

Université de Montréal

**Étude de la Modulation de l'Activité du Système Nerveux Sympathique
dans les Maladies Cardio-Vasculaires:
Rôle du Système Rénine Angiotensine et du Monoxyde d'Azote.**

Par

Annik K.-Laflamme

**Département de Pharmacologie
Faculté de Médecine**

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

Juillet, 2003

© Annik K.-Laflamme, 2003



W
4
U58
2005
v.077

Direction des bibliothèques

AVIS

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

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

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

NOTICE

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

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

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

Université de Montréal
Faculté des études supérieures

Cette thèse intitulée :

**Étude de la Modulation de l'Activité du Système Nerveux Sympathique
dans les Maladies Cardio-Vasculaires :
Rôle du Système Rénine Angiotensine et du Monoxyde d'Azote.**

Présentée par :

Annik K.-Laflamme

a été évaluée par un jury composé des personnes suivantes :

Dr André De Léan président du jury
Dr Jacques de Champlain directeur de recherche
Dr René Cardinal codirecteur de recherche
Dr Denis de Blois membre
Dr Richard Larivière examinateur externe
Dr Réginald Nadeau représentant du doyen

Thèse acceptée le : _____

RÉSUMÉ

L'objectif de ce projet de recherche est de caractériser les fonctions du système nerveux sympathique dans des conditions physiologiques et dans différents modèles de maladies cardiovasculaires chez le rat (hypertension génétique (SHR), hypertension induite par l'administration chronique de LNAME, hypertension DOCA-sel). L'étude *in vivo* et *in vitro* de l'interaction des mécanismes de transduction sympathique avec d'autres systèmes humoraux (rénine-angiotensine, monoxyde d'azote) fournira une meilleure compréhension des altérations fonctionnelles accompagnant le développement de l'hypertension et des complications cardiovasculaires associées. Nous proposons d'étudier l'effet de l'inhibition chronique du système rénine-angiotensine avec l'énalaprilat, un inhibiteur de l'enzyme de conversion, et le losartan, un antagoniste des récepteurs AT₁, sur les fonctions sympathiques basales et réflexes chez l'animal éveillé, sur l'intégrité de la voie de signalisation β -adrénergique dans des préparations membranaires cardiaques (affinité et sensibilité des récepteurs, activité de l'adénylyl cyclase) ainsi que sur la réactivité vasculaire des artères de résistances isolées et perfusées.

Nous avons démontré chez les rats génétiquement hypertendus que l'effet antihypertenseur du losartan et de l'énalaprilat était caractérisé par l'atténuation de la réactivité réflexe sympathique lors d'une hypotension induite par l'infusion de nitroprusside, par l'inhibition de l'effet facilitateur de l'angiotensine II exogène sur la libération de noradrénaline par les oreillettes isolées et par l'augmentation de l'affinité des récepteurs β -adrénergiques cardiaques. Dans le modèle d'hypertension induit par le LNAME nous avons caractérisé une augmentation de la pression artérielle temps-dépendante, une augmentation des taux plasmatiques d'adrénaline ainsi qu'une altération de la réactivité vasculaire, tandis que le système β -adrénergique-adénylyl cyclase cardiaque ne semblait pas modifié. Pour la première fois, la participation du tonus médullo-surrénalien dans cette hypertension était suggérée. L'action hypotensive du losartan et de l'énalaprilat accompagnée de la régression des poids cardiaques dans l'hypertension génétique et LNAME suggère une participation importante du système rénine-angiotensine dans le maintien de l'hypertension et le remodelage cardiaque. Le traitement chronique avec le LNAME dans le modèle d'hypertension DOCA-sel, connu pour le développement d'une hypertrophie cardiaque et rénale, a réduit les poids des coeurs et des reins de façon significative. Ces études nous suggéraient donc que le monoxyde d'azote ou ses métabolites oxydatifs pourraient participer dans le mécanisme de l'hypertrophie cardiaque et rénale. Les modèles d'hypertension LNAME, DOCA-sel et DOCA-sel-LNAME étaient tous associés à une réactivité vasculaire modifiée, i.e. une hyperréactivité endothélium-dépendante à la phényléphrine et

une vasorelaxation à l'acétylcholine réduite. Nous avons aussi caractérisé le rôle du système nerveux sympathique dans l'effet hypotenseur aigu de la mélatonine chez le SHR. L'administration intraveineuse de mélatonine produit une baisse graduelle de la pression artérielle seulement chez le rat hypertendu et ceci était caractérisé par une diminution des catécholamines plasmatiques alors que la réactivité réflexe sympathique lors d'une hypotension induite par l'infusion de nitroprusside était similaire à celle des rats normotendus, et la mélatonine n'a pas altéré la libération de noradrénaline par les oreillettes isolées. Ainsi, l'action hypotensive de cet agent semble liée à une inhibition du tonus basal sympatho-adrénale et possiblement une inhibition de la formation d'inositol phosphates induite par la phényléphrine dans les cellules musculaires lisses vasculaires. La mélatonine est un antioxydant puissant et un neutralisant de radicaux libres efficace et nous avons démontré que la génération d'anion superoxyde induit une augmentation de la formation d'inositol phosphates chez le SHR et cet effet est atténué autant pas la superoxyde dismutase que la mélatonine.

En conclusion, des évidences expérimentales nous indiquent l'existence d'interactions pré- et postsynaptiques du système sympathique avec le système rénine-angiotensine et le monoxyde d'azote. De telles interactions pourraient être d'une importance majeure dans la modulation de la sensibilité des cellules effectrices à une activation sympathique. Une identification plus précise des altérations du système sympathique et une meilleure compréhension de la modulation des fonctions pré- et postsynaptiques s'avèrent utile dans le développement d'approches thérapeutiques visant à réduire les risques et augmenter la survie des patients.

Mots clés: hypertension, expérimentale; système nerveux autonome, sympathique;
Système rénine-angiotensine; voie β -adrénergique; adénylyl cyclase;
Monoxyde d'azote, mélatonine; losartan; énalaprilat.

SUMMARY

The aim of the research project is to characterize the mechanisms regulating the sympathetic functions under physiological conditions and in different experimental model of cardiovascular disease. The experimental models studied were the spontaneously hypertensive rat (SHR), the model of hypertension induced by chronic administration of LNAME and the DOCA-salt hypertension model in the rat. The *in vivo* and *in vitro* investigations of the interaction of sympathetic transduction mechanisms with other hormonal systems (renin-angiotensin, nitric oxide) will provide better understanding of cellular dysfunctions underlying the development of hypertension and its associated cardiovascular complications. We wanted to evaluate the basal and reflex sympathetic functions in conscious animals, the cardiac β -adrenergic signal transduction pathway membrane preparations (β -adrenergic receptors and adenylyl cyclase system characteristics), the vascular reactivity of resistance arteries and the in various experimental models in relation to the maintenance of hypertension and the development of cardiac hypertrophy. These studies were undertaken in the absence or the presence of chronic treatments with blockers of the renin-angiotensin system (RAS), a specific non peptide angiotensin II receptor antagonist (losartan) or an angiotensin converting enzyme inhibitor (enalaprilat). The use of angiotensin II inhibitors is helpful to clarify the effects of angiotensin II and to assess the influence of these treatments on presynaptic and postsynaptic sympathetic functions.

We have demonstrated in spontaneously hypertensive rats (SHR) an antihypertensive effect after chronic treatment with losartan or enalaprilat which was characterized by a normalization of the sympathetic hypereactivity to nitroprusside-induced hypotension, by the blockade of the presynaptic facilitatory effect of angiotensin II on noradrenaline release from isolated atria and by the increased cardiac β -adrenergic receptors binding affinity. In the model of hypertension induced by chronic administration of LNAME, we have characterized a time-dependent increase in systolic arterial pressure and elevated plasma epinephrine concentrations in association with an altered vascular reactivity. For the first time, the possible participation of the adrenal medulla was suggested by an increase in circulating epinephrine levels. This model of hypertension did not appear to be associated with a dysfunction of the cardiac β -adrenergic-adenylyl cyclase pathway. Although this model of hypertension was not associated with cardiac hypertrophy, the hypotensive action of both losartan and enalaprilat as well as the regression of heart size suggested an important participation of the RAS in this form of hypertension and in SHR. Chronic LNAME administration in DOCA-salt hypertension, known for the development of cardiac and kidney hypertrophy,

reduced significantly cardiac and kidney weights. These studies still suggest that nitric oxide or its oxidized metabolites could participate in the mechanism of cardiac and kidney hypertrophy in the DOCA-salt model of hypertension. LNAME, DOCA-salt and DOCA-LNAME hypertension were associated with an altered peripheral vascular reactivity, i.e. an endothelium-dependent enhanced reactivity to phenylephrine and a decreased vasorelaxation to acetylcholine and isoproterenol. We have also evaluated the role of the sympathetic nervous system in the acute effect of melatonin on blood pressure in conscious SHR and Wistar-Kyoto rats (WKY). Melatonin (10 mg/kg, iv) produced a sustained time-dependent decrease of mean arterial pressure and of plasma norepinephrine (NE) levels only in SHR. In cultured aortic vascular smooth muscle cells, the basal and phenylephrine induced inositol phosphates formations were greater in SHR, and the melatonin pretreatment dose-dependently attenuated the phenylephrine responses in cells from both WKY and SHR. Therefore the hypotensive action of melatonin appears to be associated with an inhibition of basal sympathoadrenal tone and could also be mediated partly by the blockade of postsynaptic α_1 -adrenergic receptor-induced inositol phosphates formation. Melatonin is one of the most potent antioxidant and a very efficient neutralizer of free radicals. We have demonstrated that superoxide anion radical generation induced an important increase of IPs formation in vascular smooth muscle cells and this effect was markedly and similarly attenuated by pretreatments with either superoxide dismutase or melatonin.

In conclusion, experimental evidences have indicated the existence of sympathetic pre- or postsynaptic interactions with the RAS and nitric oxide. Such interactions could be of major importance in the modulation of the sensitivity of effector cells to sympathetic activation. It thus appears that a more precise identification of sympathetic dysfunctions and a clearer understanding of the modulation of pre- and postsynaptic functions could help in providing more rational therapeutic approaches to reduce the risks in these patients and improve their survival.

Keywords: hypertension, experimental; autonomic, sympathetic nervous system; renin-angiotensin system; β -adrenergic pathway; adenylyl cyclase; nitric oxide, melatonin; losartan; enalaprilat.

TABLE DES MATIÈRES

MEMBRES DU JURY	ii
RÉSUMÉ	iii
SUMMARY	v
TABLE DES MATIÈRES	vii
LISTE DES FIGURES	x
LISTE DES TABLEAUX	xiii
REMERCIEMENTS	xvi
CHAPITRE I – INTRODUCTION ET REVUE DE LITTÉRATURE	1
1. MALADIES CARDIOVASCULAIRES ET HYPERTENSION	
ARTÉRIELLE; DONNÉES CLINIQUES	2
1.1. TRAITEMENT DE L’HYPERTENSION	4
2. PHYSIOLOGIE ET PHARMACOLOGIE DU SYSTÈME	
CARDIO-VASCULAIRE	9
2.1. FONCTION PHYSIOLOGIQUE DU SYSTÈME CARDIO-VASCULAIRE	10
2.2. CONTRACTILITÉ DU MUSCLE CARDIAQUE	11
2.2.1. <i>Organisation des cellules musculaires cardiaques</i>	13
2.2.2. <i>Couplage excitation-contraction</i>	16

2.3. MODULATION PAR LES SYSTÈMES NERVEUX ET HORMONAL DE LA FONCTION CARDIO-VASCULAIRE	20
2.3.1. <i>Système nerveux central et périphérique</i>	20
2.3.1.1. <i>Système nerveux autonome</i>	21
2.3.1.2. <i>Baroréflexe</i>	22
2.3.1.3. <i>Système β-adrénergique: fonctions, propriétés et effets physiologiques</i>	24
<i>Récepteurs</i>	28
<i>Protéines G</i>	29
<i>Adénylyl cyclase</i>	33
<i>Désensibilisation des récepteurs</i>	34
2.3.2. <i>Système rénine-angiotensine</i>	37
2.3.2.1. <i>Biosynthèse de l'angiotensine II et voie de signalisation</i>	37
2.3.3. <i>Interaction entre le SRA et SNS</i>	44
2.3.3.1. <i>Modulation du système nerveux autonome central</i>	46
2.3.3.2. <i>Modulation du système nerveux sympathique périphérique</i>	49
2.3.4. <i>Facteurs dérivés de l'endothélium</i>	53
2.3.4.1. <i>Monoxyde d'azote</i>	55
2.3.4.2. <i>Voie de signalisation des facteurs vasoactifs dérivés de l'endothélium</i>	61
CHAPITRE II – SOMMAIRE DES OBJECTIFS ET MÉTHODOLOGIES.....	65
CHAPITRE III – ARTICLE SCIENTIFIQUE	
EFFECTS OF RENIN-ANGIOTENSIN BLOCKADE ON SYMPATHETIC REACTIVITY AND β-ADRENERGIC PATHWAY IN SHR.	68
<i>Additional Figures and Unpublished Results</i>	102

CHAPITRE IV – ARTICLE SCIENTIFIQUE

**SYMPATHETIC FUNCTIONS IN L-NAME-INDUCED HYPERTENSION AND
MODULATION BY THE RENIN-ANGIOTENSIN SYSTEM.112**

CHAPITRE V – ARTICLE SCIENTIFIQUE

**ROLE OF NO AND ANGIOTENSIN II IN THE EARLY DEVELOPMENT OF
IMPAIRED ENDOTHELIAL FUNCTIONS AND CARDIAC HYPERTROPHY IN
DEOXYCORTICOSTERONE ACETATE-SALT HYPERTENSION.149**

CHAPITRE VI – ARTICLE SCIENTIFIQUE

**IMPAIRED BASAL SYMPATHETIC TONE AND α_1 -ADRENERGIC
RESPONSIVENESS IN ASSOCIATION WITH THE HYPOTENSIVE EFFECT OF
MELATONIN IN SPONTANEOUSLY HYPERTENSIVE RATS.....177**

CHAPITRE VII – DISCUSSION204

CHAPITRE VIII – CONCLUSION218

CHAPITRE IX – SOURCES BIBLIOGRAPHIQUES222

***Curriculum Vitae*235**

Liste des Figures

CHAPITRE I – *Introduction et revue de littérature*

Figure 1: Effet de la tension artérielle systolique et de la tension artérielle diastolique sur la mortalité coronarienne.	3
Figure 2: Ensemble des flux calciques dans les myocytes cardiaques.....	15
Figure 3: Interactions entre le système rénine-angiotensine et le système nerveux sympathique au niveau de la terminaison nerveuse.	50
Figure 4: Courbes dose-réponses avec la phényléphrine dans des lits vasculaires mésentériques dont l'endothélium est intact et prétraités avec de l'indométhacine.	59
Figure 5: Courbes dose-réponses avec l'acétylcholine dans des lits vasculaires mésentériques dont l'endothélium est intact, et prétraités avec de l'indométhacine.	60

CHAPITRE III - *Sympathetic Functions and Angiotensin Blockade*

Figure 1: Inhibition of dose-pressure response curves to either Ang I or Ang II in WKY and SHR untreated (control) and treated with losartan or enalaprilat.....	98
Figure 2: In vivo hypotensive responses induced by infusion of nitroprusside (50 µg/kg per minute, 5 minutes).	99
Figure 3: A. β_1 and β_2 -adrenoceptor relative density in left ventricular membrane preparations measured by the competition of ICYP (50 pmol/L) binding by the selective β_2 antagonist ICI 118,551. B. Proportions of β_1 and β_2 -adrenoceptors are expressed as percentage of total specific ICYP binding and represent the mean of values calculated for each rat.	100
Figure 4: Adenylyl cyclase activity assessed by measurement of cAMP formation in the presence of increasing concentrations of different agents in left ventricular membrane preparations from untreated WKY and SHR (control) and SHR treated with losartan or enalaprilat.	101
Figure 5: Systolic arterial blood pressure in WKY and SHR untreated and treated with losartan or enalaprilat.....	103
Figure 6: Typical Scatchard analysis of 125 I-cyanopindolol binding to left ventricular membrane preparations from WKY and SHR untreated or treated with losartan or enalaprilat.....	104
Figure 7: Typical blots showing levels of α -subunits of G proteins detected by immunoblot analysis in myocardial plasma membranes from WKY and SHR untreated (CTL) or treated with losartan (LOS) or enalaprilat (ENA).	105

Figure 8: Ratio of [³H]-inositol phosphates (IPP) to the [³H]-myoinositol incorporation in the phosphatidylinositol lipid pool (PLP) during stimulation with Ang II in the aorta from untreated WKY and SHR (control) and treated with losartan or enalaprilat. 109

Figure 9: Formation of inositol phosphates in aorta from WKY and SHR under control conditions and after chronic treatment with losartan or enalaprilat..... 110

CHAPITRE IV - Sympathetic Functions after Chronic NOS Inhibition

Figure 1. Time-courses of systolic blood pressure (SBP) in sham (SHAM, open symbols) and NG-nitro-L-arginine-methyl-ester (L-NAME)-treated rats (filled symbols) not treated further (control, CTL, circles) and treated with losartan (LOS, triangles) or enalaprilat (ENA, squares)..... 142

Figure 2. (a) Inhibition of angiotensin II-induced pressor responses after chronic losartan treatment (5 mg/kg per day) and (b) inhibition of angiotensin I-induced pressor response after chronic enalaprilat treatment (1 mg/kg per day), in sham-treated and and NG-nitro-L-arginine-methyl-ester (L-NAME)-treated hypertensive rats. 143

Figure 3. Basal plasma adrenaline levels measured at the end of the treatments in sham-treated and NG-nitro-L-arginine-methyl-ester (L-NAME)-treated rats not treated further (control), treated with losartan (LOS) and treated with enalaprilat (ENA)..... 144

Figure 4. Field-stimulated release of [³H]-noradrenaline from isolated atria in the absence or in the presence of angiotensin II (Ang II) and of bradykinin (BK) expressed as a percentage of basal level of stimulation-induced outflow of radioactivity (S1)..... 145

Figure 5. Adenylyl cyclase activity measured in terms of the production of cyclic AMP (cAMP) in the presence of (a) NaF and (b) forskolin in excess of baseline formation of cAMP (Δ) in left ventricular membranes from sham-treated (SHAM) and NG-nitro-L-arginine-methyl-ester (L-NAME)-treated control rats and rats treated with losartan and enalaprilat. 146

Figure 6. Typical blots showing levels of α -subunits of G proteins detected by immunoblot analysis in myocardial plasma membranes from sham-treated (SHAM) and NG-nitro-L-arginine-methyl-ester (L-NAME)-treated control rats (CTL) and from such rats treated with losartan (LOS) and with enalaprilat (ENA). 147

Figure 7. The postulated mechanisms of the modulation of β -adrenergic-adenylyl cyclase pathway activity by angiotensin II via type 1 (AT1) receptors are NO- and Gi-dependent negative modulatory control of formation of cAMP and a facilitative modulatory control of formation of cAMP. 148

CHAPITRE V - NOS inhibition in DOCA hypertension

Figure 1. Systolic blood pressure and body weight over a period of 12 days in control rats and experimental models of hypertension	170
Figure 2. (A) Heart and (B) kidney weights over a period of 12 days after the onset of the experimental models of hypertension	171
Figure 3. Photograph of representative (A) heart and (B) kidney taken from each experimental group on day 9.....	172
Figure 4. Systolic blood pressure after 9 days of the various treatments in control rats and experimental models of hypertension.....	173
Figure 5. Heart and kidney weights after 9 days of the various treatments in control rats and experimental models of hypertension.....	174
Figure 6. Contractile reactivity of isolated mesenteric arterial beds to phenylephrine, after 9 days of the various treatments in control rats and experimental models of hypertension	175
Figure 7. Acetylcholine and isoproterenol relaxation responses of isolated mesenteric arterial beds precontracted with phenylephrine, after 9 days of the various treatments in control rats and experimental models of hypertension.....	176

CHAPITRE VI - Attenuated Sympathetic Activity by Melatonin

Figure 1: Changes in mean arterial blood pressure (MAP) and in heart rate (HR) in WKY and SHR measured over a period of 30 min after vehicle or melatonin administration (10 or 20 mg/kg, intravenously).....	198
Figure 2: Plasma norepinephrine (NE) and epinephrine (EPI) levels in basal condition and at various times after melatonin administration (10 mg/kg, intravenously).....	199
Figure 3: Hemodynamic and catecholamines responses to nitroprusside-induced hypotension (50 µg/kg/min, intravenously, 5 min).	200
Figure 4: Field stimulated release of [3H]-norepinephrine (NE) from isolated atria in the absence or presence of melatonin.	201
Figure 5: Inositol phosphates (IP) production in VSMC pretreated or not with melatonin (Mel).....	202

Liste des Tableaux

CHAPITRE I – *Introduction et revue de littérature*

Tableau I. Interactions entre le système nerveux autonome central et périphérique et le système rénine angiotensine	39
---	----

CHAPITRE III - Sympathetic Functions and Angiotensin Blockade

Table 1. Systolic Arterial Pressure, Body Weight, Relative Ventricular Weights, and Plasma and Cardiac Catecholamine Levels of WKY and SHR Under Control Conditions and After Chronic Treatment With Losartan or Enalaprilat.	94
Table 2. MAP Response Curve Parameters to Ang I and Ang II and Plasma Concentrations of Losartan and EXP 3174 in Conscious WKY and SHR Under Control Conditions and After Chronic Treatment With Losartan or Enalaprilat	95
Table 3. Baseline MAP and Heart Rate in Conscious WKY and SHR Under Control Conditions and After Chronic Treatment With Losartan or Enalaprilat Before Reflex Activation of the Sympathetic System.	95
Table 4. Total Specific β -Adrenergic Receptors and β_1 - and β_2 -Subtype Parameters Measured From Displacement Curves of ICYP Binding by ICI 188,551 and β -Adrenergic Receptors Functional Coupling Measured From Displacement Curves of ICYP Binding by Isoproterenol in WKY and SHR Under Control Conditions and After Chronic Treatment With Losartan or Enalaprilat.	96
Table 5. Adenylyl Cyclase Pathway Activity and Sensitivity Evaluated by Dose-Response Curves of Camp-Induced Formation With Different Agonists in Left Ventricular Membrane Preparations from WKY and SHR Under Control Conditions and After Chronic Treatment with Losartan or Enalaprilat.	97
Table 6. Formation of inositol phosphates in aorta and in mesenteric arteries from WKY and SHR under control conditions and after chronic treatment with losartan or enalaprilat.	111

CHAPITRE IV - Sympathetic Functions after Chronic NOS Inhibition

Table 1. Haemodynamic parameters in normotensive rats treated with various doses of losartan or enalaprilat to determine the equipotent doses.	137
Table 2. Haemodynamic parameters, plasma and tissue catecholamines levels and cardiac weights in normotensive sham-treated (SHAM) and NG-nitro-L-arginine-methyl-ester (L-NAME)-hypertensive rats under control (CTL) conditions and after treatment with losartan (LOS) or enalaprilat (ENA).	138

Table 3. Characteristics of cardiac β -adrenergic receptors in normotensive sham-treated (SHAM) and hypertensive NG-nitro-L-arginine-methyl-ester (L-NAME)-treated rats under control (CTL) conditions and after treatment with losartan (LOS) or enalaprilat (ENA).....	139
Table 4. Cardiac β -adrenergic receptors subtypes in normotensive sham-treated (SHAM) and hypertensive NG-nitro-L-arginine-methyl-ester (L-NAME)-treated rats under control (CTL) conditions.....	140
Table 5. Adenylyl cyclase pathway activity evaluated in terms of cyclic AMP (cAMP)-induced formation with different agonists in left ventricular membrane preparations from sham (SHAM)-treated and NG-nitro-L-arginine-methyl-ester (L-NAME)-treated rats under control (CTL) conditions and after treatment with losartan (LOS) or enalaprilat (ENA).....	141

CHAPITRE V - NOS inhibition in DOCA hypertension

Table 1 Parameters of contraction and relaxation responses of isolated mesenteric arterial beds	168
Table 2. Parameters of contraction and relaxation responses of isolated mesenteric arterial beds in groups treated with losartan.....	169

CHAPITRE VI - Attenuated Sympathetic Activity by Melatonin

Table 1. Basal hemodynamic parameters in WKY and SHR.....	195
Table 2. Effect of melatonin on mean arterial pressure and heart rate in WKY and SHR	196
Table 3. Resting release (R1), fractional release during S1 (FR1), and total tissue radioactivity (TTR) values of [3H]-NE in isolated atria from WKY and SHR.....	197

Dédicace

À Carl, Enya et Fyona,

*Merci de votre patience infinie,
de votre support fidèle,
et, de votre amour.*

REMERCIEMENTS

Je désire témoigner de toute ma reconnaissance au docteur Jacques de Champlain et au docteur René Cardinal pour avoir co-dirigé cette thèse de doctorat. Je désire remercier très sincèrement docteur Jacques de Champlain pour m'avoir accueillie dans ses laboratoires de recherches, au département de physiologie de l'Université de Montréal, et au sein de son équipe remarquable. Les ressources académiques, scientifiques, et professionnelles qui ont permis l'accomplissement et l'achèvement des travaux ont toujours été généreusement disponibles. Je désire remercier particulièrement Jo-Anne Leguerrier, Diane Papin et Carole Champagne pour leur support technique et administratif, leur support moral et humain ainsi que leur nombreux conseils.

