effects have been attributed to AT₂ receptors.⁷ AT₂ receptors have also been implicated in pathological conditions associated with cardiovascular remodeling such as neointimal formation, diabetes and hypertension.^{6, 8} Thus, the participation of Ang II in vascular responses after injury appears to involve both AT₁ and AT₂ receptors.¹

Vascular fibrosis involves changes in extracellular matrix (ECM) components, which include structural (collagen, elastin) and adhesion proteins (laminin, fibronectin). Collagen

has been reported to be increased in resistance arteries of SHR and of essential hypertensive patients.⁹ Ang II, endothelin-1 and mineralocorticoids appear to play a central role in this process. Indeed, Ang II stimulates human VSMCs production of collagen I and fibronectin via AT₁ receptors, and may do so as well via AT₂ receptors.¹⁰

Vascular remodeling entails degradation and reorganization of the ECM scaffolding, which may explain the recent interest in matrix metalloproteinases (MMPs) participating in these processes. Several MMPs in the vasculature, such as collagenases and gelatinases, have been implicated in atherosclerosis, restenosis and hypertension.¹¹ Changes in MMP activity or in the balance with their natural inhibitors, tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMPs), may contribute to resistance artery remodeling by modulating the composition of ECM.

We hypothesized that vascular remodeling in Ang II-induced hypertension can be mediated by both AT₁ and AT₂ receptors by altering MMP and TIMP activity which could affect ECM content and vascular mechanics. We therefore evaluated the effects of AT₁ and AT₂ receptor blockade on vascular mechanics, ECM components, MMPs and TIMPs involved in vascular remodeling of resistance arteries of Ang II-infused rats.

Methods

Animal Experiments

The study protocol was approved by the Animal Care Committee of the Clinical Research Institute of Montreal and performed following recommendations of the Canadian Council of Animal Care. Male Sprague Dawley rats (Charles Rivers, St-Constant, QC, Canada; n=8/group) were housed under controlled conditions and infused with Ile⁵-Ang II (120 ng/kg/min, Calbiochem, La Jolla, CA) via osmotic minipumps (Alzet Corp., Cupertino, CA).¹² Losartan (10 mg/kg/day) and hydralazine (25 mg/kg/day) were given in the drinking

water, while [Sar¹, Ile⁸]-Ang II (Sar-Ile, an AT₁/AT₂ antagonist) was infused via osmotic mini-pumps (10 µg/kg/min), all administered for 7 days. Prior to the end of study, SBP was measured by the tail-cuff method as previously described¹² and rats were then killed humanely.

Preparation and Mounting of Small Arteries

Third order branches of superior mesenteric arteries were dissected and placed in cold physiologic salt solution (PSS) containing (mmol/L): NaCl 120, NaHCO₃ 25, KCl 4.7, KH₂PO₄ 1.18, MgSO₄ 1.2, CaCl₂ 2.5, EDTA 0.026, and glucose 5.5. Vessels were mounted on a pressurized myograph and equilibrated for 1 hour in PSS containing 10 mmol/l EGTA (bubbled with 95% air - 5% CO₂, pH 7.4) at 37°C. Only vessels that responded with >70% vasoconstriction to extraluminal application of 0.9% KCl + 10 µmol/L norepinephrine were used. Pressure-lumen diameter relationship was assessed as intravascular pressure was increased step-wise from 3 to 140 mmHg, and media thickness and lumen diameter were measured at each pressure level.¹²

Vascular measurements and mechanics

Media cross-sectional area (CSA) was obtained by subtraction of internal CSA from external CSA using external and lumen diameters.¹² Growth index was calculated as $(CSA_h/Vessel Area_h - CSA_n/Vessel area_n)/CSA_n/Vessel area_n$, where CSA_n and CSA_h are media CSA of normotensive and hypertensive vessels, respectively. Additionally, mechanical properties of blood vessels (circumferential strain, circumferential stress, and incremental elastic modulus) were calculated as previously described.¹²

Western Blot Analysis of Vascular AT₁ and AT₂ Receptors

Protein was extracted from frozen aortas by homogenization and western analysis of AT₁ and AT₂ receptors were done as previously described.¹³

Collagen and Elastin determination

Pressurized mesenteric arteries fixed in Russel fixative were embedded in paraffin, whereas aortas were frozen in O.C.T. (Optimal Cutting Temperature) compound were used for collagen and elastin histochemistry. For collagen type I quantification, 10 μm sections were stained with Sirius red F₃BA (0.1% pH 2.0 in saturated picric acid solution, Sigma Chemicals, St. Louis, MO) and analyzed by cross-polarized microscopy as previously described.¹⁴ Images were analyzed by Northern Eclipse 5.0 (EMPIX Imaging Inc, Mississauga, ON, Canada). Elastin was stained with Verhoeff van Giesson,¹⁵ whereas fibronectin immunohistochemistry (Chemicon, Temecula, CA) was performed on paraffin-embedded sections and examined under light microscopy. Sections were counterstained with hematoxylin while negative controls were incubated with non-immune rabbit IgG in place of primary antibody.

Zymography and reverse zymography

Protein was extracted from frozen aortas by homogenization.¹⁶ Briefly, homogenates were resuspended in lysis buffer (Hepes 0.05 mol/L pH 7.4, NaCl 0.15 mol/L, Nonidet P40 1% (Roche Molecular Biochemicals, Laval, QC, Canada), MgCl₂ 1mmol/L, CaCl₂ 1mmol/L and 1 tablet of Complete™ mini EDTA-free Protease Inhibitor Cocktail (Roche Molecular Biochemicals), centrifuged (15 000 g) and protein concentration was determined with the Bio-Rad Dc protein assay (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA). Latent and activated gelatinases were detected with SDS-PAGE gelatin zymography.¹⁷ After gel staining, MMP-2 and MMP-9 were identified based on gelatin lysis at 62 kDa and 82 kDa for activated MMP-2 and MMP-9, respectively. Gelatinolytic bands were quantified using ImageQuant software 5.0 (Molecular Dynamics, Sunnyvale, CA). Reverse zymography was performed as described by Oliver *et al.*¹⁸ Briefly, gelatinase inhibitory activity was detected by incubating standard gelatin zymograms in which purified gelatinase A (0.16 $\mu\text{g/ml}$) was added. Gels were incubated with 2.5% triton X-100 and thereafter at 37 °C for 18 h in an

activity buffer (50 mmol/L Tris-HCl, pH 8, containing 5 mmol/L CaCl₂, 0.2 mol/L NaCl, 0.02% NaN₃, 0.02% w/v BRIJ-35). Gels were stained and destained as described above. Stained bands represented gelatinase inhibitory activity corresponding to TIMP binding and thus inhibiting MMP-2 activity.¹⁸

Statistical Analysis

Data are presented as mean \pm SEM. Morphological data and band optical density were analyzed by one-way ANOVA followed by a Student–Newman–Keuls test while mechanical parameters were compared by repeated-measures one-way ANOVA. A value of $P < 0.05$ was considered statistically significant.

Results

Physiological characteristics

SBP was significantly increased ($P < 0.001$) by Ang II infusion compared to controls (Table 1). This increase was significantly blunted by losartan, hydralazine and Sar-Ile. Body weight did not differ among groups. Ang II and Sar-Ile resulted in increased heart weight relative to tibia length compared to controls, whereas losartan and hydralazine prevented this increase (Table 1). Aortic CSA and M/L ratio were similar in all groups (Table 1).

Vascular mechanics

Lumen diameter of small arteries measured at increasing intraluminal pressures was significantly smaller in all treated groups compared to controls ($P < 0.001$, Figure 1A). Hydralazine and Sar-Ile significantly decreased lumen diameter when compared to Ang II ($P < 0.05$ and $P < 0.001$, respectively, Figure 1A) while media thickness was significantly decreased by losartan, hydralazine and Sar-Ile ($P < 0.001$ vs. controls and Ang II, Figure

1B). Media-to-lumen ratio was similar in all groups except after losartan which significantly decreased it ($P<0.05$ vs. Ang II, Figure 1C). Ang II increased the growth index (+21%), which was decreased by losartan (-11%) and Sar-Ile (-1%) but further increased by hydralazine (+32%).

Resistance arteries from Ang II-treated rats showed reduced strain ($P<0.001$ vs. controls) which was partially restored by losartan, but significantly decreased by Sar-Ile (Figure 1D). The leftward shift of the stress-strain curve in vessels from Ang II-treated rats suggested vessel stiffening, which was partially decreased by losartan but increased by hydralazine and Sar-Ile (Figure 1D). However, incremental elastic modulus was unaffected by Ang II and losartan. In contrast, elastic modulus was greater in hydralazine and in Sar-Ile compared to controls ($P<0.001$). Incremental elastic modulus as a function of media stress, which evaluates the stiffness of wall components independently of vessel geometry, was similar in all groups (Figure 1E).

Western Blot Analysis of Vascular AT₁ and AT₂ Receptors

Ang II had a tendency to decrease vascular AT₁ receptor expression whereas receptor expression increased significantly after AT₁ antagonism by losartan ($P<0.05$, Figure 2). No changes were observed with Sar-Ile treatment while hydralazine significantly reduced AT₁ receptor expression ($P<0.05$ vs. losartan, Figure 2). No changes were observed in AT₂ receptor expression among the groups (data not shown).

Vascular wall ECM content

Mesenteric arteries of Ang II-infused rats exhibited a trend to increase type I collagen compared to controls, whereas Sar-Ile significantly decreased it ($P<0.01$ vs. Ang II, $P<0.05$ vs. control and losartan, Table 2). Ang II reduced elastin content compared to controls ($P<0.01$), a change prevented by losartan ($P<0.05$ vs. Ang II) and unaffected by Sar-Ile

($P < 0.001$ vs. control, $P < 0.01$ vs. losartan). Hydralazine induced a trend to a reduction in elastin to similar levels as in the Ang II group, demonstrating that this effect was independent of BP. The collagen-to-elastin ratio was significantly increased by Ang II compared to other groups while a marked increase in fibronectin content was found in the Sar-Ile treated group compared to other groups (Figure 3). In aorta, type I collagen was significantly increased by Ang II ($P < 0.05$ vs. control), and significantly lowered by losartan ($P < 0.01$ vs. Ang II) and Sar-Ile ($P < 0.05$ vs. Ang II), but unaltered by hydralazine, suggesting an AT_1 -dependent, BP-independent effect. Similarly, fibronectin was increased by Ang II ($P < 0.05$ vs. control), and significantly reduced by losartan ($P < 0.05$ vs. Ang II) but not by Sar-Ile ($P < 0.001$ vs. control, $P < 0.01$ vs. losartan) (Table 2).

Gelatinase activity

Gelatin zymographic analysis revealed several bands representing lytic activity in aorta. Sar-Ile induced a significant increase in 62 kDa lytic band, which corresponds to the active form of constitutive MMP-2, compared to controls (Figure 4). The active form of MMP-9, which is an inducible MMP, was undetectable. Nevertheless, there was a significant increase in all other forms of MMP-9 with Sar-Ile, including dimerized MMP-9 (data not shown). All lytic bands were inhibited in presence of EDTA (data not shown). Ang II significantly increased TIMP-2 expression in aorta ($P < 0.05$ vs. control). Whereas losartan significantly reduced TIMP-2 expression ($P < 0.05$ vs Ang II). Sar-Ile and hydralazine increased it to a greater extent than losartan compared to controls (data not shown). In mesenteric arteries, TIMP-2 increase was induced only by Ang II, while expression levels remained very low in all other groups (Figure 5). MMP inhibitor activity by reverse zymography was only investigated on aorta because of limited mesenteric vessel availability. No significant differences were found in TIMP-1 levels between groups because of high variability, although a trend to increase in TIMP-1 binding to MMP-2 was observed with Ang II. Sar-Ile abrogated TIMP-2 binding to MMP-2 ($P < 0.01$ vs. Ang II,

Figure 6) while it significantly stimulated MMP-2 activity as determined by MMP-2/TIMP-2 ratio ($P < 0.001$, Figure 7).

Discussion

It has been proposed that AT₁ and AT₂ receptors have countervailing effects on BP regulation. Thus, it might be expected that simultaneous blockade of AT₁ and AT₂ receptors would result in reduced effects relative to selective blockade of AT₁ receptors. The present study demonstrates that concomitant blockade of AT₁ and AT₂ by Sar-Ile altered ECM deposition and mechanical properties of mesenteric resistance arteries, which participate in the vascular structural changes occurring after Ang II infusion, differentially from selective blockade of AT₁ receptors. Ang II-induced alterations in mechanical properties of mesenteric resistance arteries are determined, at least in part, by changes in the structure and the composition of the vascular wall, that may be attenuated by AT₁ antagonism, independently of BP reduction.¹² The present study suggests a role of AT₂ receptors in the regulation of ECM deposition in the media of resistance arteries following Ang II infusion, as blockade of AT₂ receptors lead to increased stiffness of the vascular wall.

Vascular remodeling in hypertension involves two processes: 1) media remodeling through growth, regression, contraction or relaxation and apoptosis of VSMC, and 2) ECM expansion or contraction. Growth of resistance artery wall induced by Ang II (+21%) was partially reduced by losartan (-11%), confirming previous findings that Ang II-induced vascular growth is mediated by the AT₁ receptor in aorta and mesenteric arteries.¹⁹ Growth index was enhanced by hydralazine (+32%), which in addition to its vasodilator properties, has been suggested to have trophic effects mediated by HIF-1 α induction of MAP kinase pathways.²⁰ Sar-Ile abrogated growth (-1%), which can be explained mainly by blockade of the AT₁ receptor that exerts growth-promoting effects and inhibition of the AT₂ anti-

proliferative effects.^{21, 22} Most studies, conducted in normotensive rats, have demonstrated that AT₂ stimulation was associated with vasodilation and inhibition of cell growth.⁷ Previous *in vivo* studies have revealed controversial results concerning the role of AT₂ on VSMC growth in different rat models of experimental hypertension. While it has been reported that the AT₂ receptor mediated aortic and coronary artery hypertrophy and differentiation,^{23, 24} we have reported that AT₁ induced vascular hypertrophy in different vascular beds in chronic Ang II-infused Wistar rats, and that this remodeling was unaffected by AT₂ blockade.²⁵ However, Cao et al.²⁶ demonstrated that both AT₁ and AT₂ receptors mediated mesenteric vascular hypertrophy and VSMC proliferation. It has also been suggested that AT₂ receptors may contribute to aortic SMC hypertrophy in SHR.²⁷ Thus, absence of stimulation of both Ang II receptor subtypes by blockade by Sar-Ile may explain the robust inhibition of growth found in the present study. The exact role of AT₂ receptors in the regulation of VSMC growth and differentiation in hypertension evidently requires further clarification. One-week Ang II infusion caused eutrophic remodeling of resistance arteries as demonstrated by increased M/L ratio with no change in CSA, as we had previously reported.²⁸ In other types of experimental models of hypertension such as SHR, eutrophic or hypertrophic remodeling may be found in different experiments.²⁹ Aortas from Sar-Ile treated rats exhibited eutrophic remodeling as shown by reduced lumen diameter with no change in net growth and media CSA. As for mesenteric resistance vessels, we found inward eutrophic remodeling as evidenced by decreased lumen diameter and media thickness, with no change in media CSA.³⁰ This remodeling may be the result of rearrangement of cellular and non-cellular components, or combination of growth and apoptosis, or a persistent contracted state of SMCs with a resultant absence of change in the total amount of wall material.³¹

Associated with structural changes, significant alteration in resistance artery wall mechanics may be found. One of the two novel findings of this study was that the vessel wall of the Sar-Ile-group was stiffer, as demonstrated by the leftward shift of the stress-

strain relationship (Figure 1D). Incremental elastic modulus, which evaluates stiffness of wall components independently of vessel geometry, was increased by Ang II, exacerbated by hydralazine, and increased to a greater extent by simultaneous blockade of AT₁ and AT₂ receptors by Sar-Ile (Figure 1E). Increased stiffness was prevented by losartan, suggesting that this effect was mediated by AT₁ receptors. The paradoxical increase in vascular stiffness after Sar-Ile, together with the losartan data, suggests that this effect was the result of blockade of AT₂ receptors. This indicates that AT₂ receptors have a beneficial effect on vascular stiffness. Increased wall stiffness was mediated by BP-independent mechanisms in Ang II-infused rats as shown by the greater stiffness found after combined blockade of both Ang II receptor subtypes with Sar-Ile and under hydralazine treatment.

We observed a tendency to a decrease in AT₁ receptor expression after Ang II-infusion as previously shown.³² AT₁ antagonism by losartan increased AT₁ expression significantly, effect that was independent of BP since hydralazine also significantly reduced AT₁ receptor expression. It is noteworthy that no changes were observed in AT₂ receptor expression.

The second novel finding of this study was the characterization of ECM changes. Increased wall stiffness depends on the balance between more distensible wall components, such as elastin and VSMCs, and less distensible and stiffer elements, such as collagen and fibronectin.³³ Our results demonstrated a decrease in media type I collagen of small resistance arteries by combined AT₁/AT₂ blockade with Sar-Ile (Table 2). Although Ang II, through both AT₁ and AT₂, has been shown to stimulate collagen production,³⁴ there was only a trend to increase collagen, most probably due to the short period of treatment with Ang II (7 days, Table 2). This can be explained by the different cellular content of these vessels. While the aorta contains more VSMCs than resistance vessels, it contains more fibroblasts which could be affected differently by Ang II. In 3-week Ang II-infused Wistar rats treated with PD123319, BP was elevated whereas fibrosis and vascular hypertrophy were reduced compared to Ang II infusion alone.²³ Collagen deposition in response to Ang

II, usually associated with fibronectin deposition, causes in most but not all instances increased vessel wall stiffness.³⁵ After 1 week Ang II infusion, significant increase in aortic media fibronectin was observed, which was restored by blockade of AT₁ receptors but increased by Sar-Ile and hydralazine treatments, demonstrating a BP-independent effect (Table 2). Moreover, increased fibronectin content induced by Sar-Ile may be attributed to absence of an inhibitory effect by the blocked AT₂ receptors on fibronectin deposition. Elastin in mesenteric arteries was significantly decreased in Ang II and Sar-Ile groups but was restored by losartan treatment, suggesting that AT₂ receptors increase elastin deposition (Table 2).

A possible mediator in the effects of AT₂ on vascular remodeling could be the vascular kallikrein-kinin system³⁶ and its role during AT₁ receptor blockade. Bradykinin is known to be vasorelaxant and anti-proliferative through NO production.³⁷ However, during AT₁ receptor blockade, no increase in bradykinin occurs since its degradation by ACE is not inhibited. However, since AT₂ stimulation has been shown to increase bradykinin locally at the cellular level,³⁸ this could potentially explain the deleterious effects of AT₂ receptor blockade as is the case when we administered Sar-Ile, as suggested by Aartsen *et al.*³⁹

The ECM organization under normal and pathological conditions results from a balance between synthesis and degradation of extracellular proteins, process in which MMPs play a major role.⁴⁰ The majority of MMPs are normally expressed at low levels, but their expression is stimulated in hypertension.⁴¹ Significant increases in MMP-2 activity were found with Sar-Ile whereas TIMP-2 binding activity was inhibited (Figure 4 and 6, respectively). This explains in part the decrease in vascular type I collagen and elastin, and subsequent decrease in the collagen/elastin ratio. These changes in ECM can be associated with modulation of cell-fibrillar ECM attachment sites and potentially influence the effect of ECM protein deposition on vascular compliance.³³ We demonstrated that regulation of ECM deposition was mediated partly by AT₂ receptors, since blockade of this receptor

(together with AT₁) by Sar-Ile reduced TIMP-2 binding (Figure 6). Contrary to our results, Rizzoni *et al.* demonstrated that subcutaneous arteries from hypertensive patients treated with either the AT₁ antagonist candesartan or the ACE inhibitor enalapril, had decreased MMP-9 activity and collagen content with candesartan treatment only.⁴² These findings suggest a role of AT₁ receptor blockade in modulation of collagen and MMP activity in human resistance vessels, whereas we found no increase in MMP-9 activity in the losartan-treated group.

Both losartan and hydralazine reduced the Ang II-induced BP rise. Sar-Ile-treated animals, however, had higher SBP than losartan but significantly lower than Ang II, which could be explained by the absence of beneficial effects mediated by AT₂. A very limited number of studies have been done in humans in who it has been demonstrated that hemodynamic changes occur after AT₂ blockade which support our findings.^{4, 5, 43} We found a significant increase in SBP when both AT₁ and AT₂ receptors were blocked, suggesting that the BP lowering effect of losartan can be mediated in part via unblocked AT₂ receptors stimulated by the increased circulating Ang II present in this experimental paradigm. Moreover, Barber *et al.*⁴⁴ also demonstrated that the AT₂ receptor blockade offset the effect of candesartan whereas its stimulation with CGP42112 reinforced the BP lowering effect of the angiotensin receptor blocker. Finally, Gigante *et al.* found that in salt-restricted rats, the AT₂ blocker PD123319 offset the BP-lowering effect of losartan, suggesting that AT₂ receptors contribute to the hypotensive effects of the AT₁ antagonist.⁶

There are limitations to this study. The use of a selective AT₂ receptor antagonist alone and in combination to losartan would have been informative, but because of limited availability and prohibitive high cost, this could not be performed and was replaced by the use of Sar-Ile. MMP activity determination was only conducted on aorta and not mesenteric arteries because of limited mesenteric artery availability. Mesenteric arteries are representative of

resistance vessels and our data from aortic tissue cannot be directly extrapolated to other segments of the vasculature.

In conclusion, the present study showed that blockade of both AT₁ and AT₂ receptors in Ang II-infused rats was associated with severe changes in structure, mechanics and composition of small mesenteric resistance arteries. In contrast Ang II-induced changes were prevented in large part by the AT₁ receptor blocker losartan, and were independent of BP reduction. These results underline the vascular protective role played by AT₂ receptors. Increases in stiffness in response to Ang II may be explained in part by the greater collagen/elastin ratio, although enhanced expression of fibronectin may play a more important role. Decreases in collagen and elastin content may be a consequence of upregulation of MMP-2 activity as well as a reduction in TIMP-2 binding to MMP-2, resulting in an increased activity of the proteinase when both AT₁ and AT₂ receptors are blocked.

Perspectives

These results demonstrate the differential importance of AT₁ and AT₂ receptors for the maintenance of vascular structural integrity. AT₁ and AT₂ receptors play opposing roles on ECM deposition: AT₁ receptors enhance fibronectin deposition and vascular stiffness, AT₂ receptors reduce stiffness and fibronectin, and increase elastin in resistance arteries. Differential regulation of ECM and vascular stiffness by AT₁ and AT₂ receptors may explain in part the different effects found on cardiovascular risk reduction after treatment with angiotensin-converting enzyme inhibitors and angiotensin receptor blockers in various cardiovascular conditions.

Acknowledgements

This work was supported by grant 13570 (to ELS) and a Group Grant to the Multidisciplinary Research Group on Hypertension, both from the Canadian Institutes of Health Research (CIHR). The authors are grateful to Suzanne Diébold and André Turgeon for their excellent technical assistance, and to Christian Charbonneau, Dr Jean-François Tanguay (Montreal Heart Institute, Montreal, QC) and Annie Vallée for assistance in microscopy, cross-polarized microscopy and histology, respectively.

Table 1 : Physiological and vascular morphological parameters

	Control	Ang II	Ang II + Los	Ang II + Sar-Ile	Ang II + Hyd
SBP (mmHg)	113 ± 2	177 ± 7*	139 ± 4 ^{†‡}	154 ± 7* [‡]	134 ± 7 ^{§//}
HW/TL (g/mm)	31.1 ± 0.3	35.1 ± 1.2*	32.0 ± 1.1 [‡]	36.7 ± 1.4*	32.9 ± 1.4 [‡]
Aorta CSA (µm ²)	1.6 ± 0.2	1.5 ± 0.3	1.6 ± 0.2	2.1 ± 0.1	1.6 ± 0.1
Aorta M/L ratio (%)	8.5 ± 0.3	8.4 ± 1.0	8.8 ± 0.7	10.7 ± 0.9	9.0 ± 0.9

* $P < 0.001$ vs. Control; [†] $P < 0.01$ vs. Control; [‡] $P < 0.01$ vs. Ang II; [§] $P < 0.05$ vs. Control; ^{//} $P < 0.001$ vs. Ang II. HW, heart weight; TL, tibia length; CSA, cross sectional area; M/L, media-to-lumen.

-Table 2 : Relative amounts of media ECM components in percent

	Control	Ang II	Ang II + Los	Ang II + Sar-Ile	Ang II + Hyd
Aorta					
Collagen type I	12.1 ± 3.7	25.9 ± 4.2 [*]	10.9 ± 2.4 [†]	14.2 ± 3.6 [‡]	23.8 ± 4.2 ^{* §}
Fibronectin	3.1 ± 1.8	18.7 ± 3.5 [*]	6.5 ± 3.2 [‡]	27.7 ± 5.8 ^{† // ¶}	21.6 ± 4.9 ^{# ¶}
Mesenteric arteries					
Collagen type I (x10 ⁻⁷)	41.2 ± 7.8	51.9 ± 1.5	38.4 ± 4.2	12.8 ± 5.1 ^{* †}	29.7 ± 6.8
Elastin	63.9 ± 3.2	44.1 ± 3.6 [#]	56.4 ± 2.0 [‡]	38.6 ± 2.8 ^{¶ //}	44.3 ± 7.4
Collagen / Elastin (x10 ⁻⁸)	6.4 ± 1.1	12.0 ± 1.3 [*]	6.8 ± 7.8 [‡]	3.5 ± 1.7 [†]	7.0 ± 1.5 [‡]

*P<0.05 vs. Control; †P<0.01 vs. Ang II; ‡P<0.05 vs. Ang II; §P<0.05 vs. Ang II + Los; //P<0.001 vs. Control;

¶P<0.01 vs. Ang II + Los; #P<0.01 vs. Control. Values are expressed in relative intensity/area (Pixels)

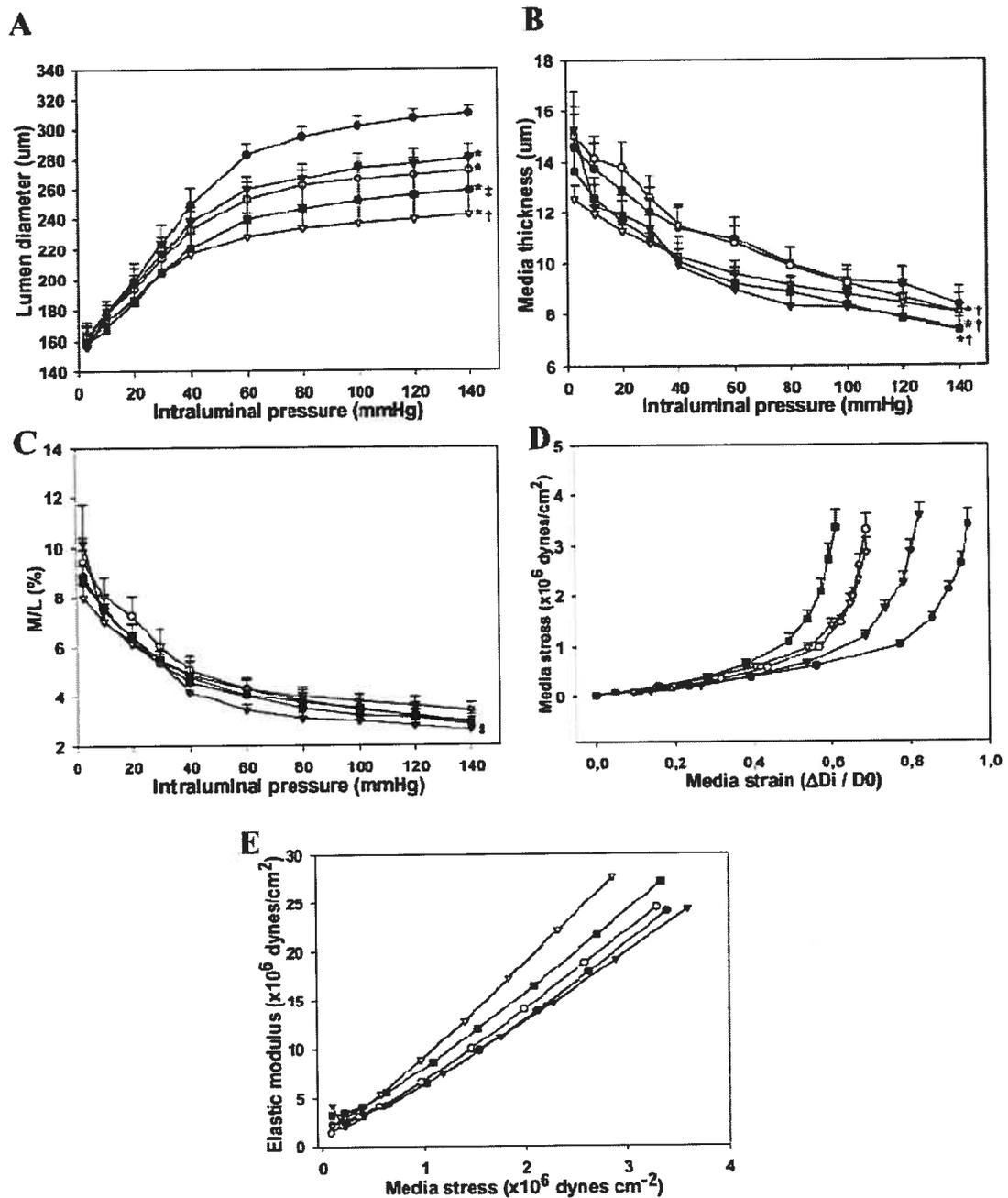


Figure 1: Mechanical properties of mesenteric resistance arteries. (A) Lumen diameter, (B) media thickness, (C) Media/lumen ratio at different intraluminal pressures and (D) Media stress-strain relationship. (E) Incremental elastic modulus plotted against media stress. Control (solid circle), Ang II (open circle), losartan (solid triangle), Sar-Ile-Ang II (open triangle), hydralazine (solid square). Results are means \pm SEM. * $P < 0.001$ vs. Control; $\dagger P < 0.001$ vs. Ang II; $\ddagger P < 0.05$ vs. Ang II.

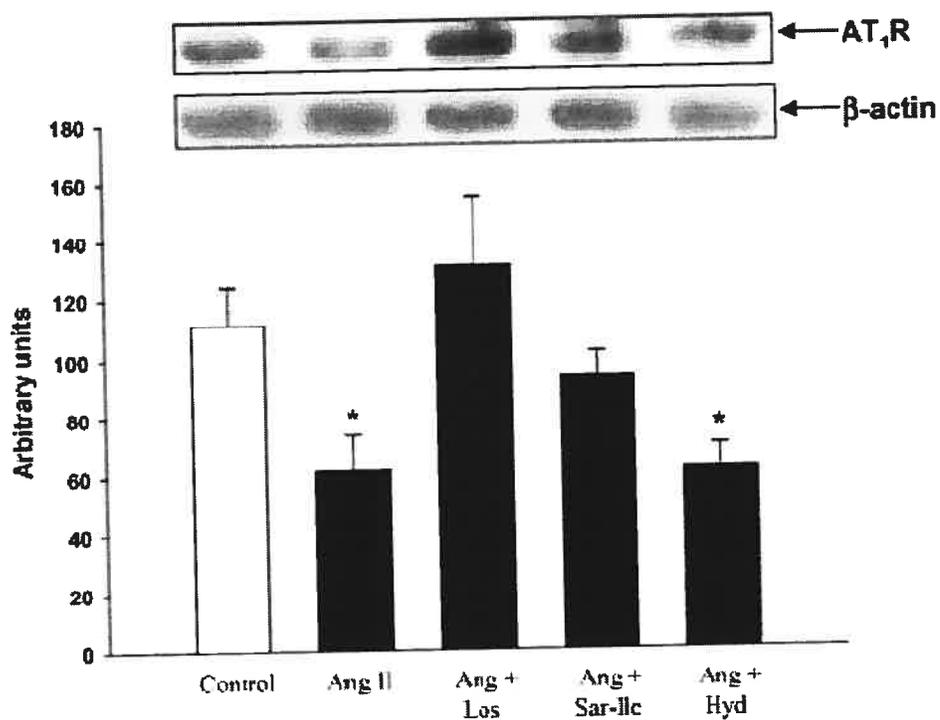


Figure 2: Vascular AT₁ expression. Top panels : Representative immunoblots of AT₁ receptor and β-actin expression. Bottom panel: Results are means ± SEM. Los, losartan and Hyd, hydralazine. * $P < 0.05$ vs. Ang II + Los.

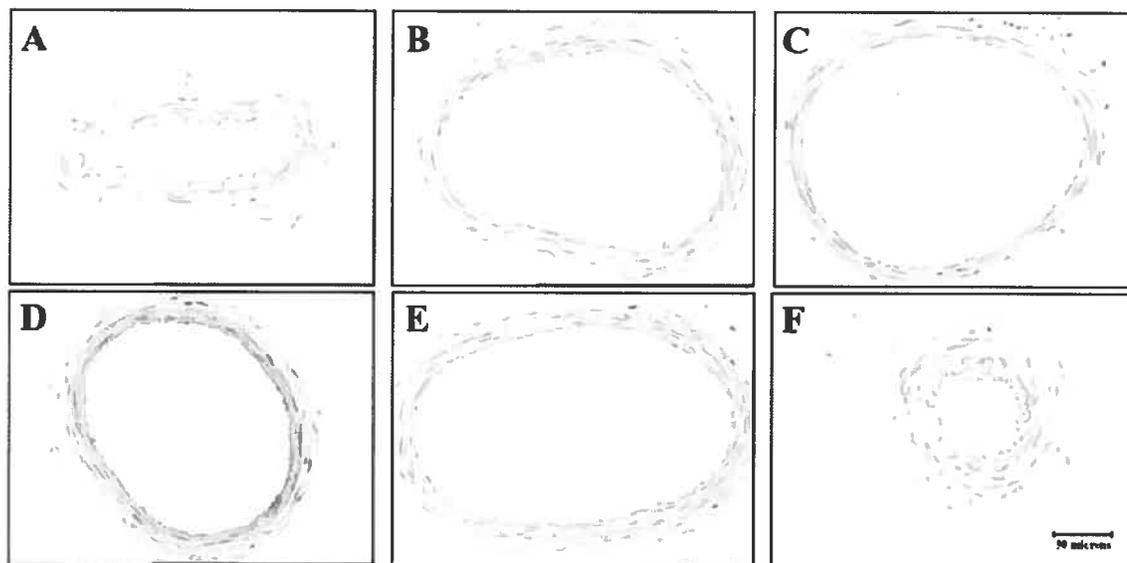


Figure 3: Immunohistochemical staining of fibronectin in mesenteric arteries. Representative images of fibronectin immunostaining in (A) control, (B) Ang II (C) losartan (D) Sar-Ile or (E) hydralazine. (F) Negative control. Brown represents fibronectin staining whereas nuclei appear blue.

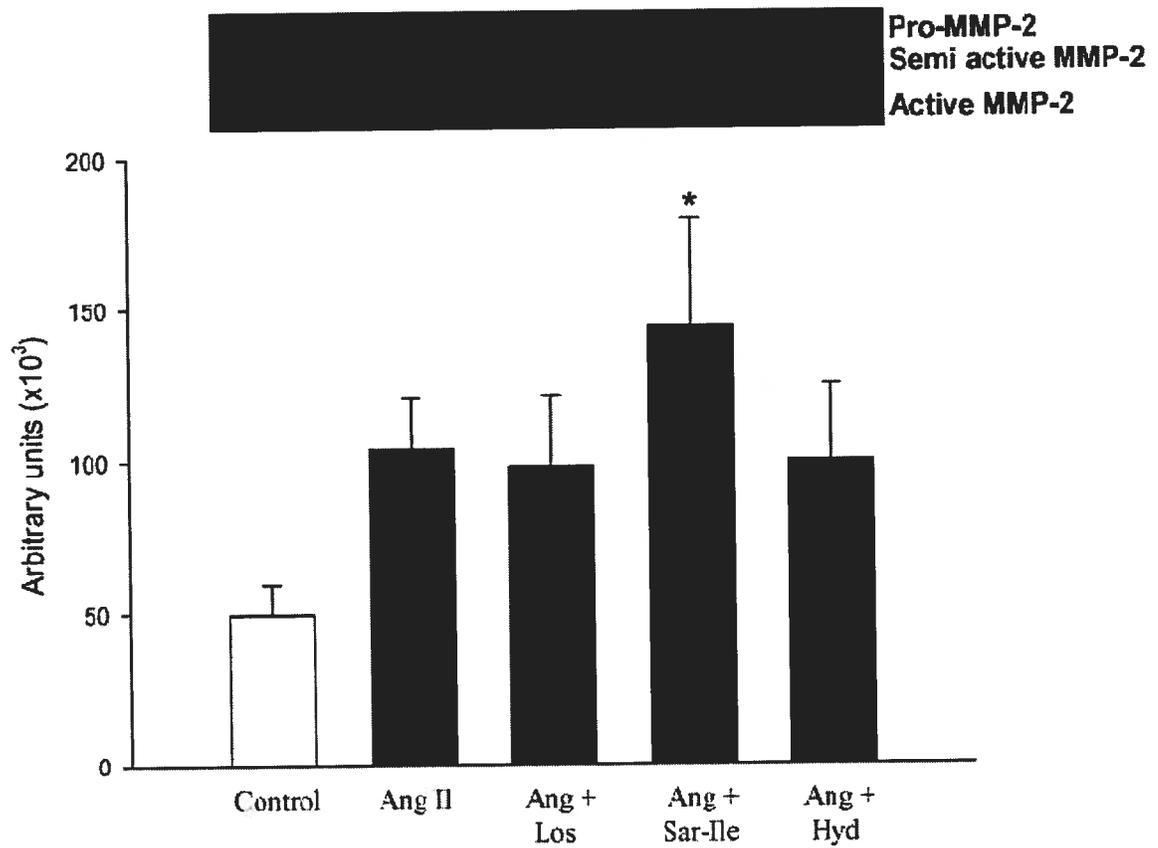


Figure 4: MMP-2 activity in aorta. Top panel: Representative gel of a gelatin zymogram of MMP-2 activity. Bottom panel: Results are means \pm SEM. * $P < 0.05$ vs. Control.

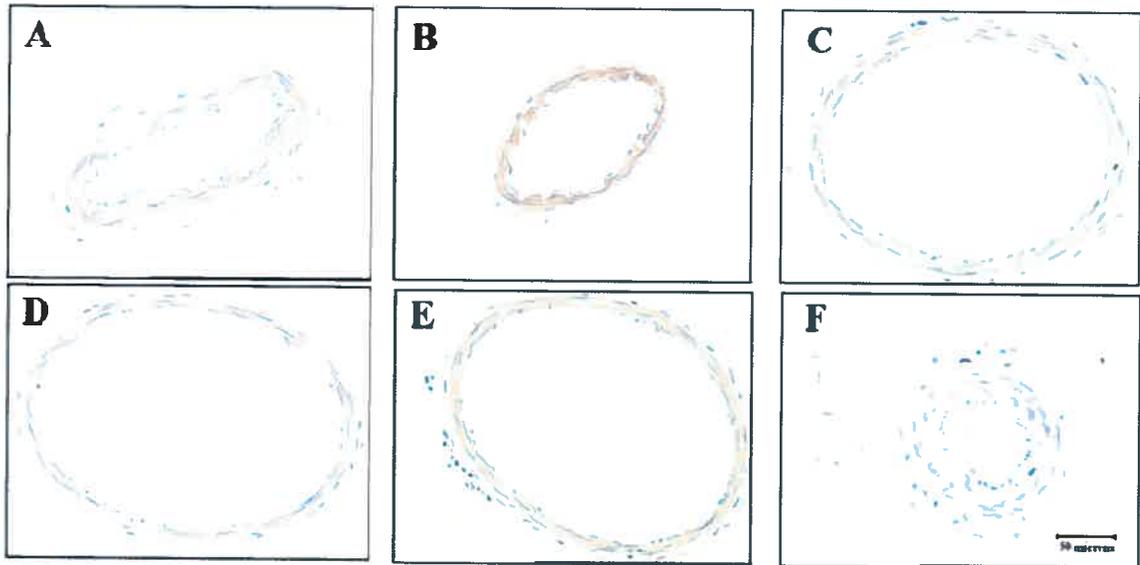


Figure 5: Immunohistochemical staining of TIMP-2 in mesenteric arteries. Representative images of TIMP-2 immunostaining (A) control, (B) Ang II, (C) losartan, (D) Sar-Ile or (E) Hydralazine. (F) Negative control. Brown represents TIMP-2 staining whereas nuclei appear blue.

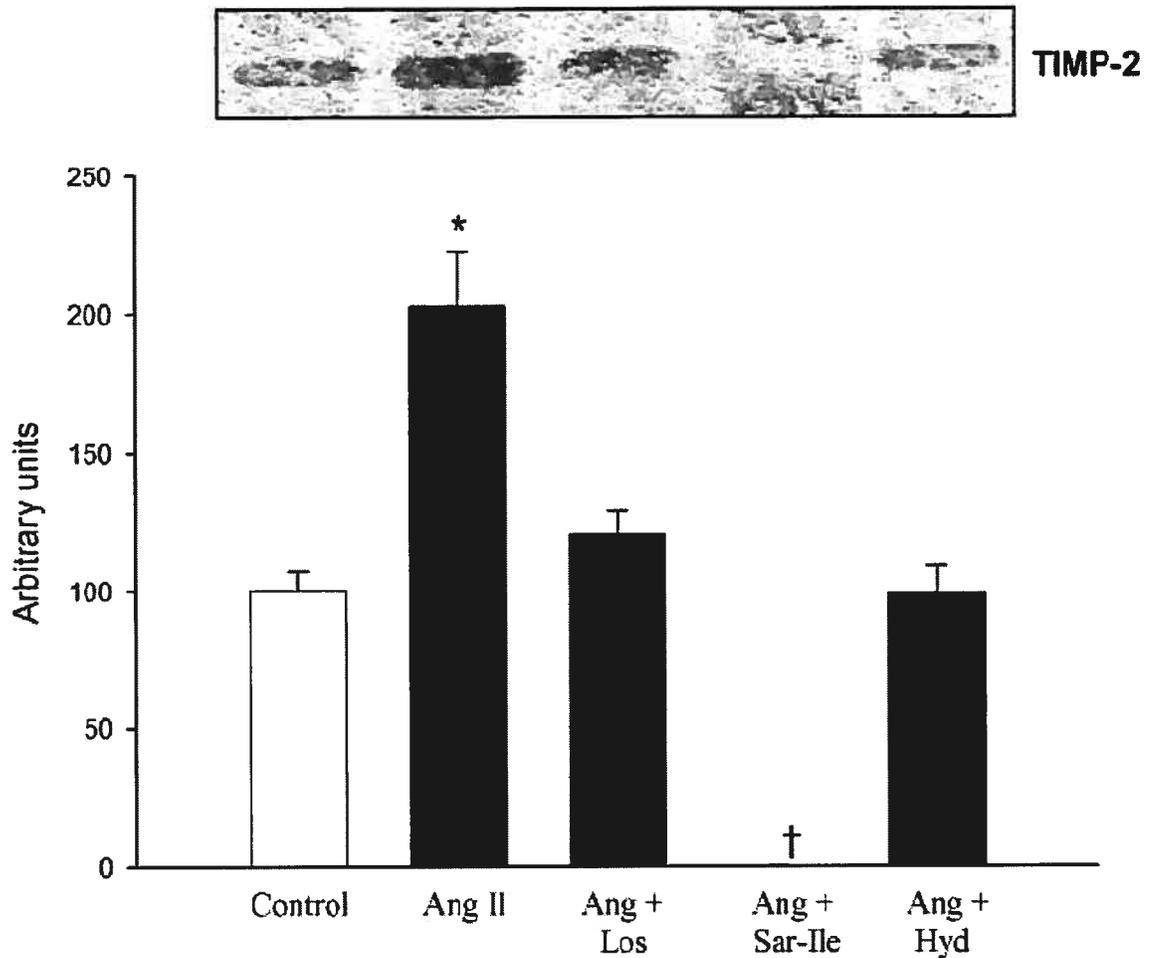


Figure 6: TIMP-2 binding in aorta by reverse gel zymography. Top panel : Representative gel of a reverse gelatin zymogram showing the differences in the binding capacity of aortic TIMP-2. Bottom panel: Results are means \pm SEM. * $P < 0.01$ vs. Control; † $P < 0.01$ vs. Ang II.

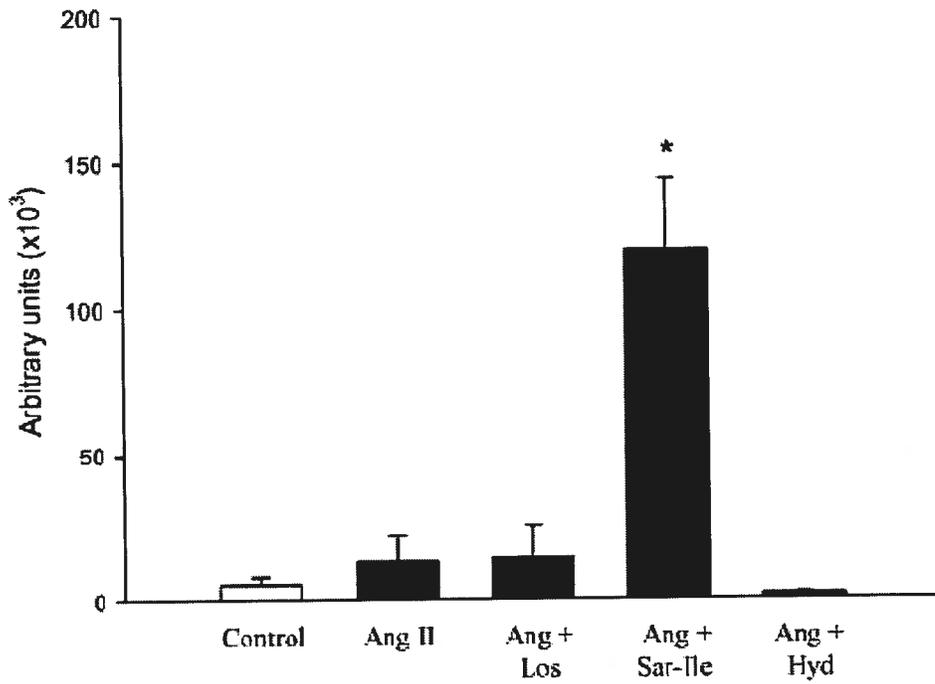


Figure 7: Relative MMP-2 activity in aorta. Relative aortic activity of active form of MMP-2 represented as the MMP-2/Timp-2 ratio. Results are means \pm SEM. * $P < 0.001$ vs. all groups.

References

1. Touyz RM, Schiffrin EL. Signal transduction mechanisms mediating the physiological and pathophysiological actions of angiotensin II in vascular smooth muscle cells. *Pharmacol Rev.* 2000;52:639-672.
2. Matrougui K, Loufrani L, Heymes C, Levy BI, Henrion D. Activation of AT₂ receptors by endogenous angiotensin II is involved in flow-induced dilation in rat resistance arteries. *Hypertension.* 1999;34:659-665.
3. de Gasparo M, Rogg H, Brink M, Wang L, Whitebread S, Bullock G, Erne P. Angiotensin II receptor subtypes and cardiac function. *Eur Heart J.* 1994;15 Suppl D:98-103.
4. Gilles R, Vingerhoedt N, Howes J, Griffin M, Howes LG. Increase in systemic blood pressure during intra-arterial PD123319 infusion: evidence for functional expression of angiotensin type 2 receptors in normal volunteers. *Blood Press.* 2004;13:110-114.
5. Phoon S, Howes LG. Forearm vasodilator response to angiotensin II in elderly women receiving candesartan: role of AT(2)- receptors. *J Renin Angiotensin Aldosterone Syst.* 2002;3:36-39.
6. Gigante B, Piras O, De Paolis P, Porcellini A, Natale A, Volpe M. Role of the angiotensin II AT₂-subtype receptors in the blood pressure-lowering effect of losartan in salt-restricted rats. *J Hypertens.* 1998;16:2039-2043.
7. Nakajima M, Hutchinson HG, Fujinaga M, Hayashida W, Morishita R, Zhang L, Horiuchi M, Pratt RE, Dzau VJ. The angiotensin II type 2 (AT₂) receptor antagonizes the growth effects of the AT₁ Receptor: gain-of-function study using gene transfer. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1995;92:10663-10667.
8. Sechi LA, Griffin CA, Schambelan M. The cardiac renin-angiotensin system in STZ-induced diabetes. *Diabetes.* 1994;43:1180-1184.
9. Intengan HD, Deng LY, Li JS, Schiffrin EL. Mechanics and composition of human subcutaneous resistance arteries in essential hypertension. *Hypertension.* 1999;33:569-574.
10. Intengan HD, Schiffrin EL. Vascular remodeling in hypertension: roles of apoptosis, inflammation, and fibrosis. *Hypertension.* 2001;38:581-587.
11. Kuzuya M, Iguchi A. Role of matrix metalloproteinases in vascular remodeling. *J Atheroscler Thromb.* 2003;10:275-282.

12. Neves MF, Virdis A, Schiffrin EL. Resistance artery mechanics and composition in angiotensin II-infused rats: effects of aldosterone antagonism. *J Hypertens.* 2003;21:189-198.
13. Touyz RM, Endemann D, He G, Li JS, Schiffrin EL. Role of AT₂ receptors in angiotensin II-stimulated contraction of small mesenteric arteries in young SHR. *Hypertension.* 1999;33:366-372.
14. Junqueira LC, Bignolas G, Brentani RR. Picrosirius staining plus polarization microscopy, a specific method for collagen detection in tissue sections. *Histochem J.* 1979;11:447-455.
15. Verhoeff FH. Some new staining methods of wide applicability including a rapid differential stain for elastic tissue. *JAMA.* 1908;50:876-877.
16. Delclaux C, d'Ortho MP, Delacourt C, Lebargy F, Brun-Buisson C, Brochard L, Lemaire F, Lafuma C, Harf A. Gelatinases in epithelial lining fluid of patients with adult respiratory distress syndrome. *Am J Physiol.* 1997;272:L442-L451.
17. Galis ZS, Muszynski M, Sukhova GK, Simon-Morrissey E, Unemori EN, Lark MW, Amento E, Libby P. Cytokine-stimulated human vascular smooth muscle cells synthesize a complement of enzymes required for extracellular matrix digestion. *Circ Res.* 1994;75:181-189.
18. Oliver GW, Leferson JD, Stetler-Stevenson WG, Kleiner DE. Quantitative reverse zymography: analysis of picogram amounts of metalloproteinase inhibitors using gelatinase A and B reverse zymograms. *Anal Biochem.* 1997;244:161-166.
19. Li JS, Touyz RM, Schiffrin EL. Effects of AT₁ and AT₂ angiotensin receptor antagonists in angiotensin II-infused rats. *Hypertension.* 1998;31:487-492.
20. Knowles HJ, Tian YM, Mole DR, Harris AL. Novel mechanism of action for hydralazine: induction of hypoxia-inducible factor-1 α , vascular endothelial growth factor, and angiogenesis by inhibition of prolyl hydroxylases. *Circ Res.* 2004;95:162-169.
21. Li JS, Schiffrin EL. Effect of chronic treatment of adult spontaneously hypertensive rats with an endothelin receptor antagonist. *Hypertension.* 1995;25:495-500.
22. Nakajima M, Hutchinson HG, Fujinaga M, Hayashida W, Morishita R, Zhang L, Horiuchi M, Pratt RE, Dzau VJ. The angiotensin II type 2 (AT₂) receptor antagonizes the growth effects of the AT₁ receptor: gain-of-function study using gene transfer. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1995;92:10663-10667.

23. Levy BI, Benessiano J, Henrion D, Caputo L, Heymes C, Duriez M, Poitevin P, Samuel JL. Chronic blockade of AT₂-subtype receptors prevents the effect of angiotensin II on the rat vascular structure. *J Clin Invest*. 1996;98:418-425.
24. Sabri A, Levy BI, Poitevin P, Caputo L, Faggin E, Marotte F, Rappaport L, Samuel JL. Differential roles of AT₁ and AT₂ receptor subtypes in vascular trophic and phenotypic changes in response to stimulation with angiotensin II. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1997;17:257-264.
25. Li JS, Sharifi AM, Schiffrin EL. Effect of AT₁ angiotensin-receptor blockade on structure and function of small arteries in SHR. *J Cardiovasc Pharmacol*. 1997;30:75-83.
26. Cao Z, Dean R, Wu L, Casley D, Cooper ME. Role of angiotensin receptor subtypes in mesenteric vascular proliferation and hypertrophy. *Hypertension*. 1999;34:408-414.
27. Otsuka S, Sugano M, Makino N, Sawada S, Hata T, Niho Y. Interaction of mRNAs for angiotensin II type 1 and type 2 receptors to vascular remodeling in spontaneously hypertensive rats. *Hypertension*. 1998;32:467-472.
28. Diep QN, Amiri F, Touyz RM, Cohn JS, Endemann D, Neves MF, Schiffrin EL. PPARalpha activator effects on Ang II-induced vascular oxidative stress and inflammation. *Hypertension*. 2002;40:866-871.
29. Intengan HD, Thibault G, Li JS, Schiffrin EL. Resistance artery mechanics, structure, and extracellular components in spontaneously hypertensive rats : effects of angiotensin receptor antagonism and converting enzyme inhibition. *Circulation*. 1999;100:2267-2275.
30. Mulvany MJ, Baumbach GL, Aalkjaer C, Heagerty AM, Korsgaard N, Schiffrin EL, Heistad DD. Vascular remodeling. *Hypertension*. 1996;28:505-506.
31. Schiffrin EL. Remodeling of resistance arteries in essential hypertension and effects of antihypertensive treatment. *Amer J Hypertens* 2004;17:1192-1200.
32. Wang DH, Du Y, Yao A. Regulation of the gene-encoding angiotensin II receptor in vascular tissue. *Microcirculation*. 1996;3:237-239.
33. Intengan HD, Schiffrin EL. Structure and mechanical properties of resistance arteries in hypertension: role of adhesion molecules and extracellular matrix determinants. *Hypertension*. 2000;36:312-318.

34. Kato H, Suzuki H, Tajima S, Ogata Y, Tominaga T, Sato A, Saruta T. Angiotensin II stimulates collagen synthesis in cultured vascular smooth muscle cells. *J Hypertens.* 1991;9:17-22.
35. Bezie Y, Lamaziere JM, Laurent S, Challande P, Cunha RS, Bonnet J, Lacolley P. Fibronectin expression and aortic wall elastic modulus in spontaneously hypertensive rats. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1998;18:1027-1034.
36. Nolly H, Carretero OA, Scicli G, Madeddu P, Scicli AG. A kallikrein-like enzyme in blood vessels of one-kidney, one clip hypertensive rats. *Hypertension.* 1990;16:436-440.
37. Rudic RD, Shesely EG, Maeda N, Smithies O, Segal SS, Sessa WC. Direct evidence for the importance of endothelium-derived nitric oxide in vascular remodeling. *J Clin Invest.* 1998;101:731-736.
38. Fukada SY, Tirapelli CR, de Godoy MA, de Oliveira AM. Mechanisms underlying the endothelium-independent relaxation induced by angiotensin II in rat aorta. *J Cardiovasc Pharmacol.* 2005;45:136-143.
39. Aartsen WM, Hilgers RH, Schiffers PM, Daemen MJ, De Mey JG, Smits JF. Changes in vascular distensibility during angiotensin-converting enzyme inhibition involve bradykinin type 2 receptors. *J Vasc Res.* 2004;41:18-27.
40. Galis ZS, Khatri JJ. Matrix metalloproteinases in vascular remodeling and atherogenesis: the good, the bad, and the ugly. *Circ Res.* 2002;90:251-262.
41. Robert V, Besse S, Sabri A, Silvestre JS, Assayag P, Nguyen VT, Swynghedauw B, Delcayre C. Differential regulation of matrix metalloproteinases associated with aging and hypertension in the rat heart. *Lab Invest.* 1997;76:729-738.
42. Rizzoni D, Porteri E, De Ciuceis C, Sleiman I, Rodella L, Rezzani R, Paiardi S, Bianchi R, Ruggeri G, Boari GE, Muiesan ML, Salvetti M, Zani F, Miclini M, Rosei EA. Effect of treatment with candesartan or enalapril on subcutaneous small artery structure in hypertensive patients with noninsulin-dependent diabetes mellitus. *Hypertension.* 2005;45:659-665.
43. Morimoto S, Yamamoto I, Uchida K, Funatsu T, Fujimura A, Honjo A, Takeda R, Kigoshi T. Hemodynamic effects of [Sar1, Ile8] AII, an angiotensin II analog, in the renin subgroups of essential hypertension. *Cardiology.* 1981;67:219-229.

44. Barber MN, Sampey DB, Widdop RE. AT(2) receptor stimulation enhances antihypertensive effect of AT(1) receptor antagonist in hypertensive rats. *Hypertension*. 1999;34:1112-1116.

CHAPITRE III : Article 2

Contribution personnelle dans cette étude :

- La mise au point des expériences et les quantifications pour cette étude
- La rédaction de l'article
- Les réponses aux commentaires des experts qui ont évalué cet article

**ROLE OF AT₁ AND AT₂ RECEPTORS IN THE EXPRESSION OF
VASCULAR INTEGRINS ON ANGIOTENSIN II-INFUSED RATS**

Pascal Brassard¹, Farhad Amiri¹, Gaétan Thibault², Ernesto L. Schiffrin¹

¹Experimental Hypertension Laboratory and

²Laboratory of Cellular Biology of Hypertension,

CIHR Multidisciplinary Research Group on Hypertension,

Clinical Research Institute of Montreal, Montreal, Quebec, Canada.

Running Head: Ang II, integrins and vascular remodeling

Word count: 4520 words

Abstract: 158 words

Figures: 6; **Supplemental Figures:** 6

Conflict of Interest: None

Correspondence:

Ernesto L. Schiffrin, MD, PhD, FRCPC

Clinical Research Institute of Montreal

110 Pine Avenue West,

Montreal, Quebec, Canada H2W 1R7

Tel: (514) 987-5528

Fax: (514) 987-5602

E-mail: XXXXXXXXXX

Abstract

Angiotensin (Ang) II plays an important role in vascular remodeling through effects that involve in part interactions of vascular smooth muscle cells (VSMC) with extracellular matrix (ECM) via integrins, which belong to a family of transmembrane receptors. We hypothesized that Ang II regulates expression of vascular integrins and their ligands in experimental hypertension. Rats were infused subcutaneously with Ang II and received AT₁ receptor blocker losartan, the AT₁/AT₂ antagonist [Sar¹-Ile⁸]-Ang II (Sar-Ile) or the vasodilator hydralazine for 7 days. Osteopontin and integrin subunit expression were evaluated immunohistochemically. Ang II enhanced vascular α_8 , β_1 , β_3 integrins and osteopontin expression, which were significantly reduced by losartan, Sar-Ile and hydralazine. Although Ang II increased vascular α_5 subunit expression, this was increased further by losartan. Losartan was the only treatment that induced α_1 subunit expression. These results demonstrate that AT₁ and AT₂ receptors have countervailing effects on vascular integrin subunit expression that may influence their effects on vascular remodeling and ECM composition.

Keywords: renin-angiotensin system, aorta, extracellular matrix, hypertension, osteopontin.

Introduction

Migration of vascular smooth muscle cells (VSMC) within or from the media to the intima plays a major role in arterial remodeling in atherosclerosis and hypertension. Migration of VSMCs and remodeling require controlled degradation of extracellular matrix (ECM) proteins by matrix metalloproteinases (MMP) and the activation or release of growth factors. VSMCs are embedded in ECM that includes collagens, fibronectin, laminin, elastin and proteoglycans.¹ The composition of the ECM can change in response to vascular injury. For example, the ECM protein tenascin, absent in normal rat aortic media, is expressed in the neointima in hypertension or after injury.^{2, 3}

Several receptor-ligand systems such as integrins are involved in cell-ECM interaction, which regulate cell phenotype and function. Integrins belong to a superfamily of transmembrane glycoprotein adhesion receptors consisting of two non-covalently linked subunits, α and β . To date, at least 18 α -subunits and 8 β -subunits have been described, with a resulting combination of more than 22 integrins with varying ligand specificity.⁴ The surrounding ECM as well as integrin-matrix interactions regulate a variety of cell behaviors, including migration,^{5, 6} proliferation,⁷ proteinase production, and differentiation.⁸⁻¹⁰

During the processes of VSMC migration from the media to the intima, cells degrade and dissociate from the ECM proteins. This process involves three steps: a phenotypic change from the contractile to the synthetic state, proteolysis of ECM proteins, and cell migration through matrix digestion, process that resembles tumor cell invasion.¹¹

Remodeling of the small arteries occurs in both human and experimental models of hypertension and involves changes in ECM and its interactions with VSMCs. Restructuring of VSMCs may be in part triggered by adhesion molecules such as integrins, which transduce signals from the extracellular environment to cytoskeletal fibrillar components.^{12,}

¹³ Changes in ECM components and the corresponding adhesion receptors, and interactions between VSMC and matrix proteins may result in rearrangement of these components of the vascular wall. Thus, fibronectin, laminin and integrins participate in resistance artery remodeling.¹⁴ MMP activation is also necessary for VSMC migration. Recent evidence supports the concept that MMPs play an important role in VSMC migration into the intima in the balloon-injured carotid artery.¹⁵⁻¹⁷

We previously demonstrated that small artery remodeling in Ang II-induced hypertension was mediated by both AT₁ and AT₂ receptors through alteration of activity of MMPs and of tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMPs), which affected ECM content and vascular mechanics of resistance vessels.¹⁸ We now hypothesized that as a result of changes in ECM components and their corresponding adhesion receptors, cell-matrix interactions would lead to a rearrangement of VSMC and restructuring of the vascular wall. Accordingly, we questioned whether changes in the expression of the various vascular integrins in Ang II-infused rats result from regulation by AT₁ and/or by AT₂ receptors, using a selective AT₁ or a combined AT₁/AT₂ receptor antagonist.

Methods

Antibodies and reagents

All reagents were from Sigma Chemicals (St. Louis, MO) unless otherwise noted. Sar-Ile was purchased from Bachem (Torrance, CA) while anti- α_1 subunit and anti- β_3 subunit antibodies were from Chemicon (Temecula, CA). Osteopontin antibody was purchased from Santa Cruz Biotechnologies (Santa Cruz, CA). Anti- α_5 and anti- β_{1a} antibodies were generous gifts from Dr. R. Hynes (Howard Hughes Medical Institute, Chevy Chase, MD) and Dr. P. Liu (Toronto General Hospital, Toronto, ON, Canada), respectively. Antiserum to the α_8 subunit was generated as described elsewhere,¹⁹ and all secondary antibodies were

from Vector Laboratories (Burlingame, CA).

Animal Experiments

The study protocol was approved by the Animal Care Committee of the Clinical Research Institute of Montreal and performed following recommendations of the Canadian Council of Animal Care. Male Sprague Dawley rats (Charles Rivers, St-Constant, QC, Canada), housed under controlled conditions, were infused with Ile⁵-Ang II (120 ng/kg/min, Calbiochem, La Jolla, CA) via osmotic mini-pumps (Alzet Corp., Cupertino, CA).¹⁸ The selective AT₁ receptor antagonist losartan (10 mg/kg/day) and the vasodilator hydralazine (25 mg/kg/day) were given in the drinking water, while the combined AT₁/AT₂ receptor antagonist Sar-Ile was infused via osmotic mini-pumps (10 µg/kg/min), all for 7 days. Systolic blood pressure (SBP) was measured by the tail-cuff method as previously described¹⁸ and rats were then killed humanely.

Integrin and osteopontin immunohistochemistry

Aorta were fixed in Russel fixative and embedded in paraffin. Endogenous peroxidase in 5-µm-thick sections was quenched by incubation with 0.3% H₂O₂ in 0.03% Tween 20-tris buffer (TBT) for 30 min. Nonspecific binding was blocked by incubation in 10% normal serum in TBT. All antigens were detected by overnight incubation with the appropriate antibody in TBT containing 10% normal serum in a humidified chamber. Primary antibodies were revealed by secondary antibodies coupled to biotin-avidin-peroxidase complex (Vectastain ABC kit, Vector Laboratories, Burlingame, CA). Peroxidase activity was detected with 1 mg/mL diaminobenzidine tetrahydrochloride and 0.2% H₂O₂. Sections were counterstained with hematoxylin (Vector Laboratories), visualized with Zeiss Axiophot 100M microscope (Carl Zeiss Microimaging Inc., Thornwood, NY), and analyzed with Northern Eclipse image analysis software (Empix Imaging Inc., Mississauga, ON, Canada). Staining was corrected by the surface area. Nonspecific staining was verified by the replacement of primary antibody by appropriate normal serum.