Je désire remercier les organismes de subventions qui m'ont supportée tout au long de cette thèse, soit le Fonds de Recherche en Santé du Québec (FRSQ), le Conseil de Recherche Médical du Canada (CRM), la Fondation des Maladies du Cœur du Québec (FMCQ), la Fondation des Maladies du Cœur du Canada (FMCC) et la Faculté des Études Supérieures (FES).

Je remercie également les organismes qui m'ont offert des prix de concours tel que la Société Québécoise d'Hypertension artérielle, la Société Canadienne d'Hypertension artérielle, la Faculté des Études supérieures, le Groupe de Recherche sur le Système Nerveux Autonome (GRSNA) et le département de pharmacologie – Journée de la recherche Gabriel Plaa.

« Les savants sont optimistes parce que leur passion leur donne des joies fréquentes en leur épargnant les chagrins ; ils ne désespèrent pas de ne jamais trouver la vérité et ils s'en consolent aisément puisqu'ils ne sont jamais privés du plaisir de la recherche. »

« La plupart d'entre eux restent jeunes de cœur. Peut-être n'ont-ils pas été aussi jeunes que d'autres, mais ils l'ont été plus longtemps. Leur naïveté même, qui éclate à tous les yeux, est un signe de jeunesse. C'est sans doute que le chagrin seul vieillit et leur passion n'engendre que des joies sans douleur. »

Henri Poincaré

(mathématicien)

1854-1912

Avant-Propos

L'approche que nous avons voulu respecter au cours du développement des projets de recherche inclut dans la présente thèse de doctorat avait pour objectif de rallier les phénomènes observés *in vivo* et les études biochimiques de la fonction cellulaire des voies de signalisation, afin de refléter notre créneau d'application scientifique et clinique.

Aussi, cette thèse fut construite sur la base scientifique de la complémentarité entre la pharmacologie et la physiologie, autant d'un point de vue de la direction sous laquelle cette thèse fut élaborée et la collaboration obtenue entre les départements de pharmacologie et de physiologie.

L'environnement et la spécialité du laboratoire d'accueil m'ont offert un cadre idéal afin de lier la recherche fondamentale et l'application physiologique et voir même clinique. Le fait d'avoir exploré la fonction cardio-vasculaire en étudiant *in vitro* l'aspect biochimique du contrôle de l'activité des myocytes par les systèmes neuro-humoraux, tout en observant *in vivo* l'intégration des différents systèmes, demeure à mon humble avis l'aspect précieux des travaux présentés dans le cadre de cette thèse.

De même, c'est ce que le Groupe de Recherche sur le Système Nerveux Autonome (GRSNA) permet en regroupant plusieurs disciplines et chercheur(e)s aux d'intérêts diversifiés.

CHAPITRE I

Introduction et Revue de Littérature

CHAPITRE I – Introduction et Revue de Littérature

1. Maladies cardiovasculaires et hypertension artérielle; données cliniques

Les maladies cardiovasculaires continuent d'être une des principales causes de morbidité et de mortalité dans le monde. Selon le Rapport sur la santé dans le monde 2002, publié par l'Organisation Mondiale de la Santé, (World Health Report 2002), les maladies cardiovasculaires ont causé plus de 16 millions de morts en 2000.

L'hypertension est associée aux maladies cardiovasculaires et peut être mortelle. En effet, les morts d'origine cardiovasculaires sont souvent associées à une tension artérielle mal maîtrisée. Dans l'étude mondiale sur le fardeau de la maladie réalisée en 2000 par l'Organisation Mondiale de la Santé (*Global Burden of Disease*), sur la contribution de 26 facteurs de risque, on a montré que l'hypertension était la principale cause de mortalité, autant dans les régions développées que dans les régions en voie de développement (Ezzati 2002). En effet, les morts d'origine cardiovasculaires sont associées à une tension artérielle mal maîtrisée dans 50 % des cas.

Au Canada, on estime que la prévalence de l'hypertension ajustée selon l'âge, chez les Canadiens âgés de 18 à 70 ans, se situait à 22 % (Joffres et al. 2001). Ces estimations se fondent sur les résultats des études épidémiologiques canadiennes « *Canadian Heart Health Surveys* » (CHHS). Les résultats de cet essai montrent que l'hypertension touche davantage les personnes âgées, soit 50 % des gens âgés de 65 ans ou plus sont hypertendus. Il existe donc un paradoxe dans l'hypertension: c'est une affection répandue, relativement facile à diagnostiquer. Pourtant, l'hypertension n'est adéquatement maîtrisée que dans 13 % des cas. Cette particularité représente un défi de taille dans le traitement de l'hypertension et de la maladie athéroscléreuse.

L'importance de la tension artérielle (TA) systolique en tant que facteur de risque de mortalité coronarienne est mise en relief par les résultats des études d'observation. Dans une analyse effectuée chez les 316 099 hommes de race blanche âgés de 35 à 57 ans ayant été évalués entre 1973 et 1975 aux fins de l'étude MRFIT (*Multiple Risk Factor Intervention Trial*), on a évalué l'influence de la TA et d'autres facteurs de risque sur la mort par coronaropathie lors d'un suivi médian de 12 ans (Neaton 1992). On a noté un gradient de risque marqué de la TA systolique pour chaque catégorie de TA diastolique. La TA systolique constituait donc un facteur prédictif plus puissant de mort par coronaropathie que la TA diastolique dans tous les groupes d'âge (Figure 1).

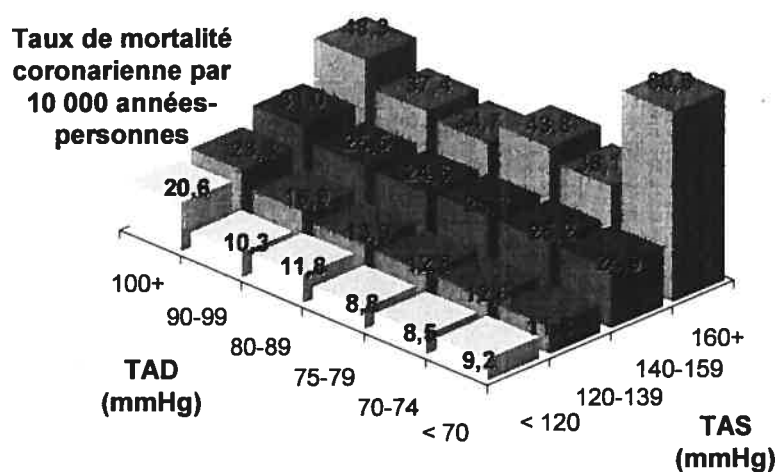


Figure 1: Effet de la tension artérielle systolique (TAS) et de la tension artérielle diastolique (TAD) sur la mortalité coronarienne. Sujets évalués dans le cadre de l'essai MRFIT (n=316 099 hommes âgés de 35 à 57 ans suivis pendant 12 ans en moyenne). D'après Neaton et coll. 1992.

Dans une autre étude d'observation réalisée en France auprès de 4714 hommes âgés de 52 ans en moyenne qui recevaient un traitement antihypertenseur, on a noté que la présence d'une TA systolique se situant entre 140 et 160 mmHg, correspondant à une « légère » augmentation de la TA systolique, était accompagnée d'une multiplication par 2 de la mortalité par maladie cardio-vasculaire ou coronaropathie ajustée en fonction de l'âge comparativement aux hommes dont l'hypertension était adéquatement maîtrisée (Benetos 2002).

Des enquêtes sur la santé menées à l'échelle nationale dans plusieurs pays ont permis de documenter les schémas de sensibilisation, de traitement et de maîtrise de l'hypertension. Les enquêtes pour les États-Unis, le Canada, l'Égypte et la Chine (Mulrow 1999) ainsi que l'Angleterre (Primatesta 2001) ont utilisé un seuil de maîtrise de l'hypertension de 140/90 mmHg. Les études ont été effectuées par un personnel bien formé et au moyen de protocoles standardisés; on y compte des études transversales menées à l'échelle nationale auprès de sujets sélectionnés au hasard. Les résultats démontrent que les pourcentages de traitement étaient de 25 à 50 % inférieurs aux pourcentages de sensibilisation. Les pourcentages de maîtrise de l'hypertension étaient plus de 2 fois plus faibles que les pourcentages de traitement. Dans chacun de ces pays, l'hypertension n'était pas maîtrisée chez plus de 50 % des patients hypertendus qui suivaient un traitement.

En général, les enquêtes menées en Europe et en Amérique du Nord ont montré qu'il y a place à amélioration lorsqu'il s'agit de maîtriser l'hypertension et les autres facteurs de risque.

1.1. Traitement de l'hypertension

L'étiologie et le traitement clinique de l'hypertension ont beaucoup évolué depuis les dernières décennies, sans compter le manque d'intérêt jadis à considérer cet état comme un facteur de risque cardio-vasculaire et les conceptions erronées. La première de celles-ci était le traitement par saignement ou par veno-section, qui

heureusement fut reconnu comme n'étant pas la meilleure approche ! La fin des années 1940 et 1950 marque le changement de l'approche au traitement de l'hypertension incluant la restriction sodique et aussi l'interruption du système nerveux sympathique avec ou sans adrénalectomie, mais à un certain prix. Néanmoins, ces expériences ont contribué au développement de l'approche et des traitements pharmacologiques bloquant le système nerveux sympathique. Les diurétiques, les bêta-bloqueurs et les antagonistes de canaux calciques furent alors introduits pour leur effets hypotenseurs, et plus récemment, les bloqueurs du système rénine-angiotensine. Aussi, les effets secondaires étaient mieux compris et contrôlés avec le développement de l'approche thérapeutique. De façon concomitante, la recherche sur les causes de l'hypertension devenait mieux définie pour déterminer qu'elles étaient multifactorielles et incluaient entre autres une réponse exagérée du système nerveux central et une implication rénale via par exemple un excès de sécrétion de la rénine.

Jusqu'à aujourd'hui, de nombreuses études ont été effectuées pour évaluer les effets des traitements antihypertenseurs au sein de diverses populations particulières, par exemple les patients atteints de maladies vasculaires, de diabète, de néphropathie, ou encore chez les personnes âgées. Dans des méta-analyses, on a comparé des traitements actifs à un placebo, et des traitements actifs entre eux. Différents antihypertenseurs s'offrent aux patients et les recommandations canadiennes pour le traitement de l'hypertension sont fondées sur des preuves fournies par les nombreuses études cliniques. Toutes les recommandations ont été cotées en fonction de la fiabilité des données et acceptées par le groupe de travail sur les recommandations fondées sur des preuves, qui est rattaché au Programme éducatif canadien sur l'hypertension (Khan 2004). Les principaux points d'intérêts de ces études sont les taux de morbidité et de mortalité cardio-vasculaires, mais aussi certains résultats pertinents tel que l'apparition de l'insuffisance rénale et les changements de la pression artérielle. Aussi, les études considérées sont des essais randomisés de traitements de première intention, composés de diurétiques, de bêta-bloquants, d'inhibiteurs de l'enzyme de

conversion de l'angiotensine (ECA), de bloqueurs de canaux calciques, d'alpha-bloquants, de médicaments à action centrale ou d'antagonistes des récepteurs de l'angiotensine (ARA).

Les recommandations canadiennes suggèrent que la maîtrise de la pression artérielle doit se faire dans une perspective globale visant la protection vasculaire des patients hypertendus (Khan 2004). Puisque l'hypertension joue un rôle important dans la progression de l'athérosclérose il est important de tenir compte des facteurs de risques présents et des affections concomitantes (c.-à-d. diabète, maladies cardiovasculaires, néphropathie). Aussi, il est recommandé de prescrire un traitement énergique visant l'atteinte de cibles tensionnelles et que pour atteindre les valeurs cibles, il est préférable d'associer différents médicaments de première intention plutôt que d'augmenter la dose ou de substituer continuellement les médicaments.

Les seuils de traitement et les cibles devraient être établis en fonction du risque global d'athérosclérose propre à chaque patient, de la présence de lésions dans les organes nobles et de maladies concomitantes, ainsi que de la pression artérielle systolique. La plupart des patients adultes auront besoin de plus d'un médicament pour atteindre la valeur cible. Selon les recommandations canadiennes, chez les adultes qui ne présentent pas d'indications contraignantes à l'égard d'autres médicaments, le traitement initial en monothérapie de première intention pour le traitement de l'hypertension diastolique, accompagnée ou non d'hypertension systolique, devrait se composer soit d'un diurétique thiazidique; un bêta-bloquant (chez les patients de moins de 60 ans), un inhibiteur de l'ECA (chez les patients non de race noire), un bloqueur de canaux calciques dihydropyridiniques à action prolongée ou un ARA. Certains médicaments conviennent pour le traitement de premier recours de l'hypertension systolique isolée, en particulier les diurétiques thiazidiques et les bloqueurs de canaux calciques dihydropyridiniques à action prolongée et les ARA. Certaines maladies concomitantes comportent des indications contraignantes à l'égard d'autres médicaments de première intention : ainsi, chez les

patients souffrant d'angine, les bêta-bloquants ou les bloqueurs de canaux calciques dihydropyridiniques à action prolongée sont recommandés, alors que pour les hypertendus souffrant d'insuffisance cardiaque, les bêta-bloquants ou les inhibiteurs de l'ECA sont recommandés comme traitement de prédilection (Khan 2004).

Au début des années 90 des essais portant sur les diurétiques ont démontré une réduction moindre de la coronaropathie que celle qui était escomptée et mettait un doute sur les effets métaboliques négatifs. D'autres part, les inhibiteurs de l'ECA et les bloqueurs de canaux calciques dihydropyridiniques tentaient à démontrer des effets anti-athéroscléreux, ce qui laissait envisager possiblement une réduction plus importante de la coronaropathie qu'avec les diurétiques. Cependant, au milieu et fin des années 90, il y eu des préoccupations au sujet des dihydropyridines, à savoir s'il y avait davantage d'infarctus du myocarde dus à ce traitement. À la même époque les ARA ont vu le jour et démontré des effets bénéfiques sur la progression des maladies vasculaires, rénales et/ou cardiaques. Depuis peu des études cliniques ont été achevées ou sont toujours en cours, évaluant un traitement initial par les différents antihypertenseurs (bloqueurs de canaux calciques dihydropyridiniques, inhibiteurs de l'ECA, antagonistes des récepteurs de l'angiotensine (ARA), alpha-bloquants, diurétiques) afin de déterminer lequel diminue plus les maladies cardiaques ou les accidents vasculaires cérébraux et la mortalité cardiovasculaires et ainsi afin de déterminer s'il existe des différences entre les diverses classes d'antihypertenseurs.

L'étude ALLHAT (2002) nous présentent les conclusions générales suivantes : les traitements avec un bloqueur de canaux calciques dihydropyridiniques et un inhibiteur de l'ECA ont eu des effets comparables à ceux d'un diurétique sur le plan de la mortalité totale; un traitement énergique est nécessaire pour atteindre les cibles tensionnelles systoliques; une polypharmacothérapie est souvent nécessaire pour atteindre les cibles tensionnelles. D'autres parts, l'étude VALUE (Julius, 2004) devait montrer qu'un ARA est plus efficace qu'un bloqueur de canaux calciques dihydropyridiniques à action prolongée pour réduire la morbidité et la mortalité

cardiaque chez les patients hypertendus à risque élevé, quand la maîtrise tensionnelle est équivalente avec les deux agents. Cependant la baisse de pression artérielle ne fut pas équivalente malgré les efforts en double aveugle. L'étude VALUE est conséquente avec les nombreuses preuves cliniques qui démontrent qu'une maîtrise tensionnelle énergique précoce est la clé pour réduire les manifestations cardiovasculaires. La supériorité de l'ARA n'a pas été démontrée et on n'a pas réussi à corroborer la croyance selon laquelle les ARA offrent une meilleure protection cardio-vasculaire que les autres classes d'antihypertenseurs. Plusieurs études de mortalité et de morbidité sur les inhibiteurs de l'ECA ont été menées et d'autres sont en cours pour évaluer les effets chez les sujets atteints de coronaropathie.

L'étude HOPE (2000) a démontré un bénéfice significatif de l'inhibiteur de l'ECA (ramipril) comparativement au traitement placebo chez les patients à haut risque avec une maladie vasculaire pour prévenir des événements cardiaques. Ces effets ont souvent été reliés à l'excellente capacité de pénétration tissulaire du ramipril. De plus, fait à noter, l'essai HOPE ne portait pas sur l'hypertension. En fait, seul 47 % des patients de l'essai HOPE présentaient des antécédents d'hypertension. La TA moyenne était de 139/79 mmHg au départ. L'inhibition des réactions catalysées par l'ECA tissulaire peut expliquer les résultats obtenus lors de l'essai HOPE. Étant donné que plus de 90 % de l'ECA se trouve dans les tissus, un inhibiteur de l'ECA doté d'une grande affinité tissulaire devrait empêcher la dégradation d'une plus grande quantité de bradykinine qui se traduirait par une plus grande quantité de monoxyde d'azote (NO), d'où un effet vasodilatateur plus important. Le NO aurait aussi des effets antithrombotiques, anti-inflammatoires et anti-athéroscléreux.

Quoiqu'il en soit, les études d'envergures de morbidité et de mortalité ayant pour objectifs de comparer les classes thérapeutiques ne semblent pas démontrer d'avantages définitifs sur les paramètres primaires mais possiblement sur certains paramètres secondaires dus à leurs différents mécanismes d'actions. Une maîtrise

tensionnelle énergétique précoce serait la clé pour réduire les manifestations cardiovasculaires.

2. Physiologie et Pharmacologie du système cardio-vasculaire

L'organisation générale du système cardio-vasculaire peut être expliquée par les éléments qui le composent. Le système circulatoire est un système continu où le cœur, par son rôle de pompe, permet au sang de s'écouler à travers le réseau vasculaire pour maintenir la circulation sanguine dans tout l'organisme. La circulation du sang à travers toutes les parties du corps se produit sous l'influence de tensions créées par l'action de pompage du cœur. Le débit du sang dans le système cardio-vasculaire entier se fait d'une région de haute pression vers une région de basse pression et ce sont les différences de pression qui sont responsables du débit. Le débit est directement proportionnel à la différence de pression mais aussi inversement proportionnel à la résistance qui s'oppose au débit.

L'organisation générale du système cardio-vasculaire peut aussi être expliquée par les processus biologiques associés aux fonctions des structures du système et ces processus relèvent d'interactions chimiques et physiques aux niveaux cellulaires et tissulaires. L'étude de la fonction du système cardio-vasculaire peut s'effectuer selon des approches paradigmatiques, soit par les efforts de la physiologie, de la pharmacologie, de la biochimie et/ou de la biologie moléculaire. L'ensemble de ces différentes approches reflète l'évolution de la recherche scientifique et de ses moyens. Les études qui font l'objet de cette thèse concernent une partie de tous ces aspects de la fonction des systèmes intracellulaires, et qui contrôlent l'activité des myocytes par les systèmes neuro-humoraux de façon autocrine ou paracrine, dans le but d'explorer la fonction cardio-vasculaire *in vitro* et *in vivo*. La fonction et la structure du système cardio-vasculaire ne font qu'être de mieux en mieux compris, permettant l'amélioration de notre capacité de prévenir des pathologies et de développer des traitements pharmacologiques pour les maladies cardio-vasculaires.

2.1. Fonction physiologique du système cardio-vasculaire

Le maintien de la tension artérielle est un facteur important dans le rôle du système circulatoire. Une circulation efficace exige un volume adéquat de sang en circulation, des vaisseaux sanguins en bon état et un coeur qui pompe avec régularité le sang dans les vaisseaux sanguins. La principale fonction du coeur est de recevoir le sang sous faible pression et de le retourner dans les artères à une pression suffisamment élevée pour que celui-ci parcoure tous les vaisseaux et atteigne à nouveau le coeur. Le débit cardiaque est déterminé par le volume d'éjection systolique pompé à chacune des contractions et par le rythme cardiaque.