Statistical Analysis

Data are presented as mean \pm SEM. Immunohistochemistry quantification was analyzed by one-way ANOVA followed by Student–Newman–Keuls test. $P<0.05$ was considered statistically significant.

Results

Vascular Integrin subunit expression

Vascular integrin α_1 subunit expression was unaffected by Ang II, or concomitant treatment with either Sar-Ile or hydralazine, but was significantly increased following AT₁ receptor blockade with losartan ($P<0.001$ vs. all groups, Figure 1 and Figure I, please see <http://hyper.ahajournals.org>). Vascular expression of integrin α_5 subunit was significantly increased by Ang II ($P<0.05$ vs. control, Figure 2 and Figure II, please see <http://hyper.ahajournals.org>) and even further increased by losartan ($P<0.001$ vs. control, $P<0.01$ vs. Ang II, Figure 2), while it decreased significantly with Sar-Ile, ($P<0.001$ vs. Ang II and Los, $P<0.01$ vs. Control, Figure 2) and hydralazine ($P<0.001$ vs. Ang II and losartan, $P<0.05$ vs. control, Figure 2). Ang II induced integrin α_8 subunit expression ($P<0.001$ vs. control, Figure 3 and Figure III, please see <http://hyper.ahajournals.org>), which was reduced by losartan ($P<0.001$ vs. Ang II, Figure 3). α_8 subunit expression was not decreased by either Sar-Ile ($P<0.001$ vs. Ang II, $P<0.01$ vs. control) or hydralazine ($P<0.001$ vs. Ang II) (Figure 3).

Ang II-induced expression of β_1 and β_3 subunits (Figures 4 and 5; Figures IV and V, please see <http://hyper.ahajournals.org>) was significantly lowered by losartan, Sar-Ile and hydralazine (Figures 4 and 5).

Osteopontin expression

Osteopontin expression was significantly increased by Ang II ($P < 0.001$ vs. control, Figure 6 and Figure IV, please see <http://hyper.ahajournals.org>), and this was partially blocked by losartan ($P < 0.001$ vs. Ang II, $P < 0.05$ vs. control), and abrogated by Sar-Ile and hydralazine ($P < 0.001$ vs. Ang II, $P < 0.05$ vs. losartan).

Discussion

We previously reported that dual blockade of AT₁/AT₂ receptors with Sar-Ile compared to AT₁ receptor blockade with losartan differentially altered structure, mechanics and composition of small mesenteric resistance arteries in response to Ang II infusion, in association with changes in MMP-2 activity and TIMP-2 binding.¹⁸ These findings led us to investigate here the possible role of vascular integrins and their ligands in the changes observed in Ang II-infused rats treated with AT₁ or combined AT₁/AT₂ receptor antagonists. In this previous study, we found that SBP was significantly increased by 7-day Ang II infusion (177 ± 7 vs. 113 ± 2 mmHg, controls, $P < 0.001$) and that this increase was significantly blunted by losartan (139 ± 4 mmHg), hydralazine (134 ± 7 mmHg) and Sar-Ile (154 ± 7 mmHg). Despite no significant differences in the effectiveness of BP reduction between dual AT₁/AT₂ antagonism by Sar-Ile and that of specific AT₁ antagonism by losartan, Sar-Ile treated animals showed a trend to higher SBP values.¹⁸ The present study demonstrates a differential role of AT₁ and AT₂ receptors in the regulation of vascular integrin expression. Expression of integrin α and β subunits was altered after blockade of either AT₁ receptors alone, or both AT₁ and AT₂ receptors. In addition to differential integrin subunit expression, osteopontin, which has high affinity to several integrins, also increased after Ang II infusion and was differentially regulated by AT₁ and AT₂ receptors.

Increased VSMC proliferation and migration contribute to the pathogenesis of hypertension.²⁰ A large number of agents and mechanisms (growth factors, ECM, cell-cell

interactions, etc.) regulate VSMC growth and migration,^{20, 21} but precise cellular signaling mechanisms involved have not been completely elucidated. Kohno *et al.*, showed *in vitro* that Ang II via AT₁ receptor stimulates migration and proliferation of human coronary artery SMC.²² Ang II, via AT₁ receptors, increased cardiac fibroblast adhesion through activation of multiple signaling pathways, which include upregulation of osteopontin and α_v , β_3 , and β_5 integrins, leading to development of left ventricular hypertrophy in spontaneously hypertensive rats.²³

In the present study, expression of α_1 integrin subunits, one of the major integrin receptors for collagen, was increased after AT₁ antagonism. This was prevented by blockade of AT₁ and AT₂ receptors with Sar-Ile, which suggests that AT₂ receptors are implicated in expression of this integrin subunit. Because of opposing effects of AT₁ and AT₂ receptors on BP, AT₁ receptor stimulation could inhibit α_1 subunit expression. Thus, simultaneous blockade of AT₁ and AT₂ receptors would result in reduced effects relative to selective blockade of AT₁ receptors. α_1 integrin mediates collagen-triggered signaling and has been proposed to signal through the Ras/Shc/MAPK pathway which inhibits MMP synthesis.²⁴ In α_1 integrin subunit null mice, angiogenesis was reduced²⁵. It has accordingly been suggested that this results from excess MMP activation, with inhibition of angiogenesis via generation of angiotatin from circulating plasminogen, which demonstrates the potential of Ang II-regulated α_1 subunit-containing integrins to influence remodeling of the vasculature.

The α_5 integrin subunit, which is part of $\alpha_5\beta_1$ integrin, the fibronectin receptor and involved in fibronectin polymerisation,²⁶ was significantly increased by Ang II, and further enhanced by AT₁ antagonism but reduced by concomitant AT₁ and AT₂ blockade. This result suggests a role for AT₂ receptors in the regulation of α_5 integrin subunits. The interaction between the fibronectin receptor $\alpha_5\beta_1$ integrin²⁷ and the RGD site of fibronectin²⁸ is required for matrix assembly in most cellular systems.^{29, 30} This is important for VSMC proliferation, since inhibition of fibronectin matrix assembly inhibits VSMC

proliferation,³¹ which may explain in part our previous result showing abrogation of growth in resistance arteries after Sar-Ile administration. This occurred despite significant increase in fibronectin, which we demonstrated is modulated by AT₂ receptors.¹⁸ In support of our findings, Chassagne *et al.* demonstrated that AT₂ receptor activation inhibited VSMC migration through fibronectin secretion and subsequent VSMC attachment.³² It is therefore possible that α_5 subunit expression, which can mediate cell attachment to fibronectin, is associated with a non-migratory VSMC phenotype.

Ang II significantly increased vascular α_8 subunit expression, similarly to what was previously shown with cardiac fibroblasts.³³ This increase may be BP-dependent, since it was prevented by losartan, Sar-Ile and hydralazine. α_8 integrin expression is associated with induction of the contractile phenotype since its upregulation was reported to occur in association with differentiation of fibroblasts into myofibroblasts¹⁹ and reduction in migratory phenotype.³⁴

The regulation of the two major β subunits participates in the overall expression and function of integrins. The expression of the β_1 subunit was significantly increased after Ang II infusion. This increase was prevented by all treatments, suggesting that the regulation of β_1 subunits is BP-dependent, similarly to that of α_8 subunits which are associated to them.³⁵ Expression of the β_3 subunit, also increased by Ang II, was abrogated by losartan, in opposition to the β_1 subunit, whose expression was only partially blunted by AT₁ antagonism. β_3 subunit expression was unaltered by dual AT₁/AT₂ antagonism and hydralazine. Thus, β_3 subunit expression may be under AT₁ receptor regulation, as previously reported by Kawano *et al.*²³ β_3 and α_v subunits, which form the $\alpha_v\beta_3$ integrin, play a critical role in cell proliferation and migration and accordingly in vascular remodeling.³⁶

Another RGD-containing protein that may be associated with VSMC proliferation is osteopontin, a soluble secreted phospho-glycoprotein which plays a role in VSMC adhesion with $\alpha_v\beta_3$ -integrin.^{37, 38} Although numerous functions have been attributed to osteopontin *in vitro*, the *in vivo* function remains less defined. Osteopontin may be regulated by Ang II and can modulate Ang II-induced fibrosis.^{39, 40} Osteopontin may serve as a negative modulator of integrin-ECM interactions.⁴¹ Extending our previous work, we show that osteopontin expression is partially affected by AT₁ antagonism and further decreased by combined AT₁ and AT₂ receptor blockade, and by hydralazine, which suggests that it is regulated by BP similarly to the α_8 and β_1 integrin subunits. It is noteworthy that most vascular integrin subunits as well as osteopontin expression were partially reduced by hydralazine, suggesting a pressure-dependent effect. The observed effect may not be however merely BP-dependent.^{18, 42} It has been suggested that vascular integrins are not only mechanosensors for shear and tension, but can also participate in the control of vascular tone.⁴³ Selective AT₁ receptor blockade lowered SBP and improved vascular remodeling in Ang II-infused rats, which did not occur with hydralazine despite similar SBP lowering.¹⁸ In addition, because α_8 , β_1 and β_3 subunit expression levels were similar in these groups, this allows the conclusion to be drawn that these subunits do not play a role in vascular remodeling in this model.

VSMC behavior in the media of blood vessels and their role in vascular remodeling may be modulated by several ECM proteins, such as fibronectin and ligands for $\alpha_5\beta_1$, $\alpha_8\beta_1$ and $\alpha_v\beta_3$. These integrins have been shown to play a role in cellular events including differentiation, development, wound healing, adhesion and cell migration. Hedin *et al.*,⁴⁴ demonstrated that fibronectin and MMP synthesis are involved in the conversion of the VSMC phenotype from contractile to synthetic. Therefore, it is plausible that in the absence of Ang II receptor activation, VSMC phenotype is migratory rather than contractile, as shown when AT₁ receptors are blocked.⁴⁵ When both AT₁ and AT₂ receptors were blocked, there was less TIMP-2 binding to MMP-2, more MMP-2 activity, and consequently more

ECM degradation and growth was abrogated. These results are supported by the present data since there was a decrease of most integrin subunits, such as $\alpha_8\beta_1$ integrin, responsible for reduction in VSMC anchoring to the surrounding ECM, and consequently possible emergence of a synthetic, migratory and non-proliferative phenotype.

There are limitations to this study. The use of a selective AT_2 receptor antagonist alone or in combination with losartan would have been informative, but because of limited availability and prohibitive high cost, this could not be performed and was replaced by Sar-Ile. By using Sar-Ile, a combined AT_1/AT_2 antagonist, we obtained evidence of a role of AT_2 receptors by comparison with the effect of a selective AT_1 receptor antagonist. We have discussed a change to a migratory phenotype represented by a differential regulation of integrins associated with this phenotype, but in this *in vivo* study we have not actually demonstrated the presence of this phenotype. The association of certain integrins with a VSMC migratory phenotype has previously been shown by others.^{34, 46}

In conclusion, blockade of AT_1 or both AT_1 and AT_2 receptors in Ang II-infused rats differentially modulated integrin and osteopontin expression which may result in a different VSMC phenotype. Whereas AT_1 receptors enhance vascular α_8 , β_1 , and β_3 integrin subunit expression and osteopontin deposition, and reduce α_1 integrin expression, AT_2 receptors increase expression of α_1 and α_5 integrin subunits.

Perspectives

These results demonstrate the differential importance of AT_1 and AT_2 receptors in the regulation of vascular integrins in Ang II-induced hypertension. Regulation of integrins and their implication in vascular remodeling or in cell phenotypic changes by AT_1 and AT_2 receptors may explain in part different effects of angiotensin-converting enzyme inhibitors and angiotensin receptor blockers on cardiovascular risk reduction in various cardiovascular conditions.

Acknowledgements

This work was supported by grant 13570 (to ELS) and a Group Grant to the Multidisciplinary Research Group on Hypertension, both from the Canadian Institutes of Health Research (CIHR). The authors are grateful to Suzanne Diébold and André Turgeon for their excellent technical assistance and to Annie Vallée and Dr. Fatiha Bouzeghrane for assistance in histology and scientific advice, respectively.

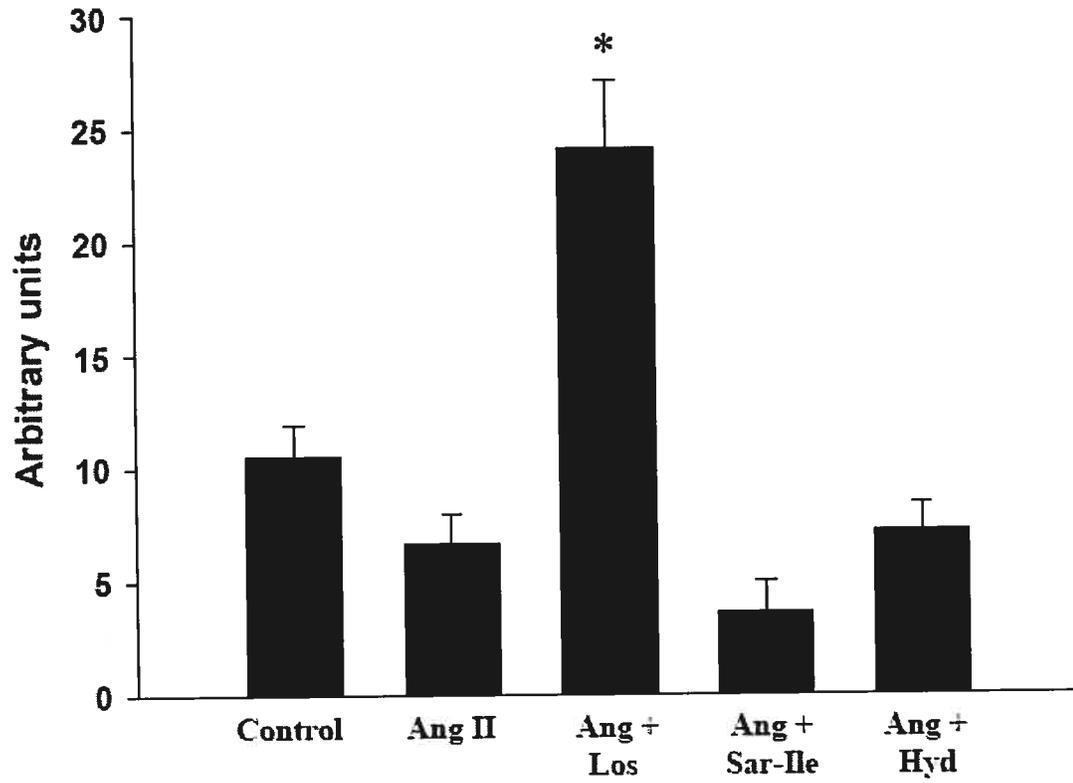


Figure 1: Vascular immunohistochemical staining of α_1 integrin subunits. Results are means \pm SEM. Los, losartan and Hyd, hydralazine. * P <0.001 vs. all groups.

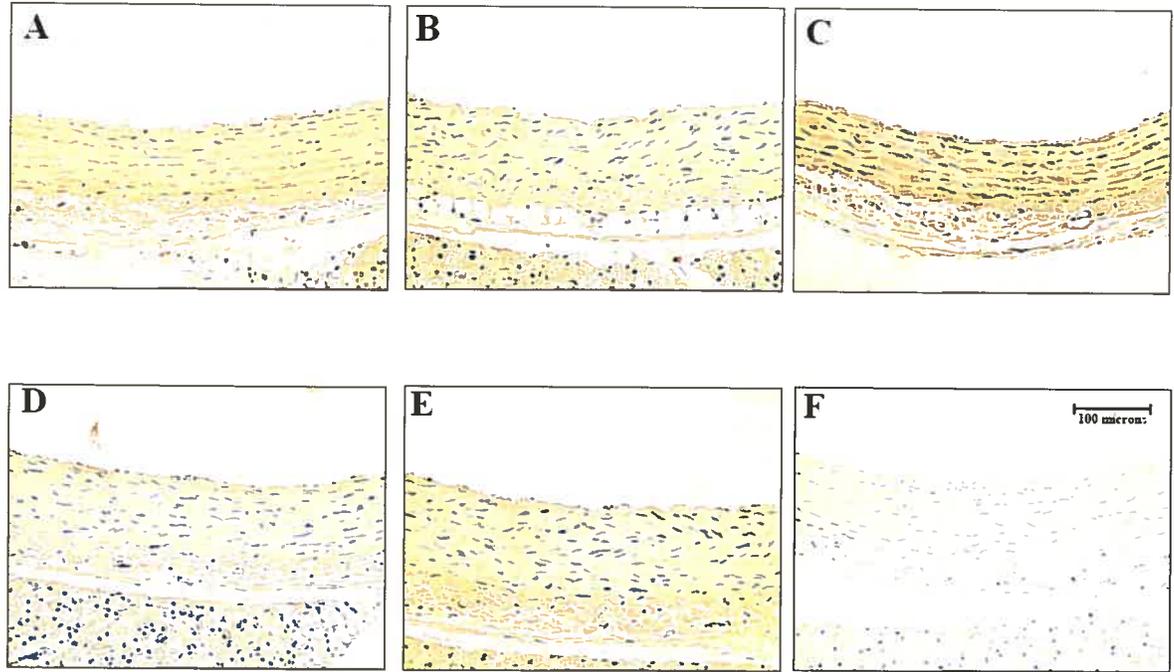


Figure I: Vascular immunohistochemical staining of α_1 integrin subunits. Representative images in (A) control, (B) Ang II (C) losartan (D) Sar-Ile or (E) hydralazine. (F) Negative control. Brown represents α_1 subunit staining whereas nuclei appear blue.

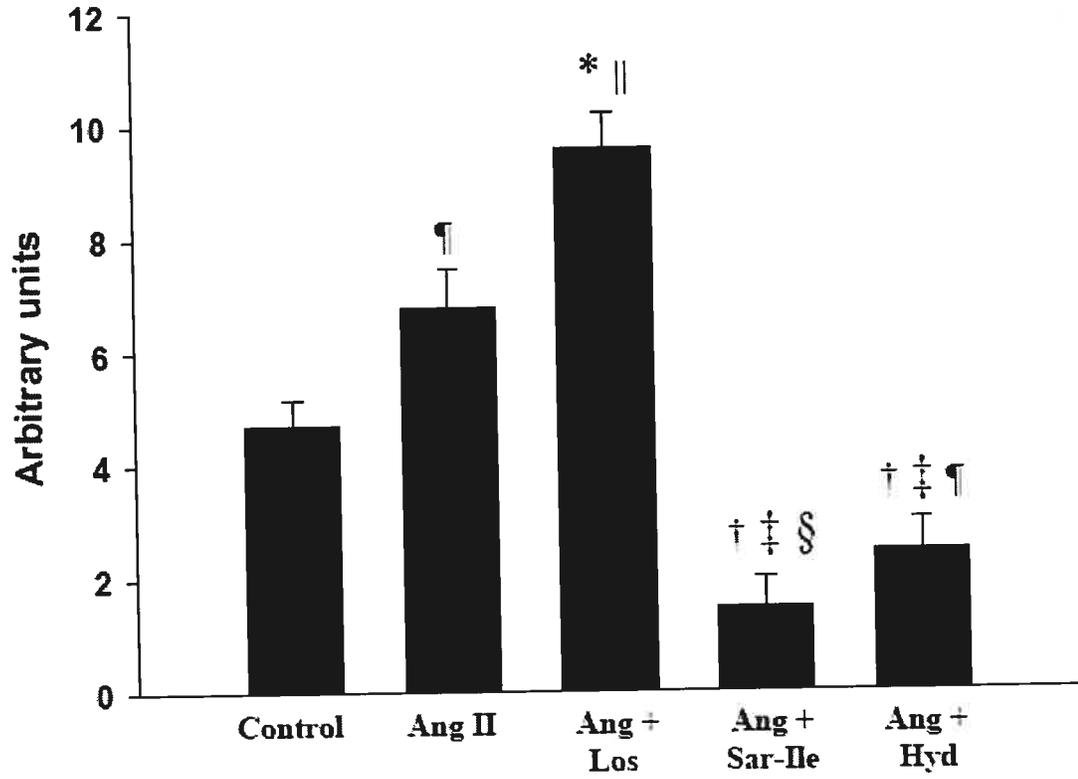


Figure 2: Vascular immunohistochemical staining of α_5 integrin subunits. Results are means \pm SEM. * P <0.001 vs. Control; † P <0.001 vs. Ang II; ‡ P <0.001 vs. Ang II + Los; § P <0.01 vs. Control; // P <0.01 vs. Ang II; ¶ P <0.05 vs. Control.

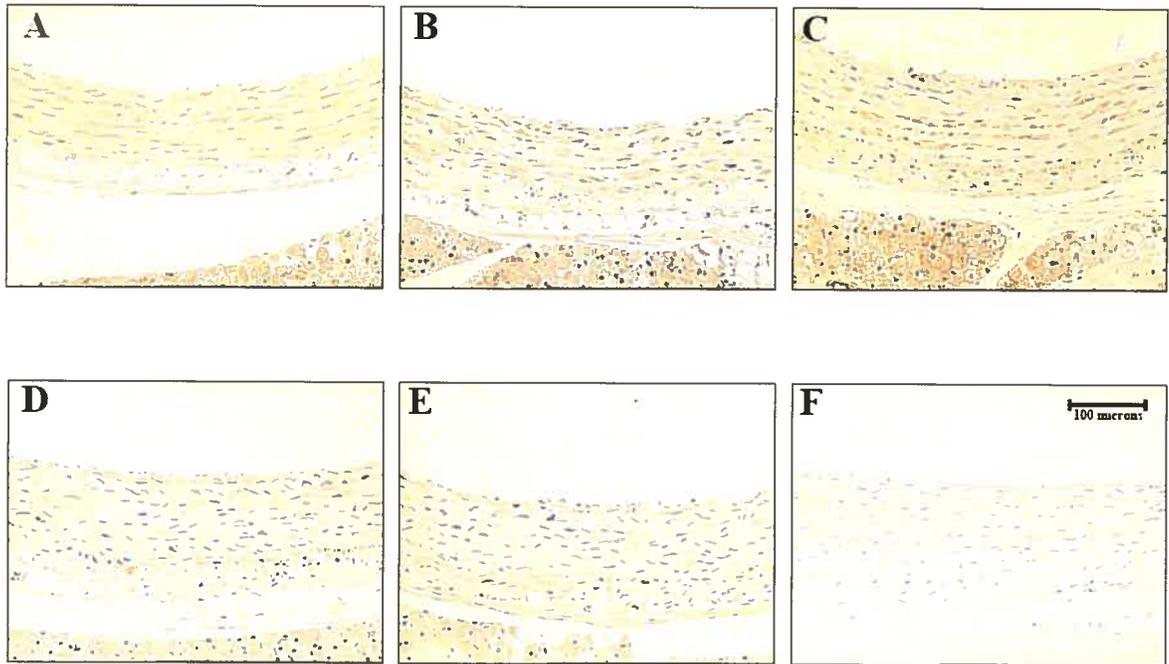


Figure II: Vascular immunohistochemical staining of α_5 integrin subunits. Representative images in (A) control, (B) Ang II (C) losartan (D) Sar-Ile or (E) hydralazine. (F) Negative control. Brown represents α_5 subunit staining whereas nuclei appear blue.

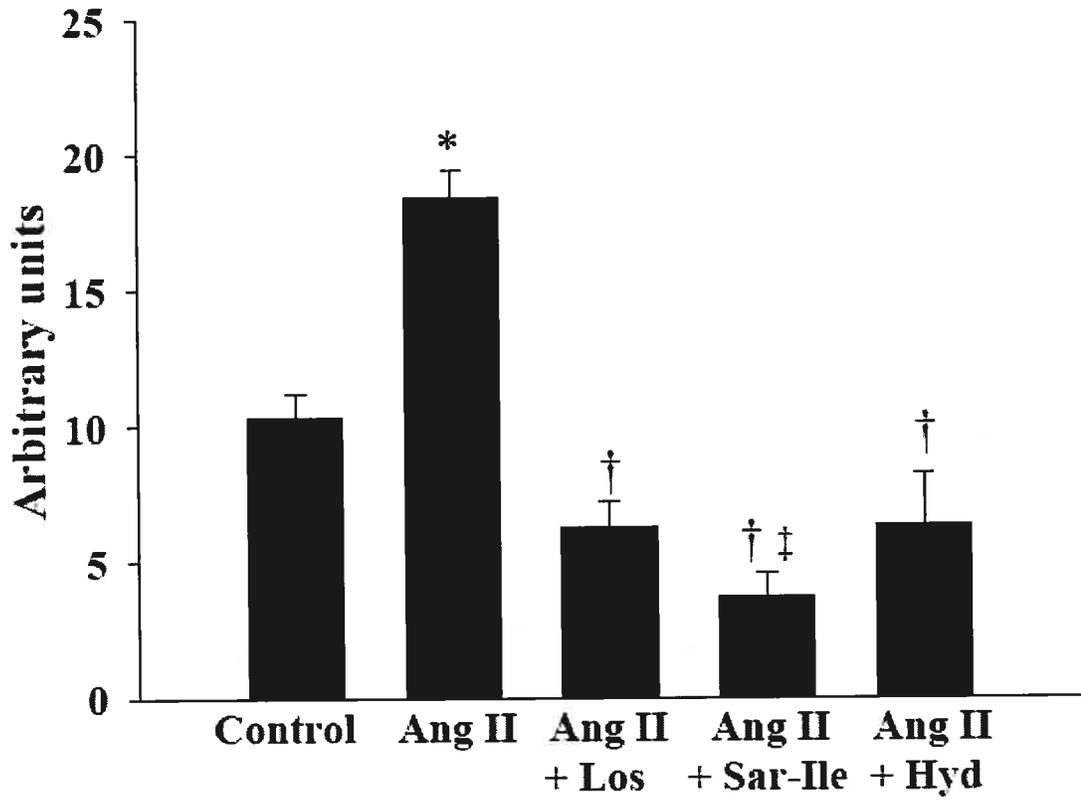


Figure 3: Vascular immunohistochemical staining of α_8 integrin subunits. Results are means \pm SEM. * P <0.001 vs. Control; † P <0.001 vs. Ang II; ‡ P <0.01 vs. Control.

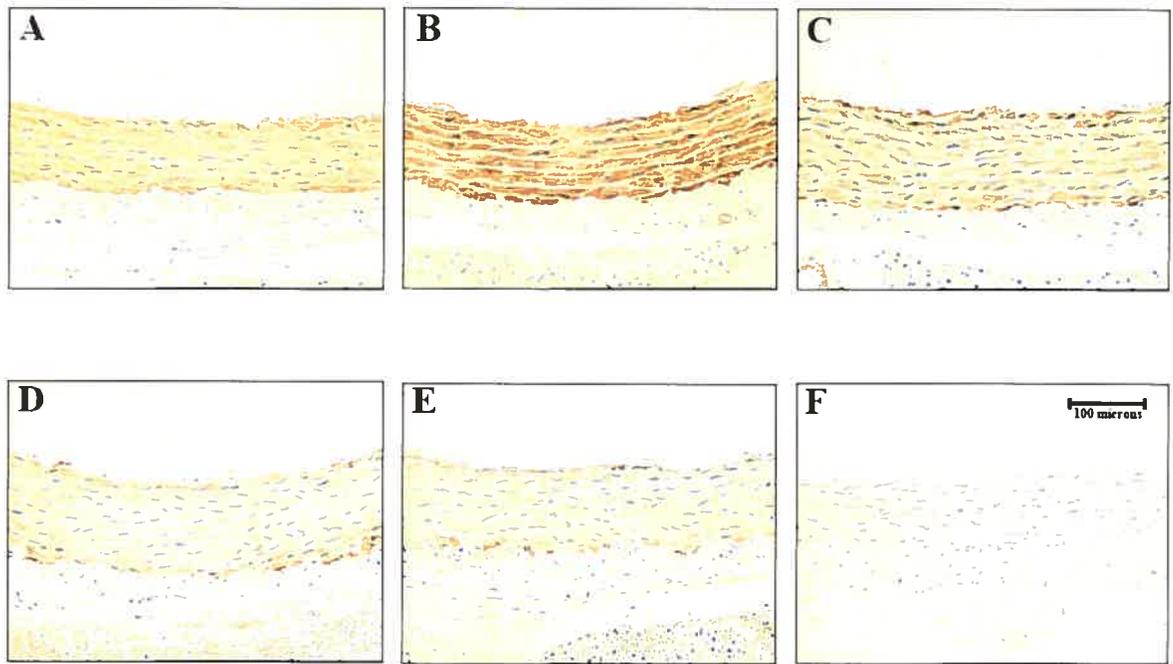


Figure III: Vascular immunohistochemical staining of α_8 integrin subunits. Representative images in (A) control, (B) Ang II (C) losartan (D) Sar-Ile or (E) hydralazine. (F) Negative control. Brown represents α_8 subunit staining whereas nuclei appear blue.

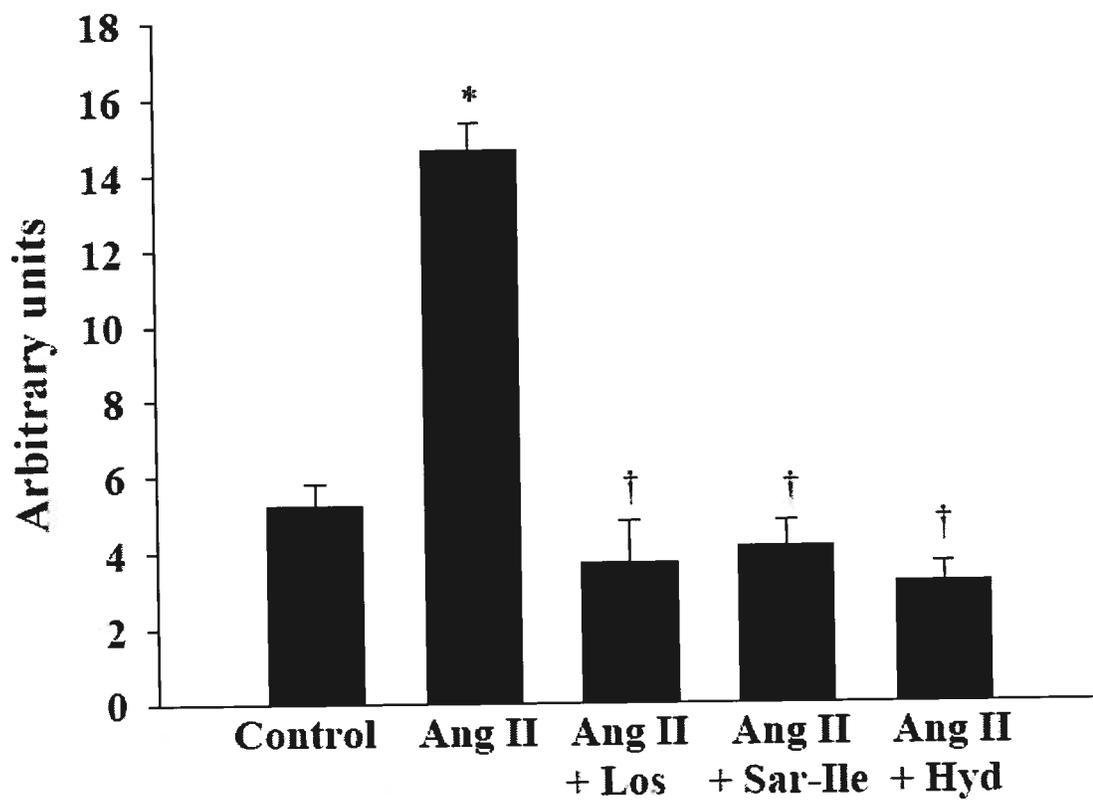


Figure 4: Vascular immunohistochemical staining of β_1 integrin subunits. Results are means \pm SEM. * P <0.001 vs. Control; † P <0.001 vs. Ang II.

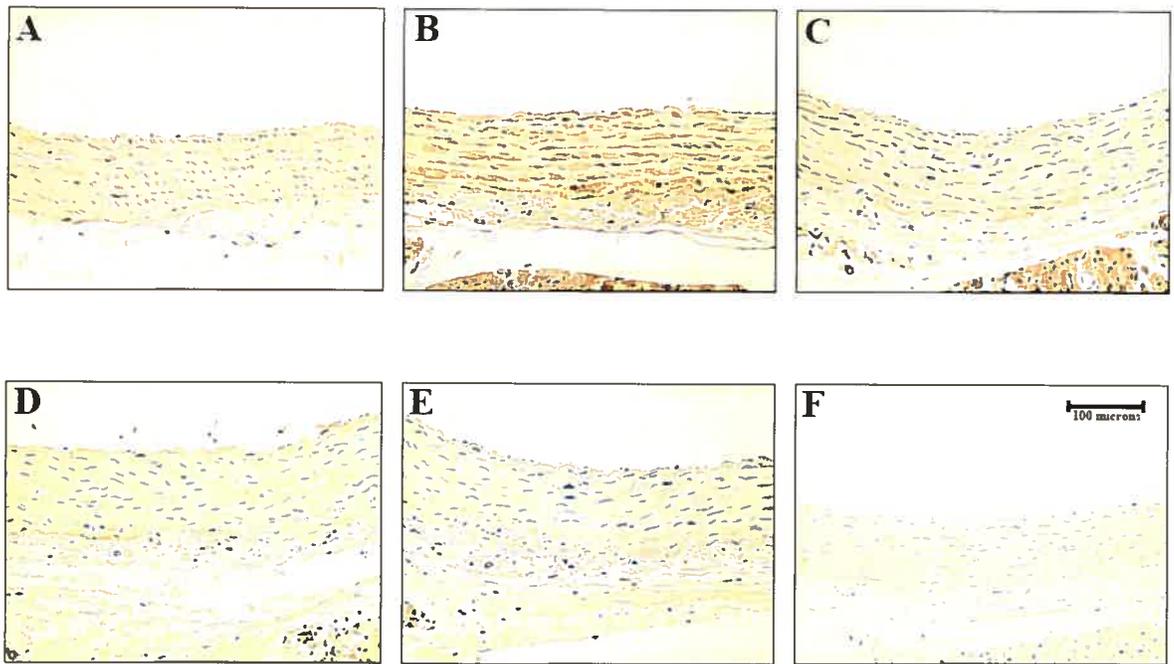


Figure IV: Vascular immunohistochemical staining of β_1 integrin subunits. Representative images in (A) control, (B) Ang II (C) losartan (D) Sar-Ile or (E) hydralazine. (F) Negative control. Brown represents β_1 subunit staining whereas nuclei appear blue.

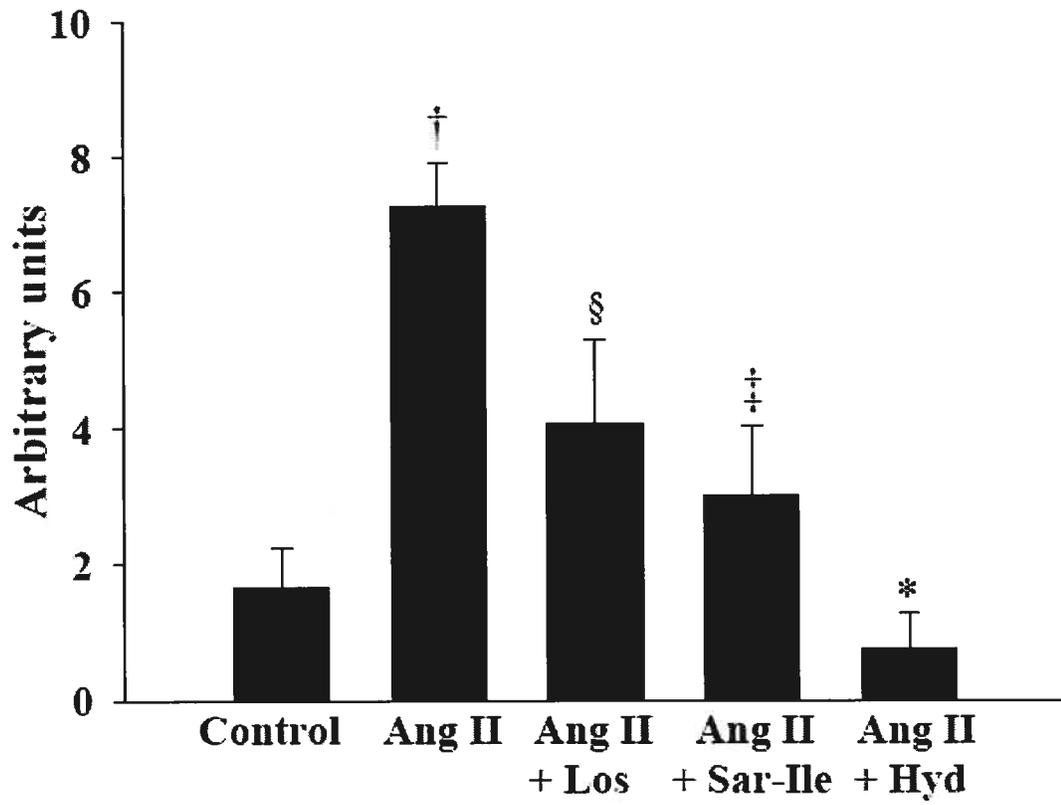


Figure 5: Vascular immunohistochemical staining of β_3 integrin subunits. Results are means \pm SEM. * P <0.001 vs. Ang II; † P <0.01 vs. Control; ‡ P <0.01 vs. Ang II; § P <0.05 vs. Ang II.

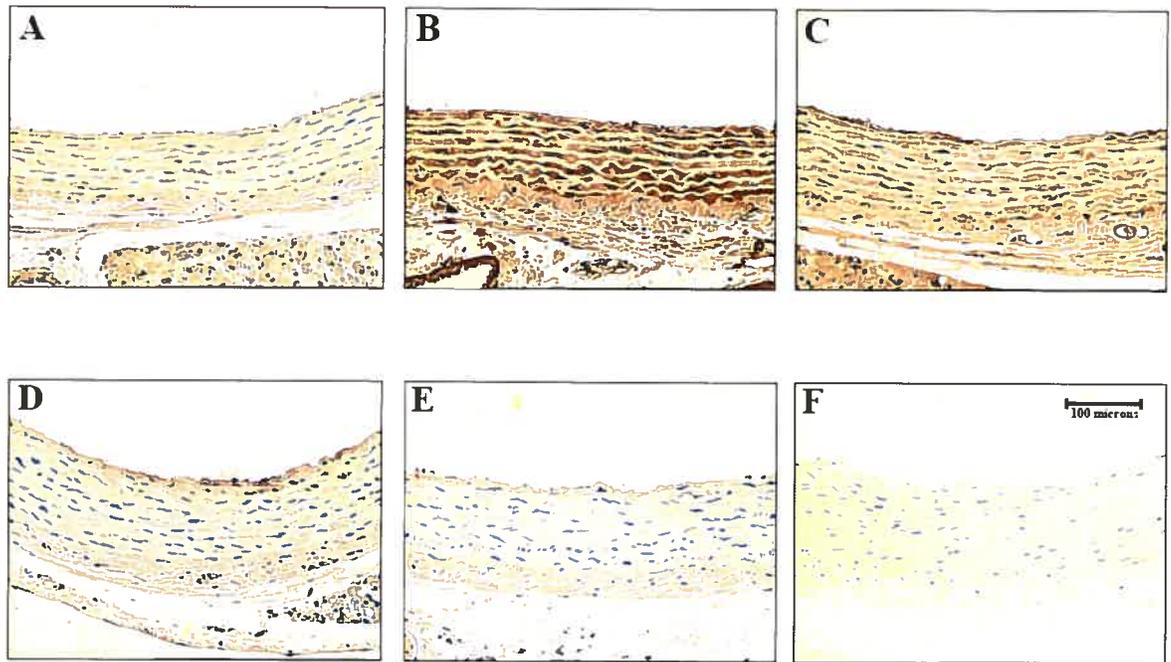


Figure V: Vascular immunohistochemical staining of β_3 integrin subunits. Representative images in (A) control, (B) Ang II (C) losartan (D) Sar-Ile or (E) hydralazine. (F) Negative control. Brown represents β_1 subunit staining whereas nuclei appear blue.

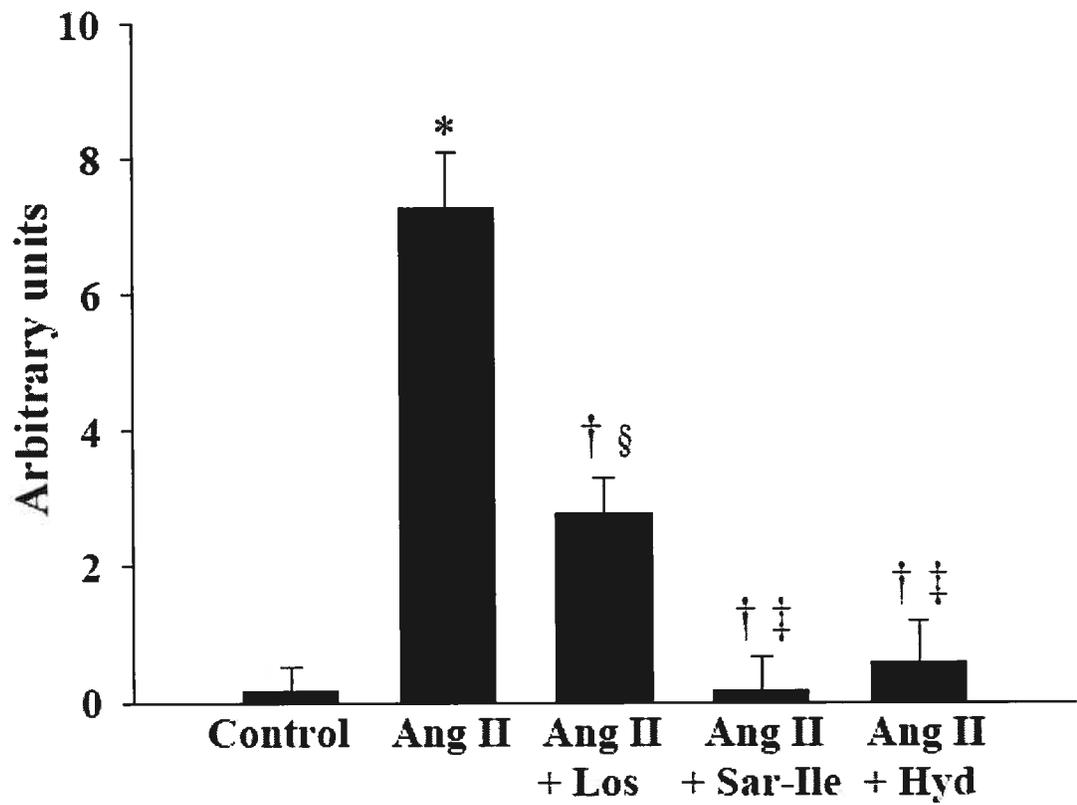


Figure 6: Vascular immunohistochemical staining of osteopontin. Results are means \pm SEM. * P <0.001 vs. Control; † P <0.001 vs. Ang II; ‡ P <0.05 vs. Ang II + Los; § P <0.05 vs. Control.

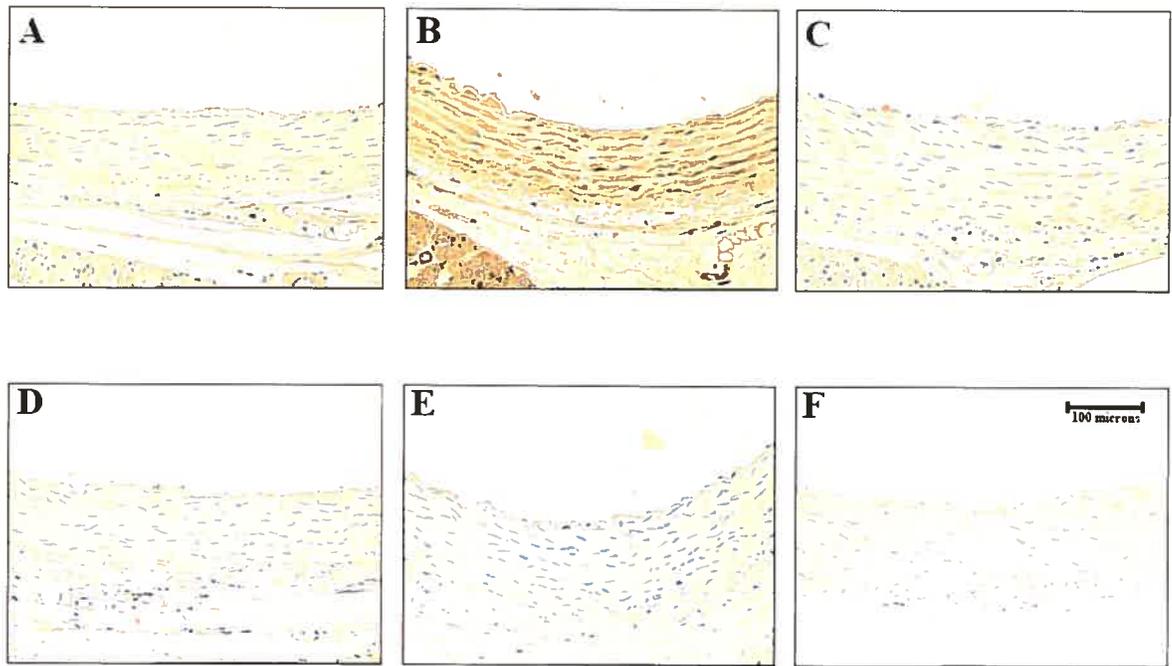


Figure VI: Vascular immunohistochemical staining of osteopontin. Representative images in (A) control, (B) Ang II (C) losartan (D) Sar-Ile or (E) hydralazine. (F) Negative control. Brown represents α_1 subunit staining whereas nuclei appear blue.

References

1. Carey DJ. Vascular smooth muscle extracellular matrix. *J Vasc Surg.* 1992;15:917-919.
2. Mackie EJ, Scott-Burden T, Hahn AW, Kern F, Bernhardt J, Regenass S, Weller A, Buhler FR. Expression of tenascin by vascular smooth muscle cells. Alterations in hypertensive rats and stimulation by angiotensin II. *Am J Pathol.* 1992;141:377-388.
3. Hedin U, Holm J, Hansson GK. Induction of tenascin in rat arterial injury. Relationship to altered smooth muscle cell phenotype. *Am J Pathol.* 1991;139:649-656.
4. Hynes RO. Integrins: versatility, modulation, and signaling in cell adhesion. *Cell.* 1992;69:11-25.
5. Brown SL, Lundgren CH, Nordt T, Fujii S. Stimulation of migration of human aortic smooth muscle cells by vitronectin: implications for atherosclerosis. *Cardiovasc Res.* 1994;28:1815-1820.
6. Panda D, Kundu GC, Lee BI, Peri A, Fohl D, Chackalaparampil I, Mukherjee BB, Li XD, Mukherjee DC, Seides S, Rosenberg J, Stark K, Mukherjee AB. Potential roles of osteopontin and $\alpha_v\beta_3$ integrin in the development of coronary artery restenosis after angioplasty. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1997;94:9308-9313.
7. Koyama H, Raines EW, Bornfeldt KE, Roberts JM, Ross R. Fibrillar collagen inhibits arterial smooth muscle proliferation through regulation of Cdk2 inhibitors. *Cell.* 1996;87:1069-1078.
8. Owens GK, Kumar MS, Wamhoff BR. Molecular regulation of vascular smooth muscle cell differentiation in development and disease. *Physiol Rev.* 2004;84:767-801.
9. Werb Z. ECM and cell surface proteolysis: regulating cellular ecology. *Cell.* 1997;91:439-442.
10. Yamamoto M, Yamamoto K, Noumura T. Type I collagen promotes modulation of cultured rabbit arterial smooth muscle cells from a contractile to a synthetic phenotype. *Exp Cell Res.* 1993;204:121-129.

11. Pauly RR, Passaniti A, Bilato C, Monticone R, Cheng L, Papadopoulos N, Gluzband YA, Smith L, Weinstein C, Lakatta EG, . Migration of cultured vascular smooth muscle cells through a basement membrane barrier requires type IV collagenase activity and is inhibited by cellular differentiation. *Circ Res.* 1994;75:41-54.
12. Intengan HD, Schiffrin EL. Vascular remodeling in hypertension: roles of apoptosis, inflammation, and fibrosis. *Hypertension.* 2001;38:581-587.
13. Wang N, Butler JP, Ingber DE. Mechanotransduction across the cell surface and through the cytoskeleton. *Science.* 1993;260:1124-1127.
14. Bezie Y, Lacolley P, Laurent S, Gabella G. Connection of smooth muscle cells to elastic lamellae in aorta of spontaneously hypertensive rats. *Hypertension.* 1998;32:166-169.
15. Dollery CM, McEwan JR, Henney AM. Matrix metalloproteinases and cardiovascular disease. *Circ Res.* 1995;77:863-868.
16. Bendeck MP, Irvin C, Reidy MA. Inhibition of matrix metalloproteinase activity inhibits smooth muscle cell migration but not neointimal thickening after arterial injury. *Circ Res.* 1996;78:38-43.
17. Zempo N, Koyama N, Kenagy RD, Lea HJ, Clowes AW. Regulation of vascular smooth muscle cell migration and proliferation in vitro and in injured rat arteries by a synthetic matrix metalloproteinase inhibitor. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1996;16:28-33.
18. Brassard P, Amiri F, Schiffrin EL. Combined angiotensin II type 1 and type 2 receptor blockade on vascular remodeling and matrix metalloproteinases in resistance arteries. *Hypertension.* 2005;46:598-606.
19. Bouzeghrane F, Mercure C, Reudelhuber TL, Thibault G. $\alpha 8 \beta 1$ integrin is upregulated in myofibroblasts of fibrotic and scarring myocardium. *J Mol Cell Cardiol.* 2004;36:343-353.
20. Berk BC. Vascular smooth muscle growth: autocrine growth mechanisms. *Physiol Rev.* 2001;81:999-1030.
21. Owens GK. Role of mechanical strain in regulation of differentiation of vascular smooth muscle cells. *Circ Res.* 1996;79:1054-1055.

22. Kohno M, Ohmori K, Nozaki S, Mizushige K, Yasunari K, Kano H, Minami M, Yoshikawa J. Effects of valsartan on angiotensin II-induced migration of human coronary artery smooth muscle cells. *Hypertens Res.* 2000;23:677-681.
23. Kawano H, Cody RJ, Graf K, Goetze S, Kawano Y, Schnee J, Law RE, Hsueh WA. Angiotensin II enhances integrin and α -actinin expression in adult rat cardiac fibroblasts. *Hypertension.* 2000;35:273-279.
24. Pozzi A, Wary KK, Giancotti FG, Gardner HA. Integrin $\alpha 1\beta 1$ mediates a unique collagen-dependent proliferation pathway in vivo. *J Cell Biol.* 1998;142:587-594.
25. Pozzi A, Moberg PE, Miles LA, Wagner S, Soloway P, Gardner HA. Elevated matrix metalloprotease and angiostatin levels in integrin $\alpha 1$ knockout mice cause reduced tumor vascularization. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2000;97:2202-2207.
26. Pickering JG, Chow LH, Li S, Rogers KA, Rocnik EF, Zhong R, Chan BM. $\alpha 5\beta 1$ integrin expression and luminal edge fibronectin matrix assembly by smooth muscle cells after arterial injury. *Am J Pathol.* 2000;156:453-465.
27. Pytela R, Pierschbacher MD, Ruoslahti E. Identification and isolation of a 140 kd cell surface glycoprotein with properties expected of a fibronectin receptor. *Cell.* 1985;40:191-198.
28. Pierschbacher MD, Ruoslahti E. Variants of the cell recognition site of fibronectin that retain attachment-promoting activity. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1984;81:5985-5988.
29. Fogerty FJ, Akiyama SK, Yamada KM, Mosher DF. Inhibition of binding of fibronectin to matrix assembly sites by anti-integrin ($\alpha 5\beta 1$) antibodies. *J Cell Biol.* 1990;111:699-708.
30. Wu C, Bauer JS, Juliano RL, McDonald JA. The $\alpha 5\beta 1$ integrin fibronectin receptor, but not the $\alpha 5$ cytoplasmic domain, functions in an early and essential step in fibronectin matrix assembly. *J Biol Chem.* 1993;268:21883-21888.
31. Mercurius KO, Morla AO. Inhibition of vascular smooth muscle cell growth by inhibition of fibronectin matrix assembly. *Circ Res.* 1998;82:548-556.
32. Chassagne C, Adamy C, Ratajczak P, Gingras B, Teiger E, Planus E, Oliviero P, Rappaport L, Samuel JL, Meloche S. Angiotensin II AT_2 receptor inhibits smooth muscle cell migration via fibronectin cell production and binding. *Am J Physiol.* 2002;282:C654-C664.

33. Thibault G, Lacombe MJ, Schnapp LM, Lacasse A, Bouzeghrane F, Lapalme G. Upregulation of $\alpha_8\beta_1$ -integrin in cardiac fibroblast by angiotensin II and transforming growth factor- β_1 . *Am J Physiol*. 2001;281:C1457-C1467.
34. Zargham R, Thibault G. $\alpha_8\beta_1$ Integrin expression in the rat carotid artery: involvement in smooth muscle cell migration and neointima formation. *Cardiovasc Res*. 2005;65:813-822.
35. Moiseeva EP. Adhesion receptors of vascular smooth muscle cells and their functions. *Cardiovasc Res*. 2001;52:372-386.
36. Sajid M, Stouffer GA. The role of $\alpha_v\beta_3$ integrins in vascular healing. *Thromb Haemost*. 2002;87:187-193.
37. Gadeau AP, Campan M, Millet D, Candresse T, Desgranges C. Osteopontin overexpression is associated with arterial smooth muscle cell proliferation in vitro. *Arterioscler Thromb*. 1993;13:120-125.
38. Liaw L, Almeida M, Hart CE, Schwartz SM, Giachelli CM. Osteopontin promotes vascular cell adhesion and spreading and is chemotactic for smooth muscle cells in vitro. *Circ Res*. 1994;74:214-224.
39. Collins AR, Schnee J, Wang W, Kim S, Fishbein MC, Bruemmer D, Law RE, Nicholas S, Ross RS, Hsueh WA. Osteopontin modulates angiotensin II-induced fibrosis in the intact murine heart. *J Am Coll Cardiol*. 2004;43:1698-1705.
40. deBlois D, Lombardi DM, Su EJ, Clowes AW, Schwartz SM, Giachelli CM. Angiotensin II induction of osteopontin expression and DNA replication in rat arteries. *Hypertension*. 1996;28:1055-1063.
41. Rittling SR, Denhardt DT. Osteopontin function in pathology: lessons from osteopontin-deficient mice. *Exp Nephrol*. 1999;7:103-113.
42. Knowles HJ, Tian YM, Mole DR, Harris AL. Novel mechanism of action for hydralazine: induction of hypoxia-inducible factor-1 α , vascular endothelial growth factor, and angiogenesis by inhibition of prolyl hydroxylases. *Circ Res*. 2004;95:162-169.
43. Martinez-Lemus LA, Wu X, Wilson E, Hill MA, Davis GE, Davis MJ, Meininger GA. Integrins as unique receptors for vascular control. *J Vasc Res*. 2003;40:211-233.

44. Hedin U, Bottger BA, Forsberg E, Johansson S, Thyberg J. Diverse effects of fibronectin and laminin on phenotypic properties of cultured arterial smooth muscle cells. *J Cell Biol.* 1988;107:307-319.
45. Holmgren A, Pantev E, Erlinge D, Edvinsson L. Inhibition of angiotensin II-induced contraction by losartan in human coronary arteries. *J Cardiovasc Pharmacol.* 1998;32:662-664.
46. Kappert K, Blaschke F, Meehan WP, Kawano H, Grill M, Fleck E, Hsueh WA, Law RE, Graf K. Integrins $\alpha_v\beta_3$ and $\alpha_v\beta_5$ mediate VSMC migration and are elevated during neointima formation in the rat aorta. *Basic Res Cardiol.* 2001;96:42-49.

CHAPITRE IV : discussion et conclusion

4. DISCUSSION

L'Ang II joue un important rôle au niveau de la biologie vasculaire en contrôlant la contraction, la croissance et l'apoptose des CMLV ainsi que le dépôt de la MEC. Par ces effets, l'Ang II est un important médiateur qui agit à divers niveaux sur le remodelage vasculaire. De plus, l'Ang II est également considéré comme agent pro-inflammatoire puisqu'elle induit l'expression de certaines cytokines telles que l'IL-1 et l'IL-6 et des médiateurs inflammatoires comme les facteurs de transcriptions NF- κ B et AP-1. Plusieurs essais cliniques, que ce soit avec les IECA ou les ARA, ont démontré l'implication de l'Ang II dans la physiopathologie de l'HTA chez l'homme et dans certains modèles expérimentaux d'HTA génétique tels que les SHR. Par conséquent, la compréhension des mécanismes qui agissent sur la régulation de la composition de la MEC et les processus de remodelage vasculaire pourra contribuer au développement de nouvelles stratégies thérapeutiques. Ces stratégies pourraient améliorer ou prévenir le remodelage vasculaire rencontré dans le développement de l'HTA.

4.1. Les récepteurs à l'Ang II et leur importance dans le remodelage vasculaire

Le remodelage vasculaire correspond à toute modification de structure et de fonction artérielle au cours de processus physiologiques et pathologiques. Les modifications adaptatives sur le court terme peuvent s'accompagner de conséquences pathologiques sur le long terme. Au cours de l'HTA, les conséquences sont différentes selon que l'on s'intéresse aux petites artères de résistances ou aux artères de conduction. Les artères de résistances subissent trois types de phénomènes : 1) un remodelage concentrique dit « eutrophique », c'est-à-dire une réorganisation de la même quantité de tissus autour d'un diamètre plus petit ; 2) une raréfaction du lit artériolaire, c'est-à-dire une densité artériolaire diminuée par unité pondérale de tissu perfusé et 3) une atteinte précoce de la fonction endothéliale, avec diminution de la biodisponibilité du NO. La conséquence globale est une augmentation des

résistances périphériques, une altération des capacités de vasodilatation et une ischémie tissulaire en condition critique de perfusion.

Notre première hypothèse visait à vérifier si le récepteur AT_2 à l'Ang II, par ses effets opposés à ceux médié par le récepteur AT_1 , pouvait contrebalancer les effets d'un remodelage vasculaire d'un point de vue mécanique et morphologique. Nous voulions par la même occasion comprendre davantage la contribution de ce récepteur au processus de remodelage vasculaire dans notre modèle d'HTA expérimentale induite par l'Ang II.

Comme il a été proposé que les récepteurs AT_1 et AT_2 avait des effets opposés à divers niveaux, mais surtout sur la régulation de la PA, il était évident pour nous de penser que l'antagonisme simultané des deux récepteurs résulterait en une diminution des effets bénéfiques, relatifs à un antagonisme sélectif du récepteur AT_1 seul, par les ARA. Notre étude démontre en fait que le antagonisme simultané des récepteurs AT_1 et AT_2 par le Sar-Ile, vient altérer le dépôt de la MEC et les propriétés mécaniques des artères de résistances du territoire mésentérique, et ce, de manière différente des changements structuraux vasculaires rencontrés suite à l'infusion d'Ang II et différemment de ce que l'on observe lors de l'antagonisme du récepteur AT_1 seul.

Nous avons démontré que l'Ang II induisait des altérations au niveau des propriétés mécaniques des artères de résistances, déterminées, du moins en partie, par les changements dans la structure et la composition de la paroi vasculaire, qui est atténuée par le blocage du récepteur AT_1 et ce, indépendamment de la réduction de la PA [363]. Notre étude suggère que le récepteur AT_2 a un rôle important à jouer dans la régulation du dépôt de la MEC dans la média de ces artères de résistance, suivant l'infusion d'Ang II, puisque l'antagonisme des récepteurs AT_2 a mené à une augmentation de la rigidité de la paroi vasculaire.

Le remodelage vasculaire dans l'HTA implique deux processus : 1) le remodelage de la média par la croissance, la régression, la contraction ou la relaxation et l'apoptose des CMLV, et 2) l'expansion ou la contraction des molécules de la MEC. Nous avons démontré dans notre étude, que l'indice de croissance des artères de résistance était augmenté suite à l'infusion d'Ang II (+21%), partiellement diminuée par le traitement au losartan (-11%), ce qui venait confirmer des résultats antérieurs montrant que l'Ang II induit, au niveau de l'aorte et des artères mésentériques, la croissance des CMLV via le récepteur AT₁ [364-366]. De plus, nous avons démontré que l'indice de croissance était augmenté suite au traitement à l'hydralazine (+32%), montrant que l'hydralazine peut médier d'autres effets. En plus de ses propriétés vasodilatatrices, il a été rapporté que l'hydralazine pouvait médier des effets trophiques par l'induction de HIF-1 α par la voie des MAPK [367]. Finalement, le traitement au Sar-Ile a aboli la croissance (-1%), ce qui peut être principalement expliqué premièrement par l'antagonisme des récepteurs AT₁ qui sont connus pour favoriser la croissance et deuxièmement, par l'inhibition des récepteurs AT₂, reconnue pour avoir des effets antiprolifératifs [153;368]. La majorité des études, effectuées chez des rats normotendus ont démontré que la stimulation des récepteurs AT₂ était associée à une vasodilatation et à une inhibition de la croissance cellulaire [153]. Des études *in vivo* ont révélé des résultats controversés concernant le rôle des récepteurs AT₂ sur la croissance des CMLV dans différents modèles d'HTA expérimentale. Tandis qu'il a été démontré que les récepteurs AT₂ pouvaient médier une hypertrophie et une différenciation des artères coronaires et de l'aorte [76;369], nous avons démontré que l'hypertrophie induite par la stimulation du récepteur AT₁ dans plusieurs territoires vasculaires chez des rats Wistar infusés à l'Ang II n'était pas affecté par le blocage des récepteurs AT₂ [364;370]. Cependant, Cao et coll. ont montré que l'antagonisme simultané des récepteurs AT₁ et AT₂ induisait une hypertrophie et une prolifération des CMLV[371]. Il a également été suggéré que les récepteurs AT₂ pouvaient contribuer à l'hypertrophie des CMLV de l'aorte chez les SHR [73]. Par conséquent, l'absence de stimulation des deux sous-types de récepteurs à l'Ang II, par l'antagonisme à l'aide du Sar-Ile, peut expliquer la forte inhibition de la

croissance, trouvée dans notre étude. Le véritable rôle du récepteur AT₂ dans la régulation de la croissance et la différenciation des CMLV dans l'HTA, demande évidemment de plus amples clarifications. Une semaine d'infusion d'Ang II a causé un remodelage vasculaire eutrophique des artères de résistance, démontrée par une augmentation du ratio média : lumière et aucun changement dans la surface de section, comme il a été montré précédemment [372]. Dans un autre type de modèle expérimental d'HTA, le SHR, un remodelage eutrophique ou hypertrophique peut être retrouvé dans d'autres études [5]. Les aortes provenant de rats traités avec le Sar-Ile démontraient un remodelage de type eutrophique comme en témoigne la diminution du diamètre de la lumière vasculaire, sans affecter la croissance nette et la surface de section de la média. Comme pour les vaisseaux de résistance au niveau mésentérique, nous avons trouvé un remodelage eutrophique interne, comme l'indique la diminution du diamètre de la lumière et de l'épaisseur de la média, sans pour autant affecter la surface de section de la média [17]. Ce remodelage résulte d'un réarrangement des composants cellulaires et non cellulaires ou la combinaison de processus de croissance et d'apoptose ou encore un état de contraction persistant des CMLV avec l'absence de changement dans la quantité totale le matériel au niveau de la paroi artérielle [373].

Associés avec des changements dans la structure des vaisseaux, nous avons également trouvé des altérations importantes au niveau mécanique dans la paroi des vaisseaux de résistance. La première des trois découvertes importantes de cette étude était que la paroi des vaisseaux du groupe traité au Sar-Ile, était plus rigide, comme le démontre le déplacement vers la gauche de la courbe du rapport stress versus déformabilité (Figure 1D, Chapitre 2). Il est important de noter qu'il était possible de constater une augmentation dans la rigidité de ces artères lors de l'isolement et du nettoyage avant que ces artères soient montées, car elles étaient beaucoup plus fragiles lors de ces manipulations. De plus, le module élastique incrémentiel « elastic modulus », qui évalue la rigidité des composants de la paroi, indépendamment de la géométrie des vaisseaux, fut augmenté par l'Ang II,

exacerbé par l'hydralazine et augmenté davantage suite à l'antagonisme simultané des récepteurs AT_1 et AT_2 par le Sar-Ile (Figure 1E, Chapitre 2). L'augmentation de la rigidité induite par l'Ang II a été évitée par le traitement au losartan, suggérant que ces effets étaient médiés par le récepteur AT_1 . L'augmentation paradoxale de la rigidité vasculaire après le traitement au Sar-Ile, avec les données recueillies par le traitement au losartan, suggère plutôt que ces effets sont le résultat de l'antagonisme des récepteurs AT_2 . Ceci indique que la stimulation des récepteurs AT_2 a des effets bénéfiques sur la rigidité vasculaire. L'augmentation de la rigidité de la paroi vasculaire a été médié par des mécanismes indépendants de la PA dans ce modèle de rats infusés à l'Ang II, puisque nous avons montré une plus grande rigidité retrouvée après l'antagonisme combiné des deux sous-types de récepteurs à l'Ang II suite aux traitements avec le Sar-Ile et à l'hydralazine.