Le débit cardiaque varie en fonction des divers besoins de l'organisme et des mécanismes qui contrôlent le rythme cardiaque ou le volume systolique. Le rythme cardiaque peut varier puisque le noeud sinusal est sous les influences nerveuses et hormonales. Un grand nombre de fibres parasympathiques et sympathiques se terminent dans le noeud sinusal. L'influence du système nerveux autonome est le facteur le plus important dans le contrôle du rythme cardiaque et cette influence est déterminée par l'équilibre entre les effets stimulateurs du système nerveux sympathique et les effets inhibiteurs du système nerveux parasympathique. D'autre part, le volume systolique peut être contrôlé par la durée de la diastole, le retour veineux, l'étirement produit par le remplissage ventriculaire et la puissance de la contraction. Les variations du volume télédiastolique (selon la loi du coeur de Frank-Starling, voir section 2.2 Contractilité du muscle cardiaque) et les modifications d'amplitude des influx du système nerveux sympathique arrivant aux ventricules peuvent produire des variations de la force des contractions.

L'énergie utilisée par le coeur provient du catabolisme de l'ATP. Plusieurs éléments cellulaires utilisent cette forme d'énergie qui est transformée en travail mécanique et en chaleur. L'énergie dépensée par le coeur peut varier dans différentes situations où le débit cardiaque est le même. Ainsi cette dépense est aussi déterminée

par la tension artérielle contre laquelle les ventricules doivent pomper. Dans le cas où la tension artérielle est élevée, par exemple chez des sujets atteints d'hypertension artérielle, le coeur consommerait plus d'énergie pour pomper le sang, malgré un débit cardiaque qui semble normal. De façon générale, plus la résistance rencontrée par le sang est importante, plus le coeur doit engendrer de pression pour que le sang continue à circuler.

Ainsi, la tension artérielle moyenne subit l'influence de modifications du débit cardiaque et de la résistance périphérique totale. La relation entre le flux sanguin, la tension et la résistance à l'écoulement s'applique autant à la circulation systémique entière qu'à des vaisseaux ou des groupes de vaisseaux et s'exprime par l'équation suivante:

$$\text{Tension artérielle moyenne} = \text{Débit cardiaque} \times \text{Résistance périphérique totale}$$

Les mécanismes responsables de la perception et de la régulation de la tension artérielle entraînent des modifications du rythme cardiaque, de la force contractile ainsi que des modifications du diamètre des vaisseaux. Le changement de diamètre des artéoles dépend entre autres du degré de contraction et de relaxation de leurs fibres musculaires, ce qui modifie la résistance à l'écoulement du sang. Les mécanismes qui influent sur le fonctionnement cardiaque et sur la résistance vasculaire, sont les influx nerveux provenant des centres cardiaques et vasomoteurs, des barorécepteurs et des nerfs vasomoteurs, les nombreuses hormones et substances chimiques, ainsi que le volume sanguin. Le maintien d'un niveau de la tension artérielle est le résultat de l'influence conjuguée de ces facteurs.

2.2. *Contractilité du muscle cardiaque*

L'évolution de la compréhension de la fonction cardio-vasculaire a suivi trois différents paradigmes créés successivement durant ce siècle dernier, pour expliquer le

contrôle de la fonction cardiaque (Katz 1987). Il s'agit d'abord du contrôle mécanique de la force de contraction systolique par l'étirement des fibres musculaires ventriculaires selon la relation de Frank-Starling appelée la loi du coeur de Starling (Starling 1918; Chapman 1965). Starling avait décrit la relation entre la force de contraction du muscle cardiaque et la longueur de ses fibres musculaires et avait conclu que le coeur possédait un pouvoir d'adaptation aux différentes conditions physiologiques mais aussi que la relation qu'il décrit permet de comprendre certaines conditions pathologiques lorsque le muscle est atteint et semble moins efficace. Ainsi le coeur peut répondre à court terme à des changements hémodynamiques. Quoiqu'il en soit, Starling lui-même reconnaissait que la longueur télédiastolique des fibres musculaires n'était pas le seul déterminant de la performance cardiaque si l'on considère que les besoins énergétiques diffèrent selon une charge donnée de volume ou de pression. Le second paradigme concerne la biochimie du processus contractile et la modification de la performance cardiaque par des modifications du couplage excitation-contraction (phénomène d'augmentation de la contractilité non due à une modification du volume télédiastolique). Ainsi la modification de la contractilité peut entraîner un déplacement de la courbe de Starling (i.e. la relation entre l'étirement et le volume) selon les propriétés biochimiques des myocytes. Les cellules sont en permanence le lieu de multiples réactions chimiques. La modification de la fonction cardiaque par des réponses à court terme à des interventions physiologiques ou pharmacologiques peut s'expliquer par l'aspect biochimique du contrôle de l'activité des myocytes par les systèmes neuro-humoraux de façon autocrine ou paracrine. Le troisième paradigme comporte les notions de la modification de l'expression génétique. En effet, une altération de la synthèse et/ou de la structure protéinique contribuerait à la régulation de la performance cardiaque à long terme.

Ainsi, quoique chacun de ces trois paradigmes décrivent un aspect spécifique du contrôle de la fonction cardiaque et des mécanismes distincts fonctionnellement dans la régulation de la fonction cardiaque, ils sont surtout complémentaires et décrivent aussi les progrès de la physiologie cardiovasculaire.

2.2.1. *Organisation des cellules musculaires cardiaques*

Les cellules du muscle cardiaque combinent certaines propriétés du muscle lisse (courtes et munies de jonctions intercellulaires) avec d'autres du muscle squelettique (d'apparence striée). La limite de chaque cellule est une membrane complexe, le sarcolemme, qui s'invagine afin de former un réseau tubulaire (tubules en T) qui prolonge l'espace extracellulaire vers l'intérieur de la cellule assurant ainsi la transmission du signal électrique du sarcolemme au milieu intracellulaire. Les cellules musculaires cardiaques sont constituées principalement de myofibrilles, soit les éléments contractiles, ainsi que de mitochondries. Les mitochondries se trouvent entre les myofibrilles et à proximité du sarcolemme et génèrent l'énergie nécessaire au développement de la force contractile et des gradients ioniques sous forme d'ATP. Le réticulum sarcoplasmique s'étend dans la cellule en partie le long du sarcolemme ou autour des tubules en T. Les citernes du réticulum sarcoplasmique libèrent du calcium via des canaux faisant partie d'une structure complexe définie comme le récepteur de la ryanodine. Le calcium provenant de cette origine peut ainsi accélérer le cycle contractile. Les tubules du réticulum sarcoplasmique capturent le calcium avec une pompe Ca^{++} -ATPase afin d'initier la relaxation (Figure 2).

Le principal rôle des cardiomyocytes réside dans le fonctionnement du cycle contraction - relaxation et par conséquent l'interaction entre les protéines contractiles majeures, l'actine et la myosine. Le filament d'actine est composé de deux brins de molécules d'actine polymérisées et enroulés de façon hélicoïdale. Un complexe de troponines composé de trois protéines régulatrices (troponine-C, troponine-I et troponine-T) se trouve à intervalle régulier sur le brin de tropomyosine (troponine-M). La troponine-I possède une forte affinité pour l'actine, la troponine-T pour la tropomyosine et la troponine-C pour le calcium. Donc ce complexe troponine lie chaque brin de tropomyosine à un brin d'actine couvrant ainsi physiquement les sites actifs de l'actine qui permettent l'interaction avec la myosine. Lorsque la concentration des ions calciques est augmentée, ceux-ci interagissent avec la troponine-C qui à son tour augmente sa force de liaison avec la troponine-I.

L'inhibition exercée par la troponine-I (le complexe troponine-tropomyosine) est donc levée, ceci est possiblement dû au changement de configuration du complexe entraîné par la liaison du calcium et libérant de cette façon les sites actifs de l'actine. Ainsi lorsque la concentration de calcium est suffisante, le calcium en se liant à la troponine supprime l'inhibition par la tropomyosine de la formation de ponts entre l'actine et la myosine. Les têtes de myosine interagissent avec les filaments d'actine selon l'état d'affinité de la liaison. Les filaments d'actine se déplacent vers le centre du sarcomère en rapprochant les lignes Z et le sarcomère est ainsi raccourci. L'énergie est fournie par l'ATP provenant principalement des mitochondries.

Un stimulus qui excite une cellule du muscle cardiaque peut être transmis aux autres cellules de ce muscle, par l'intermédiaire de jonctions lacunaires, et un ensemble de cellules réagit et se contracte comme une même entité.

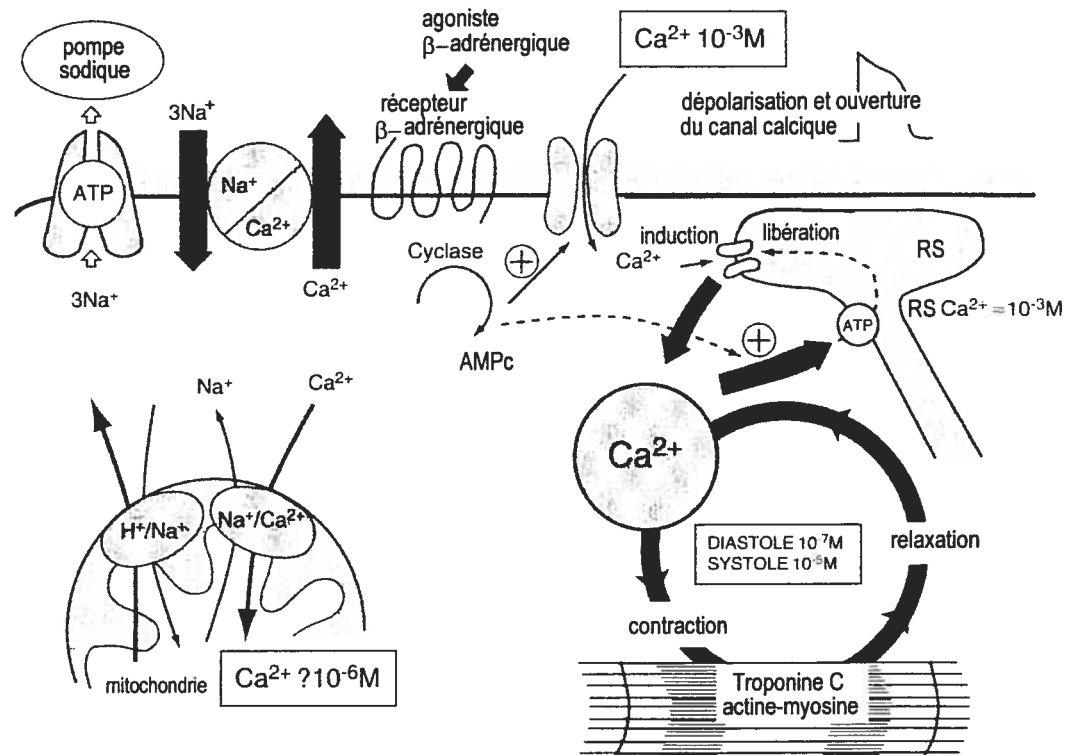


Figure 2: Ensemble des flux calciques dans les cardiomyocytes. Les ions calciques entrent dans la cellule par les canaux calciques de type L sensibles au voltage; ce calcium peut agir comme inducteur de la libération d'ions calciques du réticulum plasmique (RS); la stimulation β -adrénergique et la formation d'adénosine monophosphate (AMPc) par l'adénylyl cyclase favorise l'ouverture du canal calcique ainsi que l'augmentation du taux de capture du calcium par le RS; sortie de la cellule du calcium par l'échangeur sodium-calcium et la pompe sodique qui expulse le sodium ainsi entré. La mitochondrie peut servir de tampon pour les changements excessifs de la concentration cytosolique. (Figure adaptée d'après Opie LH: The heart, Physiology, from Cell to circulation. Philadelphia, Lippincott-Raven, 1998.)

2.2.2. *Couplage excitation-contraction*

La contraction du muscle cardiaque est déclenchée par la dépolarisation de la membrane plasmique et le mécanisme couplant cette excitation et la contraction musculaire consiste en l'augmentation de la concentration de calcium cytosolique (Figure 2).

Les cellules du muscle cardiaque sont électriquement polarisées à cause d'une distribution inégale des ions de chaque côté de leur membrane cellulaire. Lorsque la membrane est dépolarisée jusqu'à son seuil d'excitation, il s'en suit un potentiel d'action et la contraction de la cellule. La caractéristique fondamentale du potentiel d'action des cellules musculaires cardiaques est la longue dépolarisation continue (phase de plateau) due à l'augmentation marquée de la perméabilité de la membrane au calcium. L'ouverture des canaux calciques sous l'effet du voltage est entraînée par la dépolarisation initiale dépendante du sodium.

Le calcium cytosolique est augmenté par l'influx de calcium à travers la membrane cellulaire par l'entremise de trois types de canaux: les canaux activés par le voltage ("*voltage-operated channels*", VOC), les canaux activés par des récepteurs ("*receptor-operated channels*", ROC) et les canaux activés par le calcium de réserve ("*store-operated channels*", SOC). L'initiation du processus contractile a toujours été suggérée comme principalement dépendante de l'ouverture des canaux calciques sarcolemmaux voltage-dépendant de type L pour le couplage excitation-contraction (Bouchard 1995). Cet influx est généralement amplifié par la libération de calcium par le réticulum sarcoplasmique et endoplasmique passant par deux autres types de canaux: le récepteur sensible à l'inositol trisphosphate (IP₃) et le récepteur de la ryanodine (Lunde 1997). Cependant, des études ont démontré que l'entrée calcique via le courant calcique n'est pas le seul déclencheur de la libération de calcium. En effet, lors de la dépolarisation, l'échangeur Na⁺/Ca⁺⁺ voltage-dépendant générerait une pointe initiale d'entrée calcique qui serait suffisante pour déclencher une portion

de la libération calcique du réticulum sarcoplasmique induite par le calcium (Levi 1993).

Néanmoins, la source majeure du calcium cytosolique provient de la libération du calcium par le réticulum sarcoplasmique. Pour chaque vague de dépolarisation, la concentration de calcium libérée par le réticulum sarcoplasmique est plus grande relativement à la concentration de calcium entrant. Ainsi, l'hypothèse généralement acceptée du mécanisme concernant les flux calciques associés au couplage excitation-contraction est basée sur le rôle critique de la libération du calcium par le réticulum sarcoplasmique qui est déclenchée par l'entrée de calcium dans la cellule à travers la membrane plasmique avec chaque vague de dépolarisation (phénomène appelé "*calcium-induced calcium release*", CICR) (Fabiato 1983).

L'importance des aspects spatiaux temporels des signaux calciques repose sur les propriétés régénératrices des récepteurs de l' IP_3 et de la ryanodine qui contrôlent la libération de calcium des réserves intracellulaires (Berridge 1994). La caractérisation moléculaire du récepteur sur le réticulum sarcoplasmique qui induit la libération du calcium et qui se trouve à la jonction entre le réticulum sarcoplasmique et les tubules en T du sarcolemme suggère l'existence d'une synapse chimique. La structure complexe du récepteur de la ryanodine comprend le canal calcique qui libère le calcium. De plus, une partie de ce récepteur s'étend du réticulum sarcoplasmique vers le sarcolemme et constitue le complexe jonctionnel du canal qui fait le lien avec le sarcolemme. En atteignant cette structure, l'entrée de calcium extracellulaire par le sarcolemme induit un changement de conformation du récepteur de la ryanodine qui serait responsable de la libération de calcium.

Ainsi, la dépolarisation de la membrane cellulaire ouvre le canal calcique voltage-dépendant et le calcium entrant dans la cellule peut stimuler l'ouverture d'un certain nombre de récepteurs à la ryanodine qui libéreront des quantum de calcium du réticulum sarcoplasmique (Lunde 1997).

Un second type de récepteurs sur le réticulum sarcoplasmique, celui-ci sensible à l'inositol trisphosphate (IP_3), est aussi impliqué dans la libération de calcium. Dans le muscle lisse vasculaire, l' IP_3 est un second messager important dans l'effet vasoconstricteur de la stimulation α_1 -adrénergique, de l'angiotensine II et de l'endothéline et serait important dans la libération du calcium par le réticulum sarcoplasmique. L' IP_3 agit sur des récepteurs dont les propriétés physiologiques et moléculaires sont similaires à celles des récepteurs de la ryanodine. Cette famille de canaux calciques intracellulaires démontre la caractéristique du processus régénératif de la libération de calcium induite par le calcium qui est responsable des oscillations typiques des vagues de calcium complexes spatio-temporelles (Berridge 1993). Cependant, dans le muscle cardiaque sain, le rôle de l' IP_3 dans la réponse inotropique est controversé. D'autres part dans l'insuffisance cardiaque, il a été suggéré que la fonction du récepteur de l' IP_3 serait augmentée relativement à celle du récepteur de la ryanodine et ceci pourrait représenter un mécanisme participant au maintien de la libération de calcium par le réticulum sarcoplasmique, et par conséquent, de la fonction cardio-vasculaire (Go 1994).

La capture du calcium par le réticulum sarcoplasmique ou son extrusion du milieu cellulaire initie la relaxation musculaire en ramenant la concentration cytosolique de calcium à sa valeur basale. Des pompes calciques, dépendantes de l'ATP (pompe Ca^{++} -ATPase), se trouvent sur les tubules du réticulum sarcoplasmique, soit la portion distale aux juxtapositions avec le sarcolemme. Les pompes Ca^{++} -ATPase se chargent de la capture du calcium par le réticulum sarcoplasmique alors que le calcium sera emmagasiné par les protéines spécialisées, les calsequestrines. La phospholambane agit comme protéine régulatrice de la pompe calcique en inhibant son activité alors que la phosphorylation de la phospholambane, par la protéine kinase dépendante de l'adénosine monophosphate (PKA) entre autres, empêche cette inhibition. Le calcium mis en réserve avec les calsequestrines sera libéré lors des dépolarisations subséquentes. Si la réserve de calcium est augmentée il

est suggéré que la libération subséquente en sera d'autant plus augmentée et conséquemment entraînera une augmentation de la force et du taux de contraction musculaire (Luo 1994).

Dans le muscle cardiaque, les variations de la concentration du calcium au cours de l'excitation ne produisent pas un dégagement maximal des ponts actine-myosine en ne se liant qu'à une portion des sites de troponine. Ainsi, le muscle cardiaque se contracte de façon variable selon les conditions qui prévalent au moment de la contraction.

Les effets de l'augmentation du calcium responsable de l'augmentation du développement de la force contractile sont selon deux modèles, le premier étant que la concentration calcique agit comme régulateur du nombre total de ponts d'unions et l'augmentation du calcium entraînerait simplement un recrutement additionnel de ponts d'unions via l'augmentation du recrutement de troponine-C. La seconde hypothèse basée sur un modèle gradué implique soit une augmentation graduelle de la réponse de la troponine C aux ions calciques tel le taux de liaison/libération; une réponse graduelle (sensibilisation exponentielle) de l'ATPase de la myosine et/ou une phosphorylation accrue des chaînes légères de la myosine qui augmenterait l'affinité de la myosine pour l'actine (Opie 2001).

La stimulation de certains systèmes neuro-humoraux peuvent influencer la contractilité cardiaque en intervenant à plusieurs niveaux du processus de contractilité, tel que en favorisant l'augmentation du développement de la force contractile par l'augmentation de la concentration de calcium cytosolique. Par exemple, lors de la stimulation β -adrénergique, la PKA peut phosphoryler le canal calcique et provoquer un changement de conformation du pore pouvant induire une augmentation de la probabilité d'ouverture du canal. D'autre part, la PKA est une des kinases qui en phosphorylant la phospholambane induit une augmentation de la capture du calcium dans le réticulum sarcoplasmique pouvant résulter en une

augmentation de la vitesse de relaxation à la suite d'une stimulation β -adrénergique des cardiomyocytes (Luo 1994). De plus, la phosphorylation de la troponine I à la suite d'une stimulation β -adrénergique augmente le taux de relaxation.

2.3. Modulation par le système nerveux et hormonal de la fonction cardio-vasculaire

La fonction cardio-vasculaire est contrôlée par des mécanismes de régulation intrinsèque ainsi que par des mécanismes de régulation extrinsèques. Par exemple, le volume d'éjection systolique est contrôlé par un mécanisme cardiaque intrinsèque dépendant des changements du volume télédiastolique ainsi que par un mécanisme extrinsèque agissant par l'intermédiaire de facteurs neuro-humoraux influençant la contractilité ventriculaire. Par ailleurs, le tonus des muscles lisses vasculaires peut être modifié par divers facteurs physiologiques pour augmenter ou diminuer leur degré de contraction selon des mécanismes locaux (autorégulation) ou extrinsèques (réflexes neuro-humoraux) et influencer la résistance dans l'arbre vasculaire et le débit des organes.

La tension artérielle moyenne est une variable étroitement contrôlée. Les réflexes ainsi que les systèmes de transduction des signaux cellulaires qui accomplissent cette régulation constituent les mécanismes fondamentaux de contrôle cardio-vasculaire. Les contributions, entre autres, du système nerveux sympathique, du système rénine-angiotensine et de la voie du monoxyde d'azote dans les situations physiologiques et pathologiques seront décrites dans les sections suivantes.

2.3.1. Système nerveux central et périphérique

Le système nerveux central comprend l'encéphale et la moelle épinière dont les faisceaux nerveux conduisent les messages en provenance et en direction de l'encéphale. Des neurones localisés dans le bulbe rachidien contrôlent une grande

variété de fonctions vitales, telles que le rythme cardiaque, la dilatation et la constriction des vaisseaux sanguins.

Le système nerveux périphérique comprend tous les neurones autres que ceux de l'encéphale et de la moelle épinière. Les voies nerveuses du système périphérique relient le système nerveux central à toutes les structures périphériques de l'organisme via les nerfs crâniens et les nerfs rachidiens. Du point de vue fonctionnel, le système nerveux périphérique se divise en une partie afférente et une partie efférente. La partie afférente (sensitive) est composée de fibres nerveuses transmettant les influx vers le système nerveux central. La partie efférente (motrice) se subdivise en système nerveux somatique et en système nerveux autonome. Le système nerveux somatique relie les fibres motrices du système nerveux central vers les muscles squelettiques et la peau alors que le système nerveux autonome relie les fibres motrices du système nerveux central vers les muscles lisses, le muscle cardiaque et les glandes.