Nous avons observé une tendance à une diminution de l'expression des récepteurs AT_1 après l'infusion d'Ang II comme il a été décrit antérieurement [374]. L'antagonisme des récepteurs AT_1 par le losartan augmente significativement l'expression des récepteurs AT_1 , effet indépendant de la réduction de la PA, puisque l'hydralazine diminuait également significativement l'expression des récepteurs AT_1 . Nous devons cependant mentionner que nous n'avons observé aucune modification dans les niveaux d'expression des récepteurs AT_2 .

4.2. Régulation des composants de la MEC de la paroi vasculaire par les récepteurs à l'Ang II

L'HTA cause des modifications de la structure de la paroi vasculaire impliquant la MEC. Afin de mieux comprendre les causes qui ont mené à une plus grande rigidité de la paroi des vaisseaux de résistances chez les rats traités avec Sar-Ile, nous avons choisi de caractériser les principaux constituants de la MEC qui pourraient avoir un rôle à jouer à ce niveau. Nous avons donc émis comme hypothèse qu'il y avait une augmentation des constituants non élastiques fibrillaires, comme le collagène, et une diminution des

constituants élastiques, comme l'élastine, chez les rats traités à l'aide du Sar-Ile, qui montraient une rigidité vasculaire accrue.

La deuxième découverte de cette étude concerne la caractérisation des changements des constituants de la MEC. L'augmentation de la rigidité peut dépendre de la balance des composants plus distensibles de la paroi, comme l'élastine et les CMLV et autres éléments moins distensibles et plus rigides, comme le collagène et la fibronectine [375]. Nos résultats démontrent une diminution dans le contenu en collagène de type I au niveau de la média des petites artères de résistance par l'antagonisme combiné des récepteurs AT₁ et AT₂, par le traitement au Sar-Ile (Tableau 2, Chapitre 2). Malgré le fait qu'il a été démontré que l'Ang II, par les récepteurs AT₁ et AT₂, stimulait la production de collagène [376], nous avons uniquement observé une tendance à l'augmentation de collagène, probablement dû à la courte période de traitement de 7 jours (Tableau 2, Chapitre 2). Ceci peut être expliqué par les différences dans le contenu cellulaire de ces vaisseaux. Tandis que l'aorte contient plus de CMLV que les vaisseaux de résistances, il contient plus de fibroblastes, qui peuvent être affectés différemment par l'Ang II. Chez des rats Wistar infusés à l'Ang II pendant 3 semaines et traités avec le PD123319, il a été démontré que la PA a augmenté, tandis que la fibrose et l'hypertrophie vasculaire ont été réduites, en comparaison à l'infusion d'Ang II seule [76]. Le collagène est le matériau le plus rigide de la paroi artérielle, il se pourrait qu'une augmentation de collagène ou des changements dans les types de collagène, ou même une combinaison des deux, puisse avoir comme conséquence une augmentation de la rigidité de la paroi vasculaire. Dans les modèles d'HTA génétique, des altérations peuvent refléter la présence de facteurs prédisposant qui sont soit spécifiques à l'HTA ou communs à une population d'hypertendus et leurs contrôles correspondants normotendus. De plus, le dépôt de collagène en réponse à l'Ang II, est habituellement associé au dépôt de fibronectine, causant dans la majorité des cas, mais pas toujours, une augmentation de la rigidité de la paroi des vaisseaux [208]. Après une semaine d'infusion d'Ang II, une augmentation significative du contenu en fibronectine dans la média des

aortes a été observée, ce qui a été rétabli suite au blocage des récepteurs AT₁, mais augmenté par les traitements au Sar-Ile ou à l'hydralazine, ce qui démontre l'indépendance de la PA à ce niveau (Tableau 2, Chapitre 2). Par contre, dans les artères de résistance, nous avons observé une augmentation, très importante par ailleurs, du contenu en fibronectine uniquement dans le groupe traité au Sar-Ile (Tableau 2, Chapitre 2). Par conséquent, l'augmentation du contenu en fibronectine, induit par le blocage des récepteurs AT₁ et AT₂, peut être attribuée à l'absence de l'effet inhibiteur sur le dépôt de fibronectine par blocage des récepteurs AT₂. Nous avons également démontré que le contenu en élastine dans les artères mésentériques était significativement diminué dans le groupe infusé à l'Ang II et le groupe traité au Sar-Ile, mais a été rétabli par le traitement au losartan, suggérant que le récepteur AT₂ augmente le dépôt d'élastine (Tableau 2, Chapitre 2).

Un médiateur possible des effets du récepteur AT₂ sur le remodelage vasculaire pourrait être le système kallikréine-kinine [377] et son rôle durant le blocage des récepteurs AT₁. La bradykinine (BK) est reconnue comme un vasorelaxant qui a des effets antiprolifératifs de par la production du NO [378]. Cependant, durant le blocage du récepteur AT₁, aucune augmentation de BK n'est survenue puisque sa dégradation par l'ECA1 n'est pas inhibée. Par contre, puisqu'il a été démontré que la stimulation du récepteur AT₂ augmente localement les niveaux de la BK [379], ceci pourrait potentiellement expliquer les effets délétères du blocage des récepteurs AT₂ comme lorsque nous administrons le Sar-Ile, tel qu'il a récemment été suggéré par Aartsen et coll. [380].

Ces résultats, nous avons ont obligé à rejeter une partie de notre hypothèse, puisque nous avons obtenu une diminution du contenu en collagène dans les artères de résistance mésentérique au lieu de l'augmentation que nous avons prédite. Ceci n'altère cependant pas l'implication de cette diminution de collagène au niveau de l'augmentation de la rigidité vasculaire, puisque nous avons observé une diminution du ratio collagène : élastine lorsque les récepteurs AT₁ et AT₂ sont bloqués. Ceci n'explique pas, l'augmentation de la

rigidité vasculaire chez les rats traités avec le Sar-Ile, qui est plutôt expliquée par la très importante et significative augmentation du dépôt de fibronectine dans la paroi vasculaire dans ce groupe.

4.3. Rôle des récepteurs à l'Ang II dans la régulation de l'activité des MMPs et leurs inhibiteurs endogènes

Après avoir constaté l'importante diminution dans le dépôt du collagène et de l'élastine, nous avons donc posé l'hypothèse que nous étions probablement en présence d'une augmentation de l'expression ou de l'activité des MMPs, ou une régulation à la baisse de leurs inhibiteurs endogènes, les TIMPs.

Afin d'être capable d'attribuer les changements dans la constitution de la MEC à une régulation différente des MMPs, nous avons entrepris l'étude de l'activité des gélatinases qui sont des enzymes pouvant dégrader les principaux composants de la MEC et qui ont été démontré comme ayant une fonction majeure dans la dégradation des constituants de la MEC de la lame basale, agissant, entre autres, sur la perméabilité vasculaire [381]. De plus, nous ne pouvions nous contenter de quantifier seulement l'expression de ces enzymes, puisque l'expression peut ne pas avoir d'impact sur la matrice elle-même. Nous avons donc opté pour une quantification de l'activité de ces enzymes, par zymographie sur gel, une technique très sensible visant à quantifier la quantité de substrats dégradés par les différentes formes de ces enzymes (forme active, forme semi-active ou forme inactive) qui est directement proportionnelle à leur activité.

L'organisation de la MEC dans des conditions normales et pathologiques résulte d'une balance entre la synthèse et la dégradation des composants de la MEC, processus dans lequel les MMPs jouent un rôle majeur [275]. La plupart des MMPs sont normalement exprimées à un niveau très bas, mais leur expression est augmentée dans l'HTA [382]. Une augmentation significative dans l'activité de la MMP-2 a été détectée (Figure 4, Chapitre 2)

dans le groupe traité au Sar-Ile. Ceci explique, en partie, la diminution du collagène de type I et de l'élastine et la diminution subséquente du ratio collagène : élastine, comme nous l'avions proposé lors de l'établissement de notre hypothèse.

Afin d'établir l'activité relative réelle de ces MMPs, nous devons aussi quantifier les inhibiteurs endogènes des MMPs (TIMPs) et établir une relation entre l'activité et l'inhibition afin de voir si ces enzymes sont réellement impliquées dans les processus de remodelage vasculaire observés. La quantification de la capacité des TIMPs à se lier aux MMPs se mesure par la quantification de la zone d'inhibition de l'activité enzymatique par zymographie inverse. Après avoir constaté l'augmentation de l'activité de la MMP-2, nous avons démontré que la liaison de TIMP-2, à cette MMP, a été inhibée (Figure 6, Chapitre 2), tandis que nous n'avons montré aucune variation dans la liaison de TIMP-1 à cette MMP.

Nous avons donc réussi à démontrer que la régulation du dépôt des constituants de la MEC étaient partiellement médiés par les récepteurs AT_2 , puisque l'antagonisme de ces récepteurs, en plus du l'antagonisme concomitant des récepteurs AT_1 par le Sar-Ile, réduit la liaison de TIMP-2 à la MMP-2 (Figure 6, Chapitre 2), comme nous l'avions suggéré lors de l'établissement de notre hypothèse. Par contre, Rizzoni et coll. ont trouvé que des artères sous-cutanées provenant de patients hypertendus diabétiques traités soit avec le candesartan, un ARA, ou l'enalapril, un IECA, montraient une activité réduite de la MMP-9 et du contenu en collagène, uniquement suite au traitement avec le candesartan [383]. Cette découverte suggère un rôle pour l'antagonisme des récepteurs AT_1 dans la modulation du dépôt de collagène et de l'activité de la MMP-9, dans les artères de résistance chez l'homme, tandis que nous n'avons observé aucune augmentation de l'activité de la MMP-9 après avoir traité au losartan des rats infusés avec l'Ang II.

4.4. Implication des récepteurs à l'Ang II au niveau de l'expression des intégrines vasculaires

Les changements de la MEC observés, peuvent être également associés à la modulation des sites d'attachement cellulaire de la matrice et peuvent potentiellement influencer la compliance vasculaire par le dépôt de protéines de la MEC [375]. Toujours dans le but d'expliquer l'augmentation de la rigidité vasculaire suite à l'antagonisme des deux récepteurs à l'Ang II, nous devons vérifier si l'augmentation de la rigidité était uniquement liée aux modifications de la MEC ou s'il y avait également une augmentation de l'ancrage de cette matrice aux récepteurs cellulaires, les intégrines. C'est pourquoi nous avons émis l'hypothèse qu'une augmentation de certaines intégrines exprimées au niveau des CMLV, pourrait expliquer une augmentation de l'ancrage des CMLV à la matrice et influencer, en partie, l'augmentation de la rigidité vasculaire observée chez le groupe traité au Sar-Ille.

Nous avons démontré qu'il y avait une régulation différente de l'expression des intégrines, par les récepteurs AT₁ et AT₂. De plus, l'expression des sous-unités α et β des intégrines a été altéré suite à l'antagonisme du récepteur AT₁ ou l'antagonisme concomitant des récepteurs AT₁ et AT₂. En plus d'une expression différente dans les sous-unités, nous avons démontré que l'ostéopontine, qui a une grande affinité pour plusieurs intégrines, était également augmenté après l'infusion d'Ang II et était aussi régulée différemment par les récepteurs AT₁ et AT₂. Ces résultats viennent éclaircir davantage les mécanismes concernant les effets bénéfiques de l'antagonisme des récepteurs AT₁ et des effets nuisibles de l'antagonisme des récepteurs AT₂.

Nous avons obtenus des différences dans l'altération de la structure, la mécanique et la composition des artères de résistance en réponse à l'infusion d'Ang II et à l'antagonisme simultané des récepteurs AT₁ et AT₂, de pair avec les changements dans l'activité de la MMP-2. Ces résultats nous aident à investiguer le rôle possible des intégrines vasculaires et

leurs ligands au niveau des changements observés dans ce modèle traité soit avec un antagoniste des récepteurs AT₁ ou un antagoniste des deux types de récepteur AT₁ et AT₂.

Une augmentation de la prolifération et de la migration contribue à la pathogenèse de l'HTA [384]. Un grand nombre d'agents et de mécanismes (facteurs de croissance, MEC, interaction cellule-cellule) régulent la croissance et la migration cellulaire [384;385]. Cependant, les mécanismes de signalisation cellulaire précis impliqués dans ces processus n'ont pas encore été résolus complètement. Kohno et coll. ont démontré *in vitro* que l'Ang II, par le récepteur AT₁, stimule la migration et la prolifération des CMLV dans les artères coronaires humaines [386]. De plus, l'Ang II, via le récepteur AT₁, augmente l'adhésion des fibroblastes cardiaques, par l'activation de multiples voies de signalisation, qui incluent l'augmentation de l'expression de l'ostéopontine et des intégrines α_v , β_3 et β_5 , menant au développement d'une hypertrophie ventriculaire gauche chez les SHR [387].

Dans notre étude, l'expression de la sous-unité α_1 , un des principaux récepteurs pour le collagène, a été augmentée suite à l'antagonisme des récepteurs AT₁ et cette augmentation a été empêchée par le blocage simultané des récepteurs AT₁ et AT₂, ce qui suggère que les récepteurs AT₂ sont impliqués dans l'expression de cette sous-unité. De plus, puisque nous observons des effets opposés de par les récepteurs AT₁ et AT₂ en ce qui concerne la PA, la stimulation des récepteurs AT₁ peut inhiber l'expression de la sous-unité α_1 . Par conséquent, le blocage simultané des récepteurs AT₁ et AT₂ pourrait résulter en une diminution des effets, de par le blocage sélectif des récepteurs AT₁.

L'intégrine α_5 , qui est un composant du récepteur à la fibronectine et qui est impliqué dans la polymérisation de la fibronectine, [388] est significativement augmentée après l'infusion d'Ang II et davantage augmentée suite à l'antagonisme des récepteurs AT₁, mais réduite après le blocage simultané des récepteurs AT₁ et AT₂, suggérant que les récepteurs AT₂ jouent un rôle dans la régulation de cette sous-unité. L'interaction entre la fibronectine et le

récepteur $\alpha_5\beta_1$ [389] et le site RGD situé sur la fibronectine [390] est requise pour initier l'assemblage de la matrice dans la majorité des systèmes cellulaires [391;392]. Ceci est très important pour la prolifération des CMLV [324], et peut expliquer, en partie, la diminution importante de la croissance au niveau des artères de résistance après l'administration de Sar-Ile, malgré l'augmentation significative de fibronectine, que nous avons démontré être modulé par les récepteurs AT_2 . Pour supporter ces résultats, Chassagne et coll. ont démontré que l'activation du récepteur AT_2 inhibait le migration des CMLV par l'augmentation de la sécrétion de fibronectine et l'attachement subséquent des CMLV [393]. Il est donc possible que l'expression de la sous-unité α_5 , qui peut médier l'attachement des cellules à la fibronectine, résulte en une inhibition de la migration cellulaire.

Tout comme l'expression de l'intégrine α_5 , nous avons démontré que l'Ang II augmentait significativement l'expression vasculaire de la sous-unité α_8 , comme il a été démontré antérieurement chez des fibroblastes cardiaques [394]. Nous n'avons, par contre, pas observé d'augmentation de la sous-unité α_8 suite aux traitements au losartan, à l'hydralazine et au Sar-Ile, ce qui suggère que cette augmentation est soit causé par une diminution de la PA ou à un effet spécifique des récepteurs AT_1 accompagnés par un effet non sélectif de l'hydralazine [367]. Il a été démontré que l'expression de la sous-unité α_8 était associée à l'induction d'un phénotype contractile, puisque l'augmentation de son expression entraîne la différenciation des fibroblastes en myofibroblastes contractiles [395] et réduit le phénotype migratoire [396]. De plus, Zargham et coll. viennent de démontrer que la diminution de l'expression par l'utilisation d'ARN interférant (« *siRNA* »), augmentait le phénotype migratoire, confirmant notre hypothèse de départ qui veut que l'expression de la sous-unité α_8 soit impliquée avec ce changement de phénotype [397].

Nous avons également démontré que la sous-unité β_1 était significativement augmentée après infusion d'Ang II, et que cette augmentation a été significativement diminuée par tous

les traitements, suggérant que l'expression de la sous-unité β_1 est dépendante de la PA, ou encore une fois, qu'elle pourrait très bien être dépendante du récepteur AT_1 , accompagné d'un effet non spécifique de l'hydralazine [367], de façon similaire au profil d'expression de l'intégrine α_8 , celle-ci ayant été démontrée comme étant associée à l'intégrine β_1 [398].

En ce qui concerne l'expression de la sous-unité β_3 , nous avons trouvé qu'elle était augmentée suite à l'infusion d'Ang II, et que cette augmentation pouvait être abolie par le traitement au losartan, de manière différente à l'expression de la sous-unité β_1 , dont l'expression est partiellement diminuée par l'antagonisme des récepteurs AT_1 . L'expression de la sous-unité β_3 n'a pas été modifiée par l'antagonisme des récepteurs AT_1 et AT_2 ainsi que par le traitement à l'hydralazine. Par conséquent, la régulation de l'expression de la sous-unité β_3 pourrait être médiée par le récepteur AT_1 , comme il a été rapporté auparavant par Kawano et coll. [387]. Il a été décrit précédemment que l'expression des sous-unités β_3 et α_v , qui forment l'intégrine $\alpha_v\beta_3$, joue un rôle critique dans la prolifération cellulaire et la migration, toutes deux importantes dans le remodelage des vaisseaux [399].

Une autre protéine contenant le motif RGD qui pourrait être associé avec la prolifération des CMLV est l'ostéopontine, une phospho-glycoprotéine soluble sécrétée et qui joue un rôle dans l'adhésion des CMLV par l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ [332;400]. Par conséquent, plusieurs fonctions ont été attribuées à l'ostéopontine *in vitro*. Par contre, ses réelles applications *in vivo* demeurent moins bien définies. Il a été rapporté que l'ostéopontine peut être régulée par l'Ang II et peut moduler la fibrose induite par l'Ang II [401;402]. Il a également été montré que l'ostéopontine peut agir comme un modulateur négatif de l'interaction intégrine-MEC [403]. Nous avons démontré que l'expression de l'ostéopontine est partiellement affectée par l'antagonisme des récepteurs AT_1 , et est davantage diminuée par le blocage simultané des récepteurs AT_1 et AT_2 ainsi que par l'hydralazine, ce qui suggère que son expression est régulée par la PA, tout comme l'expression des sous-unités α_8 et β_1 . Il est à noter que l'expression de la majorité des sous-unités des intégrines ainsi que

l'expression de l'ostéopontine a été partiellement réduite suite au traitement à l'hydralazine, suggérant une dépendance de la PA. Les effets observés peuvent par contre être plus ou moins dépendants de la PA [367]. Le blocage sélectif des récepteurs AT₁ diminue la PA systolique et améliore le remodelage vasculaire dans le modèle de rats infusés à l'Ang II, ce qui n'est pas observé suite au traitement à l'hydralazine, malgré une diminution similaire de la PA systolique. En plus, puisque le niveau d'expression des sous-unités α_8 , β_1 et β_3 étaient similaires dans ces groupes, ceci rend possible la conclusion que ces sous-unités peuvent ne pas jouer un rôle au niveau du remodelage vasculaire, du moins pour le modèle de rats infusés à l'Ang II.

Le comportement des CMLV dans la média des vaisseaux sanguins et leur rôle dans le remodelage vasculaire peut être modulé par plusieurs protéines de la MEC, tel que la fibronectine et les ligands pour les intégrines $\alpha_5\beta_1$, $\alpha_8\beta_1$ et $\alpha_v\beta_3$. Ces intégrines ont démontré jouer un rôle au niveau d'événements cellulaires, incluant la différenciation, le développement, la cicatrisation, l'adhésion et la migration cellulaire. Hedin et coll. [404] ont montré que la fibronectine et la synthèse des MMPs étaient impliquées dans la conversion du phénotype contractile en phénotype synthétique chez les CMLV. Par conséquent, il est possible qu'en absence d'activation des récepteurs à l'Ang II, le phénotype soit migratoire plutôt que contractile, comme démontré lorsque les récepteurs AT₁ sont bloqués [405]. Lorsque les deux récepteurs AT₁ et AT₂ sont bloqués, nous avons démontré qu'il y avait moins de liaisons de TIMP-2 à la MMP-2, une plus grande activité de la MMP-2 et en conséquence, plus de dégradation de la MEC. Nous avons aussi montré que la croissance des CMLV était grandement affecté, comme en témoignait l'indice de croissance. De plus, des études ont démontré que TIMP-2 était impliqué dans l'inhibition de la migration cellulaire des VSMC et des cellules endothéliales [296;297]. Puisque nous observons une inhibition presque complète de TIMP-2, ceci suggère également que cette diminution puisse favoriser le phénotype migratoire. De plus, l'augmentation significative de l'expression de TIMP-2 dans les vaisseaux des rats traités à l'Ang II, nous indique qu'il

est possible que TIMP-2 puisse inhiber le phénotype migratoire, puisque nous favorisons le phénotype contractile des CMLV via l'activation du récepteur AT₁. Ces résultats sont en lien direct avec les résultats d'expression des intégrines qui montrent que des sous unités d'intégrines, comme l' $\alpha_8\beta_1$, responsable de l'ancrage des CMLV à la MEC environnante, et par conséquent une diminution des liens CMLV-MEC, peuvent conduire à la possible émergence d'un phénotype synthétique, migratoire et non prolifératif.

Nous sommes obligés de rejeter notre hypothèse de départ, voulant qu'on ait une augmentation de l'expression des intégrines vasculaires, ce qui aurait pu expliquer d'autre part, l'augmentation de la rigidité des vaisseaux, après le blocage simultané des récepteurs AT₁ et AT₂. Nous n'avons obtenu aucune augmentation, mais plutôt une diminution de l'expression des sous-unités des intégrines étudiées ainsi qu'une diminution de l'expression de l'ostéopontine. Cependant, cette expérience a pu mettre en évidence que l'expression de ces intégrines ne semble pas jouer un rôle dans le remodelage vasculaire dans ce modèle d'HTA induite par l'Ang II.

4.5. Les effets du Sar-IIe

Aussi bien le losartan que l'hydralazine, ont réduit l'augmentation de la PA induite par l'Ang II. Les animaux traités au Sar-IIe avaient cependant une PA systolique supérieure aux animaux traités au losartan, mais significativement inférieure aux animaux traités à l'Ang II, ce qui peut être expliqué par l'absence d'effets bénéfiques médiés par le récepteur AT₂ lorsqu'il est bloqué. Malheureusement, un nombre très limité d'études ont été effectuées chez l'homme. Il a cependant été montré chez l'homme que des changements hémodynamiques surviennent après le blocage des récepteurs AT₂, ce qui soutient nos résultats [406-408]. Nous avons démontré une augmentation significative de la PA systolique quand les deux récepteurs à l'Ang II sont bloqués, suggérant que la diminution de la PA suite au traitement à l'aide du losartan peut être en partie médié par stimulation du récepteur AT₂ non bloqué par l'Ang II circulante qui est augmentée dans le plasma dans ce

paradigme expérimental. De plus, Barber et coll. [174] ont également démontré que le blocage des récepteurs AT₂ inhibait les effets du candesartan, tandis que sa stimulation avec le CGP42112 augmentait l'effet de diminution de la PA, engendré par le traitement au candesartan, par le blocage des récepteurs AT₁. Finalement, Gigante et coll. ont démontré que chez le rat ayant une diète réduite en sel, le bloqueur des récepteurs AT₂, PD123319, empêchait la diminution de la PA normalement induite par le losartan, suggérant que la stimulation des récepteurs AT₂ contribue aux effets hypotenseurs de l'antagoniste des récepteurs AT₁ [409].

5. Limites de nos études

Il y a bien entendu des limitations à l'interprétation des résultats de cette thèse. L'utilisation d'un antagoniste sélectif des récepteurs AT₂ seul et en combinaison avec le losartan aurait été informative, mais puisque la disponibilité de ce produit est limitée et parce que son prix est excessivement élevé, cette option n'a pas pu être retenue et a été remplacée par l'utilisation du Sar-Ile. De plus, la détermination de l'activité des MMPs a été réalisée essentiellement sur des aortes et non pas sur des artères mésentériques à cause de la disponibilité limitée de ces dernières. Les artères mésentériques étant représentatives des vaisseaux de résistance, nos données provenant de l'aorte ne peuvent être directement extrapolées à d'autres segments de la vasculature. J'ai avancé la possibilité d'un phénotype migratoire, en référence à la régulation différentielle des intégrines qui sont associées à ce phénotype, mais dans cette étude *in vivo* nous n'avons pas démontré la mise en évidence ce phénotype. Néanmoins, l'association de certaines intégrines avec la migration de CMLV a été démontrée par plusieurs autres équipes de recherche.

6. Conclusion

En conclusion, nos études ont démontré que l'antagonisme simultané des récepteurs AT₁ et AT₂ dans un modèle de rat infusé à l'Ang II était associé à de sévères modifications dans la structure, la mécanique, et la composition de la MEC au niveau des petites artères de

résistance mésentériques. De plus, l'antagonisme de ces récepteurs a aussi augmenté l'activité de la MMP-2, tant au niveau de sa propre activation qu'en altérant de manière presque totale son inhibition par TIMP-2, résultant en une activité relative accrue de cette MMP. En contrepartie, l'infusion d'Ang II induit des changements qui ont été largement empêchés par le blocage du récepteur AT₁ avec le losartan, et ce, indépendamment de la baisse de la PA. Ces résultats soulignent le rôle protecteur au niveau vasculaire joué par les récepteurs AT₂. L'augmentation de la rigidité vasculaire en réponse à l'Ang II peut être expliquée, en partie, par l'augmentation du ratio collagène : élastine. De plus, l'augmentation de fibronectine pourrait jouer un rôle très important à ce niveau. La diminution du collagène et de l'élastine peut être une conséquence de l'augmentation de l'activité de la MMP-2, tout comme la réduction de la liaison de TIMP-2 à la MMP-2, ayant comme résultat une augmentation de l'activité de cette protéinase lorsque les deux récepteurs sont bloqués. De plus, nous avons démontré que le blocage du récepteur AT₁ ou des deux récepteurs à l'Ang II, dans notre modèle de rats infusés à l'Ang II, modulait différemment l'expression de certaines intégrines ainsi que l'ostéopontine, ce qui peut résulter, selon le cas, en un changement de phénotype des CMLV. Tandis que l'activation du récepteur AT₁ augmente l'expression des sous-unités α_8 , β_1 et β_3 ainsi que le dépôt de l'ostéopontine et réduit l'expression de l'intégrine α_1 , l'activation du récepteur AT₂ quant à lui, augmente l'expression des sous-unités α_1 et α_5 . La régulation différentielle de ces intégrines et leur implication dans le remodelage vasculaire ou au niveau des changements de phénotypes par les récepteurs AT₁ et AT₂ peut expliquer, en partie, les différents effets retrouvés dans la réduction du risque cardiovasculaire après traitement avec des IECA et les ARA dans des conditions cardiovasculaires variées.

7. Perspectives

Nos résultats démontrent l'importance des récepteurs AT₁ et AT₂ au niveau du maintien de l'intégrité structural des vaisseaux sanguins. Les récepteurs de l'Ang II jouent des rôles différents dans la régulation des intégrines vasculaires et le dépôt de leurs ligands dans

l'hypertension artérielle induite par l'Ang II. Cependant, la contribution des récepteurs AT₁ et AT₂ *in vivo* à la migration des CMLV, et au niveau remodelage vasculaire a besoin d'être investiguée davantage. Par exemple, il a été montré, par d'autres études que l'expression de la sous-unité α_8 était associée à l'inhibition du phénotype migratoire. Par ailleurs, il a été démontré que l'activation du récepteur AT₂ était également liée à l'inhibition de la migration des CMLV. Il serait donc important d'évaluer si la diminution de l'expression de la sous-unité α_8 , constatée lorsqu'on a inhibé les deux récepteurs à l'Ang II, est directement impliquée dans l'augmentation possible du phénotype migratoire chez les CMLV. D'autre part, il a été rapporté que l'activation du récepteur AT₂ diminuait les processus de migration des CMLV via l'augmentation de la sécrétion de fibronectine, qui par conséquent, augmenterait l'ancrage des CMLV à la MEC environnante. Il serait intéressant de vérifier si cette diminution de la migration suite à l'activation du récepteur AT₂, ne seraient pas en partie liée à l'augmentation de l'expression de la sous-unité α_5 , faisant partie intégrante du principal récepteur à la fibronectine, l'intégrine $\alpha_5\beta_1$. Finalement, comme il a été démontré que TIMP-2 était associé à l'inhibition de la migration des CMLV, il serait important de voir si la diminution de TIMP-2, dans notre modèle, a aussi un rôle à jouer sur un possible changement dans le phénotype des CMLV.

8. Importance de cette étude et considérations thérapeutiques

L'inhibition du SRAA a montré son efficacité dans le traitement des maladies cardiovasculaires et la réduction de la mortalité cardiovasculaire. Le succès des IECA dans le traitement de l'HTA, l'insuffisance cardiaque congestive, l'infarctus du myocarde et la néphropathie diabétique souligne l'utilité de cette approche thérapeutique. La multiplicité des indications des IECA est liée au fait que cette classe de médicaments est supposée posséder des caractéristiques de protection des organes cibles qui vont au-delà du contrôle de la PA. Dans les modèles expérimentaux, la capacité à inhiber la dégradation des kinines ainsi que leur effet sur la réduction de la production de l'Ang II contribue à la protection d'organes cibles dans différents modèles de maladies cardiovasculaires. Bien qu'inhibant

d'une façon plus spécifique le SRAA au niveau des sites récepteurs, les ARA ne possèdent pas l'activité de potentialiser la BK (en inhibant sa dégradation) propre aux IECA. De plus, les membres de la famille des « sartans » ne bloquent pas le récepteur AT₂ de l'Ang II. À l'inverse, ils exposent ces récepteurs à des concentrations élevées d'Ang II circulante, résultant de l'inactivation du retrocontrôle négatif qu'exerce l'Ang II, via son récepteur AT₁, sur la synthèse de rénine et sur sa propre synthèse. La question de savoir si les différences pharmacologiques entre les deux classes d'inhibiteurs du SRAA peuvent avoir des implications cliniques reste à être débattue. Des effets médiés par les récepteurs AT₂, comme l'augmentation de la production de vasodilatateurs (NO, GMPc, prostaglandines), ainsi que les caractéristiques antiprolifératives de ce récepteur pourraient contribuer à une diminution supplémentaire de la PA ainsi qu'à la prévention de la dysfonction endothéliale, de l'hypertrophie et du remodelage vasculaire. Il est possible qu'une étude plus extensive du récepteur AT₂ puisse aider à comprendre les bénéfices cliniques des antagonistes des récepteurs AT₁ dans la mesure où ils démasquent l'activité des récepteurs AT₂.

9. Bibliographie

1. 1999 World Health Organization-International Society of Hypertension Guidelines for the Management of Hypertension. Guidelines Subcommittee. *J Hypertens* 17:151-183, 1999.
2. Davis MJ, Ferrer PN, Gore RW. Vascular anatomy and hydrostatic pressure profile in the hamster cheek pouch. *Am J Physiol* 250:H291-H303, 1986.
3. Schiffrin EL. Remodeling of resistance arteries in human hypertension: effects of cilazapril, an angiotensin-I-converting enzyme inhibitor. *Cardiology* 86 (Suppl 1):16-22, 1995.
4. Sharifi AM, Li JS, Endemann D, Schiffrin EL. Effects of enalapril and amlodipine on small-artery structure and composition, and on endothelial dysfunction in spontaneously hypertensive rats. *J Hypertens* 16:457-466, 1998.
5. Intengan HD, Thibault G, Li JS, Schiffrin EL. Resistance artery mechanics, structure, and extracellular components in spontaneously hypertensive rats : effects of angiotensin receptor antagonism and converting enzyme inhibition. *Circulation* 100:2267-2275, 1999.
6. Rhodin J.A. Architecture of the vessel wall. In: Bohr D, Somlyo AP, Sparks HV, editors. *Handbook of physiology*. Bethesda: American Physiological Society; 1980. p. 1-32.
7. Kwon HM, Sangiorgi G, Ritman EL, McKenna C, Holmes DR, Jr., Schwartz RS, Lerman A. Enhanced coronary vasa vasorum neovascularization in experimental hypercholesterolemia. *J Clin Invest* 101:1551-1556, 1998.
8. Kuwahara F, Kai H, Tokuda K, Shibata R, Kusaba K, Tahara N, Niiyama H, Nagata T, Imaizumi T. Hypoxia-inducible factor-1alpha/vascular endothelial growth factor pathway for adventitial vasa vasorum formation in hypertensive rat aorta. *Hypertension* 39:46-50, 2002.
9. Chobanian AV, Bakris GL, Black HR, Cushman WC, Green LA, Izzo JL, Jr., Jones DW, Materson BJ, Oparil S, Wright JT, Jr., Roccella EJ. The Seventh Report of the Joint National Committee on Prevention, Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Pressure: the JNC 7 report. *JAMA* 289:2560-2572, 2003.

10. Zarnke KB, Levine M, McAlister FA, Campbell NR, Myers MG, McKay DW, Bolli P, Honos G, Lebel M, Mann K, Wilson TW, Abbott C, Tobe S, Burgess E, Rabkin S. The 2000 Canadian recommendations for the management of hypertension: part two--diagnosis and assessment of people with high blood pressure. *Can J Cardiol* 17:1249-1263, 2001.
11. Pageau M, Ferland M. Le Portrait de Santé. La région de Québec et ses territoires de CLSC. Régie régionale de la santé et des services sociaux du Québec; 2002. p. 1-346.
12. Pickering GW. *The nature of essential hypertension*. London: J & A Churchill; 1961.
13. Société québécoise d'hypertension artérielle. *Hypertension artérielle 2002. Guide thérapeutique. 2^e édition*. Imprimerie Canada; 2002.
14. Whitworth JA. 2003 World Health Organization (WHO)/International Society of Hypertension (ISH) statement on management of hypertension. *J Hypertens* 21:1983-1992, 2003.
15. Touyz RM, Campbell N, Logan A, Gledhill N, Petrella R, Padwal R. The 2004 Canadian recommendations for the management of hypertension: Part III--Lifestyle modifications to prevent and control hypertension. *Can J Cardiol* 20:55-59, 2004.
16. Joffres MR, Hamet P, MacLean DR, L'italien GJ, Fodor G. Distribution of blood pressure and hypertension in Canada and the United States. *Am J Hypertens* 14:1099-1105, 2001.
17. Mulvany MJ, Baumbach GL, Aalkjaer C, Heagerty AM, Korsgaard N, Schiffrin EL, Heistad DD. Vascular remodeling. *Hypertension* 28:505-506, 1996.
18. Baumbach GL, Heistad DD. Remodeling of cerebral arterioles in chronic hypertension. *Hypertension* 13:968-972, 1989.
19. Schiffrin EL. Endothelin: role in experimental hypertension. *J Cardiovasc Pharmacol* 35:S33-S35, 2000.
20. Heagerty AM, Aalkjaer C, Bund SJ, Korsgaard N, Mulvany MJ. Small artery structure in hypertension. Dual processes of remodeling and growth. *Hypertension* 21:391-397, 1993.
21. Mulvany MJ. A reduced elastic modulus of vascular wall components in hypertension? *Hypertension* 20:7-9, 1992.

22. Folkow B. Physiological aspects of primary hypertension. *Physiol Rev* 62:347-504, 1982.
23. Deng LY, Schiffrin EL. Effects of endothelin-1 and vasopressin on resistance arteries of spontaneously hypertensive rats. *Am J Hypertens* 5:817-822, 1992.
24. Deng LY, Schiffrin EL. Effect of antihypertensive treatment on response to endothelin of resistance arteries of hypertensive rats. *J Cardiovasc Pharmacol* 21:725-731, 1993.
25. Thybo NK, Korsgaard N, Mulvany MJ. Morphology and function of mesenteric resistance arteries in transgenic rats with low-renin hypertension. *J Hypertens* 10:1191-1196, 1992.
26. Thybo NK, Korsgaard N, Eriksen S, Christensen KL, Mulvany MJ. Dose-dependent effects of perindopril on blood pressure and small-artery structure. *Hypertension* 23:659-666, 1994.
27. Thybo NK, Stephens N, Cooper A, Aalkjaer C, Heagerty AM, Mulvany MJ. Effect of antihypertensive treatment on small arteries of patients with previously untreated essential hypertension. *Hypertension* 25:474-481, 1995.
28. Schiffrin EL. Remodeling of resistance arteries in essential hypertension and effects of antihypertensive treatment. *Am J Hypertens* 17:1192-1200, 2004.
29. Clark JM, Glagov S. Transmural organization of the arterial media. The lamellar unit revisited. *Arteriosclerosis* 5:19-34, 1985.
30. Schwartz SM, Heimark RL, Majesky MW. Developmental mechanisms underlying pathology of arteries. *Physiol Rev* 70:1177-1209, 1990.
31. Berry CL, Henrichs KJ. Morphometric investigation of hypertrophy in the arteries of DOCA-hypertensive rats. *J Pathol* 136:85-94, 1982.
32. Levy BI, Michel JB, Salzmann JL, Azizi M, Poitevin P, Safar M, Camilleri JP. Effects of chronic inhibition of converting enzyme on mechanical and structural properties of arteries in rat renovascular hypertension. *Circ Res* 63:227-239, 1988.
33. Lee RMK. Blood vessel changes in hypertension: structure and function. In: Boca Raton: CRC Press, editor. 1989. p. 199.
34. Gumbiner BM. Cell adhesion: the molecular basis of tissue architecture and morphogenesis. *Cell* 84:345-357, 1996.

35. Glagov S. Hemodynamic risk factors: mechanical stress, mural architecture, medial nutrition and vulnerability of arteries to atherosclerosis. In: Williams & Wilkins, editor. *The Pathogenesis of Atherosclerosis*. Wissler RW, Geer JC ed. Baltimore, Md: 1972. p. 164-99.
36. Safar ME. Pulse pressure in essential hypertension: clinical and therapeutical implications. *J Hypertens* 7:769-776, 1989.
37. Laurent S, Girerd X, Mourad JJ, Lacolley P, Beck L, Boutouyrie P, Mignot JP, Safar M. Elastic modulus of the radial artery wall material is not increased in patients with essential hypertension. *Arterioscler Thromb* 14:1223-1231, 1994.
38. Benetos A, Laurent S, Hoeks AP, Boutouyrie PH, Safar ME. Arterial alterations with aging and high blood pressure. A noninvasive study of carotid and femoral arteries. *Arterioscler Thromb* 13:90-97, 1993.
39. Girerd X, Mourad JJ, Acar C, Heudes D, Chiche S, Bruneval P, Mignot JP, Billaud E, Safar M, Laurent S. Noninvasive measurement of medium-sized artery intima-media thickness in humans: in vitro validation. *J Vasc Res* 31:114-120, 1994.
40. Bots ML, Hofman A, de Bruyn AM, de Jong PT, Grobbee DE. Isolated systolic hypertension and vessel wall thickness of the carotid artery. The Rotterdam Elderly Study. *Arterioscler Thromb* 13:64-69, 1993.
41. Mulvany MJ, Aalkjaer C. Structure and function of small arteries. *Physiol Rev* 70:921-961, 1990.
42. Schiffrin EL. Reactivity of small blood vessels in hypertension: relation with structural changes. State of the art lecture. *Hypertension* 19:II1-II9, 1992.
43. Bohlen HG. Localization of vascular resistance changes during hypertension. *Hypertension* 8:181-183, 1986.
44. Laurant P, Touyz RM, Schiffrin EL. Effect of pressurization on mechanical properties of mesenteric small arteries from spontaneously hypertensive rats. *J Vasc Res* 34:117-125, 1997.
45. Schiffrin EL, Deng LY, Laroche P. Effects of a b-blocker or a converting enzyme inhibitor on resistance arteries in essential hypertension. *Hypertension* 23:83-91, 1994.
46. Benetos A, Pannier B, Brahim M, Safar ME, Levy BI. Dose-related changes in the mechanical properties of the carotid artery in WKY rats and SHR following relaxation of arterial smooth muscle. *J Vasc Res* 30:23-29, 1993.

47. Laurent S. Arterial wall hypertrophy and stiffness in essential hypertensive patients. *Hypertension* 26:355-362, 1995.
48. Benetos A, Gautier S, Ricard S, Topouchian J, Asmar R, Poirier O, Larosa E, Guize L, Safar M, Soubrier F, Cambien F. Influence of angiotensin-converting enzyme and angiotensin II type 1 receptor gene polymorphisms on aortic stiffness in normotensive and hypertensive patients. *Circulation* 94:698-703, 1996.
49. Christensen KL, Jespersen LT, Mulvany MJ. Development of blood pressure in spontaneously hypertensive rats after withdrawal of long-term treatment related to vascular structure. *J Hypertens* 7:83-90, 1989.
50. Aalkjaer C, Heagerty AM, Petersen KK, Swales JD, Mulvany MJ. Evidence for increased media thickness, increased neuronal amine uptake, and depressed excitation--contraction coupling in isolated resistance vessels from essential hypertensives. *Circ Res* 61:181-186, 1987.
51. Hajdu MA, Heistad DD, Ghoneim S, Baumbach GL. Effects of antihypertensive treatment on composition of cerebral arterioles. *Hypertension* 18:II15-II21, 1991.
52. Margolius HS. Kallikreins and kinins. Molecular characteristics and cellular and tissue responses. *Diabetes* 45 (Suppl 1):S14-S19, 1996.
53. Ryan JW, Ryan US, Schultz DR, Whitaker C, Chung A. Subcellular localization of pulmonary angiotensin-converting enzyme (kininase II). *Biochem J* 146:497-499, 1975.
54. Dzau VJ, Bernstein K, Celermajer D, Cohen J, Dahlof B, Deanfield J, Diez J, Drexler H, Ferrari R, van Gilst W, Hansson L, Hornig B, Husain A, Johnston C, Lazar H, Lonn E, Luscher T, Mancini J, Mimran A, Pepine C, Rabelink T, Remme W, Ruilope L, Ruzicka M, Schunkert H, Swedberg K, Unger T, Vaughan D, Weber M. The relevance of tissue angiotensin-converting enzyme: manifestations in mechanistic and endpoint data. *Am J Cardiol* 88 (9A):1L-20L, 2001.
55. Chiu AT, Herblin WF, McCall DE, Ardecky RJ, Carini DJ, Duncia JV, Pease LJ, Wong PC, Wexler RR, Johnson AL. Identification of angiotensin II receptor subtypes. *Biochem Biophys Res Commun* 165:196-203, 1989.
56. Bumpus FM, Catt KJ, Chiu AT, DeGasparo M, Goodfriend T, Husain A, Peach MJ, Taylor DG, Jr., Timmermans PB. Nomenclature for angiotensin receptors. A report of the Nomenclature Committee of the Council for High Blood Pressure Research. *Hypertension* 17:720-721, 1991.

57. Wright JW, Harding JW. Brain angiotensin receptor subtypes in the control of physiological and behavioral responses. *Neurosci Biobehav Rev* 18:21-53, 1994.
58. Handa RK. Characterization and signaling of the AT₄ receptor in human proximal tubule epithelial (HK-2) cells. *J Am Soc Nephrol* 12:440-449, 2001.
59. Hall KL, Venkateswaran S, Hanesworth JM, Schelling ME, Harding JW. Characterization of a functional angiotensin IV receptor on coronary microvascular endothelial cells. *Regul Pept* 58:107-115, 1995.
60. Kim S, Iwao H. Molecular and cellular mechanisms of angiotensin II-mediated cardiovascular and renal diseases. *Pharmacol Rev* 52:11-34, 2000.
61. Rosendorff C. The renin-angiotensin system and vascular hypertrophy. *J Am Coll Cardiol* 28:803-812, 1996.
62. Fukuda N, Satoh C, Hu WY, Soma M, Kubo A, Kishioka H, Watanabe Y, Izumi Y, Kanmatsuse K. Production of angiotensin II by homogeneous cultures of vascular smooth muscle cells from spontaneously hypertensive rats. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 19:1210-1217, 1999.
63. Naftilan AJ, Zuo WM, Inglefinger J, Ryan TJ, Jr., Pratt RE, Dzau VJ. Localization and differential regulation of angiotensinogen mRNA expression in the vessel wall. *J Clin Invest* 87:1300-1311, 1991.
64. Guo C, Ju H, Leung D, Massaeli H, Shi M, Rabinovitch M. A novel vascular smooth muscle chymase is upregulated in hypertensive rats. *J Clin Invest* 107:703-715, 2001.
65. Ju H, Gros R, You X, Tsang S, Husain M, Rabinovitch M. Conditional and targeted overexpression of vascular chymase causes hypertension in transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98:7469-7474, 2001.
66. Moeller I, Allen AM, Chai SY, Zhuo J, Mendelsohn FA. Bioactive angiotensin peptides. *J Hum Hypertens* 12:289-293, 1998.
67. Santos RA, Ferreira AJ, Pinheiro SV, Sampaio WO, Touyz R, Campagnole-Santos MJ. Angiotensin-(1-7) and its receptor as a potential targets for new cardiovascular drugs. *Expert Opin Investig Drugs* 14:1019-1031, 2005.
68. Horiba N, Nomura K, Shizume K. Exogenous and locally synthesized angiotensin II and glomerulosa cell functions. *Hypertension* 15:190-197, 1990.

69. Chai SY, Fernando R, Peck G, Ye SY, Mendelsohn FA, Jenkins TA, Albiston AL. The angiotensin IV/AT₄ receptor. *Cell Mol Life Sci* 61:2728-2737, 2004.
70. Dostal DE, Hunt RA, Kule CE, Bhat GJ, Karoor V, McWhinney CD, Baker KM. Molecular mechanisms of angiotensin II in modulating cardiac function: intracardiac effects and signal transduction pathways. *J Mol Cell Cardiol* 29:2893-2902, 1997.
71. Pieruzzi F, Abassi ZA, Keiser HR. Expression of renin-angiotensin system components in the heart, kidneys, and lungs of rats with experimental heart failure. *Circulation* 92:3105-3112, 1995.
72. Schiffrin EL. Vascular remodeling and endothelial function in hypertensive patients: effects of antihypertensive therapy. *Scand Cardiovasc J* 32 (Suppl 47):15-21, 1998.
73. Otsuka S, Sugano M, Makino N, Sawada S, Hata T, Niho Y. Interaction of mRNAs for angiotensin II type 1 and type 2 receptors to vascular remodeling in spontaneously hypertensive rats. *Hypertension* 32:467-472, 1998.
74. Lever AF, Lyall F, Morton JJ, Folkow B. Angiotensin II, vascular structure and blood pressure. *Kidney Int* 41 (Suppl 37):S51-S55, 1992.
75. Li JS, Touyz RM, Schiffrin EL. Effects of AT₁ and AT₂ angiotensin receptor antagonists in angiotensin II-infused rats. *Hypertension* 31:487-492, 1998.
76. Levy BI, Benessiano J, Henrion D, Caputo L, Heymes C, Duriez M, Poitevin P, Samuel JL. Chronic blockade of AT₂-subtype receptors prevents the effect of angiotensin II on the rat vascular structure. *J Clin Invest* 98:418-425, 1996.
77. Kai T, Kino H, Sugimura K, Shimada S, Kurooka A, Akamatsu K, Takenaka T, Fukamizu A, Murakami K, Ishikawa K, Katori R. Significant role of the increase in renin-angiotensin system in cardiac hypertrophy and renal glomerular sclerosis in double transgenic tsukuba hypertensive mice carrying both human renin and angiotensinogen genes. *Clin Exp Hypertens* 20:439-449, 1998.
78. Didion SP, Sigmund CD, Faraci FM. Impaired endothelial function in transgenic mice expressing both human renin and human angiotensinogen. *Stroke* 31:760-764, 2000.
79. Esther CR, Jr., Howard TE, Marino EM, Goddard JM, Capecchi MR, Bernstein KE. Mice lacking angiotensin-converting enzyme have low blood pressure, renal pathology, and reduced male fertility. *Lab Invest* 74:953-965, 1996.

80. Kim HS, Krege JH, Kluckman KD, Hagaman JR, Hodgin JB, Best CF, Jennette JC, Coffman TM, Maeda N, Smithies O. Genetic control of blood pressure and the angiotensinogen locus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92:2735-2739, 1995.
81. Yanai K, Saito T, Kakinuma Y, Kon Y, Hirota K, Taniguchi-Yanai K, Nishijo N, Shigematsu Y, Horiguchi H, Kasuya Y, Sugiyama F, Yagami K, Murakami K, Fukamizu A. Renin-dependent cardiovascular functions and renin-independent blood-brain barrier functions revealed by renin-deficient mice. *J Biol Chem* 275:5-8, 2000.
82. Murphy TJ, Alexander RW, Griendling KK, Runge MS, Bernstein KE. Isolation of a cDNA encoding the vascular type-1 angiotensin II receptor. *Nature* 351:233-236, 1991.
83. Sasaki K, Yamano Y, Bardhan S, Iwai N, Murray JJ, Hasegawa M, Matsuda Y, Inagami T. Cloning and expression of a complementary DNA encoding a bovine adrenal angiotensin II type-1 receptor. *Nature* 351:230-233, 1991.
84. Inagami T, Guo DF, Kitami Y. Molecular biology of angiotensin II receptors: an overview. *J Hypertens* 12 (Suppl 10):S83-S94, 1994.
85. Burson JM, Aguilera G, Gross KW, Sigmund CD. Differential expression of angiotensin receptor 1A and 1B in mouse. *Am J Physiol* 267:E260-E267, 1994.
86. Zhuo J, Moeller I, Jenkins T, Chai SY, Allen AM, Ohishi M, Mendelsohn FA. Mapping tissue angiotensin-converting enzyme and angiotensin AT1, AT2 and AT4 receptors. *J Hypertens* 16:2027-2037, 1998.
87. Tian Y, Baukal AJ, Sandberg K, Bernstein KE, Balla T, Catt KJ. Properties of AT1a and AT1b angiotensin receptors expressed in adrenocortical Y-1 cells. *Am J Physiol* 270:E831-E839, 1996.
88. Oliverio MI, Best CF, Kim HS, Arendshorst WJ, Smithies O, Coffman TM. Angiotensin II responses in AT1A receptor-deficient mice: a role for AT1B receptors in blood pressure regulation. *Am J Physiol* 272:F515-F520, 1997.
89. Zhu Z, Zhang SH, Wagner C, Kurtz A, Maeda N, Coffman T, Arendshorst WJ. Angiotensin AT1B receptor mediates calcium signaling in vascular smooth muscle cells of AT1A receptor-deficient mice. *Hypertension* 31:1171-1177, 1998.
90. Chen X, Li W, Yoshida H, Tsuchida S, Nishimura H, Takemoto F, Okubo S, Fogo A, Matsusaka T, Ichikawa I. Targeting deletion of angiotensin type 1B receptor gene in the mouse. *Am J Physiol* 272:F299-F304, 1997.

91. Oliverio MI, Kim HS, Ito M, Le T, Audoly L, Best CF, Hiller S, Kluckman K, Maeda N, Smithies O, Coffman TM. Reduced growth, abnormal kidney structure, and type 2 (AT₂) angiotensin receptor-mediated blood pressure regulation in mice lacking both AT_{1A} and AT_{1B} receptors for angiotensin II. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95:15496-15501, 1998.
92. Igase M, Strawn WB, Gallagher PE, Geary RL, Ferrario CM. Angiotensin II AT₁ receptors regulate ACE2 and angiotensin-(1-7) expression in the aorta of spontaneously hypertensive rats. *Am J Physiol* 289:H1013-H1019, 2005.
93. Ichiki T, Takeda K, Tokunou T, Funakoshi Y, Ito K, Iino N, Takeshita A. Reactive oxygen species-mediated homologous downregulation of angiotensin II type 1 receptor mRNA by angiotensin II. *Hypertension* 37:535-540, 2001.
94. Makita N, Iwai N, Inagami T, Badr KF. Two distinct pathways in the down-regulation of type-1 angiotensin II receptor gene in rat glomerular mesangial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 185:142-146, 1992.
95. Monti J, Schinke M, Bohm M, Ganten D, Bader M, Bricca G. Glial angiotensinogen regulates brain angiotensin II receptors in transgenic rats TGR(ASrAOGEN). *Am J Physiol* 280:R233-R240, 2001.
96. Clark MA, Diz DI, Tallant EA. Angiotensin-(1-7) downregulates the angiotensin II type 1 receptor in vascular smooth muscle cells. *Hypertension* 37:1141-1146, 2001.
97. Guo DF, Inagami T. Epidermal growth factor-enhanced human angiotensin II type 1 receptor. *Hypertension* 23:1032-1035, 1994.
98. Della BR, Ries S, Himmelstoss C, Kurtz A. Expression of cardiac angiotensin II AT₁ receptor genes in rat hearts is regulated by steroids but not by angiotensin II. *J Hypertens* 13:763-769, 1995.
99. Ichiki T, Usui M, Kato M, Funakoshi Y, Ito K, Egashira K, Takeshita A. Downregulation of angiotensin II type 1 receptor gene transcription by nitric oxide. *Hypertension* 31:342-348, 1998.
100. Du Y, Qiu J, Nelson SH, Wang DH. Regulation of type 1 ANG II receptor in vascular tissue: role of α_1 -adrenoreceptor. *Am J Physiol* 273:R1224-R1229, 1997.
101. Llorens-Cortes C, Greenberg B, Huang H, Corvol P. Tissue expression and regulation of type 1 angiotensin II receptor subtypes by quantitative reverse transcriptase-polymerase chain reaction analysis. *Hypertension* 24:538-548, 1994.

102. Nio Y, Matsubara H, Murasawa S, Kanasaki M, Inada M. Regulation of gene transcription of angiotensin II receptor subtypes in myocardial infarction. *J Clin Invest* 95:46-54, 1995.
103. Yamamoto K, Masuyama T, Sakata Y, Mano T, Nishikawa N, Kondo H, Akehi N, Kuzuya T, Miwa T, Horii M. Roles of renin-angiotensin and endothelin systems in development of diastolic heart failure in hypertensive hearts. *Cardiovasc Res* 47:274-283, 2000.
104. Strehlow K, Wassmann S, Bohm M, Nickenig G. Angiotensin AT1 receptor overexpression in hypercholesterolaemia. *Ann Med* 32:386-389, 2000.
105. Chung O, Unger T. Pharmacology of angiotensin receptors and AT1 receptor blockers. *Basic Res Cardiol* 93 (Suppl 2):15-23, 1998.
106. Burnier M. Angiotensin II type 1 receptor blockers. *Circulation* 103:904-912, 2001.
107. Lo MW, Goldberg MR, McCrea JB, Lu H, Furtek CI, Bjornsson TD. Pharmacokinetics of losartan, an angiotensin II receptor antagonist, and its active metabolite EXP3174 in humans. *Clin Pharmacol Ther* 58:641-649, 1995.
108. Pals DT, Masucci FD, Denning GS, Jr., Sipos F, Fessler DC. Role of the pressor action of angiotensin II in experimental hypertension. *Circ Res* 29:673-681, 1971.
109. Matsoukas JM, Polevaya L, Ancans J, Mavromoustakos T, Kolocouris A, Roumelioti P, Vlahakos DV, Yamdagni R, Wu Q, Moore GJ. The design and synthesis of a potent Angiotensin II cyclic analogue confirms the ring cluster receptor conformation of the hormone Angiotensin II. *Bioorg Med Chem* 8:1-10, 2000.
110. Mavromoustakos T, Apostolopoulos V, Matsoukas J. Antihypertensive drugs that act on Renin-Angiotensin System with emphasis in AT(1) antagonists. *Mini Rev Med Chem* 1:207-217, 2001.
111. Roumelioti P, Tselios T, Alexopoulos K, Mavromoustakos T, Kolocouris A, Moore GJ, Matsoukas JM. Structural comparison between type I and type II antagonists: possible implications in the drug design of AT1 antagonists. *Bioorg Med Chem Lett* 10:755-758, 2000.
112. Touyz RM, Schiffrin EL. Signal transduction mechanisms mediating the physiological and pathophysiological actions of angiotensin II in vascular smooth muscle cells. *Pharmacol Rev* 52:639-672, 2000.

113. Force T, Bonventre JV. Growth factors and mitogen-activated protein kinases. *Hypertension* 31:152-161, 1998.
114. Itoh H, Mukoyama M, Pratt RE, Gibbons GH, Dzau VJ. Multiple autocrine growth factors modulate vascular smooth muscle cell growth response to angiotensin II. *J Clin Invest* 91:2268-2274, 1993.
115. Freeman EJ, Ruehr ML, Dorman RV. ANG II-induced translocation of cytosolic PLA2 to the nucleus in vascular smooth muscle cells. *Am J Physiol* 274:C282-C288, 1998.
116. Touyz RM, Berry C. Recent advances in angiotensin II signaling. *Braz J Med Biol Res* 35:1001-1015, 2002.
117. Touyz RM, Schiffrin EL. Reactive oxygen species in vascular biology: implications in hypertension. *Histochem Cell Biol* 122:339-352, 2004.
118. Kranzhofer R, Schmidt J, Pfeiffer CA, Hagl S, Libby P, Kubler W. Angiotensin induces inflammatory activation of human vascular smooth muscle cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 19:1623-1629, 1999.
119. Pueyo ME, Gonzalez W, Nicoletti A, Savoie F, Arnal JF, Michel JB. Angiotensin II stimulates endothelial vascular cell adhesion molecule-1 via nuclear factor-kappaB activation induced by intracellular oxidative stress. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 20:645-651, 2000.
120. Wagenaar LJ, Voors AA, Buikema H, van Gilst WH. Angiotensin receptors in the cardiovascular system. *Can J Cardiol* 18:1331-1339, 2002.
121. Unger T. Neurohormonal modulation in cardiovascular disease. *Am Heart J* 139 (Suppl 1 Pt 2):S2-S8, 2000.
122. Laragh JH. Two forms of vasoconstriction in systemic hypertension. *Am J Cardiol* 60:82G-93G, 1987.
123. Hahn AW, Resink TJ, Kern F, Buhler FR. Peptide vasoconstrictors, vessel structure, and vascular smooth-muscle proliferation. *J Cardiovasc Pharmacol* 22 (Suppl 5):S37-S43, 1993.
124. Berry C, Touyz R, Dominiczak AF, Webb RC, Johns DG. Angiotensin receptors: signaling, vascular pathophysiology, and interactions with ceramide. *Am J Physiol* 281:H2337-H2365, 2001.

125. Szabo Z, Speth RC, Brown PR, Kerényi L, Kao PF, Mathews WB, Ravert HT, Hilton J, Rauseo P, Dannals RF, Zheng W, Lee S, Sandberg K. Use of positron emission tomography to study AT₁ receptor regulation in vivo. *J Am Soc Nephrol* 12:1350-1358, 2001.
126. Chung O, Unger T. Angiotensin II receptors in the kidney. *Kidney Blood Press Res* 21:245-248, 1998.
127. Balt JC, Mathy MJ, Nap A, Pfaffendorf M, van Zwieten PA. Effect of the AT₁-receptor antagonists losartan, irbesartan, and telmisartan on angiotensin II-induced facilitation of sympathetic neurotransmission in the rat mesenteric artery. *J Cardiovasc Pharmacol* 38:141-148, 2001.
128. Sanada S, Kitakaze M, Node K, Takashima S, Ogai A, Asanuma H, Sakata Y, Asakura M, Ogita H, Liao Y, Fukushima T, Yamada J, Minamino T, Kuzuya T, Hori M. Differential subcellular actions of ACE inhibitors and AT₁ receptor antagonists on cardiac remodeling induced by chronic inhibition of NO synthesis in rats. *Hypertension* 38:404-411, 2001.
129. Malmqvist K, Kahan T, Edner M, Held C, Hagg A, Lind L, Muller-Brunotte R, Nystrom F, Ohman KP, Osbakken MD, Ostergern J. Regression of left ventricular hypertrophy in human hypertension with irbesartan. *J Hypertens* 19:1167-1176, 2001.
130. Fischer JW, Stoll M, Hahn AW, Unger T. Differential regulation of thrombospondin-1 and fibronectin by angiotensin II receptor subtypes in cultured endothelial cells. *Cardiovasc Res* 51:784-791, 2001.
131. Chen HC, Bouchie JL, Perez AS, Clermont AC, Izumo S, Hampe J, Feener EP. Role of the angiotensin AT₁ receptor in rat aortic and cardiac PAI-1 gene expression. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 20:2297-2302, 2000.
132. Brown NJ, Vaughan DE. Prothrombotic effects of angiotensin. *Adv Intern Med* 45:419-429, 2000.
133. Strawn WB, Chappell MC, Dean RH, Kivlighn S, Ferrario CM. Inhibition of early atherogenesis by losartan in monkeys with diet-induced hypercholesterolemia. *Circulation* 101:1586-1593, 2000.
134. Griendling KK, Sorescu D, Ushio-Fukai M. NAD(P)H oxidase: role in cardiovascular biology and disease. *Circ Res* 86:494-501, 2000.

135. Alexander RW. Theodore Cooper Memorial Lecture. Hypertension and the pathogenesis of atherosclerosis. Oxidative stress and the mediation of arterial inflammatory response: a new perspective. *Hypertension* 25:155-161, 1995.
136. Mervaala E, Muller DN, Schmidt F, Park JK, Gross V, Bader M, Breu V, Ganten D, Haller H, Luft FC. Blood pressure-independent effects in rats with human renin and angiotensinogen genes. *Hypertension* 35:587-594, 2000.
137. Mervaala EM, Muller DN, Park JK, Schmidt F, Lohn M, Breu V, Dragun D, Ganten D, Haller H, Luft FC. Monocyte infiltration and adhesion molecules in a rat model of high human renin hypertension. *Hypertension* 33:389-395, 1999.
138. Romero JC, Reckelhoff JF. State-of-the-Art lecture. Role of angiotensin and oxidative stress in essential hypertension. *Hypertension* 34:943-949, 1999.
139. Griendling KK, Sorescu D, Lassegue B, Ushio-Fukai M. Modulation of protein kinase activity and gene expression by reactive oxygen species and their role in vascular physiology and pathophysiology. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 20:2175-2183, 2000.
140. Mervaala E, Dehmel B, Gross V, Lippoldt A, Bohlender J, Milia AF, Ganten D, Luft FC. Angiotensin-converting enzyme inhibition and AT1 receptor blockade modify the pressure-natriuresis relationship by additive mechanisms in rats with human renin and angiotensinogen genes. *J Am Soc Nephrol* 10:1669-1680, 1999.
141. Kiarash A, Pagano PJ, Tayeh M, Rhaleb NE, Carretero OA. Upregulated expression of rat heart intercellular adhesion molecule-1 in angiotensin II- but not phenylephrine-induced hypertension. *Hypertension* 37:58-65, 2001.
142. Cheng ZJ, Vapaatalo H, Mervaala E. Angiotensin II and vascular inflammation. *Med Sci Monit* 11:RA194-RA205, 2005.
143. Milligan G. Oligomerisation of G-protein-coupled receptors. *J Cell Sci* 114:1265-1271, 2001.
144. AbdAlla S, Lothar H, Abdel-tawab AM, Quitterer U. The angiotensin II AT2 receptor is an AT1 receptor antagonist. *J Biol Chem* 276:39721-39726, 2001.
145. Unger T. The angiotensin type 2 receptor: variations on an enigmatic theme. *J Hypertens* 17:1775-1786, 1999.
146. Touyz RM, Endemann D, He G, Li JS, Schiffrin EL. Role of AT2 receptors in angiotensin II-stimulated contraction of small mesenteric arteries in young SHR. *Hypertension* 33:366-372, 1999.