Dans le contexte des travaux de recherche présentés dans cette thèse, une attention plus particulière est donnée à la fonction du système nerveux autonome dans la section suivante.

2.3.1.1. Système nerveux autonome

Le système nerveux autonome (système involontaire dont l'activité est inconsciente) peut être divisé en deux parties fonctionnelles et structurales: le système sympathique et le système parasympathique.

Les fibres préganglionnaires et postganglionnaires parasympathiques ainsi que les fibres préganglionnaires sympathiques sont toutes des fibres cholinergiques et sécrètent l'acétylcholine qui agit comme neurotransmetteur. D'autres part, la plupart des fibres postganglionnaires sympathiques sont des fibres adrénérgiques et sécrètent la noradrénaline. De nombreux organes sont innervés par les deux divisions du système nerveux autonome et causent souvent des réactions opposées. Cette double

innervation permet un réglage plus précis de l'activité. Par exemple, le cœur reçoit une riche innervation constituée par des fibres nerveuses sympathiques et parasympathiques postganglionnaires se terminant sur les cellules du système de conduction spécialisé aussi bien que sur les cellules myocardiques des oreillettes et des ventricules. Cependant, la plupart des organes sont davantage contrôlés par une des deux divisions du système nerveux autonome. De façon générale, l'effet de la stimulation sympathique sur les effecteurs tel que le cœur, les vaisseaux sanguins et la médullosurrénale augmente le rythme cardiaque, la contraction vasculaire et stimule la sécrétion adrénérgique respectivement. D'autre part, l'effet de la stimulation parasympathique diminue le rythme cardiaque et dilate les vaisseaux sanguins.

2.3.1.2. Baroréflexe

Le contrôle et l'intégration de la fonction cardio-vasculaire s'effectuent selon un système réflexe et concernent principalement la régulation de la tension artérielle systémique puisque le maintien de cette variable est fondamental pour assurer un débit sanguin convenable aux organes. La régulation du volume sanguin est l'élément le plus fondamental du contrôle de la tension artérielle particulièrement à long terme et est réalisée principalement par la régulation homéostatique. Un écart de la tension artérielle de son niveau normal déclenche une modification réflexe d'une ou plusieurs variables tels que le débit cardiaque et/ou la résistance périphérique totale afin de maintenir la tension artérielle à son niveau initial.

Les récepteurs et les voies afférentes qui apportent des informations au système nerveux central les plus importants sont les barorécepteurs artériels. À la bifurcation de chacune des artères carotides, la paroi des artères est amincie et contient un grand nombre de terminaisons nerveuses ramifiées. Cette région identifiée comme le sinus carotidien se comporte comme un récepteur sensible à l'étirement et la torsion qui dépendent de la pression dans l'artère. Les neurones afférents forment des synapses sur les neurones des centres de contrôle cardio-vasculaire. Un second

barorécepteur artériel se trouve également dans la crosse aortique et d'autres récepteurs à l'étirement se trouvent également dans les grosses veines, les vaisseaux pulmonaires et les parois du coeur. Les influx des barorécepteurs sont reçus par les neurones du centre bulbaire cardio-vasculaire et déterminent la fréquence d'influx des nerfs sympathiques qui vont au coeur, aux artérioles et aux veines et vers les nerfs parasympathiques qui vont au coeur. Quand les barorécepteurs augmentent leur fréquence de décharge à la suite d'une augmentation de la tension artérielle, il en résulte une diminution de l'activité sympathique efférente au coeur, aux artérioles et aux veines et une augmentation de l'activité parasympathique efférente au coeur. Les influx nerveux provenant des barorécepteurs inhibent l'activité vasoconstrictrice induite par le centre vasomoteur, et, agissent sur le centre cardiaque, stimulant l'activité des nerfs parasympathiques et diminuant celle des nerfs sympathiques innervant le coeur. Ainsi, les vaisseaux se dilatent, le rythme et la force de contraction du coeur diminuent, entraînant une baisse de débit cardiaque, et finalement une baisse de la pression sanguine. Inversement, une diminution de la tension artérielle résulterait en une diminution de la fréquence de décharge des barorécepteurs et une diminution de l'influx vers le centre cardio-vasculaire. Ainsi, l'augmentation de l'activité sympathique et la diminution de l'activité parasympathique résulteraient en une augmentation du débit cardiaque et de la résistance périphérique totale et un retour de la pression sanguine à la normale. Toutefois, le réflexe barorécepteur fonctionne principalement comme un régulateur à court terme de la tension artérielle. Si la tension artérielle persiste à dévier de sa valeur normale, les barorécepteurs s'adapteront à cette nouvelle pression en la considérant comme normale. Ainsi, lorsque la pression est élevée pendant plusieurs jours, les barorécepteurs s'y adaptent et considèrent cette pression comme la pression normale, mais les baroréflexes s'opposeront aux écarts instantanés de la tension artérielle par rapport à ce nouveau niveau de base. C'est ce qui se produit dans les cas d'une élévation chronique de la tension artérielle.

2.3.1.3. Système β -adrénergique : fonctions, propriétés et effets physiologiques.

Le système nerveux autonome en activant des systèmes de signalisations cellulaires et leurs seconds messagers peut modifier l'activité cellulaire et par conséquent celle de l'organe effecteur, par exemple en altérant les mouvements calciques. Le système β -adrénergique est un système effecteur du système nerveux sympathique. Les différents sous-types de récepteurs β -adrénergiques se retrouvent au niveau postsynaptique et aussi présynaptique de la jonction nerveuse. La conception classique de la transmission de messages entre les cellules veut que les récepteurs soient des serrures dont les ligands (hormones et neurotransmetteurs) sont les clés et en l'absence de ligand spécifique la serrure reste fermée et la cellule inactive. Cependant l'on sait maintenant que les récepteurs peuvent avoir une activité spontanée et être dans un état actif même sans stimulation hormonale. Une autre perception classique qui était la linéarité des voies de transduction du signal est inadéquate pour expliquer les résultats expérimentaux (Gudermann 1996). En effet, la signalisation via les récepteurs couplés aux protéines G (protéines hétérotrimériques régulatrices liant les nucléotides guanyliques) est plutôt un réseau complexe avec des voies qui convergent et divergent à chacun des niveaux de transduction tel le récepteur, la protéine G et l'effecteur. Par exemple, la complexité peut s'expliquer par leur mobilité, la convergence des transmetteurs pour un récepteur, mais aussi par l'état monomérique ou oligomérique du récepteur dont le dernier pourrait donner lieu à une fonction allostérique.

Les catécholamines provoquent leurs divers effets biologiques par l'activation de récepteurs membranaires spécifiques. Sur la base de la puissance relative des différents agonistes adrénérgiques, les récepteurs adrénérgiques ont d'abord été subdivisés en sous-types α et β par Alquist en 1948. D'autres sous-classifications ont suivi pour expliquer les différents effets pharmacologiques et physiologiques.

La sous-classification originale des récepteurs β_1 dans le cœur et des récepteurs β_2 dans les muscles lisses vasculaires présume un degré de spécificité pour les

organes. Cependant, avec l'évolution des techniques biochimiques d'identification et de liaison, l'hypothèse a maintenant évolué en ce fait que les variétés de récepteurs peuvent co-exister dans une variété d'organes quoique souvent un sous-type prédomine. La proportion relative des récepteurs β_1 et β_2 dans un tissu peut être déterminée par des études de liaison avec un ligand β non spécifique marqué de radio-isotopes en présence d'un antagoniste spécifique à un des deux sous-types, par exemple un antagoniste β_2 spécifique. Que un ou deux sous-types de récepteurs soient présents, la courbe de compétition le démontrera et des méthodes analytiques permettent de déterminer les caractéristiques de la liaison des récepteurs, soit la quantité et le degré d'affinité. Si l'on parvenait à déterminer l'importance physiologique et la régulation des sous-types de récepteurs adrénergiques, ceci contribuerait à la compréhension de leur rôle spécifique dans les processus biologiques et pathophysiologiques, ce qui pourrait mener au développement d'agents pharmacologiques plus sélectifs pour ces sous-types.

Une des premières voies de signalisation à être d'abord comprise de façon plus complète fut la voie β -adrénergique qui induit la phosphorylation dépendante de l'AMP cyclique de plusieurs protéines cibles. La voie de signalisation couplée aux protéines G fonctionne en terme de cascade. Les trois premières composantes de la voie séquentielle de signalisation sont des protéines membranaires, soit le récepteur β -adrénergique (protéine membranaire intégrale), la protéine régulatrice liant le GTP (G_s , protéine associée à la membrane) et un effecteur primaire, l'enzyme adénylyl cyclase (protéine membranaire intégrale). Quoiqu'un contact soit requis entre les trois composantes protéiques, ces dernières ne sont pas nécessairement constamment associées dans la membrane, mais peuvent diffuser séparément et se rencontrer pour passer le message dans ce trajet aléatoire. Cette mobilité peut servir d'amplification si l'on considère qu'un récepteur peut rencontrer et activer plusieurs protéines G (Hille 1992). Si les protéines doivent être mobiles, ceci implique que des restrictions dans la mobilité pourraient restreindre le fonctionnement de cette signalisation. La multiplicité des voies de signalisation s'explique entre autres par la multiplicité de ses

composantes. Plusieurs sous-types de récepteurs d'une même classe peuvent reconnaître et interagir avec le même transmetteur. De la même façon, plusieurs types de protéines G et de leurs sous-unités sont connus jusqu'à présent. La nature de leur interaction avec les effecteurs et les récepteurs n'est pas bien connue. D'autant plus, les effecteurs enzymatiques représentent aussi des familles d'enzymes homologues donnant une importance à la multiplicité des systèmes de transduction.

D'autres parts, la convergence de plusieurs transmetteurs pour un système effecteur peut soulever le questionnement sur la spécificité suggérée par la diversité des transmetteurs. Cependant, il semble que l'expression sélective dans une cellule cible d'un type de récepteur hormonal et de certaines protéines cibles intracellulaires susceptibles à une modulation spécifique rendrait la sélectivité de la voie de signalisation dans ce système. Différents types de cellules exprimant différents types de récepteurs lorsque présents dans une même région d'un organe reflète une combinaison d'interactions spécifiques résultant donc en un effet global spécifique (Hille 1992). La spécificité peut cependant être compromise de plusieurs autres façons. Par exemple, les mécanismes de signalisation passant par les protéines G doivent passer par environ seulement une vingtaine de types de protéines G qui représentent l'ensemble des protéines G_s , G_i / G_o , G_q . Des interactions entre les seconds messagers des différentes voies intracellulaires peuvent influencer le résultat final tel qu'une augmentation d'un second messager qui entraîne des modifications de la concentration d'un autre en agissant sur sa voie de signalisation ou l'enzyme effecteur (e.g. une augmentation de calcium intracellulaire peut stimuler l'adénylyl cyclase type I sensible à la calmoduline, inhiber la guanylyl cyclase ou activer la PDE des nucléotides cycliques de type I). De plus, un certain type de récepteurs pourrait activer des protéines de plus d'une famille. Ainsi, l'augmentation de l'AMP cyclique pourrait résulter de l'interaction (« crosstalk ») avec une adénylyl cyclase sensible au calcium plutôt que de l'activation d'une protéine G_s ou pourrait aussi résulter de la stimulation de la cyclase type II par une sous-unité $\beta\gamma$ libérée d'une protéine G autre que G_s . D'autres parts, quoique plusieurs protéines G puissent converger vers un

effecteur, la spécificité de leur modulation par des récepteurs individuels pourrait être stricte.

Les réponses cellulaires passant par la voie de récepteurs couplés aux protéines G sont évidemment complexes. La stimulation β -adrénergique entraîne la phosphorylation de plusieurs protéines par la PKA dans les cellules cardiaques (phosphorylase kinase, glycogène synthase, phospholamban, troponin I, PDE dépendante du Ca^{++} -Calmoduline, actine, canaux calciques type L (Hille 1992)). Ainsi une multitude d'actions dans un seul tissu affectent plusieurs fonctions (métabolisme, canaux ioniques, expression génétique). Une telle action pléiotropique ne peut se traduire simplement par une excitation ou une inhibition électrophysiologique. La pléiotropie est une caractéristique majeure de la signalisation couplée aux protéines G, affectant des cascades d'événements. Le système nerveux autonome peut contrôler le tonus vasculaire, le débit cardiaque, et plusieurs autres due à l'action pléiotropique de transmetteurs sur les organes cibles.

Les réponses des systèmes couplés aux protéines G sont plus lentes et d'une durée plus longue. À un certain moment de la cascade il y a amplification due à une action catalytique persistante. D'un point de vue spatio-temporel, il semblerait qu'un regroupement dense des récepteurs, protéines G et des effecteurs serait contre-productif dans un système d'amplification où il y a nécessité d'interactions mobiles des protéines de signalisation. Peu d'études nous renseignent sur la distribution des récepteurs au niveau de la surface cellulaire. Il semblerait que le récepteur doit être près de son effecteur primaire. D'autre part, les récepteurs peuvent être distants du site de libération de l'agoniste ou du transmetteur si l'on considère la lenteur de la réponse comparativement à une transmission synaptique chimique rapide. Les facteurs importants sont la haute affinité de liaison et l'excès de récepteurs et de protéines G. De plus, une faible fraction de l'occupation maximale des récepteurs est nécessaire pour évoquer l'action physiologique maximale. Des sommations temporelles, spatiales (de par la durée de vie du transmetteur, le récepteur sera exposé

à son accumulation dans cet intervalle de temps selon la caractéristique de diffusion) ainsi qu'une sommation agonistique (de par la convergence de plusieurs types de récepteurs activés respectivement par une faible concentration d'agoniste vers la même protéine G pourrait être équivalent à une concentration élevée d'un seul de ces agonistes) peuvent entrer en jeu. À ces notions doit aussi s'ajouter la considération de la notion de coopérativité entre les sites d'un récepteur oligomérique. En effet la coopérativité pourrait expliquer l'interaction de type allostérique. Il semble que les récepteurs oligomériques soient abondants et les récentes techniques pour leur identification permettront d'établir l'importance et la complexité de la signalisation des récepteurs couplés aux protéines G (Park 2004).

Récepteurs

Le récepteur β 2-adrénergique a été le premier récepteur couplé aux protéines G à être cloné (Dixon 1986). L'analyse de sa séquence primaire d'acides aminés révèle 7 segments hydrophobiques qui représentent les segments transmembranaires. Les segments, par leur arrangement tridimensionnel forment le récepteur, en terme de réceptacle, soit pour des ligands agonistes ou antagonistes. Par exemple, il a été démontré que l'isoprotérénol interagit avec le troisième et le cinquième domaine transmembranaire. Ainsi, dans sa configuration tridimensionnelle, lorsque le récepteur est lié à un agoniste, les domaines 3 et 5 seraient à proximité. Dans une configuration de liaison avec un antagoniste, il semble qu'un arrangement spécifique s'installe entre le domaine 3 et 7 (Hein 1997). Certaines chaînes d'acides aminés cytoplasmiques qui relient les domaines transmembranaires sont des domaines impliqués dans le couplage avec les protéines G. En effet, l'étude de récepteurs chimériques construits de récepteurs ayant différentes spécificités de couplage avec différentes protéines G on permis d'identifier qu'une portion du troisième domaine et des régions du deuxième domaine cytoplasmiques sont responsables pour déterminer la spécificité de l'interaction entre le récepteur et la protéine G (Kobilka 1988). D'autres régions intracellulaires (portion carboxyle du troisième domaine et la portion

amino-terminale du terminus carboxyle) semblent impliquées dans l'efficacité du couplage récepteur-effecteur, quoiqu'elles ne semblent pas déterminer la spécificité d'interactions. Les changements structuraux qui accompagnent la liaison d'un agoniste et qui mènent à l'activation des protéines G ne sont pas encore tout à fait compris, et nécessitent l'habileté de suivre les changements de conformation tridimensionnelles en présence d'agonistes, antagonistes et protéines G.

Plusieurs récepteurs adrénergiques recombinants ont été construits pouvant activer de façon constitutive les protéines G, même en l'absence d'agoniste. In vitro, lorsque le type sauvage du récepteur β_2 est surexprimé, une activité constitutive a été démontrée pouvant activer la protéine Gs en l'absence d'agonistes (Chidiac 1994). Cette activité constitutive peut être inhibée par certains antagonistes aussi appelés agonistes inverses ou antagonistes négatifs contrairement aux antagonistes purs lesquels ne feraient que bloquer l'accès des agonistes au récepteur permettant un bas niveau de l'activation basal des protéines G par le récepteur. Contrairement, les agonistes inverses en plus de bloquer l'accès à l'agoniste, provoque un changement de conformation qui prévient l'activation basale des protéines G. Dans des tissus normaux, l'activité constitutive β -adrénergique des érythrocytes a été révélée par l'inhibition de l'activité de l'adénylyl cyclase par des agonistes inverses (Gotze 1994).

Protéines G

Les protéines G font le lien entre la liaison du ligand au récepteur (premier messager) et l'activation du système enzymatique membranaire qui produira le second messager. On peut même généraliser en disant que les protéines G ont le rôle de médiateur de la signalisation d'un grand nombre de récepteurs à sept domaines transmembranaires à la surface cellulaire vers une variété d'effecteurs intracellulaires. Les protéines G sont composées de 3 sous-unités : α (39-52 kDa), β (35-36 kDa) et γ (8-10 kDa). Les sous-unités β et γ sont assemblées en dimère $\beta\gamma$ qui agit en tant qu'unité fonctionnelle. Il semblerait que ces dimères ne sont dissociables que dans des conditions de dénaturations. Les sous-unités α peuvent lier les nucléotides

guanyliques et sont actives lorsque liées au GTP et inactives lorsque liées au GDP. Les premiers modèles d'actions des protéines G proposaient un rôle spécifique et direct des sous-unités α sur la modulation de l'activité des effecteurs cellulaires alors qu'un rôle plus passif était attribué aux sous-unités $\beta\gamma$ en tant qu'atténuateur de l'activité de la sous-unité α . Il est maintenant reconnu que les sous-unités $\beta\gamma$ peuvent jouer un rôle direct de signalisation en modulant l'activité de canaux potassiques, de l'adénylyl cyclase et de phospholipases dans les cellules mammifères. Ainsi, la liaison d'un agoniste à un récepteur à 7 domaines transmembranaires modifie la conformation du récepteur catalysant l'échange du GDP pour un GTP au site de liaison de haute affinité de la sous-unité α de la protéine G couplée au récepteur contrôlant ainsi le cycle de dissociation-association de la sous-unité α et le dimère $\beta\gamma$ (Birnbaumer 1994). La liaison du GTP induit un changement de conformation de la sous-unité α résultant en la dissociation du complexe récepteur-protéine G, ce qui libère les sous-unités α et $\beta\gamma$ pour qu'elles interagissent avec leur effecteur cible. L'activité GTPasique intrinsèque de la sous-unité α hydrolyse le GTP lié en GDP, et, le GDP lié à la sous-unité α en interagissant fortement avec la sous-unité $\beta\gamma$ termine l'interaction des sous-unités avec leur effecteur. Quoique cette action d'hydrolyse puisse être considérée comme un mécanisme de régulation, il est reconnu que cette réaction est trop lente comparativement à la rapidité de plusieurs réponses physiologiques. Des protéines régulatrices de la signalisation des protéines G pourraient être responsables de régulation sélective, i.e. des protéines accessoires pouvant contrôler l'échange et l'hydrolyse de nucléotides guanyliques. La phosphodiesterase du GMP cyclique et le PLC β sont deux effecteurs régulés par la sous-unité α qui sont capables d'accélérer le taux d'hydrolyse du GTP par cette même sous-unité. Ainsi, le signal intracellulaire est contrôlé par des cycles interdépendants d'association-dissociation et est amplifié puisque un récepteur lié à un agoniste peut activer plusieurs protéines G alors que la durée de ce signal est en partie déterminée par la durée de la sous-unité α sous la forme liée au GTP.

L'étude de la structure tridimensionnelle des différents états d'association des protéines G, soit la sous-unité α liée au GTP ou au GDP, le dimère $\beta\gamma$ ou le trimère $\alpha\beta\gamma$, peut laisser supposer certains mécanismes d'actions. La conformation de la sous-unité α diffère qu'elle soit liée au GDP ou au GTP et la région principale où se trouve cette différence est au niveau de la région de la liaison du phosphate γ du GTP. Quant à la structure tridimensionnelle du dimère $\beta\gamma$, aucune différence n'a été notée lorsque comparée à l'hétérotrimère. Notamment, la forme de l'unité β présente des similitudes à un hélice à 7 lames, et la sous-unité γ se situe comme étant la queue de l'hélice β . Le dimère $\beta\gamma$ est perçu comme étant un levier barre rigide servant à l'ouverture de la région pour la liaison du nucléotide guanylique de la sous-unité α lors de l'activation du récepteur. Ainsi les sous-unités α et $\beta\gamma$ sont maintenues dans un état inactif par leur association mutuelle en un complexe hétérotrimérique. La sous-unité α lie le GDP avec une haute affinité et cette interaction est stabilisée par le $\beta\gamma$ (Wall 1995). Les sous-unités $\beta\gamma$ sont impliquées dans le ciblage de protéines kinases spécifiques des récepteurs liés aux protéines G responsables de la désensibilisation du signal. D'autres rôles pour ce dimère seront sans doute élucidés dans le futur.

Comme pour les autres composants des voies de signalisation couplée aux protéines G plusieurs sous-types sont identifiés sur la base de la structure moléculaire et de la fonction. Les protéines G sont classifiées selon la nature de la sous-unité α en 4 classes générales (α_s , α_i/o , α_q et α_{12}) selon la similarité des acides aminés, qui regroupent plus de 23 sous-unités distinctes encodées par 17 gènes différents (Gudermann 1996). Plusieurs sous-unités α peuvent interagir avec les mêmes effecteurs, chaque sous-unité α peut moduler différents effecteurs alors qu'un récepteur membranaire peut interagir avec différentes sous-unités α . Ainsi la sélectivité des voies de signalisation ne peut être définie avec certitude et exactitude. Les protéines $G\alpha$ sont composées de deux domaines, soit un domaine GTPase et un domaine α -hélicoïdale communs aux sous-unités α . La portion N-terminale est le site

majeur d'interaction entre les sous-unités α et $\beta\gamma$ (Conklin, 1993). Une diversité est aussi observée pour les sous-unités β et au moins 5 sous-unités β et 12 sous-unités γ ont été décrites.

Les sous-types de récepteurs adrénergiques peuvent se coupler à plus d'une classe de protéine G et bien que les sous-types d'une même famille se couplent généralement aux mêmes protéines G, une certaine différence dans la puissance de l'effet d'un même agoniste ou antagoniste peut être observée. Les récepteurs β -adrénergiques activent via la protéine Gs l'adénylyl cyclase et les canaux potassiques alors que l'activation de l'échangeur Na^+/H^+ est indépendante de la Gs. Les récepteurs α -adrénergiques de leur part activent aussi via un couplage aux protéines G différentes voies de signalisation. Les récepteurs α_1 activent la phospholipase C via les protéines Gq ainsi que la phospholipase A2 et les canaux calciques via les Gi. Les récepteurs α_2 entraînent l'inhibition de l'activation de l'adénylyl cyclase via l'activation des Gi.

Ainsi, lorsque les catécholamines se lient aux récepteurs β -adrénergiques il y a changement de configuration du récepteur β -adrénergique permettant la liaison du guanosine triphosphate (GTP) à la sous-unité α de la protéines G qui se dissocie du récepteur pour aller activer l'adénylyl cyclase qui transforme l'ATP en AMP cyclique, le second messenger. En général, la modification de la concentration tissulaire d'AMP cyclique est liée à une modification de la contractilité cardiaque ou de la vasodilatation, selon le cas. La majorité des effets de l'AMP cyclique sont médiés par les protéines kinases qui phosphorylent des enzymes et des protéines entraînant à leur tour d'autres réactions. Par exemple, l'activation de la PKA, le troisième messenger, peut augmenter les mouvements calciques et induire un effet inotrope positif. Plus précisément, l'activation de la PKA qui phosphoryle des protéines sarcolemmales provoque l'augmentation d'entrée de calcium due à l'augmentation de l'ouverture des canaux calciques voltage-dépendants. Il s'ensuit une augmentation de la libération de

calcium par les récepteurs de la ryanodine du réticulum sarcoplasmique et donc une augmentation de la concentration calcique intracellulaire pouvant interagir avec la troponine C et induire la désinhibition de la tropomyosine sur l'interaction entre la myosine et l'actine ainsi qu'une augmentation de l'activité ATPasique des têtes de myosine. Globalement, il en résulte une augmentation du taux et de l'amplitude de la force de contraction. De plus, l'augmentation de la phosphorylation de la phospholambane, induit une augmentation du taux de relaxation.

Adénylyl cyclase

Plusieurs formes de l'enzyme adénylyl cyclase existent, se différenciant par leur sensibilité au complexe calmoduline-calcium ou par leur taille (120 kDa-150 kDa). Une petite forme testiculaire de 46 kDa insensible à la régulation classique par le GTP, la forskoline ou la calmoduline est aussi connue mais n'a pas été clonée. Au moins huit types d'adénylyl cyclases ont été caractérisés à partir de l'ADNc cloné (type I à VIII). Environ entre 1090 et 1184 acides aminés composent les protéines codées par ces clones et la structure semble un duplicata avec 2 larges domaines hydrophobes contenant chacun 6 segments transmembranaires et 3 régions cytosoliques dont l'extrémité N-terminale. La séquence des sections transmembranaires est très différente d'une forme à l'autre. La topographie ressemble à celle des canaux calciques sensibles aux dihydropyridines, des canaux potassiques, des transporteurs du glucose, et des protéines qui jouent un rôle de transporteurs et possèdent des sites spécifiques pour l'ATP (Hanoune 1994). Les adénylyl cyclases des mammifères possèdent une similarité globale de 50%. Les travaux portant sur la localisation tissulaire des adénylyl cyclases chez le rat, par l'analyse des ARN en Northern blot, ont démontré que tous les types sont exprimés dans le cerveau. Les types IV, V et VI sont distribués plus largement dans le cerveau, le foie, le cœur, le rein, le poumon et le testicule alors que le type VII est exprimé dans le cerveau et le cœur. L'expression de l'enzyme dans des lignées cellulaires a permis de caractériser les fonctions structurelles. Les deux boucles cytoplasmiques sont indispensables à l'activité catalytique qu'elles soient exprimées indépendamment ou sous forme d'une

molécule unique. La mobilité relative des deux portions dans la membrane plasmique joue un rôle important dans l'activité de l'adénylyl cyclase et la forskoline pourrait agir sur ces phénomènes de fluidité (Iyengar 1993). L'activité des adénylyl cyclases est influencée par différents types de régulations et chaque cellule pourrait comporter plus d'un type de cyclase. L'activation de l'adénylyl cyclase est due à la sous-unité α de la protéine Gs sous la forme liant le GTP ainsi que par le complexe calmoduline-calcium qui active directement l'enzyme indépendamment des protéines G. Plus particulièrement, les adénylyl cyclases de types I et III sont activés par le complexe calmoduline-calcium. La sous-unité $\beta\gamma$ peut directement inhiber le type I mais stimule les types II et IV lorsqu'ils sont stimulés par $Gs\alpha$. De façon indirecte l'inhibition de l'activité peut être la conséquence de la libération des sous-unités $\beta\gamma$ de la G_i qui peuvent lier et donc inactiver les sous-unités α s libres. De plus, la sous-unité α_i peut inhiber directement des types d'adénylyl cyclases II, III et VI.

Désensibilisation des récepteurs

La transduction du signal β -adrénergique est régulée par les changements de l'état fonctionnel du récepteur ainsi que le nombre à la surface cellulaire. La désensibilisation du système de signalisation représente des processus par lesquels l'interaction fonctionnelle du récepteur et sa protéine G est altérée, entraînant une réduction de la réponse à une stimulation hormonale ou à un neurotransmetteur. La désensibilisation peut découler du changement de la structure des récepteurs suite à leur phosphorylation ainsi que des changements de la densité des récepteurs au niveau membranaire. L'addition et la dissociation de phosphates sont souvent les moyens de régulation de l'activité de protéines cellulaires et d'enzymes. Par exemple, le couplage à la protéine Gs du récepteur β_2 est réduit lorsqu'il est phosphorylé par la PKA. Des sites de phosphorylation ont été identifiés sur le troisième segment intracellulaire et un autre sur le terminus carboxyle. La phosphorylation peut survenir en l'absence d'agoniste et être médiée par d'autres récepteurs couplées à la Gs. Une autre famille de kinases, les kinases des récepteurs couplés aux protéines G (*G*

protein-coupled receptor kinase (GRKs)) sont aussi impliquées dans la désensibilisation entre autre des récepteurs β -adrénergiques. Au moins six différentes GRKs ont été identifiées et les GRK2 et GRK3, aussi appelée β ARK1 et β ARK2, sont les kinases des récepteurs β -adrénergiques. Chacune des GRKs diffère par sa spécificité de substrat et sa distribution tissulaire. Les caractéristiques principales de la désensibilisation par les GRKs sont la phosphorylation de récepteurs liés à un agoniste, aussi, la phosphorylation par la GRK n'affecte pas par elle-même la fonction du récepteur, mais une protéine accessoire est nécessaire, soit la β -arrestine. Le site de phosphorylation est au terminus carboxyle des récepteurs β -adrénergiques.

La modification de la densité des récepteurs à la surface de la membrane cellulaire est une façon de réguler la transduction du signal. Une stimulation prolongée des récepteurs par leur agoniste entraîne généralement une diminution du nombre total de récepteurs soit à la suite d'une augmentation de la dégradation des récepteurs ou une diminution de la synthèse. Deux processus diminuent le nombre de récepteurs au niveau de la membrane plasmique : la séquestration qui est un processus rapide et réversible (1-5 min), et la « *downregulation* » qui se produit plus lentement (heures) qui mènent à la dégradation des récepteurs dans des lysosomes. Le processus de séquestration est un processus dynamique dans lequel les récepteurs transitent entre la membrane plasmique et les endosomes, en présence d'agonistes. Le récepteur β 2 adrénergique est un récepteur membranaire qui est rapidement internalisé par les endosomes de façon réversible, à la suite de l'activation par un agoniste. Par des méthodes d'immunocytochimie il a été démontré que la disparition de la membrane du récepteur couplé à son agoniste est médiée par l'internalisation des récepteurs dans le même système endosomal où se trouvent les récepteurs de la transferrine (Von Zastrow 1992). Le processus de « *downregulation* » est moins bien caractérisé mais pourrait impliquer l'enlèvement rapide du récepteur à la membrane ainsi que d'une diminution du taux de synthèse du récepteur. Les deux processus, la séquestration et la « *downregulation* » conduisent à la désensibilisation puisque l'enlèvement des récepteurs à la membrane plasmique entraîne un accès réduit du récepteur à l'agoniste

et à la protéine G. D'autre part, la séquestration pourrait jouer un rôle dans la resensibilisation en facilitant l'enlèvement des phosphates. La phosphorylation par la PKA du récepteur $\beta 2$ pourrait faciliter la « *downregulation* » (Bouvier, 1989) alors que la séquestration du récepteur $\beta 2$ semble influencée par la phosphorylation du récepteur par la GRK. En effet une mutation négative dominante de la β ARK1 peut atténuer la phosphorylation ainsi que la séquestration du type sauvage du récepteur $\beta 2$ (Fergusson 1995).

L'évolution des méthodes de développement de souris transgéniques dans lesquelles des copies additionnelles d'un gène sont introduites dans le génome de la souris par injection pronucléaire a permis la création de plusieurs modèles de souris transgéniques surexprimant des composantes du système adrénergiques cardiaque. Les souris qui surexpriment les récepteurs $\beta 1$ et $\beta 2$ cardiaques démontrent des phénotypes distincts. La surexpression des récepteurs $\beta 2$ résulte en l'augmentation de la fonction basale myocardique en l'absence de stimulation du récepteur par un agoniste, i.e. l'activité basale de l'adénylyl cyclase, la contractilité auriculaire et la fonction ventriculaire *in vivo* sont augmentées (Milano 1994). Dans ce même modèle, la contractilité cardiaque et le rythme cardiaque de souris transgénique non traitée était similaires à ceux de souris non transgéniques dans des conditions de stimulation maximale avec l'isoprotérénol. Ainsi l'activité constitutive des récepteurs $\beta 2$ -adrénergiques pourrait contribuer à la régulation de la contractilité cardiaque *in vivo*. Cependant, le rôle de l'activité constitutive des récepteurs en moindre quantité et sous des conditions physiologiques ou pathophysiologiques reste inconnu. D'autres modèles transgéniques surexprimant β ARK1 ou un inhibiteur de β ARK1 ont été générés pour déterminer si la phosphorylation des récepteurs dépendante d'un agoniste par β ARK1 contribue à la régulation *in vivo* de la fonction de ces récepteurs. La souche qui surexprimait β ARK1 démontrait une atténuation de la contractilité ventriculaire stimulée par l'isoprotérénol, alors que les souris exprimant l'inhibiteur de β ARK1 démontrait une augmentation de la contractilité cardiaque (Koch 1995). Le

développement des modèles transgéniques pourra contribuer à la compréhension des rôles physiologiques et patophysiologiques joués par chacun des récepteurs adrénergiques. Selon les études *in vitro* dans les cultures cellulaires, les interactions complexes de phosphorylation du récepteur par différentes kinases, la séquestration et la « *downregulation* » pourraient participer à l'atténuation du signal après la stimulation du récepteur. Cependant, l'importance de ces voies de désensibilisation *in vivo* est mal connue.

L'activation de la Gs-GTPase par le récepteur β -adrénergique dans une préparation membranaire est atténuée suite à une pré-exposition des cellules à un agoniste β -adrénergique. Cette désensibilisation du récepteur β -adrénergique serait attribuée entre autres à l'action de kinases des récepteurs couplés aux protéines G (GRKs) sur la base de l'effet d'un inhibiteur de la kinase des récepteurs β -adrénergique (β ARK) et aussi puisque la substitution de récepteurs par des mutants n'ayant pas de sites de phosphorylation empêchait cette désensibilisation (Lohse 1990; Bouvier 1988). D'autre part une surexpression de β ARK et de la β -arrestine augmenterait la désensibilisation du récepteur β -adrénergique (Pippig 1993). La désensibilisation du récepteur β -adrénergique est aussi due à la séquestration des récepteurs et par leur phosphorylation par la PKA. Aussi, ces trois voies de désensibilisation seraient indépendantes puisque chacune est inhibée par des inhibiteurs spécifiques et par la mutation de sites spécifiques.

2.3.2. Système rénine-angiotensine

2.3.2.1. Biosynthèse de l'angiotensine II et voie de signalisation

Le système rénine-angiotensine (SRA) est responsable de plusieurs actions physiologiques telles qu'un effet tonique sur les cellules musculaires lisses vasculaires, la sécrétion d'aldostérone par les glandes surrénales, et, la réabsorption de sodium par les cellules tubulaires rénales et la rétention d'eau (balance hydrique et électrolytique). Le SRA est une cascade protéolytique dont l'angiotensine II qui est le produit final principal de cette voie de synthèse est un octapeptide vasopresseur.

Aussi, l'angiotensine II serait impliquée dans des effets inotropes et hypertrophiques dans les cellules vasculaires et cardiaques. L'angiotensine II pourrait être un régulateur de la croissance et de la prolifération cellulaire, avec l'habileté de stimuler la phosphorylation de la tyrosine, activer les MAP kinases, et induire les proto-oncogènes (Huckle 1994). L'angiotensine II contribue à la régulation du système cardio-vasculaire par ses effets presseurs résultant de divers mécanismes : la vasoconstriction, la libération d'aldostérone, l'équilibre de fluides ainsi que la facilitation de transmission nerveuse sympathique (Tableau 1). La réponse pressive à l'angiotensine II implique un effet vasoconstricteur direct sur les cellules musculaires lisses vasculaires et un effet indirect résultant de ses actions centrales qui augmentent la tension artérielle et/ou induisent une altération de la réponse réflexe bradycardisante à une augmentation de la tension artérielle. De plus, ce peptide joue un rôle important dans le remodelage vasculaire et cardiaque. Une activation inappropriée du SRA dans les tissus, par exemple, suite à une lésion comme un infarctus du myocarde ou d'autres mécanismes liés au vieillissement, peut entraîner des altérations de la fonction et de la structure des tissus cardiaques et des vaisseaux sanguins; par exemple, le remodelage tissulaire menant à l'hypertrophie ventriculaire gauche, et l'épaississement de vaisseaux majeurs et la perte de compliance, conduisant à une augmentation de la résistance vasculaire périphérique totale. Le SRA assume un rôle primordial dans le maintien de l'homéostasie cardio-vasculaire et l'importance d'une anomalie de son fonctionnement dans les maladies cardiovasculaires a été démontrée par l'effet bénéfique de l'inhibition de son activité.

Tableau I. Interactions entre le système nerveux autonome central et périphérique et le système rénine angiotensine.

Sites	Actions de l'angiotensine II
Terminaison nerveuse sympathique	<ul style="list-style-type: none"> . Facilitation présynaptique de la synthèse et de la libération de noradrénaline . Inhibition de la recapture de noradrénaline
Cerveau	<ul style="list-style-type: none"> . Augmentation de la décharge sympathique . Atténuation du contrôle baroréflexe de la fréquence cardiaque . Inhibition du tonus vagal cardiaque . Stimulation de la dipsogénie et de la libération de vasopressine
Coeur	<ul style="list-style-type: none"> . Augmentation de la contractilité . Développement de l'hypertrophie ventriculaire . Facilitation de la neurotransmission sympathique . Inhibition de l'action du vague sur le coeur
Artère	<ul style="list-style-type: none"> . Stimulation de la vasoconstriction . Stimulation de la croissance cellulaire . Augmentation de la vasoconstriction α-adrénergique
Surrénale	<ul style="list-style-type: none"> . Stimulation de la libération des catécholamines . Stimulation de la sécrétion d'aldostérone
Rein	<ul style="list-style-type: none"> . Stimulation des fonctions des tubules proximaux . Stimulation de la constriction des artérioles efférentes

Il est maintenant établi que le SRA n'est pas seulement un système endocrinien retrouvé dans la circulation mais plusieurs de ses éléments, comme l'angiotensinogène, la rénine, l'angiotensine I, l'enzyme de conversion et/ou l'angiotensine II, sont aussi présents dans plusieurs tissus et organes tels que le cerveau, le coeur, les artères, le rein et les glandes surrénales. L'angiotensine II est aussi décrite comme une hormone peptidique intracrine, c'est-à-dire qui agit au niveau intracellulaire peu importe que l'hormone soit synthétisée par la cellule même ou soit internalisée (Re 1984). Dans le coeur, les deux manières intracrines ont été démontrées, l'internalisation et la liaison nucléaire de l'angiotensine par les myocytes, de même que la production intracellulaire d'angiotensine (Re 2002; Robertson 1995). Le spectre du rôle de l'angiotensine II est d'autant plus large et varié que sa biologie cellulaire et moléculaire est mieux comprise, et qu'il est pratiquement établi maintenant qu'il existe différentes routes enzymatiques pour sa génération, qu'il y a différents récepteurs distribués dans différents tissus, qu'il y a différents mécanismes de régulation des récepteurs, et, qu'il y a différentes voies de signalisation.

L'angiotensine II est principalement dérivée d'une protéine précurseur, l'angiotensinogène, dont la seule fonction semble de servir comme seul substrat pour la rénine, une protéase qui en forme l'angiotensine I. La génération d'angiotensine à partir de l'angiotensinogène serait l'étape limitante dans le SRA (Clouser 1989). Quoique le foie fut reconnu comme le site majeur de la synthèse de l'angiotensinogène, la présence de son ARN messager a été démontrée dans plusieurs tissus suggérant ainsi que l'angiotensinogène peut conduire à la formation d'angiotensine dans plusieurs tissus (Tewksbury 1990). Quand à la rénine, cette enzyme est synthétisée dans les cellules juxtaglomérulaires du rein et sa libération est contrôlée par le système nerveux, la pression sanguine, la concentration tubulaire rénale de chlore et l'angiotensine II plasmatique. La rénine n'aurait d'autres substrats que l'angiotensinogène et l'angiotensinogène ne réagirait principalement qu'avec la rénine. La rénine fait partie de la famille des protéases acides, cependant, elle agit

sur l'angiotensinogène qui est présent dans le plasma dont le pH est neutre. Il a été proposé que la rénine n'agirait pas directement dans le plasma mais lorsque associée à la surface des cellules endothéliales (Dzau 1987), quoique *in vitro* la rénine démontrerait une activité optimum à pH neutre. Néanmoins, le taux de production de l'angiotensine I est linéairement dépendant du substrat, l'angiotensinogène, ainsi que de la concentration enzymatique. L'angiotensine I sert à son tour de substrat pour l'enzyme de conversion de l'angiotensine (ECA) et est rapidement transformée pour donner l'angiotensine II. L'ECA fut d'abord défini comme un ectoenzyme lié à la surface des cellules endothéliales vasculaires en contact avec le plasma, et contribue par conséquent à un apport constant d'angiotensine I.

L'existence d'un SRA tissulaire est bien documentée pour plusieurs espèces animales (Campbell 1987) ainsi que chez l'humain (Taddei 1991). Des SRA endogènes sont présents localement dans plusieurs types tissulaires et exercent des influences autocrines et paracrines sur les fonctions locales tissulaires (Dzau 1988). Il a été aussi suggéré que les SRA opéreraient en entier ou en partie indépendamment du SRA circulant. Il n'est pas encore bien établi, si le SRA local ou tissulaire est en soit un système autonome dont les éléments enzymatiques principaux comme la rénine et l'angiotensinogène seraient synthétisés par le tissu ou si ces éléments seraient dérivés de la circulation sanguine. Les SRA circulants et tissulaires peuvent agir en s'intégrant dans la génération de l'angiotensine II. Les évidences de la provenance de la rénine sont si divergentes qu'elle est toujours le sujet de débats actuels. La présence de l'ARN messenger de tous les éléments du SRA a été démontrée dans la paroi vasculaire et la production de rénine active et d'angiotensine II a été démontrée dans des cultures cellulaires endothéliales et de muscle lisse vasculaire (Samani 1987, Assad 1982, Lilly 1985, Saio 1989). Cependant, des études *in vivo* suggèrent que l'activité vasculaire du SRA est abolie après une néphrectomie, suggérant que la rénine active qui se trouvait dans la paroi vasculaire était principalement dérivée de la production rénale (Li 1991). Ainsi la rénine active serait captée par les tissus de la circulation. Dans une étude chez des patients hypertendus, il a été rapporté que la

libération de rénine et d'angiotensine II dans la circulation de l'avant-bras induite par une stimulation des récepteurs β -adrénergiques était en corrélation directe avec le profil de l'activité plasmatique de la rénine (Taddei 1993). Ainsi la rénine vasculaire locale pourrait être partiellement dérivée de la rénine circulante. Quoiqu'il en soit, une fois que la rénine active est présente dans les tissus, elle peut induire la production d'angiotensine II et le SRA local possède donc un rôle physiologique.

Ainsi, les évidences suggèrent un modèle de SRA endocrine versus paracrine/autocrine plutôt que de SRA plasmatique versus tissulaire (Unger 1991). En effet, l'angiotensine II serait générée par l'ECA à la surface externe des cellules endothéliales peu importe si le précurseur angiotensine I est produit au niveau intracellulaire ou dans la circulation. Ainsi les inhibiteurs de l'ECA peuvent inhiber autant la formation et l'action d'angiotensine II endocrine et paracrine.

L'ECA est aussi appelé kininase II parce qu'il est aussi responsable pour la dégradation de la bradykinine, un vasodilatateur puissant. Ainsi l'ECA a un double rôle dans l'élévation de la tension artérielle, en générant l'angiotensine II et en inactivant la bradykinine. Ainsi, il n'est pas étonnant que les inhibiteurs de l'ECA soient des antihypertenseurs efficaces. Cependant, chez les sujets sains, ces inhibiteurs n'affectent pas la tension artérielle significativement. Aussi, la possibilité que d'autres enzymes que l'ECA génèrent l'angiotensine II à partir de son précurseur ou que l'expression d'ECA soit augmentée, peut expliquer le retour à la normal des taux plasmatiques d'angiotensine II suite à une thérapie chronique aux inhibiteurs de l'ECA (Dzau 1993). La conversion de l'angiotensine I en angiotensine II par l'ECA n'est pas exclusive et les voies alternatives de formation de l'angiotensine II tissulaire incluent les chymases présentes dans les espaces interstitielles du coeur et des vaisseaux et contrôleraient la production d'angiotensine II différemment de l'enzyme de conversion dans divers compartiments cellulaires. Il a été démontré que le tissu cardiaque contient une sérine-protéase qui semble être un enzyme majeur pour la production cardiaque de l'angiotensine II. Cet enzyme est une chymase membre de

la sous-famille des chymotrypsines et serait spécifique pour l'angiotensine I (Dzau 1993). D'autres enzymes, incluant la tonine, l'élastase, la kallikréine l'activateur de la plasminogène tissulaire et la cathepsine G peuvent tous former l'angiotensine II directement de l'angiotensinogène. Le rôle et la contribution des ces différents systèmes dans le contrôle de la tension artérielle ou toute autre fonction de l'angiotensine II restent encore méconnues. Quoiqu'il en soit il reste intéressant que la constante de spécificité de la chymase cardiaque humaine qui mesure son efficacité de production de l'angiotensine II, est plus grande que celle de l'ECA, et, il semblerait que la chymase cardiaque serait responsable de 80% de la formation d'angiotensine II dans le tissu cardiaque humain (Urata 1990; Wolny 1997).