147. Matsumoto T, Sagawa N, Mukoyama M, Tanaka I, Itoh H, Goto M, Itoh H, Horiuchi M, Dzau VJ, Mori T, Nakao K. Type 2 angiotensin II receptor is expressed in human myometrium and uterine leiomyoma and is down-regulated during pregnancy. *J Clin Endocrinol Metab* 81:4366-4372, 1996.
148. Zahradka P, Yau L, Lalonde C, Buchko J, Thomas S, Werner J, Nguyen M, Saward L. Modulation of the vascular smooth muscle angiotensin subtype 2 (AT₂) receptor by angiotensin II. *Biochem Biophys Res Commun* 252:476-480, 1998.
149. Grady EF, Sechi LA, Griffin CA, Schambelan M, Kalinyak JE. Expression of AT₂ receptors in the developing rat fetus. *J Clin Invest* 88:921-933, 1991.
150. Shanmugam S, Lenkei ZG, Gasc JM, Corvol PL, Llorens-Cortes CM. Ontogeny of angiotensin II type 2 (AT₂) receptor mRNA in the rat. *Kidney Int* 47:1095-1100, 1995.
151. Matsubara H. Pathophysiological role of angiotensin II type 2 receptor in cardiovascular and renal diseases. *Circ Res* 83:1182-1191, 1998.
152. Miyata N, Park F, Li XF, Cowley AW, Jr. Distribution of angiotensin AT₁ and AT₂ receptor subtypes in the rat kidney. *Am J Physiol* 277:F437-F446, 1999.
153. Nakajima M, Hutchinson HG, Fujinaga M, Hayashida W, Morishita R, Zhang L, Horiuchi M, Pratt RE, Dzau VJ. The angiotensin II type 2 (AT₂) receptor antagonizes the growth effects of the AT₁ Receptor: gain-of-function study using gene transfer. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92:10663-10667, 1995.
154. Ohkubo N, Matsubara H, Nozawa Y, Mori Y, Murasawa S, Kijima K, Maruyama K, Masaki H, Tsutumi Y, Shibasaki Y, Iwasaka T, Inada M. Angiotensin type 2 receptors are reexpressed by cardiac fibroblasts from failing myopathic hamster hearts and inhibit cell growth and fibrillar collagen metabolism. *Circulation* 96:3954-3962, 1997.
155. Bautista R, Sanchez A, Hernandez J, Oyekan A, Escalante B. Angiotensin II type AT₂ receptor mRNA expression and renal vasodilatation are increased in renal failure. *Hypertension* 38:669-673, 2001.
156. Kijima K, Matsubara H, Murasawa S, Maruyama K, Ohkubo N, Mori Y, Inada M. Regulation of angiotensin II type 2 receptor gene by the protein kinase C-calcium pathway. *Hypertension* 27:529-534, 1996.
157. Matsubara H, Inada M. Molecular insights into angiotensin II type 1 and type 2 receptors: expression, signaling and physiological function and clinical application of its antagonists. *Endocr J* 45:137-150, 1998.

158. Mancina R, Susini T, Renzetti A, Forti G, Razzoli E, Serio M, Maggi M. Sex steroid modulation of AT₂ receptors in human myometrium. *J Clin Endocrinol Metab* 81:1753-1757, 1996.
159. Wang DH, Qiu J, Hu Z. Differential regulation of angiotensin II receptor subtypes in the adrenal gland: role of aldosterone. *Hypertension* 32:65-70, 1998.
160. Haithcock D, Jiao H, Cui XL, Hopfer U, Douglas JG. Renal proximal tubular AT₂ receptor: signaling and transport. *J Am Soc Nephrol* 10 (Suppl 11):S69-S74, 1999.
161. Sandmann S, Yu M, Kaschina E, Blume A, Bouzinova E, Aalkjaer C, Unger T. Differential effects of angiotensin AT₁ and AT₂ receptors on the expression, translation and function of the Na⁺-H⁺ exchanger and Na⁺-HCO³⁻ symporter in the rat heart after myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol* 37:2154-2165, 2001.
162. Ruiz-Ortega M, Lorenzo O, Ruperez M, Konig S, Wittig B, Egido J. Angiotensin II activates nuclear transcription factor kappaB through AT₁ and AT₂ in vascular smooth muscle cells: molecular mechanisms. *Circ Res* 86:1266-1272, 2000.
163. Wiemer G, Scholkens BA, Wagner A, Heitsch H, Linz W. The possible role of angiotensin II subtype AT₂ receptors in endothelial cells and isolated ischemic rat hearts. *J Hypertens* 11 (Suppl 5):S234-S235, 1993.
164. Siragy HM, Jaffa AA, Margolius HS, Carey RM. Renin-angiotensin system modulates renal bradykinin production. *Am J Physiol* 271:R1090-R1095, 1996.
165. Gohlke P, Pees C, Unger T. AT₂ receptor stimulation increases aortic cyclic GMP in SHRSP by a kinin-dependent mechanism. *Hypertension* 31:349-355, 1998.
166. Carey RM, Jin XH, Siragy HM. Role of the angiotensin AT₂ receptor in blood pressure regulation and therapeutic implications. *Am J Hypertens* 14 (Suppl.):S98-S102, 2001.
167. Stoll M, Hahn AW, Jonas U, Zhao Y, Schieffer B, Fischer JW, Unger T. Identification of a zinc finger homeodomain enhancer protein after AT₂ receptor stimulation by differential mRNA display. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 22:231-237, 2002.
168. Ichiki T, Labosky PA, Shiota C, Okuyama S, Imagawa Y, Fogo A, Niimura F, Ichikawa I, Hogan BL, Inagami T. Effects on blood pressure and exploratory behaviour of mice lacking angiotensin II type-2 receptor. *Nature* 377:748-750, 1995.

169. Hein L, Barsh GS, Pratt RE, Dzau VJ, Kobilka BK. Behavioural and cardiovascular effects of disrupting the angiotensin II type-2 receptor in mice. *Nature* 377:744-747, 1995.
170. Siragy HM, Carey RM. The subtype 2 (AT₂) angiotensin receptor mediates renal production of nitric oxide in conscious rats. *J Clin Invest* 100:264-269, 1997.
171. Akishita M, Yamada H, Dzau VJ, Horiuchi M. Increased vasoconstrictor response of the mouse lacking angiotensin II type 2 receptor. *Biochem Biophys Res Commun* 261:345-349, 1999.
172. Tanaka M, Tsuchida S, Imai T, Fujii N, Miyazaki H, Ichiki T, Naruse M, Inagami T. Vascular response to angiotensin II is exaggerated through an upregulation of AT₁ receptor in AT₂ knockout mice. *Biochem Biophys Res Commun* 258:194-198, 1999.
173. Tsutsumi Y, Matsubara H, Masaki H, Kurihara H, Murasawa S, Takai S, Miyazaki M, Nozawa Y, Ozono R, Nakagawa K, Miwa T, Kawada N, Mori Y, Shibasaki Y, Tanaka Y, Fujiyama S, Koyama Y, Fujiyama A, Takahashi H, Iwasaka T. Angiotensin II type 2 receptor overexpression activates the vascular kinin system and causes vasodilation. *J Clin Invest* 104:925-935, 1999.
174. Barber MN, Sampey DB, Widdop RE. AT₂ receptor stimulation enhances antihypertensive effect of AT₁ receptor antagonist in hypertensive rats. *Hypertension* 34:1112-1116, 1999.
175. Powell JS, Clozel JP, Muller RK, Kuhn H, Hefti F, Hosang M, Baumgartner HR. Inhibitors of angiotensin-converting enzyme prevent myointimal proliferation after vascular injury. *Science* 245:186-188, 1989.
176. Laflamme L, Gasparo M, Gallo JM, Payet MD, Gallo-Payet N. Angiotensin II induction of neurite outgrowth by AT₂ receptors in NG108-15 cells. Effect counteracted by the AT₁ receptors. *J Biol Chem* 271:22729-22735, 1996.
177. Meffert S, Stoll M, Steckelings UM, Bottari SP, Unger T. The angiotensin II AT₂ receptor inhibits proliferation and promotes differentiation in PC12W cells. *Mol Cell Endocrinol* 122:59-67, 1996.
178. Tsuzuki S, Eguchi S, Inagami T. Inhibition of cell proliferation and activation of protein tyrosine phosphatase mediated by angiotensin II type 2 (AT₂) receptor in R3T3 cells. *Biochem Biophys Res Commun* 228:825-830, 1996.

179. Goto M, Mukoyama M, Suga S, Matsumoto T, Nakagawa M, Ishibashi R, Kasahara M, Sugawara A, Tanaka I, Nakao K. Growth-dependent induction of angiotensin II type 2 receptor in rat mesangial cells. *Hypertension* 30:358-362, 1997.
180. Munzenmaier DH, Greene AS. Opposing actions of angiotensin II on microvascular growth and arterial blood pressure. *Hypertension* 27:760-765, 1996.
181. Aumailley M, Gayraud B. Structure and biological activity of the extracellular matrix. *J Mol Med* 76:253-265, 1998.
182. Streuli C. Extracellular matrix remodelling and cellular differentiation. *Curr Opin Cell Biol* 11:634-640, 1999.
183. Prockop DJ, Kivirikko KI. Collagens: molecular biology, diseases, and potentials for therapy. *Annu Rev Biochem* 64:403-434, 1995.
184. Rosenbloom J, Abrams WR, Mecham R. Extracellular matrix 4: the elastic fiber. *FASEB J* 7:1208-1218, 1993.
185. Debelle L, Tamburro AM. Elastin: molecular description and function. *Int J Biochem Cell Biol* 31:261-272, 1999.
186. Dobrin PB. Mechanical properties of arteries. *Physiol Rev* 58:397-460, 1978.
187. Kielty CM, Sherratt MJ, Shuttleworth CA. Elastic fibres. *J Cell Sci* 115:2817-2828, 2002.
188. Lee KA, Pierce RA, Davis EC, Mecham RP, Parks WC. Conversion to an elastogenic phenotype by fetal hyaline chondrocytes is accompanied by altered expression of elastin-related macromolecules. *Dev Biol* 163:241-252, 1994.
189. Safar ME, Laurent S. Behaviour of conduit arteries in hypertension. *Clin Exp Hypertens* 15:1033-1045, 1993.
190. Briones AM, Gonzalez JM, Somoza B, Giraldo J, Daly CJ, Vila E, Gonzalez MC, McGrath JC, Arribas SM. Role of elastin in spontaneously hypertensive rat small mesenteric artery remodelling. *J Physiol* 552:185-195, 2003.
191. Boumaza S, Arribas SM, Osborne-Pellegrin M, McGrath JC, Laurent S, Lacolley P, Challande P. Fenestrations of the carotid internal elastic lamina and structural adaptation in stroke-prone spontaneously hypertensive rats. *Hypertension* 37:1101-1107, 2001.

192. Tryggvason K, Hoyhtya M, Salo T. Proteolytic degradation of extracellular matrix in tumor invasion. *Biochim Biophys Acta* 907:191-217, 1987.
193. George EL, Georges-Labouesse EN, Patel-King RS, Rayburn H, Hynes RO. Defects in mesoderm, neural tube and vascular development in mouse embryos lacking fibronectin. *Development* 119:1079-1091, 1993.
194. Iozzo RV. Matrix proteoglycans: from molecular design to cellular function. *Annu Rev Biochem* 67:609-652, 1998.
195. Schwartz N. Biosynthesis and regulation of expression of proteoglycans. *Front Biosci* 5:D649-D655, 2000.
196. Taipale J, Keski-Oja J. Growth factors in the extracellular matrix. *FASEB J* 11:51-59, 1997.
197. Iozzo RV. The biology of the small leucine-rich proteoglycans. Functional network of interactive proteins. *J Biol Chem* 274:18843-18846, 1999.
198. Yamaguchi Y, Mann DM, Ruoslahti E. Negative regulation of transforming growth factor- β by the proteoglycan decorin. *Nature* 346:281-284, 1990.
199. Timpl R. Macromolecular organization of basement membranes. *Curr Opin Cell Biol* 8:618-624, 1996.
200. Iozzo RV, San Antonio JD. Heparan sulfate proteoglycans: heavy hitters in the angiogenesis arena. *J Clin Invest* 108:349-355, 2001.
201. Hudson BG, Reeders ST, Tryggvason K. Type IV collagen: structure, gene organization, and role in human diseases. Molecular basis of Goodpasture and Alport syndromes and diffuse leiomyomatosis. *J Biol Chem* 268:26033-26036, 1993.
202. Yurchenco PD, O'Rear JJ. Basal lamina assembly. *Curr Opin Cell Biol* 6:674-681, 1994.
203. Tryggvason K. The laminin family. *Curr Opin Cell Biol* 5:877-882, 1993.
204. Colognato H, Yurchenco PD. Form and function: the laminin family of heterotrimers. *Dev Dyn* 218:213-234, 2000.

205. Kallunki P, Tryggvason K. Human basement membrane heparan sulfate proteoglycan core protein: a 467-kD protein containing multiple domains resembling elements of the low density lipoprotein receptor, laminin, neural cell adhesion molecules, and epidermal growth factor. *J Cell Biol* 116:559-571, 1992.
206. Sasaki T, Fukai N, Mann K, Gohring W, Olsen BR, Timpl R. Structure, function and tissue forms of the C-terminal globular domain of collagen XVIII containing the angiogenesis inhibitor endostatin. *EMBO J* 17:4249-4256, 1998.
207. Magnusson MK, Mosher DF. Fibronectin: structure, assembly, and cardiovascular implications. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 18:1363-1370, 1998.
208. Bezie Y, Lamaziere JM, Laurent S, Challande P, Cunha RS, Bonnet J, Lacolley P. Fibronectin expression and aortic wall elastic modulus in spontaneously hypertensive rats. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 18:1027-1034, 1998.
209. Kim S, Ohta K, Hamaguchi A, Omura T, Tominaga K, Yukimura T, Miura K, Tanaka M, Iwao H. AT1 receptor-mediated stimulation by angiotensin II of rat aortic fibronectin gene expression in vivo. *Br J Pharmacol* 113:662-663, 1994.
210. Tamura K, Nyui N, Tamura N, Fujita T, Kihara M, Toya Y, Takasaki I, Takagi N, Ishii M, Oda K, Horiuchi M, Umemura S. Mechanism of angiotensin II-mediated regulation of fibronectin gene in rat vascular smooth muscle cells. *J Biol Chem* 273:26487-26496, 1998.
211. Sternlicht MD, Werb Z. How matrix metalloproteinases regulate cell behavior. *Annu Rev Cell Dev Biol* 17:463-516, 2001.
212. Woessner JF, Jr. The matrix metalloproteinase family. In: Parks WC, Mecham RP, editors. *Matrix Metalloproteinases*. Academic Press ed. San Diego, CA: 1998. p. 1-14.
213. Chantrain C., DeClerck Y.A. Les métalloprotéases matricielles et leurs inhibiteurs synthétiques dans la progression tumorale. *Médecine/Sciences* 18:565-575, 2002.
214. Jeffrey JJ. Interstitial collagenases. In: Parks WC, Mecham RP, editors. *Matrix Metalloproteinases*. Academic Press ed. San Diego, CA: 1998. p. 15-42.
215. Knauper V, Cowell S, Smith B, Lopez-Otin C, O'Shea M, Morris H, Zardi L, Murphy G. The role of the C-terminal domain of human collagenase-3 (MMP-13) in the activation of procollagenase-3, substrate specificity, and tissue inhibitor of metalloproteinase interaction. *J Biol Chem* 272:7608-7616, 1997.

216. Ohuchi E, Imai K, Fujii Y, Sato H, Seiki M, Okada Y. Membrane type 1 matrix metalloproteinase digests interstitial collagens and other extracellular matrix macromolecules. *J Biol Chem* 272:2446-2451, 1997.
217. Aimes RT, Quigley JP. Matrix metalloproteinase-2 is an interstitial collagenase. Inhibitor-free enzyme catalyzes the cleavage of collagen fibrils and soluble native type I collagen generating the specific 3/4- and 1/4-length fragments. *J Biol Chem* 270:5872-5876, 1995.
218. GROSS J, LAPIERE CM. Collagenolytic activity in amphibian tissues: a tissue culture assay. *Proc Natl Acad Sci U S A* 48:1014-1022, 1962.
219. Stricklin GP, Bauer EA, Jeffrey JJ, Eisen AZ. Human skin collagenase: isolation of precursor and active forms from both fibroblast and organ cultures. *Biochemistry* 16:1607-1615, 1977.
220. Goldberg GI, Wilhelm SM, Kronberger A, Bauer EA, Grant GA, Eisen AZ. Human fibroblast collagenase. Complete primary structure and homology to an oncogene transformation-induced rat protein. *J Biol Chem* 261:6600-6605, 1986.
221. Hasty KA, Pourmotabbed TF, Goldberg GI, Thompson JP, Spinella DG, Stevens RM, Mainardi CL. Human neutrophil collagenase. A distinct gene product with homology to other matrix metalloproteinases. *J Biol Chem* 265:11421-11424, 1990.
222. Prikk K, Maisi P, Pirila E, Sepper R, Salo T, Wahlgren J, Sorsa T. In vivo collagenase-2 (MMP-8) expression by human bronchial epithelial cells and monocytes/macrophages in bronchiectasis. *J Pathol* 194:232-238, 2001.
223. Johansson N, Saarialho-Kere U, Airola K, Herva R, Nissinen L, Westermarck J, Vuorio E, Heino J, Kahari VM. Collagenase-3 (MMP-13) is expressed by hypertrophic chondrocytes, periosteal cells, and osteoblasts during human fetal bone development. *Dev Dyn* 208:387-397, 1997.
224. Balbin M, Pendas AM, Uria JA, Jimenez MG, Freije JP, Lopez-Otin C. Expression and regulation of collagenase-3 (MMP-13) in human malignant tumors. *APMIS* 107:45-53, 1999.
225. Collier IE, Wilhelm SM, Eisen AZ, Marmer BL, Grant GA, Seltzer JL, Kronberger A, He CS, Bauer EA, Goldberg GI. H-ras oncogene-transformed human bronchial epithelial cells (TBE-1) secrete a single metalloprotease capable of degrading basement membrane collagen. *J Biol Chem* 263:6579-6587, 1988.

226. Steffensen B, Wallon UM, Overall CM. Extracellular matrix binding properties of recombinant fibronectin type II-like modules of human 72-kDa gelatinase/type IV collagenase. High affinity binding to native type I collagen but not native type IV collagen. *J Biol Chem* 270:11555-11566, 1995.
227. Shipley JM, Doyle GA, Fliszar CJ, Ye QZ, Johnson LL, Shapiro SD, Welgus HG, Senior RM. The structural basis for the elastolytic activity of the 92-kDa and 72-kDa gelatinases. Role of the fibronectin type II-like repeats. *J Biol Chem* 271:4335-4341, 1996.
228. Allan JA, Docherty AJ, Barker PJ, Huskisson NS, Reynolds JJ, Murphy G. Binding of gelatinases A and B to type-I collagen and other matrix components. *Biochem J* 309:299-306, 1995.
229. Wilhelm SM, Collier IE, Marmer BL, Eisen AZ, Grant GA, Goldberg GI. SV40-transformed human lung fibroblasts secrete a 92-kDa type IV collagenase which is identical to that secreted by normal human macrophages. *J Biol Chem* 264:17213-17221, 1989.
230. Olson MW, Gervasi DC, Mobashery S, Fridman R. Kinetic analysis of the binding of human matrix metalloproteinase-2 and -9 to tissue inhibitor of metalloproteinase (TIMP)-1 and TIMP-2. *J Biol Chem* 272:29975-29983, 1997.
231. Huhtala P, Tuuttila A, Chow LT, Lohi J, Keski-Oja J, Tryggvason K. Complete structure of the human gene for 92-kDa type IV collagenase. Divergent regulation of expression for the 92- and 72-kilodalton enzyme genes in HT-1080 cells. *J Biol Chem* 266:16485-16490, 1991.
232. Salo T, Liotta LA, Tryggvason K. Purification and characterization of a murine basement membrane collagen-degrading enzyme secreted by metastatic tumor cells. *J Biol Chem* 258:3058-3063, 1983.
233. Salo T, Lyons JG, Rahemtulla F, Birkedal-Hansen H, Larjava H. Transforming growth factor-beta 1 up-regulates type IV collagenase expression in cultured human keratinocytes. *J Biol Chem* 266:11436-11441, 1991.
234. Tryggvason K, Huhtala P, Tuuttila A, Chow L, Keski-Oja J, Lohi J. Structure and expression of type IV collagenase genes. *Cell Differ Dev* 32:307-312, 1990.
235. Reponen P, Sahlberg C, Huhtala P, Hurskainen T, Thesleff I, Tryggvason K. Molecular cloning of murine 72-kDa type IV collagenase and its expression during mouse development. *J Biol Chem* 267:7856-7862, 1992.

236. Saarialho-Kere UK, Welgus HG, Parks WC. Distinct mechanisms regulate interstitial collagenase and 92-kDa gelatinase expression in human monocytic-like cells exposed to bacterial endotoxin. *J Biol Chem* 268:17354-17361, 1993.
237. Overall CM, Wrana JL, Sodek J. Independent regulation of collagenase, 72-kDa progelatinase, and metalloendoproteinase inhibitor expression in human fibroblasts by transforming growth factor- β . *J Biol Chem* 264:1860-1869, 1989.
238. Giannelli G, Falk-Marzillier J, Schiraldi O, Stetler-Stevenson WG, Quaranta V. Induction of cell migration by matrix metalloproteinase-2 cleavage of laminin-5. *Science* 277:225-228, 1997.
239. Vu TH, Shipley JM, Bergers G, Berger JE, Helms JA, Hanahan D, Shapiro SD, Senior RM, Werb Z. MMP-9/gelatinase B is a key regulator of growth plate angiogenesis and apoptosis of hypertrophic chondrocytes. *Cell* 93:411-422, 1998.
240. Liu Z, Zhou X, Shapiro SD, Shipley JM, Twining SS, Diaz LA, Senior RM, Werb Z. The serpin α 1-proteinase inhibitor is a critical substrate for gelatinase B/MMP-9 in vivo. *Cell* 102:647-655, 2000.
241. Lucchesi PA, Sabri A, Belmadani S, Matrougui K. Involvement of metalloproteinases 2/9 in epidermal growth factor receptor transactivation in pressure-induced myogenic tone in mouse mesenteric resistance arteries. *Circulation* 110:3587-3593, 2004.
242. Hao L, Du M, Lopez-Campistrous A, Fernandez-Patron C. Agonist-induced activation of matrix metalloproteinase-7 promotes vasoconstriction through the epidermal growth factor-receptor pathway. *Circ Res* 94:68-76, 2004.
243. Suzuki M, Raab G, Moses MA, Fernandez CA, Klagsbrun M. Matrix metalloproteinase-3 releases active heparin-binding EGF-like growth factor by cleavage at a specific juxtamembrane site. *J Biol Chem* 272:31730-31737, 1997.
244. Pei D, Majmudar G, Weiss SJ. Hydrolytic inactivation of a breast carcinoma cell-derived serpin by human stromelysin-3. *J Biol Chem* 269:25849-25855, 1994.
245. Manes S, Mira E, Barbacid MM, Cipres A, Fernandez-Resa P, Buesa JM, Merida I, Aracil M, Marquez G, Martinez A. Identification of insulin-like growth factor-binding protein-1 as a potential physiological substrate for human stromelysin-3. *J Biol Chem* 272:25706-25712, 1997.
246. Pei D. CA-MMP: a matrix metalloproteinase with a novel cysteine array, but without the classic cysteine switch. *FEBS Lett* 457:262-270, 1999.

247. Brown PD, Kleiner DE, Unsworth EJ, Stetler-Stevenson WG. Cellular activation of the 72 kDa type IV procollagenase/TIMP-2 complex. *Kidney Int* 43:163-170, 1993.
248. Sato H, Takino T, Okada Y, Cao J, Shinagawa A, Yamamoto E, Seiki M. A matrix metalloproteinase expressed on the surface of invasive tumour cells. *Nature* 370:61-65, 1994.
249. Llano E, Pendas AM, Freije JP, Nakano A, Knauper V, Murphy G, Lopez-Otin C. Identification and characterization of human MT5-MMP, a new membrane-bound activator of progelatinase a overexpressed in brain tumors. *Cancer Res* 59:2570-2576, 1999.
250. Shapiro SD. Matrix metalloproteinase degradation of extracellular matrix: biological consequences. *Curr Opin Cell Biol* 10:602-608, 1998.
251. Hotary K, Allen E, Punturieri A, Yana I, Weiss SJ. Regulation of cell invasion and morphogenesis in a three-dimensional type I collagen matrix by membrane-type matrix metalloproteinases 1, 2, and 3. *J Cell Biol* 149:1309-1323, 2000.
252. Pei D, Kang T, Qi H. Cysteine array matrix metalloproteinase (CA-MMP)/MMP-23 is a type II transmembrane matrix metalloproteinase regulated by a single cleavage for both secretion and activation. *J Biol Chem* 275:33988-33997, 2000.
253. Morgunova E, Tuuttila A, Bergmann U, Isupov M, Lindqvist Y, Schneider G, Tryggvason K. Structure of human pro-matrix metalloproteinase-2: activation mechanism revealed. *Science* 284:1667-1670, 1999.
254. Bode W, Fernandez-Catalan C, Tschesche H, Grams F, Nagase H, Maskos K. Structural properties of matrix metalloproteinases. *Cell Mol Life Sci* 55:639-652, 1999.
255. Van Wart HE, Birkedal-Hansen H. The cysteine switch: a principle of regulation of metalloproteinase activity with potential applicability to the entire matrix metalloproteinase gene family. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87:5578-5582, 1990.
256. Mignatti P, Rifkin DB. Nonenzymatic interactions between proteinases and the cell surface: novel roles in normal and malignant cell physiology. *Adv Cancer Res* 78:103-157, 2000.
257. Carmeliet P, Moons L, Lijnen R, Baes M, Lemaitre V, Tipping P, Drew A, Eeckhout Y, Shapiro S, Lupu F, Collen D. Urokinase-generated plasmin activates matrix metalloproteinases during aneurysm formation. *Nat Genet* 17:439-444, 1997.

258. Pei D, Weiss SJ. Furin-dependent intracellular activation of the human stromelysin-3 zymogen. *Nature* 375:244-247, 1995.
259. Pei D, Weiss SJ. Transmembrane-deletion mutants of the membrane-type matrix metalloproteinase-1 process progelatinase A and express intrinsic matrix-degrading activity. *J Biol Chem* 271:9135-9140, 1996.
260. Okumura Y, Sato H, Seiki M, Kido H. Proteolytic activation of the precursor of membrane type 1 matrix metalloproteinase by human plasmin. A possible cell surface activator. *FEBS Lett* 402:181-184, 1997.
261. Maquoi E, Noel A, Frankenne F, Angliker H, Murphy G, Foidart JM. Inhibition of matrix metalloproteinase 2 maturation and HT1080 invasiveness by a synthetic furin inhibitor. *FEBS Lett* 424:262-266, 1998.
262. Yana I, Weiss SJ. Regulation of membrane type-1 matrix metalloproteinase activation by proprotein convertases. *Mol Biol Cell* 11:2387-2401, 2000.
263. Kang T, Nagase H, Pei D. Activation of membrane-type matrix metalloproteinase 3 zymogen by the proprotein convertase furin in the trans-Golgi network. *Cancer Res* 62:675-681, 2002.
264. Cao J, Hymowitz M, Conner C, Bahou WF, Zucker S. The propeptide domain of membrane type 1-matrix metalloproteinase acts as an intramolecular chaperone when expressed in trans with the mature sequence in COS-1 cells. *J Biol Chem* 275:29648-29653, 2000.
265. Pavlaki M, Cao J, Hymowitz M, Chen WT, Bahou W, Zucker S. A conserved sequence within the propeptide domain of membrane type 1 matrix metalloproteinase is critical for function as an intramolecular chaperone. *J Biol Chem* 277:2740-2749, 2002.
266. Bannikov GA, Karelina TV, Collier IE, Marmer BL, Goldberg GI. Substrate binding of gelatinase B induces its enzymatic activity in the presence of intact propeptide. *J Biol Chem* 277:16022-16027, 2002.
267. Chesler NC, Ku DN, Galis ZS. Transmural pressure induces matrix-degrading activity in porcine arteries ex vivo. *Am J Physiol* 277:H2002-H2009, 1999.
268. Southgate KM, Mehta D, Izzat MB, Newby AC, Angelini GD. Increased secretion of basement membrane-degrading metalloproteinases in pig saphenous vein into carotid artery interposition grafts. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 19:1640-1649, 1999.

269. Tronc F, Mallat Z, Lehoux S, Wassef M, Esposito B, Tedgui A. Role of matrix metalloproteinases in blood flow-induced arterial enlargement: interaction with NO. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 20:e120-e126, 2000.
270. Cai H, Harrison DG. Endothelial dysfunction in cardiovascular diseases: the role of oxidant stress. *Circ Res* 87:840-844, 2000.
271. Rajagopalan S, Meng XP, Ramasamy S, Harrison DG, Galis ZS. Reactive oxygen species produced by macrophage-derived foam cells regulate the activity of vascular matrix metalloproteinases in vitro. Implications for atherosclerotic plaque stability. *J Clin Invest* 98:2572-2579, 1996.
272. Frears ER, Zhang Z, Blake DR, O'Connell JP, Winyard PG. Inactivation of tissue inhibitor of metalloproteinase-1 by peroxynitrite. *FEBS Lett* 381:21-24, 1996.
273. Galis ZS, Muszynski M, Sukhova GK, Simon-Morrissey E, Unemori EN, Lark MW, Amento E, Libby P. Cytokine-stimulated human vascular smooth muscle cells synthesize a complement of enzymes required for extracellular matrix digestion. *Circ Res* 75:181-189, 1994.
274. Libby P, Galis ZS. Cytokines regulate genes involved in atherogenesis. *Ann N Y Acad Sci* 748:158-168, 1995.
275. Galis ZS, Khatri JJ. Matrix metalloproteinases in vascular remodeling and atherogenesis: the good, the bad, and the ugly. *Circ Res* 90:251-262, 2002.
276. Sottrup-Jensen L, Birkedal-Hansen H. Human fibroblast collagenase-alpha-macroglobulin interactions. Localization of cleavage sites in the bait regions of five mammalian alpha-macroglobulins. *J Biol Chem* 264:393-401, 1989.
277. Bein K, Simons M. Thrombospondin type 1 repeats interact with matrix metalloproteinase 2. Regulation of metalloproteinase activity. *J Biol Chem* 275:32167-32173, 2000.
278. Takahashi C, Sheng Z, Horan TP, Kitayama H, Maki M, Hitomi K, Kitaura Y, Takai S, Sasahara RM, Horimoto A, Ikawa Y, Ratzkin BJ, Arakawa T, Noda M. Regulation of matrix metalloproteinase-9 and inhibition of tumor invasion by the membrane-anchored glycoprotein RECK. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95:13221-13226, 1998.
279. Greene J, Wang M, Liu YE, Raymond LA, Rosen C, Shi YE. Molecular cloning and characterization of human tissue inhibitor of metalloproteinase 4. *J Biol Chem* 271:30375-30380, 1996.

280. Silbiger SM, Jacobsen VL, Cupples RL, Koski RA. Cloning of cDNAs encoding human TIMP-3, a novel member of the tissue inhibitor of metalloproteinase family. *Gene* 141:293-297, 1994.
281. Stetler-Stevenson WG, Kruttsch HC, Liotta LA. Tissue inhibitor of metalloproteinase (TIMP-2). A new member of the metalloproteinase inhibitor family. *J Biol Chem* 264:17374-17378, 1989.
282. Tuuttila A, Morgunova E, Bergmann U, Lindqvist Y, Maskos K, Fernandez-Catalan C, Bode W, Tryggvason K, Schneider G. Three-dimensional structure of human tissue inhibitor of metalloproteinases-2 at 2.1 Å resolution. *J Mol Biol* 284:1133-1140, 1998.
283. Huang W, Meng Q, Suzuki K, Nagase H, Brew K. Mutational study of the amino-terminal domain of human tissue inhibitor of metalloproteinases 1 (TIMP-1) locates an inhibitory region for matrix metalloproteinases. *J Biol Chem* 272:22086-22091, 1997.
284. Murphy G, Houbrechts A, Cockett MI, Williamson RA, O'Shea M, Docherty AJ. The N-terminal domain of tissue inhibitor of metalloproteinases retains metalloproteinase inhibitory activity. *Biochemistry* 30:8097-8102, 1991.
285. Henriët P, Blavier L, Declerck YA. Tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMP) in invasion and proliferation. *APMIS* 107:111-119, 1999.
286. Gomez DE, Alonso DF, Yoshiji H, Thorgeirsson UP. Tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, regulation and biological functions. *Eur J Cell Biol* 74:111-122, 1997.
287. Shimada T, Nakamura H, Ohuchi E, Fujii Y, Murakami Y, Sato H, Seiki M, Okada Y. Characterization of a truncated recombinant form of human membrane type 3 matrix metalloproteinase. *Eur J Biochem* 262:907-914, 1999.
288. Will H, Atkinson SJ, Butler GS, Smith B, Murphy G. The soluble catalytic domain of membrane type 1 matrix metalloproteinase cleaves the propeptide of progelatinase A and initiates autoproteolytic activation. Regulation by TIMP-2 and TIMP-3. *J Biol Chem* 271:17119-17123, 1996.
289. English WR, Velasco G, Stracke JO, Knauper V, Murphy G. Catalytic activities of membrane-type 6 matrix metalloproteinase (MMP25). *FEBS Lett* 491:137-142, 2001.

290. Kolkenbrock H, Essers L, Ulbrich N, Will H. Biochemical characterization of the catalytic domain of membrane-type 4 matrix metalloproteinase. *Biol Chem* 380:1103-1108, 1999.
291. Hashimoto G, Aoki T, Nakamura H, Tanzawa K, Okada Y. Inhibition of ADAMTS4 (aggrecanase-1) by tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMP-1, 2, 3 and 4). *FEBS Lett* 494:192-195, 2001.
292. Bigg HF, Shi YE, Liu YE, Steffensen B, Overall CM. Specific, high affinity binding of tissue inhibitor of metalloproteinases-4 (TIMP-4) to the COOH-terminal hemopexin-like domain of human gelatinase A. TIMP-4 binds progelatinase A and the COOH-terminal domain in a similar manner to TIMP-2. *J Biol Chem* 272:15496-15500, 1997.
293. Itoh Y, Nagase H. Preferential inactivation of tissue inhibitor of metalloproteinases-1 that is bound to the precursor of matrix metalloproteinase 9 (progelatinase B) by human neutrophil elastase. *J Biol Chem* 270:16518-16521, 1995.
294. Okada Y, Watanabe S, Nakanishi I, Kishi J, Hayakawa T, Watorek W, Travis J, Nagase H. Inactivation of tissue inhibitor of metalloproteinases by neutrophil elastase and other serine proteinases. *FEBS Lett* 229:157-160, 1988.
295. Maquoi E, Frankenne F, Baramova E, Munaut C, Sounni NE, Remacle A, Noel A, Murphy G, Foidart JM. Membrane type 1 matrix metalloproteinase-associated degradation of tissue inhibitor of metalloproteinase 2 in human tumor cell lines. *J Biol Chem* 275:11368-11378, 2000.
296. Cheng L, Mantile G, Pauly R, Nater C, Felici A, Monticone R, Bilato C, Gluzband YA, Crow MT, Stetler-Stevenson W, Capogrossi MC. Adenovirus-mediated gene transfer of the human tissue inhibitor of metalloproteinase-2 blocks vascular smooth muscle cell invasiveness in vitro and modulates neointimal development in vivo. *Circulation* 98:2195-2201, 1998.
297. Fernandez HA, Kallenbach K, Seghezzi G, Grossi E, Colvin S, Schneider R, Mignatti P, Galloway A. Inhibition of endothelial cell migration by gene transfer of tissue inhibitor of metalloproteinases-1. *J Surg Res* 82:156-162, 1999.
298. Valente P, Fassina G, Melchiori A, Masiello L, Cilli M, Vacca A, Onisto M, Santi L, Stetler-Stevenson WG, Albini A. TIMP-2 over-expression reduces invasion and angiogenesis and protects B16F10 melanoma cells from apoptosis. *Int J Cancer* 75:246-253, 1998.

299. Jo Y, Yeon J, Kim HJ, Lee ST. Analysis of tissue inhibitor of metalloproteinases-2 effect on pro-matrix metalloproteinase-2 activation by membrane-type 1 matrix metalloproteinase using baculovirus/insect-cell expression system. *Biochem J* 345:511-519, 2000.
300. Ahonen M, Baker AH, Kahari VM. Adenovirus-mediated gene delivery of tissue inhibitor of metalloproteinases-3 inhibits invasion and induces apoptosis in melanoma cells. *Cancer Res* 58:2310-2315, 1998.
301. Hoegy SE, Oh HR, Corcoran ML, Stetler-Stevenson WG. Tissue inhibitor of metalloproteinases-2 (TIMP-2) suppresses TKR-growth factor signaling independent of metalloproteinase inhibition. *J Biol Chem* 276:3203-3214, 2001.
302. Baker AH, Zaltsman AB, George SJ, Newby AC. Divergent effects of tissue inhibitor of metalloproteinase-1, -2, or -3 overexpression on rat vascular smooth muscle cell invasion, proliferation, and death in vitro. TIMP-3 promotes apoptosis. *J Clin Invest* 101:1478-1487, 1998.
303. Kraling BM, Wiederschain DG, Boehm T, Rehn M, Mulliken JB, Moses MA. The role of matrix metalloproteinase activity in the maturation of human capillary endothelial cells in vitro. *J Cell Sci* 112:1599-1609, 1999.
304. Hanahan D, Folkman J. Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis. *Cell* 86:353-364, 1996.
305. Eliceiri BP, Cheresh DA. The role of av integrins during angiogenesis: insights into potential mechanisms of action and clinical development. *J Clin Invest* 103:1227-1230, 1999.
306. Brooks PC, Stromblad S, Sanders LC, von Schalscha TL, Aimes RT, Stetler-Stevenson WG, Quigley JP, Cheresh DA. Localization of matrix metalloproteinase MMP-2 to the surface of invasive cells by interaction with integrin avb3. *Cell* 85:683-693, 1996.
307. Itoh T, Tanioka M, Yoshida H, Yoshioka T, Nishimoto H, Itohara S. Reduced angiogenesis and tumor progression in gelatinase A-deficient mice. *Cancer Res* 58:1048-1051, 1998.
308. Brooks PC, Silletti S, von Schalscha TL, Friedlander M, Cheresh DA. Disruption of angiogenesis by PEX, a noncatalytic metalloproteinase fragment with integrin binding activity. *Cell* 92:391-400, 1998.

309. Pfeifer A, Kessler T, Silletti S, Cheresh DA, Verma IM. Suppression of angiogenesis by lentiviral delivery of PEX, a noncatalytic fragment of matrix metalloproteinase 2. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97:12227-12232, 2000.
310. Silletti S, Kessler T, Goldberg J, Boger DL, Cheresh DA. Disruption of matrix metalloproteinase 2 binding to integrin $\alpha_v\beta_3$ by an organic molecule inhibits angiogenesis and tumor growth in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98:119-124, 2001.
311. Deryugina EI, Ratnikov B, Monosov E, Postnova TI, DiScipio R, Smith JW, Strongin AY. MT1-MMP initiates activation of pro-MMP-2 and integrin $\alpha_v\beta_3$ promotes maturation of MMP-2 in breast carcinoma cells. *Exp Cell Res* 263:209-223, 2001.
312. O'Reilly MS, Wiederschain D, Stetler-Stevenson WG, Folkman J, Moses MA. Regulation of angiostatin production by matrix metalloproteinase-2 in a model of concomitant resistance. *J Biol Chem* 274:29568-29571, 1999.
313. Patterson BC, Sang QA. Angiostatin-converting enzyme activities of human matrilysin (MMP-7) and gelatinase B/type IV collagenase (MMP-9). *J Biol Chem* 272:28823-28825, 1997.
314. Maeshima Y, Colorado PC, Kalluri R. Two RGD-independent $\alpha_v\beta_3$ integrin binding sites on tumstatin regulate distinct anti-tumor properties. *J Biol Chem* 275:23745-23750, 2000.
315. Levi E, Fridman R, Miao HQ, Ma YS, Yayon A, Vlodavsky I. Matrix metalloproteinase 2 releases active soluble ectodomain of fibroblast growth factor receptor 1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93:7069-7074, 1996.
316. Clark EA, Brugge JS. Integrins and signal transduction pathways: the road taken. *Science* 268:233-239, 1995.
317. Lafrenie RM, Yamada KM. Integrin-dependent signal transduction. *J Cell Biochem* 61:543-553, 1996.
318. Shattil SJ, Ginsberg MH. Perspectives series: cell adhesion in vascular biology. Integrin signaling in vascular biology. *J Clin Invest* 100:1-5, 1997.
319. Brown MC, Turner CE. Characterization of paxillin LIM domain-associated serine threonine kinases: activation by angiotensin II in vascular smooth muscle cells. *J Cell Biochem* 76:99-108, 1999.

320. Liaw L, Skinner MP, Raines EW, Ross R, Cheresch DA, Schwartz SM, Giachelli CM. The adhesive and migratory effects of osteopontin are mediated via distinct cell surface integrins. Role of alpha v beta 3 in smooth muscle cell migration to osteopontin in vitro. *J Clin Invest* 95:713-724, 1995.
321. Wiener J, Lombardi DM, Su JE, Schwartz SM. Immunohistochemical and molecular characterization of the differential response of the rat mesenteric microvasculature to angiotensin-II infusion. *J Vasc Res* 33:195-208, 1996.
322. Hedin U, Thyberg J, Roy J, Dumitrescu A, Tran PK. Role of tyrosine kinases in extracellular matrix-mediated modulation of arterial smooth muscle cell phenotype. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 17:1977-1984, 1997.
323. Wilson E, Sudhir K, Ives HE. Mechanical strain of rat vascular smooth muscle cells is sensed by specific extracellular matrix/integrin interactions. *J Clin Invest* 96:2364-2372, 1995.
324. Mercurius KO, Morla AO. Inhibition of vascular smooth muscle cell growth by inhibition of fibronectin matrix assembly. *Circ Res* 82:548-556, 1998.
325. Magnusson MK, Mosher DF. Fibronectin: structure, assembly, and cardiovascular implications. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 18:1363-1370, 1998.
326. Ling S, Dai A, Ma YH, Wilson E, Chatterjee K, Ives HE, Sudhir K. Matrix-dependent gene expression of egr-1 and PDGF A regulate angiotensin II-induced proliferation in human vascular smooth muscle cells. *Hypertension* 34:1141-1146, 1999.
327. Bilato C, Curto KA, Monticone RE, Pauly RR, White AJ, Crow MT. The inhibition of vascular smooth muscle cell migration by peptide and antibody antagonists of the $\alpha_v\beta_3$ integrin complex is reversed by activated calcium/calmodulin-dependent protein kinase II. *J Clin Invest* 100:693-704, 1997.
328. Wu X, Mogford JE, Platts SH, Davis GE, Meininger GA, Davis MJ. Modulation of calcium current in arteriolar smooth muscle by $\alpha_v\beta_3$ and $\alpha_5\beta_1$ integrin ligands. *J Cell Biol* 143:241-252, 1998.
329. Schnapp LM, Goswami S, Rienzi N, Koteliansky VE, Gotwals P, Schachter EN. Integrins inhibit angiotensin II-induced contraction in rat aortic rings. *Regul Pept* 77:177-183, 1998.
330. Mogford JE, Davis GE, Platts SH, Meininger GA. Vascular smooth muscle $\alpha_v\beta_3$ integrin mediates arteriolar vasodilation in response to RGD peptides. *Circ Res* 79:821-826, 1996.

331. Mogford JE, Davis GE, Meininger GA. RGDN peptide interaction with endothelial $\alpha_5\beta_1$ integrin causes sustained endothelin-dependent vasoconstriction of rat skeletal muscle arterioles. *J Clin Invest* 100:1647-1653, 1997.
332. Gadeau AP, Campan M, Millet D, Candresse T, Desgranges C. Osteopontin overexpression is associated with arterial smooth muscle cell proliferation in vitro. *Arterioscler Thromb* 13:120-125, 1993.
333. Bezie Y, Lacolley P, Laurent S, Gabella G. Connection of smooth muscle cells to elastic lamellae in aorta of spontaneously hypertensive rats. *Hypertension* 32:166-169, 1998.
334. Daniel-Lamazière JM, Lacolley P, Bezie Y, Challande P, Laurent S. Interactions cellule-matrice et propriétés élastiques des gros troncs artériels. *Médecine/Sciences* 13:799-808, 1997.
335. Chiquet M. Regulation of extracellular matrix gene expression by mechanical stress. *Matrix Biol* 18:417-426, 1999.
336. Leung DY, Glagov S, Mathews MB. Cyclic stretching stimulates synthesis of matrix components by arterial smooth muscle cells in vitro. *Science* 191:475-477, 1976.
337. Tyagi SC. Physiology and homeostasis of extracellular matrix: cardiovascular adaptation and remodeling. *Pathophysiology* 7:177-182, 2000.
338. Hou G, Mulholland D, Gronska MA, Bendeck MP. Type VIII collagen stimulates smooth muscle cell migration and matrix metalloproteinase synthesis after arterial injury. *Am J Pathol* 156:467-476, 2000.
339. Bendeck MP, Irvin C, Reidy M, Smith L, Mulholland D, Horton M, Giachelli CM. Smooth muscle cell matrix metalloproteinase production is stimulated via $\alpha_v\beta_3$ integrin. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 20:1467-1472, 2000.
340. Jian B, Jones PL, Li Q, Mohler ER, III, Schoen FJ, Levy RJ. Matrix metalloproteinase-2 is associated with tenascin-C in calcific aortic stenosis. *Am J Pathol* 159:321-327, 2001.
341. Faull RJ, Kovach NL, Harlan JM, Ginsberg MH. Affinity modulation of integrin $\alpha_5\beta_1$: regulation of the functional response by soluble fibronectin. *J Cell Biol* 121:155-162, 1993.
342. Byzova TV, Rabbani R, D'Souza SE, Plow EF. Role of integrin $\alpha_v\beta_3$ in vascular biology. *Thromb Haemost* 80:726-734, 1998.

343. DiPersio CM, Trevithick JE, Hynes RO. Functional comparison of the $\alpha 3A$ and $\alpha 3B$ cytoplasmic domain variants of the chicken $\alpha 3$ integrin subunit. *Exp Cell Res* 268:45-60, 2001.
344. Retta SF, Balzac F, Ferraris P, Belkin AM, Fassler R, Humphries MJ, De Leo G, Silengo L, Tarone G. $\beta 1$ -integrin cytoplasmic subdomains involved in dominant negative function. *Mol Biol Cell* 9:715-731, 1998.
345. Pankov R, Cukierman E, Katz BZ, Matsumoto K, Lin DC, Lin S, Hahn C, Yamada KM. Integrin dynamics and matrix assembly: tensin-dependent translocation of $\alpha 5\beta 1$ integrins promotes early fibronectin fibrillogenesis. *J Cell Biol* 148:1075-1090, 2000.
346. Jones PL, Crack J, Rabinovitch M. Regulation of tenascin-C, a vascular smooth muscle cell survival factor that interacts with the $\alpha v\beta 3$ integrin to promote epidermal growth factor receptor phosphorylation and growth. *J Cell Biol* 139:279-293, 1997.
347. Barillari G, Albonici L, Incerpi S, Bogetto L, Pistrutto G, Volpi A, Ensoli B, Manzari V. Inflammatory cytokines stimulate vascular smooth muscle cells locomotion and growth by enhancing $\alpha 5\beta 1$ integrin expression and function. *Atherosclerosis* 154:377-385, 2001.
348. Doi M, Shichiri M, Yoshida M, Marumo F, Hirata Y. Suppression of integrin $\alpha(v)$ expression by endothelin-1 in vascular smooth muscle cells. *Hypertens Res* 23:643-649, 2000.
349. Yan L, Moses MA, Huang S, Ingber DE. Adhesion-dependent control of matrix metalloproteinase-2 activation in human capillary endothelial cells. *J Cell Sci* 113:3979-3987, 2000.
350. Bendeck MP, Nakada MT. The $\beta 3$ integrin antagonist m7E3 reduces matrix metalloproteinase activity and smooth muscle cell migration. *J Vasc Res* 38:590-599, 2001.
351. Nakamura T, Ruiz-Lozano P, Lindner V, Yabe D, Taniwaki M, Furukawa Y, Kobuke K, Tashiro K, Lu Z, Andon NL, Schaub R, Matsumori A, Sasayama S, Chien KR, Honjo T. DANCE, a novel secreted RGD protein expressed in developing, atherosclerotic, and balloon-injured arteries. *J Biol Chem* 274:22476-22483, 1999.
352. Horwitz AR, Parsons JT. Cell migration--movin' on. *Science* 286:1102-1103, 1999.
353. Schoenwaelder SM, Burridge K. Bidirectional signaling between the cytoskeleton and integrins. *Curr Opin Cell Biol* 11:274-286, 1999.

354. Humphries MJ. Integrin structure. *Biochem Soc Trans* 28:311-339, 2000.
355. Mould AP, Akiyama SK, Humphries MJ. Regulation of integrin $\alpha 5\beta 1$ -fibronectin interactions by divalent cations. Evidence for distinct classes of binding sites for Mn^{2+} , Mg^{2+} , and Ca^{2+} . *J Biol Chem* 270:26270-26277, 1995.
356. Shyy JY, Chien S. Role of integrins in cellular responses to mechanical stress and adhesion. *Curr Opin Cell Biol* 9:707-713, 1997.
357. Turley EA. Extracellular matrix remodeling: multiple paradigms in vascular disease. *Circ Res* 88:2-4, 2001.
358. Yee KO, Schwartz SM. Why atherosclerotic vessels narrow: the fibrin hypothesis. *Thromb Haemost* 82:762-771, 1999.
359. Lee RT, Berditchevski F, Cheng GC, Hemler ME. Integrin-mediated collagen matrix reorganization by cultured human vascular smooth muscle cells. *Circ Res* 76:209-214, 1995.
360. Gotwals PJ, Chi-Rosso G, Lindner V, Yang J, Ling L, Fawell SE, Koteliansky VE. The $\alpha 1\beta 1$ integrin is expressed during neointima formation in rat arteries and mediates collagen matrix reorganization. *J Clin Invest* 97:2469-2477, 1996.
361. Corbett SA, Schwarzbauer JE. $\beta 3$ integrin activation improves $\alpha v\beta 3$ -mediated retraction of fibrin matrices. *J Surg Res* 83:27-31, 1999.
362. Bishop GG, McPherson JA, Sanders JM, Hesselbacher SE, Feldman MJ, McNamara CA, Gimple LW, Powers ER, Mousa SA, Sarembock IJ. Selective $\alpha v\beta 3$ -receptor blockade reduces macrophage infiltration and restenosis after balloon angioplasty in the atherosclerotic rabbit. *Circulation* 103:1906-1911, 2001.
363. Neves MF, Viridis A, Schiffrin EL. Resistance artery mechanics and composition in angiotensin II-infused rats: effects of aldosterone antagonism. *J Hypertens* 21:189-198, 2003.
364. El Mabrouk M, Touyz RM, Schiffrin EL. Differential ANG II-induced growth activation pathways in mesenteric artery smooth muscle cells from SHR. *Am J Physiol* 281:H30-H39, 2001.
365. Li X, Shams M, Zhu J, Khalig A, Wilkes M, Whittle M, Barnes N, Ahmed A. Cellular localization of AT1 receptor mRNA and protein in normal placenta and its reduced expression in intrauterine growth restriction. Angiotensin II stimulates the release of vasorelaxants. *J Clin Invest* 101:442-454, 1998.

366. Touyz RM, He G, Wu XH, Park JB, Mabrouk ME, Schiffrin EL. Src is an important mediator of extracellular signal-regulated kinase 1/2-dependent growth signaling by angiotensin II in smooth muscle cells from resistance arteries of hypertensive patients. *Hypertension* 38:56-64, 2001.
367. Knowles HJ, Tian YM, Mole DR, Harris AL. Novel mechanism of action for hydralazine: induction of hypoxia-inducible factor-1a, vascular endothelial growth factor, and angiogenesis by inhibition of prolyl hydroxylases. *Circ Res* 95:162-169, 2004.
368. Li JS, Schiffrin EL. Effect of chronic treatment of adult spontaneously hypertensive rats with an endothelin receptor antagonist. *Hypertension* 25:495-500, 1995.
369. Sabri A, Levy BI, Poitevin P, Caputo L, Faggin E, Marotte F, Rappaport L, Samuel JL. Differential roles of AT₁ and AT₂ receptor subtypes in vascular trophic and phenotypic changes in response to stimulation with angiotensin II. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 17:257-264, 1997.
370. Li JS, Sharifi AM, Schiffrin EL. Effect of AT₁ angiotensin-receptor blockade on structure and function of small arteries in SHR. *J Cardiovasc Pharmacol* 30:75-83, 1997.
371. Cao Z, Dean R, Wu L, Casley D, Cooper ME. Role of angiotensin receptor subtypes in mesenteric vascular proliferation and hypertrophy. *Hypertension* 34:408-414, 1999.
372. Diep QN, Amiri F, Touyz RM, Cohn JS, Endemann D, Neves MF, Schiffrin EL. PPARalpha activator effects on Ang II-induced vascular oxidative stress and inflammation. *Hypertension* 40:866-871, 2002.
373. Schiffrin EL, Hayoz D. How to assess vascular remodelling in small and medium-sized muscular arteries in humans. *J Hypertens* 15:571-584, 1997.
374. Wang DH, Du Y, Yao A. Regulation of the gene-encoding angiotensin II receptor in vascular tissue. *Microcirculation* 3:237-239, 1996.
375. Intengan HD, Schiffrin EL. Structure and mechanical properties of resistance arteries in hypertension: role of adhesion molecules and extracellular matrix determinants. *Hypertension* 36:312-318, 2000.
376. Kato H, Suzuki H, Tajima S, Ogata Y, Tominaga T, Sato A, Saruta T. Angiotensin II stimulates collagen synthesis in cultured vascular smooth muscle cells. *J Hypertens* 9:17-22, 1991.

377. Nolly H, Carretero OA, Scicli G, Madeddu P, Scicli AG. A kallikrein-like enzyme in blood vessels of one-kidney, one clip hypertensive rats. *Hypertension* 16:436-440, 1990.
378. Rudic RD, Shesely EG, Maeda N, Smithies O, Segal SS, Sessa WC. Direct evidence for the importance of endothelium-derived nitric oxide in vascular remodeling. *J Clin Invest* 101:731-736, 1998.
379. Fukada SY, Tirapelli CR, de Godoy MA, de Oliveira AM. Mechanisms underlying the endothelium-independent relaxation induced by angiotensin II in rat aorta. *J Cardiovasc Pharmacol* 45:136-143, 2005.
380. Aartsen WM, Hilgers RH, Schiffers PM, Daemen MJ, De Mey JG, Smits JF. Changes in vascular distensibility during angiotensin-converting enzyme inhibition involve bradykinin type 2 receptors. *J Vasc Res* 41:18-27, 2004.
381. Toschi E, Barillari G, Sgadari C, Bacigalupo I, Cereseto A, Carlei D, Palladino C, Zietz C, Leone P, Sturzl M, Butto S, Cafaro A, Monini P, Ensoli B. Activation of matrix-metalloproteinase-2 and membrane-type-1-matrix-metalloproteinase in endothelial cells and induction of vascular permeability in vivo by human immunodeficiency virus-1 Tat protein and basic fibroblast growth factor. *Mol Biol Cell* 12:2934-2946, 2001.
382. Robert V, Besse S, Sabri A, Silvestre JS, Assayag P, Nguyen VT, Swynghedauw B, Delcayre C. Differential regulation of matrix metalloproteinases associated with aging and hypertension in the rat heart. *Lab Invest* 76:729-738, 1997.
383. Rizzoni D, Porteri E, De Ciuceis C, Sleiman I, Rodella L, Rezzani R, Paiardi S, Bianchi R, Ruggeri G, Boari GE, Muiesan ML, Salvetti M, Zani F, Miclini M, Rosei EA. Effect of treatment with candesartan or enalapril on subcutaneous small artery structure in hypertensive patients with noninsulin-dependent diabetes mellitus. *Hypertension* 45:659-665, 2005.
384. Berk BC. Vascular smooth muscle growth: autocrine growth mechanisms. *Physiol Rev* 81:999-1030, 2001.
385. Owens GK. Role of mechanical strain in regulation of differentiation of vascular smooth muscle cells. *Circ Res* 79:1054-1055, 1996.
386. Kohno M, Ohmori K, Nozaki S, Mizushige K, Yasunari K, Kano H, Minami M, Yoshikawa J. Effects of valsartan on angiotensin II-induced migration of human coronary artery smooth muscle cells. *Hypertens Res* 23:677-681, 2000.

387. Kawano H, Cody RJ, Graf K, Goetze S, Kawano Y, Schnee J, Law RE, Hsueh WA. Angiotensin II enhances integrin and α -actinin expression in adult rat cardiac fibroblasts. *Hypertension* 35:273-279, 2000.
388. Pickering JG, Chow LH, Li S, Rogers KA, Rocnik EF, Zhong R, Chan BM. α 5b1 integrin expression and luminal edge fibronectin matrix assembly by smooth muscle cells after arterial injury. *Am J Pathol* 156:453-465, 2000.
389. Pytela R, Pierschbacher MD, Ruoslahti E. Identification and isolation of a 140 kd cell surface glycoprotein with properties expected of a fibronectin receptor. *Cell* 40:191-198, 1985.
390. Pierschbacher MD, Ruoslahti E. Variants of the cell recognition site of fibronectin that retain attachment-promoting activity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 81:5985-5988, 1984.
391. Fogerty FJ, Akiyama SK, Yamada KM, Mosher DF. Inhibition of binding of fibronectin to matrix assembly sites by anti-integrin ($\alpha_5\beta_1$) antibodies. *J Cell Biol* 111:699-708, 1990.
392. Wu C, Bauer JS, Juliano RL, McDonald JA. The α 5b1 integrin fibronectin receptor, but not the α 5 cytoplasmic domain, functions in an early and essential step in fibronectin matrix assembly. *J Biol Chem* 268:21883-21888, 1993.
393. Chassagne C, Adamy C, Ratajczak P, Gingras B, Teiger E, Planus E, Oliviero P, Rappaport L, Samuel JL, Meloche S. Angiotensin II AT₂ receptor inhibits smooth muscle cell migration via fibronectin cell production and binding. *Am J Physiol* 282:C654-C664, 2002.
394. Thibault G, Lacombe MJ, Schnapp LM, Lacasse A, Bouzeghrane F, Lapalme G. Upregulation of $\alpha_8\beta_1$ -integrin in cardiac fibroblast by angiotensin II and transforming growth factor- β 1. *Am J Physiol* 281:C1457-C1467, 2001.
395. Bouzeghrane F, Mercure C, Reudelhuber TL, Thibault G. $\alpha_8\beta_1$ integrin is upregulated in myofibroblasts of fibrotic and scarring myocardium. *J Mol Cell Cardiol* 36:343-353, 2004.
396. Zargham R, Thibault G. $\alpha_8\beta_1$ Integrin expression in the rat carotid artery: involvement in smooth muscle cell migration and neointima formation. *Cardiovasc Res* 65:813-822, 2005.
397. Zargham R, Thibault G. RNA interference targeting α_8 integrin sheds light on the dichotomy of vascular smooth muscle cell migration and proliferation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 25:e-49, 2005.

398. Moiseeva EP. Adhesion receptors of vascular smooth muscle cells and their functions. *Cardiovasc Res* 52:372-386, 2001.
399. Sajid M, Stouffer GA. The role of $\alpha_v\beta_3$ integrins in vascular healing. *Thromb Haemost* 87:187-193, 2002.
400. Liaw L, Almeida M, Hart CE, Schwartz SM, Giachelli CM. Osteopontin promotes vascular cell adhesion and spreading and is chemotactic for smooth muscle cells in vitro. *Circ Res* 74:214-224, 1994.
401. Collins AR, Schnee J, Wang W, Kim S, Fishbein MC, Bruemmer D, Law RE, Nicholas S, Ross RS, Hsueh WA. Osteopontin modulates angiotensin II-induced fibrosis in the intact murine heart. *J Am Coll Cardiol* 43:1698-1705, 2004.
402. deBlois D, Lombardi DM, Su EJ, Clowes AW, Schwartz SM, Giachelli CM. Angiotensin II induction of osteopontin expression and DNA replication in rat arteries. *Hypertension* 28:1055-1063, 1996.
403. Rittling SR, Denhardt DT. Osteopontin function in pathology: lessons from osteopontin-deficient mice. *Exp Nephrol* 7:103-113, 1999.
404. Hedin U, Bottger BA, Forsberg E, Johansson S, Thyberg J. Diverse effects of fibronectin and laminin on phenotypic properties of cultured arterial smooth muscle cells. *J Cell Biol* 107:307-319, 1988.
405. Holmgren A, Pantev E, Erlinge D, Edvinsson L. Inhibition of angiotensin II-induced contraction by losartan in human coronary arteries. *J Cardiovasc Pharmacol* 32:662-664, 1998.
406. Gilles R, Vingerhoedt N, Howes J, Griffin M, Howes LG. Increase in systemic blood pressure during intra-arterial PD123319 infusion: evidence for functional expression of angiotensin type 2 receptors in normal volunteers. *Blood Press* 13:110-114, 2004.
407. Phoon S, Howes LG. Forearm vasodilator response to angiotensin II in elderly women receiving candesartan: role of AT_2 -receptors. *J Renin Angiotensin Aldosterone Syst* 3:36-39, 2002.
408. Morimoto S, Yamamoto I, Uchida K, Funatsu T, Fujimura A, Honjo A, Takeda R, Kigoshi T. Hemodynamic effects of [Sar1, Ile8] AII, an angiotensin II analog, in the renin subgroups of essential hypertension. *Cardiology* 67:219-229, 1981.

409. Gigante B, Piras O, De Paolis P, Porcellini A, Natale A, Volpe M. Role of the angiotensin II AT₂-subtype receptors in the blood pressure-lowering effect of losartan in salt-restricted rats. *J Hypertens* 16:2039-2043, 1998.

Annexe A

Tableau 1 : Tableau récapitulatif des différentes composantes de la matrice extracellulaire.

Composantes de la MEC	Contrôle	Ang II	Ang II + Los	Ang II + Sar-Ile	Ang II + Hyd
Aorte					
Collagène type I	12.1 ± 3.7	25.9 ± 4.2 [¶]	10.9 ± 2.4 ^{//}	14.2 ± 3.6 [#]	23.8 ± 4.2 ^{¶∞}
Fibronectine	3.1 ± 1.8	18.7 ± 3.5 [¶]	6.5 ± 3.2 [#]	27.7 ± 5.8 ^{//**}	21.6 ± 4.9 ^{§•}
Sous-unité de l'intégrine α ₁	10.6 ± 1.4	6.6 ± 1.3	24.1 ± 1.5 ^{***}	3.6 ± 1.3	7.2 ± 1.3
Sous-unité de l'intégrine α ₅	4.7 ± 0.5	6.8 ± 0.6 [¶]	9.6 ± 0.6 ^{**}	1.5 ± 0.5 ^{†‡§}	2.3 ± 0.6 ^{†‡¶}
Sous-unité de l'intégrine α ₈	10.4 ± 0.9	18.4 ± 1.0 [*]	6.3 ± 0.9 [†]	3.7 ± 0.8 ^{†§}	6.3 ± 1.0 [†]
Sous-unité de l'intégrine β ₁	5.2 ± 0.6	14.6 ± 0.8 [*]	3.7 ± 0.6 [†]	4.1 ± 0.7 [†]	3.1 ± 0.6 [†]
Sous-unité de l'intégrine β ₃	1.7 ± 0.6	7.3 ± 0.7 [§]	4.1 ± 0.6 [#]	3.0 ± 0.5 ^{//}	0.7 ± 0.5 [†]
Ostéopontine	0.2 ± 0.4	7.3 ± 0.8 [*]	2.8 ± 0.5 ^{†¶}	0.2 ± 0.5 ^{†∞}	0.6 ± 0.6 ^{†∞}
Artères mésothériques					
Collagène type I (x10 ⁻⁷)	41.2 ± 7.8	51.9 ± 1.5	38.4 ± 4.2	12.8 ± 5.1 ^{¶*}	29.7 ± 6.8
Élastine	63.9 ± 3.2	44.1 ± 3.6 [§]	56.4 ± 2.0 [#]	38.6 ± 2.8 ^{•//}	44.3 ± 7.4
Collagène / élastine (x10 ⁻⁸)	6.4 ± 1.1	12.0 ± 1.3 [¶]	6.8 ± 7.8 [#]	3.5 ± 1.7 ^{//}	7.0 ± 1.5 [#]
Fibronectine (Figure 3)	N	+	N	++++	++
TIMP-2 (Figure 5)	+	++++	-	+	+

* P<0.001 vs. Contrôle; † P<0.001 vs. Ang II; ‡ P<0.001 vs. Ang II + Los; § P<0.01 vs. Contrôle; // P<0.01 vs. Ang II; ¶ P<0.05 vs. Contrôle; # P<0.05 vs. Ang II; ∞ P<0.05 vs. Ang II + Los; • P<0.01 vs. Ang II + Los; ** P<0.001 vs. Ang II + Los; *** P<0.001 vs. tous les groupes. Les valeurs sont exprimées en intensité relative/aire(Pixels)