Initialement on attribuait l'action antihypertensive des inhibiteurs du SRA dans les conditions pathologiques où l'élévation du SRA plasmatique contribue au développement et au maintien de l'hypertension. Les études chez des sujets hypertendus et chez des modèles animaux ont démontré que la tension artérielle peut être réduite par des inhibiteurs de l'ECA indépendamment d'une stimulation ou non du SRA plasmatique (Keuneke 1990). Ceci peut être dû à l'inhibition de la production locale d'angiotensine II tissulaire. Aussi, il a été rapporté que l'importance et la durée de la réduction de la tension artérielle corrélaient mieux avec l'inhibition de l'activité du SRA tissulaire qu'avec l'inhibition de l'activité du SRA plasmatique (Dzau 1988).

Les actions biologiques du SRA sont surtout attribuées aux effets de l'angiotensine II et sa liaison à des récepteurs spécifiques. Il existe au moins deux récepteurs pour l'angiotensine II, le sous type 1 (AT1) et le sous type 2 (AT2). Le récepteur de l'angiotensine AT1 est principalement responsable des effets cardiovasculaires et rénaux de l'angiotensine II (de Gasparo 2000). La structure du récepteur AT1 est typique d'un récepteur à 7 domaines transmembranaires dont certains comme les deuxièmes et troisièmes boucles sont responsables du couplage avec les protéines G. La majorité des fonctions physiologiques sont exprimées via l'activation de la phospholipase C médiée par les protéines Gq. Ainsi il en résulte la

génération d'IP₃, responsable de la libération de calcium des réserves intracellulaires, et, en la génération de diacylglycérol qui facilite l'activation de protéine kinase C et une augmentation des niveaux de calcium intracellulaire par les canaux calciques de type L (Saward 1997). Le récepteur AT₁ est exprimé dans plusieurs tissus. Sa distribution dans le cœur et les vaisseaux est consistante avec les effets inotropes, chronotropes et vasomoteurs qui sont reconnus à l'angiotensine II (Zhuo 1994). En effet, la vasoconstriction coronarienne et les effets trophiques myocardiques dans le développement de l'hypertrophie cardiaque de l'angiotensine II sont médiés par le récepteur AT₁ (Kobayashi 1978).

Le récepteur AT₁, qui stimule la phospholipase C ou inhibe l'adénylyl cyclase, est impliqué dans la réponse hémodynamique aiguë et la réponse hypertrophique à long terme de l'angiotensine II. L'angiotensine pourrait donc être une cible majeure dans le développement de traitements pharmacologiques de l'hypertension artérielle et des maladies cardio-vasculaires associées aux organes cibles. D'ailleurs plusieurs des inhibiteurs de l'enzyme de conversion et des antagonistes non-peptidiques sélectifs pour le récepteur AT₁ sont disponibles en clinique.

2.3.3. Interaction entre le SRA et SNS

Le SRA interagit avec plusieurs autres systèmes impliqués dans le contrôle de la tension artérielle tel que le système nerveux sympathique (SNS). Les interactions entre le SRA et le SNS ont lieu tant au niveau des mécanismes centraux qu'au niveau des mécanismes périphériques présynaptiques et postsynaptiques des terminaisons nerveuses sympathiques (K.-Laflamme 1998a). En effet, l'angiotensine II interagit avec les mécanismes baroréflexes du contrôle du rythme cardiaque et facilite la neurotransmission au niveau des terminaisons nerveuses, des ganglions, de la médullosurrénale et augmente la décharge sympathique du système nerveux central (Reid, 1992). Cette facilitation peut résulter soit d'une diminution de la recapture présynaptique, par une augmentation de la biosynthèse de catécholamines, par une facilitation de la libération de catécholamines via les récepteurs présynaptiques AT₁

ou soit par une augmentation de la sensibilité des effecteurs postsynaptiques (Saxena 1992 ; Story 1987). Outre cela, la sécrétion de rénine par les reins est sous l'influence d'un contrôle neuronal (Zanchetti 1977). Ainsi le système nerveux sympathique est un des facteurs pouvant déterminer les taux de libération de rénine et d'angiotensine II localement et par conséquent de l'activité du SRA. Ceci a été démontré entre autres par l'augmentation de la libération de rénine à la suite d'une activation des récepteurs β -adrénergiques des cellules juxtaglomérulaires ainsi que vasculaires (Davis 1976, Taddei 1992).

Ainsi, l'angiotensine II produite localement exerce un effet facilitateur sur la neurotransmission sympathique périphérique et les récepteurs β -adrénergiques pourraient être impliqués dans la relation entre les deux systèmes.

L'étiologie du développement de l'hypertension artérielle est encore mal définie. Les mécanismes de la pathogenèse de l'hypertension englobent une augmentation du tonus sympathique qui peut résulter d'une augmentation de la facilitation et/ou d'une diminution de la modulation négative de la transmission adrénérique. En plus d'une augmentation de l'efflux du système nerveux sympathique en provenance du système nerveux central, d'autres influences contribuent à la concentration synaptique élevée de noradrénaline tel qu'une augmentation des influences neuromodulatrices de l'angiotensine et de l'adrénaline co-libérée et une recapture neuronale de la noradrénaline déficiente. Une augmentation de l'activité sympathique serait responsable à la fois de l'initiation et du maintien de l'élévation de la tension artérielle et contribuerait aussi à des événements cardio-vasculaires néfastes. L'inhibition du SRA dans certaines circonstances semble pouvoir réduire l'activité du système nerveux sympathique. Le SRA serait donc impliqué et plus particulièrement avec un rôle important des SRA locaux, en plus de leurs interactions avec d'autres systèmes. Les interactions décrites entre le SNS et le SRA peuvent contribuer de façon synergique dans le développement et le maintien de l'hypertension artérielle et

par le fait même, expliquer certains mécanismes d'actions de substances pharmacologiques interférant avec ces systèmes.

2.3.3.1. Modulation du système nerveux autonome central

Des changements dans les taux d'hormones circulantes ou de neurotransmetteurs centraux peuvent altérer la fonction baroréflexe en agissant sur les sites centraux impliqués dans le contrôle cardio-vasculaire (Bishop 1991). Dans plusieurs modèles expérimentaux et chez les patients hypertendus, il est clairement établi que le seuil d'activation du baroréflexe artériel est réajusté à des niveaux de tension artérielle plus élevés (Liard 1980). D'autre part, l'action potentielle de l'angiotensine II au niveau central serait d'atténuer la régulation négative de l'activité sympathique efférente et du rythme cardiaque induite par l'activation du barorécepteur et de l'arc baroréflexe. D'ailleurs il a été rapporté que le contrôle baroréflexe du rythme cardiaque relativement à une augmentation de la tension artérielle était altéré après l'administration au niveau central d'angiotensine II, et ceci était suggéré par la réduction de la réponse bradycardisante réflexe à la phényléphrine ainsi que par une réponse exagérée à l'hypotension (Guo 1984; Goldsmith 1991). Ainsi des évidences expérimentales suggèrent la contribution d'une hyperactivité du SRA au niveau central dans la modification du fonctionnement du contrôle baroréflexe du rythme cardiaque dans le développement et/ou le maintien de l'hypertension artérielle. De plus, il a été suggéré que l'angiotensine II endogène périphérique contribuerait aussi à l'atténuation des fonctions baroréflexes chez les rats génétiquement hypertendus de la souche SHR (*Spontaneously Hypertensive Rats*) (Kawano 1994). Par conséquent, si l'angiotensine II endogène agit sur les centres cardio-vasculaires et atténue les baroréflexes, la réduction de la biosynthèse d'angiotensine II ou le blocage de ses récepteurs pourrait augmenter ou normaliser la sensibilité des baroréflexes. Puisque les sites sensibles à l'action de l'angiotensine au niveau central sont richement vascularisés par des vaisseaux particulièrement fenestrés, ces sites sont donc dépourvus d'une barrière hémato-encéphalique et peuvent réagir soit à l'angiotensine produite localement soit à l'angiotensine de la circulation périphérique (Unger 1988).

Plusieurs évidences suggèrent que l'action centrale de l'angiotensine II implique l'*area postrema* et que l'ablation de cette structure abolit l'effet de l'angiotensine II sur la fonction du baroréflexe (Matsukawa 1990). Ainsi, l'action de l'angiotensine sur l'arc baroréflexe peut expliquer pourquoi l'administration d'angiotensine II cause l'augmentation de la tension artérielle sans induire une bradycardie réflexe. Il semblerait que l'administration chronique d'angiotensine II conduirait à l'augmentation de la tension artérielle d'abord par son effet vasoconstricteur direct qui serait le facteur initial dominant alors que dans la phase chronique du développement de l'hypertension dans un tel modèle, le facteur neurogénique impliquant l'*area postrema* serait dominant (Cox 1991). De plus, le réajustement du seuil d'activation du baroréflexe sympathique est aboli en présence de lésions dans la région de l'*area postrema* (Cox 1991). L'atténuation du baroréflexe sympathique et du contrôle réflexe du rythme cardiaque serait responsable du maintien de l'hypertension. D'autre part, il a été démontré que l'*area postrema* chez les SHR contenait une densité de récepteurs pour l'angiotensine II plus élevée que chez les rats normotendus Wistar-Kyoto suggérant encore une fois un rôle pour l'angiotensine II dans l'altération de la fonction du baroréflexe particulièrement dans l'hypertension artérielle (Andrews 1993).

En plus de faciliter l'activité sympathique, l'angiotensine II peut inhiber l'activité vagale centrale et périphérique modulant le rythme cardiaque. En effet, il a été démontré par l'analyse de la variabilité du rythme cardiaque dans ses domaines de fréquences et de temps que la modulation vagale du rythme cardiaque était atténuée alors que la modulation sympathique était augmentée pendant l'infusion d'angiotensine II comparativement aux réponses à l'infusion de phényléphrine chez des sujets sains (Townend 1995). Ainsi une partie de l'atténuation de la bradycardie en réponse à l'infusion d'angiotensine II peut être causée par l'inhibition de l'activité parasympathique cardiaque. Dans des conditions expérimentales chez l'animal, où l'on peut mesurer directement l'activité du nerf vague, il avait été démontré que l'augmentation de cette activité en réponse à une augmentation de la tension artérielle par l'angiotensine II était réduite comparativement à la réponse à une augmentation de

la tension artérielle par la phényléphrine suggérant ainsi l'inhibition de l'activité vagale centrale (Lumbers 1979). Une action inhibitrice de l'angiotensine II sur la stimulation du nerf vague périphérique a aussi été démontrée dans des conditions expérimentales par la réduction de la diminution du rythme cardiaque (Potter 1982). De plus, le traitement avec des inhibiteurs du SRA augmente l'activité parasympathique cardiaque chez des volontaires normotendus et des patients insuffisants cardiaques (Campbell 1985, Osterziel 1990).

Une partie de l'effet bénéfique des bloqueurs du SRA dans le traitement de l'hypertension pourrait résulter d'une interaction avec l'activité du SRA central. Quoique le traitement chronique avec un bloqueur des récepteurs AT₁ dans un modèle expérimental d'hypertension réduit la tension artérielle et normalise la fonction baroréflexe, il n'est pas clairement établi si le blocage fonctionnel des récepteurs AT₁ centraux est associé avec la normalisation de la fonction baroréflexe (Bartholomeusz 1995). Nous avons déjà rapporté un tonus et une réactivité sympathique accrus chez des patients hypertendus suggérant une diminution de la sensibilité des mécanismes baroréflexes et/ou une augmentation de la sensibilité des mécanismes présynaptiques facilitateurs (de Champlain 1994). Le traitement avec un inhibiteur de l'enzyme de conversion dans cette étude était accompagné par une réduction de la réponse sympathique à l'hypotension suggérant une normalisation du seuil d'activation du baroréflexe qui pourrait participer à l'effet hypotenseur. De plus, il a aussi été démontré que dans un modèle d'hypertension rénale, le traitement avec des bloqueurs du SRA résultait en une réduction de l'activation des nerfs sympathiques comparativement à des rats traités avec le nitroprussiate de sodium, un vasodilatateur direct (Niederberger 1995). En résumé, ces résultats suggèrent que l'activité basale du système sympathique n'est pas le seul facteur impliqué dans l'hypertension mais que le SRA est également directement impliqué dans l'hyperréactivité sympathique associée à l'hypertension. Le réajustement du seuil d'activation du contrôle baroréflexe du rythme cardiaque vers des tensions artérielles plus basses a été observé dans l'hypertension autant rénine-dépendante que rénine-

indépendante et peut contribuer à l'effet antihypertenseur des bloqueurs de l'angiotensine. De plus, l'absence de tachycardie réflexe et l'augmentation de la sensibilité du baroréflexe observées chez des patients atteints d'insuffisance cardiaque traités avec des inhibiteurs de l'enzyme de conversion pourraient résulter de l'amélioration de la balance sympatho-vagale (Osterziel 1990).

2.3.3.2. Modulation du système nerveux sympathique périphérique

Le SRA facilite la neurotransmission du système nerveux sympathique périphérique en agissant sur les fonctions présynaptiques et postsynaptiques de la terminaison nerveuse sympathique (Figure 3). L'administration d'angiotensine II dans des modèles expérimentaux induit l'augmentation des concentrations plasmatiques d'adrénaline et de noradrénaline libérées par les médullosurrénales. Cet effet semble résulter d'une action directe du peptide qui peut être bloqué par le losartan, un antagoniste des récepteurs AT₁ (Wong 1990). La facilitation de la neurotransmission sympathique par l'action de l'angiotensine II sur des mécanismes présynaptiques tels que la libération ou la recapture de la noradrénaline par les terminaisons nerveuses a été démontrée dans plusieurs tissus (le coeur, le muscle lisse vasculaire et le rein) et dans plusieurs espèces incluant l'humain. Dans les oreillettes isolées de rats, nous avons démontré l'effet facilitateur de l'angiotensine II par ses récepteurs AT₁ sur la libération de noradrénaline par les terminaisons nerveuses sympathiques induite par la stimulation électrique (Foucart 1996). Dans cette étude, la modulation facilitatrice présynaptique par l'angiotensine II démontrait une plus grande sensibilité dans la souche de rats génétiquement hypertendus (SHR) comparativement à leur souche contrôle Wistar-Kyoto, et le traitement chronique avec le losartan, un inhibiteur des récepteurs AT₁, inhibait la facilitation induite par l'angiotensine II exogène sur la libération de noradrénaline. Un autre mécanisme par lequel l'angiotensine II peut faciliter la neurotransmission sympathique est par l'inhibition de la recapture de la noradrénaline. Ce phénomène a été observé dans plusieurs tissus comme le myocarde mais n'est pas encore bien compris (Peach 1969).

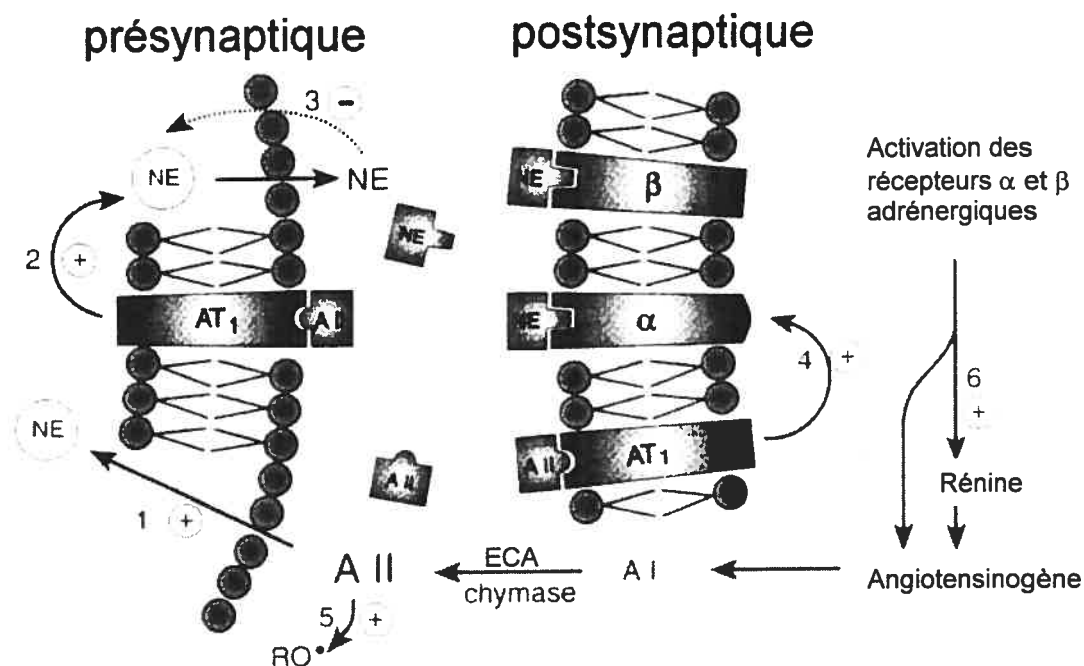


Figure 3: Interactions entre le système rénine-angiotensine et le système nerveux sympathique au niveau de la terminaison nerveuse, sur les sites pré- et postsynaptiques. L'angiotensine II peut : 1) augmenter la synthèse de norépinéphrine (NE) *, 2) augmenter la libération de NE induite par une stimulation électrique, 3) inhiber la recapture de NE, 4) augmenter la réponse à une stimulation α -adrénergique et 5) stimuler la génération de radicaux libres ($RO\cdot$). L'activation des récepteurs adrénergiques peut stimuler la formation d'angiotensine II dans plusieurs tissus (6). AI: angiotensine I; AII: angiotensine II; ECA: enzyme de conversion de l'angiotensine; (+) potentialisation; (-) inhibition. Les lignes pleines indiquent des mécanismes clairement établis (2,4,5,6); les lignes pointillées indiquent des mécanismes encore hypothétiques (1,3). (Figure adaptée d'après K.-Laflamme A et de Champlain J: Interactions des systèmes sympathiques et rénine-angiotensine. *Thérapie*, 1998a; 53: 245-252.)

* Le terme NE de cette figure fait référence à la norépinéphrine pour décrire le neurotransmetteur sympathique. Noter l'équivalence avec le terme noradrénaline tel que décrit dans le corps de la présente thèse.

L'augmentation de l'activité du système nerveux sympathique peut conduire à la désensibilisation des récepteurs β -adrénergiques. En effet, la désensibilisation ou le découplage des récepteurs β -adrénergiques a été démontré dans plusieurs modèles d'hypertension artérielle chronique et d'insuffisance cardiaque. Puisque l'angiotensine II facilite la neurotransmission sympathique, la diminution de la réactivité sympathique par le blocage du SRA pourrait contribuer à la normalisation de l'affinité des récepteurs β -adrénergiques cardiaques. Nos études ainsi que celles de plusieurs chercheurs ont démontré que le traitement avec un inhibiteur de l'ECA dans l'hypertension et l'insuffisance cardiaque augmentait la sensibilité et/ou la densité des récepteurs β -adrénergiques qui étaient réduites dans ces états pathologiques (de Champlain 1994, Horn 1988, Gilbert 1988). De plus, une modification de la densité relative des sous-types de récepteurs β_1 et β_2 a été observée dans le développement de l'hypertension chez les SHR, les rats DOCA-sel et dans l'insuffisance cardiaque chez l'humain et ceci s'exprimait par une augmentation de la proportion des récepteurs β_2 -adrénergiques (Brodde 1991, Michel 1987, Yamada 1984, Nguyen 1995). Dans les situations où les taux d'adrénaline seraient augmentés, l'activation des récepteurs β_2 -adrénergiques pourrait soit maintenir une réponse physiologique, soit compenser la perte de récepteurs β_1 -adrénergiques pour maintenir la contractilité ou soit faciliter la neurotransmission présynaptique et contribuer au le développement de l'hypertension. L'effet sympatholytique du blocage du SRA pourrait induire la resensibilisation ainsi que la normalisation de la proportion des sous-types de récepteurs adrénergiques et des fonctions β -adrénergiques.

La facilitation postsynaptique de la neurotransmission sympathique par l'angiotensine II a été proposée pour les récepteurs α_1 - et α_2 -adrénergiques dans les lits vasculaires (van Zwieten 1986). Plusieurs études ont démontré que le blocage des récepteurs AT_1 atténue la réponse contractile de la phényléphrine. Le traitement avec le losartan chez le lapin atténue l'augmentation de la tension artérielle induite par la phényléphrine et réduit la diminution du diamètre et du débit induite par la

phényléphrine dans les artères mésentériques chez les SHR et les WKY suggérant ainsi que l'angiotensine II potentialise la réponse à la phényléphrine (Madwed 1994, Qiu 1994). L'augmentation de la concentration intracellulaire de calcium et de l'activité de la protéine kinase C dans les cellules musculaires lisses pourraient être impliquées (Laher 1990). Ainsi, quoique l'effet hypotenseur du traitement avec le losartan dans l'hypertension expérimentale et chez l'humain est principalement attribué à son effet bloqueur des récepteurs AT_1 , d'autres mécanismes comme l'effet facilitateur de l'angiotensine II dans l'action vasoconstrictrice d'agonistes α -adrénergiques seraient aussi impliqués dans la réduction de la fonction nerveuse sympathique. Dans les cellules musculaires lisses de rats il a aussi été rapporté que l'angiotensine II induit la transcription et l'expression des récepteurs α_1 -adrénergiques (Hu 1995). D'autres parts, outre l'interaction dans l'effet presseur entre ces systèmes de signalisation, il semble aussi que chacun ait un effet inducteur de la voie de signalisation facilitant la transcription et l'expression de protéines ou la synthèse d'ADN (par exemple Jak/STAT) et que les deux voies pourraient interagir sur les mêmes messagers tel que démontré par la réduction de la synthèse d'ADN induite par l'angiotensine II dans les cellules musculaires lisses en présence d'un antagoniste α_1 -adrénergiques et par conséquent il y aurait une interaction dans le processus de remodelage (Sasaguri 2000 ; van Kleef 1992).

L'effet des inhibiteurs de l'enzyme de conversion sur la fonction d'un tissu en particulier peut représenter une réduction locale des niveaux d'angiotensine II, mais peut aussi être indirect, résultant de l'interruption d'un processus dépendant de l'angiotensine II tel que une diminution de l'activité du nerf sympathique.

En résumé, l'angiotensine II peut exercer diverses actions sur les terminaisons nerveuses sympathiques et les cellules effectrices, telle que la facilitation de la réponse à une stimulation sympathique. Il semble évident que l'angiotensine II endogène facilite la transmission sympathique. Physiologiquement, le rôle et l'importance de l'angiotensine II dans l'augmentation de la transmission sympathique

et sa contribution dans les réponses cardio-vasculaires à la stimulation sympathique reste encore à déterminer. Aussi, à l'inverse, l'importance de la contribution du système nerveux sympathique à la réponse pressive à l'angiotensine II sera aussi à déterminer.

2.3.4. Facteurs dérivés de l'endothélium

La surface interne du myocarde et celle de la totalité du système vasculaire, soit la surface en contact avec le sang dans les cavités cardiaques, est tapissée par une fine couche de cellules endothéliales. La situation physiologique de l'endothélium met en évidence son rôle qui ne se limite pas seulement au contrôle de la fonction des éléments cellulaires de la circulation et le niveau plasmatique des hormones, mais comprend aussi l'intégration et la transmission des signaux provenant de la circulation ou des tissus sous-jacents. Les cellules endothéliales exercent une régulation locale importante en sécrétant des substances qui affectent le tonus des cellules musculaires sous-jacentes ainsi que l'adhésion et l'agrégation des plaquettes et la prolifération cellulaire, ce qui lui confère son rôle protecteur en maintenant les fonctions physiologiques normales. Ainsi l'endothélium peut moduler les fonctions et les structures cardio-vasculaires.

Les travaux de Furchgott ont mis en évidence que la relaxation vasculaire induite par l'acétylcholine était dépendante de la présence de l'endothélium donnant ainsi toute son importance au rôle de l'endothélium dans la régulation de la vasomotion. Furchgott et Zawadzki (1980) ont découvert un facteur de relaxation dérivé de l'endothélium (EDRF) qui fut par la suite identifié comme étant le monoxyde d'azote (NO). Il est maintenant bien établi que les cellules endothéliales peuvent répondre à divers stimuli par la libération de substances vasoactives influençant le contrôle local du tonus.

Les cellules endothéliales peuvent aussi libérer une substance qui induit une hyperpolarisation du muscle lisse vasculaire et sa relaxation, et cette substance est connue sous le nom de facteur hyperpolarisant dérivé de l'endothélium (EDHF) (Cohen 1995). La voie de signalisation intracellulaire qui induit la synthèse de l'EDHF n'est pas tout à fait connue mais pourrait impliquer une augmentation de la concentration de calcium intracellulaire. De la même façon, la formation et la libération de prostacycline dépendent aussi de la libération de calcium par les réserves intracellulaires (Parsaee 1992). Ainsi les facteurs relaxants jouent un rôle physiologique important dans la régulation de la circulation mais aussi dans certaines pathologies telles que l'hypertension, l'athérosclérose, les lésions de reperfusion.

L'activation des cellules endothéliales peut aussi résulter en la production de facteurs contractants (EDCF) tels que l'angiotensine, l'endothéline ou des facteurs dérivés de la cyclo-oxygénase comme les prostanoïdes (prostaglandine H₂, thromboxane A₂) ou les anions superoxydes (Lüscher 1990). L'anion superoxyde induit la contraction du muscle lisse soit directement en contrebalançant l'effet relaxant du NO ou soit en altérant la fonction endothéliale en inactivant le NO (en causant son catabolisme).

Une atténuation de la relaxation endothélium-dépendante a été observée et clairement établie dans plusieurs études portant sur des modèles expérimentaux d'hypertension et chez les patients hypertendus (Vanhoutte 1989). Cette anomalie est observée pour plusieurs agonistes différents qui agissent sur des récepteurs et des voies de signalisation différentes ce qui généralise le trouble de la fonction endothéliale impliquant une altération de la voie de la L-arginine-NO et la production d'EDCF (Taddei 1997). L'endothélium perd donc ainsi ses propriétés protectrices qui maintenaient une dilatation et prévenaient l'adhésion plaquettaire ainsi que la prolifération et la migration des cellules musculaires lisses. La normalisation de la tension artérielle avec des médicaments antihypertenseurs n'implique pas nécessairement une normalisation de la réponse endothéliale aux vasodilatateurs,

quoique cet effet bénéfique serait aussi souhaitable pour la réduction des facteurs de risques cardio-vasculaires.

2.3.4.1. Monoxyde d'azote

Le monoxyde d'azote (NO) a été identifié comme une importante molécule de signalisation. Jusqu'à présent trois isoformes de la synthase du NO (NOS) ont été identifiées : la NOS neuronale (NOS_n, type I), la NOS inductible (NOS_i, type II) et la NOS endothéliale (NOS_e, type III).

Le NO est synthétisé par la NO synthase (NOS) qui catalyse la conversion de la L-arginine en L-citrulline. L'activation de la NOS endothéliale constitutive dépend de sa liaison calcium-dépendante à la calmoduline. Par conséquent, les stimuli qui augmentent la concentration calcique sont susceptibles d'activer cette NOS. Le NO induit la relaxation du muscle lisse vasculaire via l'activation de la guanylyl cyclase soluble, soit localement ou après sa diffusion aux cellules adjacentes, résultant en l'augmentation de GMP cyclique. Les cellules endothéliales peuvent être stimulées pour produire et libérer le NO par des agonistes tels que l'acétylcholine, la bradykinine, la substance P et la sérotonine. En plus de son rôle dans le contrôle du tonus vasculaire, le NO inhibe l'agrégation plaquettaire, la formation de thrombus, l'adhésion des leucocytes et la prolifération des vaisseaux sanguins. Le NO est donc important dans le maintien de l'homéostasie vasculaire (Moncada 1993; Loscarzo 1995). Une libération permanente de NO devrait en théorie réduire la rigidité artérielle et augmenter la compliance artérielle. Plusieurs études chez les animaux et les humains (Zeiger 1993) ont démontré que les maladies cardio-vasculaires sont associées avec une production anormale de NO suggérant la participation de cette anomalie dans le développement de pathologies.

Le NO joue un rôle important dans le contrôle de la fonction du système nerveux autonome périphérique et est aussi un élément important dans la signalisation

du système nerveux central, pouvant affecter les réponses du système nerveux autonome. La NOS_n serait présente dans des régions spécifiques du cerveau, impliquées dans le contrôle de la tension artérielle.

Au niveau cardiaque, la contractilité basale du muscle papillaire isolé ou des cellules myocardiques ainsi que la contractilité stimulée par le système β -adrénergique, sont réduites par l'action du NO exogène ou endogène (Brady 1993, Mohan 1996). La libération de NO par l'endothélium endocardique ainsi que des analogues du GMP cyclique ont démontré une action de réduction de la durée de la contraction du muscle cardiaque et des myocytes (Shah 1991, Smith 1991). Il est ainsi postulé que l'activation de la guanylyl cyclase sensible au NO pourrait influencer la contractilité cardiaque. De plus des isoformes de la NOS ont été identifiés dans plusieurs types cellulaires cardiaques et la présence des formes constitutives et inductibles fut démontrée dans les myocytes cardiaques de rats (Schulz 1992). L'action inotropique du système β -adrénergique cardiaque est atténuée par le NO (Balligand 1993). Il existe donc une interaction entre le NO, l'AMP cyclique et le GMP cyclique pour le contrôle des mécanismes inotropiques.

D'autres parts, l'angiotensine II, via les récepteurs AT₁, peut augmenter la production de NO induite par les cytokines dans les cellules musculaires cardiaques (Ikeda 1995). Ainsi, l'angiotensine II, via la stimulation des récepteurs AT₁, réduirait la réponse contractile β -adrénergique du muscle cardiaque soit par couplage négatif à l'activité de l'adénylyl cyclase cardiaque via les protéines Gi (Crawford 1991) et/ou par l'augmentation de la production endogène de NO (Gomez 1996). Le NO pourrait avoir une influence sur la sensibilité de la sous-unité catalytique soit directement par son oxydation ou indirectement par un mécanisme dépendant de la GMP cyclique. D'autre part, une augmentation de la production d'AMP cyclique induite par l'activation des récepteurs AT₁ a aussi été observée dans plusieurs préparations cellulaires incluant les cardiomyocytes (Sadoshima 1993; Johnson 1992). Ces observations, ainsi que les résultats de nos travaux (K-Laflamme 1998b) nous

permettent d'émettre l'hypothèse d'une influence bimodale de l'angiotensine II sur la voie de signalisation β -adrénergique cardiaque. Dans des conditions normales, le blocage des récepteurs AT₁ atténuerait la modulation négative du NO et des protéines Gi sur la formation d'AMP cyclique et induirait une augmentation de l'activité de l'adénylyl cyclase cardiaque alors que dans les conditions où la synthèse de NO serait inhibée, la modulation négative sur la formation d'AMP cyclique par les récepteurs AT₁ étant atténuée, le mécanisme facilitateur sur la formation d'AMP cyclique serait dominant (K-Laflamme 1998b, voir Figure 7 Chapitre III). Ainsi la voie de signalisation β -adrénergique cardiaque peut être modulée par l'angiotensine II et la voie de signalisation du NO.

L'administration d'inhibiteurs de la synthèse de NO atténue l'action hypotensive du losartan chez le rat suggérant que le NO pourrait être impliqué dans l'action antihypertensive des antagonistes des récepteurs AT₁ (Cachofeiro 1995). En effet, en plus de leur effet hypotenseur, les antagonistes des récepteurs de l'angiotensine pourraient avoir un effet bénéfique additionnel sur la relaxation dépendante de l'endothélium. Dans des lits d'artères mésentériques de SHR et dans le modèle d'hypertension DOCA-sel, nous avons observé une augmentation de la réactivité α_1 -adrénergique en comparaison avec les artères de rats normotendus et cette hyperréactivité était atténuée par des traitements chroniques avec l'énalaprilat et le losartan mais cet effet ne pouvait être observé en l'absence d'endothélium suggérant que la normalisation endothélium-dépendante de l'hyperréactivité α_1 -adrénergique pourrait être associée à l'amélioration de la vasorelaxation endothélium-dépendante (K.-Laflamme 1998a, K.-Laflamme 1998c, Oster 1995) (Figure 4). Il a aussi été démontré que le NO, la présence d'un endothélium intact ainsi que les récepteurs AT₂ atténuent la potentialisation par l'angiotensine II de la vasoconstriction induite par la phényléphrine dans des anneaux aortiques de SHR (Maeso 1996). Ces études suggéraient que la présence de NO est nécessaire afin d'observer l'effet bénéfique maximal du losartan sur la réponse contractile de la phényléphrine. D'ailleurs nous avons aussi observé une amélioration de la réponse vasorelaxante et endothélium-

dépendante à l'acétylcholine chez les SHR et les DOCA-sel traités avec le losartan (Figure 5). Cependant le mécanisme liant ces facteurs dans la réponse vasoconstrictrice n'est pas connu mais contribue sans doute à l'équilibre entre les facteurs endogènes vasodilatateurs et vasoconstricteurs. Il serait possible que l'angiotensine II affecte la réactivité vasculaire α_1 -adrénergique indirectement en intervenant sur la voie de synthèse ou de signalisation du NO via la production d'anions superoxydes qui inactivent le NO. L'hypertension induite par l'administration d'angiotensine II a été associée avec une augmentation de la production vasculaire d'anions superoxydes par l'activation de l'enzyme NADH/NADPH oxydase et une atténuation de la relaxation endothélium-dépendante alors que le losartan normalisait ces fonctions (Laursen 1997, Rajagopalan 1996). Ainsi le blocage du SRA pourrait réduire le processus oxydatif et favoriser l'amélioration des fonctions endothéliales qui font la balance de la stimulation α -adrénergique.

D'autres part, puisque la contribution du NO dans la vasorelaxation β -adrénergique a été démontrée dans les vaisseaux de plusieurs espèces et incluant les humains (Cardillo 1997, Ming 1997), l'atténuation du fonctionnement de la voie du NO pourrait participer à la réduction de la réponse vasorelaxante β -adrénergique dans l'hypertension. D'une part, la contribution de l'endothélium à la vasorelaxation β -adrénergique est proposée via la production et/ou la libération de NO par les cellules endothéliales induite par l'activation de récepteurs exprimés dans les cellules endothéliales et produisant une relaxation dépendante du GMP cyclique du muscle lisse vasculaire (Akimoto 2002). D'autre part, il a aussi été suggéré que le NO exercerait une influence basale sur la vasorelaxation β -adrénergique en augmentant les niveaux de GMP cyclique du muscle lisse vasculaire qui inhibent l'activité de la phosphodiesterase de l'AMP cyclique (PDE-3) et conséquemment potentialisent une éventuelle activation β -adrénergique par une plus grande augmentation des taux d'AMP cyclique (Delpy 1996).

Nous avons observé que l'administration chronique de losartan et d'énalaprilat dans les modèles expérimentaux d'hypertension artérielle, tels que SHR ou induite par l'administration de L-NAME ou DOCA-sel, normalise la réponse vasorelaxante β -adrénergique. La réduction du stress oxydatif induit par l'angiotensine II sur les cellules endothéliales serait probablement impliquée dans cet effet bénéfique sur les fonctions relaxantes endothéliales. L'administration de bloqueurs du SRA a prouvé dans plusieurs études leur efficacité antihypertensive dans le modèle induit par l'administration chronique de L-NAME supportant l'hypothèse que l'angiotensine II tissulaire joue un rôle important.

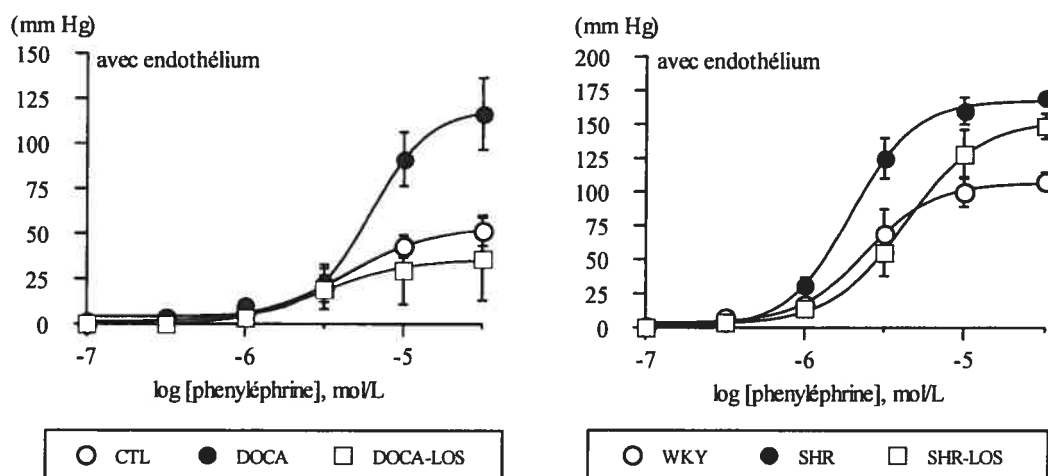


Figure 4: Courbes dose-réponses à la phényléphrine ($0.1 - 10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) dans des lits vasculaires mésentériques prétraités avec de l'indométhacine, dont l'endothélium est intact. Les modèles expérimentaux d'hypertension artérielle sont le modèle induit par l'administration pendant 9 jours de déoxycorticostérone et sel chez le rat (DOCA) et le rat spontanément hypertendu âgé de 12 semaines (SHR), et les normotendus respectifs sont les rats contrôles (CTL) et les rats Wistar-Kyoto (WKY). Les rats hypertendus étaient traités chroniquement ou non avec le losartan (LOS, 5 mg/kg/jour , 12 jours minipompes osmotiques). La vasoconstriction est estimée par l'augmentation de la pression de perfusion (mm Hg).

(Figure tirée de *K.-Laflamme A et de Champlain J: Interactions des systèmes sympathique et rénine-angiotensine. Thérapie, 1998a; 53: 245-252.*)

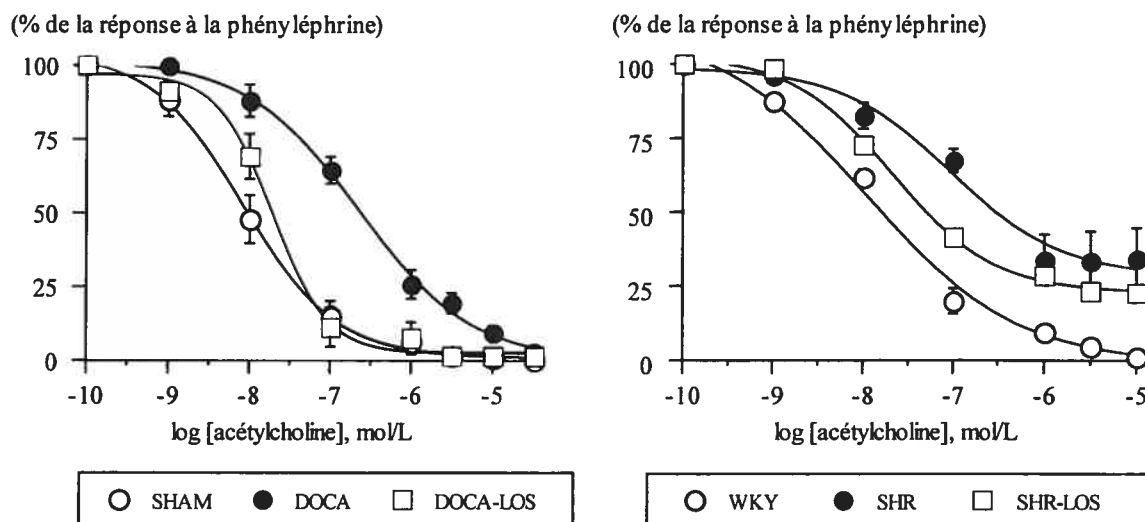


Figure 5: Courbes dose-réponses à l'acétylcholine ($0.1 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ - $10 \text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) dans des lits vasculaires mésentériques prétraités avec de l'indométhacine, dont l'endothélium est intact. Voir Figure 4 pour la description des groupes. La vasorelaxation est exprimée en pourcentage (%) de la réponse initiale à la phényléphrine ($0.1\text{-}3 \text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, produisant 50% de la réponse contractile maximale).

(Figure tirée de *K.-Laflamme A et de Champlain J: Interactions des systèmes sympathique et rénine-angiotensine. Thérapie, 1998a; 53: 245-252.*)

2.3.4.2. Voie de signalisation des facteurs vasoactifs dérivés de l'endothélium

Les voies de signalisation dans les cellules endothéliales, couplant l'exposition à des stimuli chimiques (neurotransmetteurs, hormones, peptides) ou mécaniques (cisaillement) à la libération de facteurs vasoactifs, sont distinctes et variées et peuvent être sélectivement altérées dans des conditions pathologiques. Le couplage des différents récepteurs aux différentes protéines G caractérise leur fonctionnement. Les protéines G_i peuvent coupler l'activation du récepteur par la sérotonine, les agonistes α_2 -adrénergiques, les leukotriènes et la thrombine à l'augmentation de la concentration calcique dans la cellule endothéliale alors que les protéines G_q peuvent aussi coupler l'activation du récepteur par la bradykinine et l'adénosine diphosphate à ce même effet final qu'est l'augmentation de la concentration calcique (Boulangier 1997). En général, le résultat à court terme de l'activation des protéines G par la liaison d'un agoniste à son récepteur sur l'endothélium est l'augmentation de la concentration intracellulaire de calcium (van Breemen 1997).

La libération de NO par la voie des protéines G_i sensible à la toxine pertussique pourrait résulter de l'interaction de la sous-unité $\beta\gamma$ des protéines G_i avec les canaux potassique dépendants du calcium (K_{Ca}) (Vaca 1992) et puisque les cellules endothéliales sont dépourvues de canaux calciques dépendants du voltage, l'hyperpolarisation pourrait aussi causer une augmentation de l'influx calcique qui à son tour activerait la NOS. De plus, les protéines G_i peuvent interagir directement avec la phospholipase C et la formation d' IP_3 et d' IP_4 et induire la libération de calcium des réserves intracellulaires et l'influx de calcium extracellulaire (Park 1993).

L'augmentation de la concentration de calcium intracellulaire s'effectue selon deux phases telles que décrites précédemment pour la cellule musculaire, la première est causée par la libération rapide et transitoire de calcium du réticulum endoplasmique et la seconde résulte de l'influx soutenu provenant de l'espace

extracellulaire. La libération de calcium du réticulum endoplasmique s'effectue généralement par l'activation des récepteurs de l'IP₃ et possiblement des récepteurs de la ryanodine (Graier 1994). L'influx de calcium extracellulaire n'est pas tout à fait caractérisé mais en plus de l'entrée calcique induite par une hyperpolarisation, plusieurs types de canaux calciques semblent pouvoir participer à l'entrée de calcium tels que les canaux de fuites en conditions basales, les canaux activés par l'étirement et les canaux activés par la réduction de la réserve calcique soit les *Depletion-Activated Channels* (DAC) qui seraient sélectifs pour le calcium (Vaca 1994). Ce mécanisme d'entrée est inactif lorsque les réserves de calcium du réticulum endoplasmique sont pleines et est activé lorsque ces dernières sont déchargées (Davis 1997). L'influx de calcium extracellulaire durant la deuxième phase de l'augmentation de la concentration intracellulaire est caractérisé par une augmentation prolongée et serait critique pour la libération des agents vasorelaxants par l'endothélium (Lückoff 1988). Dans les cellules endothéliales et les cellules non-excitables, cet influx calcique qui est associé à la réduction des réserves intracellulaires ou la libération du calcium par ces réserves a été nommé influx calcique capacitatif (Putney 1986). Ainsi les deux phases sont en quelque sorte reliées de telle façon que le degré de déplétion des réserves intracellulaires déterminera l'influx capacitatif subséquent. Ce courant calcique dans les cellules non-excitables aurait un rôle important dans le maintien de niveaux élevés de calcium intracellulaire et pour le renflouement de réserves après une stimulation par un agoniste (Clapham 1995). Dans les cellules endothéliales, l'augmentation de la concentration calcique par l'activation de ce courant serait impliquée dans la production et la libération de NO par des stimuli physiologiques et pharmacologiques (Davis 1997). Une anomalie dans le fonctionnement des voies de signalisations endothéliales aura donc des conséquences importantes dans plusieurs pathologies.

Les trois types d'enzymes, NOS I, II et III, semblent impliqués dans le contrôle du tonus vasculaire. La contribution du NO à la vasodilatation dépendante de l'AMP cyclique a aussi été démontrée comme résultant de l'ouverture de canaux K_{ATP} et de

l'augmentation conséquente des niveaux de calcium dans les cellules des muscles lisses vasculaires et les cellules endothéliales (Lückoff 1990; Ming 1997). De plus l'expression de la NOS I fut observée dans les cellules musculaires lisses d'artères carotidiennes de SHR et elle serait activée en présence d'angiotensine II (Boulanger 1998). Ceci suggère une source de NO non endothéliale dans ce modèle d'hypertension qui expliquerait la plus grande réactivité contractile à l'angiotensine II des vaisseaux en présence de L-NAME comparativement aux normotendus qui n'exprimaient pas de NOS I dans les cellules musculaires lisses (Boulanger 1998).

Les voies de signalisation dans les cellules endothéliales, couplant l'exposition à des stimuli chimiques (neurotransmetteurs, hormones, peptides) ou mécaniques (cisaillement) à la libération de facteurs vasoactifs, ne sont pas uniquement dépendantes d'une augmentation de la concentration calcique intracellulaire mais peuvent être aussi calcium-indépendantes. Effectivement, la disparité dans la relation temporelle entre l'augmentation de calcium intracellulaire induite par un agoniste et l'activation de la NOS endothéliale, la durée du premier étant plus courte que la production de NO, indique que d'autres mécanismes influencent l'activité de la NOS endothéliale (Fleming 1997). Par exemple, Fleming et coll. (1997) ont démontré que la production soutenue de NO induite par les forces de cisaillement dans les cellules endothéliales peut avoir lieu en l'absence de calcium extracellulaire et en présence d'un antagoniste de la calmoduline, alors que cette réponse était sensible à un inhibiteur de la tyrosine kinase. De plus, l'activation de la NOS III peut être induite par l'application d'inhibiteurs de phosphatases suggérant ainsi que la phosphorylation d'une tyrosine de la NOS III ou d'une protéine régulatrice associée à la NOS III, via l'activation de tyrosine kinases, serait impliquée dans la voie de signalisation indépendante du calcium et de la calmoduline (Fleming 1997). Quoique l'activation dépendante du calcium de la NOS III résultant de l'interaction d'un agoniste avec son récepteur semble aussi impliquer des tyrosine kinases, les voies de signalisation couplant l'exposition à des stimuli mécaniques à la libération de facteurs vasoactifs

dans les cellules endothéliales impliqueraient aussi des tyrosine kinases probablement par des mécanismes différents.

Dans les myocytes cardiaques, il a été proposé que la NOS pourrait être activée via les récepteurs muscariniques et par conséquent serait responsable de l'influence du tonus vagal sur l'activité sympathique cardiaque. Cependant, les mécanismes par lequel la stimulation muscarinique stimulerait l'activité de la NOS dans les myocytes est inconnue, de même que la signalisation intracellulaire responsable de l'activation de la NOS constitutive et les voies de signalisation impliquant et/ou contrôlées par le NO. Toutefois, tel que mentionné précédemment, l'augmentation du calcium cytosolique induite par le système β -adrénergique peut être responsable de l'activation calcium-dépendante de la NOS des myocytes cardiaques.

3. CHAPITRE II – Sommaire des Objectifs et Méthodologies

Sommaire des objectifs

L'objectif de ce projet est de caractériser les fonctions du système nerveux sympathique dans des conditions physiologiques et dans différents modèles de maladies cardiovasculaires chez le rat (hypertension génétique, hypertension induite par l'administration chronique de LNAME, hypertension DOCA-sel et une combinaison LNAME-DOCA-sel). Nous voulions aussi caractériser les interactions pré- et postsynaptiques des mécanismes de transduction sympathique avec d'autres systèmes humoraux tel que le SRA et le monoxyde d'azote, les altérations fonctionnelles accompagnant le développement de l'hypertension et les complications cardiovasculaires associées. Ainsi l'effet de l'inhibition chronique du système rénine-angiotensine avec l'énalaprilat, un inhibiteur de l'ECA, et le losartan, un ARA, sur les fonctions sympathiques basales et réflexes chez l'animal éveillé (paramètres hémodynamiques, taux de catécholamines plasmiques et tissulaires), sur l'intégrité de la voie de signalisation β -adrénergique dans des préparations membranaires cardiaques (affinité et sensibilité des récepteurs, activité de l'adénylyl cyclase), sur l'effet facilitateur de l'angiotensine II exogène sur la libération de catécholamines par les oreillettes isolées, ainsi que sur la réactivité vasculaire endothélium-dépendante des artères de résistances isolées et perfusées, ont été évalués.

La ligne directrice des hypothèses de travail de chacun des protocoles était la présence d'interactions entre les mécanismes de transduction du système nerveux sympathique avec d'autres systèmes humoraux (rénine-angiotensine, monoxyde d'azote) et de défauts de ces interactions contribuant aux altérations fonctionnelles accompagnant le développement de l'hypertension et des complications cardiovasculaires associées, tel que l'atténuation de la réactivité réflexe sympathique,

l'altération de l'effet facilitateur de l'angiotensine II exogène sur la libération de noradrénaline, l'augmentation de la participation du tonus médullo-surrénalien, l'altération de la réactivité vasculaire, la participation importante du système rénine-angiotensine dans le maintien de l'hypertension et le remodelage cardiaque et le rôle de traitements aux propriétés antioxydantes tel la mélatonine. De telles interactions pourraient être d'une importance majeure dans la modulation de la sensibilité des cellules effectrices à une activation sympathique.

Sommaire des méthodologies

- Modèles et traitements pharmacologiques *in vivo*:

Différents modèles expérimentaux ont été utilisés. À part le modèle de rats génétiquement hypertendus (SHR) ainsi que les rats normotendus Wistar-Kyoto (WKY) qui sont achetés ainsi directement du producteur, les autres modèles expérimentaux de développements de pathologies cardiovasculaires ont été mis au point dans notre laboratoire ainsi que leur traitement par les bloqueurs du SRA. Le modèle LNAME consiste de rats Sprague-Dawley qui ont reçu le L-NAME dans l'eau de breuvage. Le modèle DOCA consiste de traitements avec la deoxycorticostérone et sel pour le développement de l'hypertension et de l'hyperterrophie cardiaque. Le modèle DOCA-LNAME est une combinaison des deux modèles afin d'évaluer l'effet du blocage chronique du NO sur le développement de l'hypertension et de l'hypertrophie. Les traitements chroniques avec le losartan ou l'énalaprilat (12 jours, pompes osmotiques) ont été administrés à des doses antihypertensives équipotentes.

- Paramètres hémodynamiques, études *in vivo*.

Le tonus basal et la réactivité réflexe du système sympathique à l'hypotension induite par le nitroprusside (NP) ont été évalués chez des rats éveillés *in vivo* par la mesure directe de la pression artérielle moyenne (PAM), du rythme cardiaque (RC) et des catécholamines circulantes et tissulaires. La pression artérielle a aussi été mesurée par pléthysmographie dans certains protocoles.

- Paramètres pharmacologiques et biochimiques, études *in vitro*

La méthodologie pour la préparation membranaire de cœurs et de vaisseaux a été mise au point dans le laboratoire par l'adaptation de méthodologies déjà publiées. Brièvement, pour une préparation membranaire fraîche des ventricules, le cœur est prélevé rapidement dans une solution tampon froide et homogénéisé. Le surnageant est purifié par centrifugations différentielles afin d'obtenir une concentration protéinique de 1 mg/ml. Pour les études de la fonction β -adrénergique cardiaque, les caractéristiques des récepteurs (densité et affinité), des protéines G et l'activité de l'adénylyl cyclase sont mesurées dans les préparations membranaires par quantification des produits radioactifs par chromatographie séquentielle. L'activité de l'adénylyl cyclase s'évalue par la production d'AMP cyclique basale ainsi que par la stimulation de production d'AMP cyclique en présence d'un agoniste. Des courbes doses réponses sont obtenus par la stimulation avec différents agonistes : la forskoline, l'isoprotérénol, le fluorure de sodium ou le Gpp(NH)p en présence de ^{32}P -ATP et de ^3H -AMP cyclique. La densité et l'affinité des récepteurs β -adrénergiques cardiaques totaux, la modulation de la population des récepteurs β_1 et β_2 -adrénergiques cardiaques et la proportion des récepteurs β -adrénergiques capables d'un couplage fonctionnel ont été mesurées dans les préparations membranaires cardiaques par radioliation en présence de ^{125}I -cyanopindolol. Les sous-unités α de protéines G ont aussi été caractérisées par électrophorèse et immunodetection. La voie de signalisation des inositol phosphates (IPs) a été évaluée par la formation des inositol phosphates (IPs) dans les cultures cellulaires de muscles lisses vasculaires par chromatographie échangeuse d'ions en conditions basales et après stimulation en présence de phényléphrine. La libération de [^3H]-norépinephrine au repos et induite par stimulation électrique a été étudié dans les oreillettes isolées. La réactivité vasculaire du lit mésentérique isolé et perfusé a été estimée pour la vasoconstriction et la vasodilatation mesurées par les changements de pression de perfusion en présence de phényléphrine, d'acétylcholine, d'isoprotérénol ou de nitroprussiate de sodium, et en présence ou en absence d'endothélium.

CHAPITRE III – Article Scientifique

**EFFECTS OF RENIN-ANGIOTENSIN BLOCKADE ON SYMPATHETIC
REACTIVITY AND β -ADRENERGIC PATHWAY IN SHR.**

Hypertension 1997; 30(part 1): 278-287

**EFFECTS OF RENIN-ANGIOTENSIN BLOCKADE ON SYMPATHETIC
REACTIVITY AND β -ADRENERGIC PATHWAY IN SHR.**

Annik K.-Laflamme, Laurence Oster, René Cardinal, Jacques de Champlain.

Groupe de Recherche sur le Système Nerveux Autonome,
Département de Pharmacologie (A.K.-L., R.C.)
et Département de Physiologie (L.O., J. de C.),
Faculté de Médecine, Université de Montréal, Montréal, Québec, Canada, H3C 3J7.

Keywords: hypertension, genetic; autonomic nervous system; renin-angiotensin system; β -adrenergic receptors; adenylyl cyclase; losartan; enalaprilat.

Short title: Sympathetic Functions and Angiotensin Blockade.

Author for correspondence:

Dr Jacques de Champlain
Département de Physiologie, Faculté de Médecine
Université de Montréal
C.P. 6128, succursale centre-ville
Montréal, Québec
Canada, H3C 3J7

Hypertension 1997; 30(part 1): 278-287

Submitted September 20, 1996,

Revised manuscript submitted November 29, 1996,

Final submission : January 9, 1997.

Abstract

As interactions between the renin-angiotensin and sympathetic nervous systems have been suggested in the pathogenesis of hypertension we wanted to investigate the effect of chronic renin-angiotensin blockade with losartan and enalaprilat on the sympathetic reactivity to hypotension and on the cardiac β -adrenergic-coupled adenylyl cyclase pathway in 12-week-old Wistar-Kyoto rats (WKY) and spontaneously hypertensive rats (SHR). Both treatments, exerting equipotent shifts of angiotensin-pressure responses, lowered BP and attenuated cardiac hypertrophy similarly in SHR. The nitroprusside-induced hypotension was similar in both strains but the associated increases in plasma catecholamines and heart rate were higher in SHR. In SHR treated with losartan and enalaprilat the nitroprusside-induced hypotension was greater and associated with markedly attenuated increases in norepinephrine and heart rate. The binding affinity of cardiac β -adrenoceptors was significantly lower and β_2 -adrenoceptor subtype was dominant in untreated SHR in contrast to WKY in which β_1 -adrenoceptor subtype was dominant. Enalaprilat treatment increased total β -adrenoceptor density whereas both treatments restored the binding affinity and β_1 - and β_2 -adrenoceptors proportions to normal in SHR. Isoproterenol-, guanylylimidodiphosphate [Gpp(NH)p]- and forskolin-stimulated adenylyl cyclase reactivity was increased in SHR. Enalaprilat restored adenylyl cyclase reactivity to normal in SHR and reduced the sensitivity (EC_{50}) of Gpp(NH)p-induced cAMP formation in both strains. The present study supports the possibility that functional alterations of the renin-angiotensin and sympathetic systems are involved in hypertension in SHR. The antihypertensive action of losartan and enalaprilat in SHR may be partly mediated through the normalization of sympathetic hyperreactivity and the restoration of β -adrenergic signaling pathway sensitivity.

Selected Abbreviations and Acronyms

ACE	=	angiotensin-converting enzyme
Ang I	=	angiotensin I
Ang II	=	angiotensin II
AT1	=	angiotensin II type 1 (receptor)
BP	=	blood pressure
Gpp(NH)p	=	guanylylimidodiphosphate
ICYP	=	¹²⁵ I-cyanopindolol
MAP	=	mean arterial pressure
RAS	=	renin-angiotensin system
SHR	=	spontaneously hypertensive rat(s)
WKY	=	Wistar-Kyoto rat(s)

Introduction

The RAS plays an important role in maintaining cardiovascular homeostasis. The RAS was originally thought to be a circulating endocrine system but it is now known that components of the RAS are also present in local tissues such as blood vessel walls, the heart, the kidney, the adrenal, the brain and other tissues and exert autocrine and paracrine influences on local tissue functions.^{1,2} The local RASs may be involved in the pathophysiology of hypertension. The inhibition of local angiotensin production may explain the observation that the long-term BP-lowering effect of ACE inhibitors is often unrelated to pretreatment plasma renin level.³ There are numerous interactions between the RAS and other BP control systems, for instance the sympathetic nervous system. Ang II has been shown to facilitate neurotransmission at the nerve endings, ganglia, adrenal medulla and central nervous system. More specifically Ang II has been suggested to decrease prejunctional re-uptake, increase catecholamine biosynthesis, facilitate catecholamine release through AT₁ presynaptic mechanisms and sensitize postjunctional structures.^{4,5}

Orally active AT₁ receptor antagonists are a new class of drugs currently being used in the treatment of hypertension. Losartan by interfering with the RAS via AT₁ receptor blockade could provide some advantages over ACE inhibitors in blocking specifically AT₁-mediated effects of circulating and tissue Ang II. The differences between these two therapeutic approaches could be accounted for by the differences in neurohormonal activation, in bradykinin potentiation and in the inhibition of the action of Ang II derived from the classic pathway and also from alternative synthesis pathways.⁶

SHR have been widely used as a model for the study and development of antihypertensive drugs. The etiology of hypertension in SHR is not fully elucidated but treatment with ACE inhibitors has been shown to lower BP effectively. Since both the RAS and sympathetic nervous system have been implicated in the

development and maintenance of hypertension, the objectives of our study were to evaluate the effect of chronic RAS blockade on BP and sympathetic reflex reactivity. We also investigated the effect of chronic RAS blockade on cardiac postsynaptic functions such as the characteristics of β -adrenergic receptors (total number and affinity, subtype distribution and guanine nucleotide-sensitive functional coupling) as well as the basal and induced formation of cAMP by the β -adrenergic receptors, guanine nucleotide regulatory (G) proteins and the catalytic subunit adenylyl cyclase. To determine whether losartan and enalaprilat (an ACE inhibitor) possess different mechanisms of action, we compared their effects on sympathetic functions using equipotent doses of both drugs in displacing angiotensin-pressure response curves.

Methods

Animal Preparation

Experiments were carried out in accordance with institutional animal ethic committee guidelines. Male WKY and SHR were used at 10 weeks of age (Charles River Laboratories, St-Constant, Québec, Canada). Rats were anaesthetized with sodium pentobarbital (50 mg/kg, IP, Somnotol, MTC Pharmaceuticals) and osmotic pumps (model 2002, Alza Corp) were implanted subcutaneously in the flank region for 12 days. WKY and SHR control groups underwent the same surgical procedure without implantation of an osmotic pump. Twenty-four hours before implantation, osmotic pumps were filled with losartan (dissolved in isotonic saline) to provide an infusion rate of 5 mg/kg/day or with enalaprilat (dissolved in saline (0.3% Na₂CO₃)) to provide an infusion rate of 1 mg/kg/day. At the end of the treatments, when the animals were 12 weeks old, systolic arterial BP was measured in conscious rats by tail-cuff plethysmography (Harvard Apparatus Ltd) and was recorded on a MacLab/8 system (AD Instruments Pty Ltd). Six to seven BP readings were obtained for each rat and averaged.

***In vivo* MAP Response Curves to Ang I and Ang II**

Animals assigned to *in vivo* experiments in conscious unrestrained, resting conditions were catheterized. After 11 days of their respective treatments the rats were anaesthetized and polyethylene tubings (PE-10) welded to PE-50 catheters were inserted into the left femoral artery and vein and positioned in the abdominal aorta and vena cava. Both catheters were tunneled subcutaneously and extruded at the back of the neck through L-shaped PE-280 tubing and were protected from the rat by insertion into a stainless steel tether. The catheters were filled with heparinized saline and the rats were placed in individual cages where they were allowed to recover for at least 24 hours. The arterial catheter was coupled to a pressure transducer (Statham P23ID; Gould Statham Inc) and the signal was amplified and recorded by a Biopac data acquisition system (MP100WS, Harvard Apparatus Canada). MAP and heart rate were monitored with a computerized analysis program (Acknowledge 3.0, Harvard Apparatus). When MAP and heart rate had reached stable basal level, after at least 20 minutes of continuous recording, basal values were measured and 0.4 mL arterial blood was withdrawn for measurement of basal aortic plasma catecholamine levels. The volume withdrawn was replaced with heparinized saline. Ang I and Ang II dose-MAP response curves were constructed. Bolus injections of increasing and noncumulative doses of Ang I and Ang II (0.003 to 1.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$) were administered at 5 min intervals through the venous catheter. A blood sample (0.4 mL) was withdrawn from the arterial catheter for measurement of plasma levels of losartan and its metabolite EXP 3174 (see below). From each logarithmic dose-response curve, the ED₅₀ was calculated as the dose resulting in 50% of the maximal response.

Reflex Activation of the Sympathetic Nervous System

In other groups of rats different from those in the above described protocol, basal MAP and heart rate were recorded and a blood sample of 0.4 mL was withdrawn after a stabilization period. A 5 min intravenous infusion of sodium nitroprusside (50 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{min}$) was administered at 0.05 mL/min. Haemodynamic parameters and plasma catecholamine levels were measured at the end of the 5 min infusion period.

Measurement of Plasma and Tissue Catecholamine Levels

Aortic blood samples (0.4 mL) were placed in ice-chilled tubes containing a preservative solution (0.25 mol/L EGTA, 0.2 mol/L reduced glutathione, pH7). The samples were rapidly centrifuged at 14 000g for 5 min at 4°C. The plasma was frozen at -80°C until the assay. Parts of the left and right ventricles were rapidly dissected and weighed and kept at -80°C until the assay. Plasma and tissue catecholamine concentrations were measured by radioenzymatic assay.⁷

Membrane Preparations

For *in vitro* experiments, the rats were weighed and killed by decapitation. The hearts were rapidly removed and tissues isolated from the left and right ventricular free walls. Cleaned and minced myocardium was homogenized in ice-cold buffer (mmol/L; sucrose 250, Tris 5, MgCl₂ 1, EDTA 1, dithiothreitol 1, phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF) 0.01, pH 7.4) with a Polytron homogenizer (Brinkman) at a setting of 9, two time for 10 sec and once for 5 sec. The homogenate was filtered through three layers of cheesecloth and centrifuged at 1000g for 10 min at 4°C. The supernatant filtered through two layers of cheesecloth was centrifuged at 45 000g for 30 min at 4°C to yield membranes. The pellet was washed twice in a second ice-cold buffer (incubation buffer: mmol/L; Tris 50, MgCl₂ 10, EDTA 1, dithiothreitol 1, PMSF 0.01, pH 7.4). The final plasma membrane pellet was resuspended to give a final concentration of 1 mg/mL protein. The protein concentration was determined by the method of Lowry et al⁸ using bovine albumin serum as the standard.

Characteristics of β -Adrenergic Receptors

ICYP binding to β -adrenergic receptors was studied in purified cardiac membrane preparations. For saturation binding experiments, membrane preparations (approximately 40 μ g protein) were incubated with ICYP (10 to 250 pmol/L) in incubation buffer either alone or with alprenolol (10 μ mol/L) which was used for determination of nonspecific binding. The incubation was carried out at room

temperature (25°C) for 2 hours, in a total volume of 250 μ L. The reaction was terminated by the addition of ice-cold incubation buffer and rapid vacuum filtration through type A/C glass fiber filters (Gelman Sciences). The density (B_{max}) and affinity (K_d) of binding sites for ICYP were determined by linear regression analysis of saturation isotherm data, linearly transformed according to the method of Scatchard.⁹ The proportions of β_1 - and β_2 -adrenoceptors subtypes were assessed from displacement curves of ICYP binding (50 pmol/L) by ICI 118,551 (a β_2 selective antagonist, 10 pmol/L to 200 μ mol/L). Competition experiments of ICYP binding with increasing concentrations of isoproterenol (500 pmol/L to 1 mmol/L) in the absence and presence of Gpp(NH)p (50 μ mol/L) were performed to determine the proportions of the high and low affinity states of the receptor for the agonist as an index of receptor - G protein coupling, since the guanine nucleotide-sensitive high affinity state of the receptors is believed to represent the complex agonist- β -adrenoceptor-Gs. All experiments were performed in duplicate. The binding data of the displacement curves for each animal, expressed in picomoles per liter, were analyzed with an iterative nonlinear regression program (Allfit).¹⁰

Adenylyl Cyclase Activity

Adenylyl cyclase activity and sensitivity in cardiac membrane preparations were assessed by the method of Salomon.¹¹ Basal adenylyl cyclase activity and concentration response curves to isoproterenol, Gpp(NH)p and forskolin (1 nmol/L to 1 mmol/L) as well as cAMP formation in the presence of NaF (10 mmol/L) were determined. Membrane samples containing 4 μ g protein were incubated 15 minutes at 37°C in (mmol/L) GTP 0.06, ATP 0.1, cAMP 1, 3-isobutyl-1-methyl xanthine 0.1, and phosphoenol pyruvate 2.8 as well as 2.5 U/mL pyruvate kinase and 19 U/mL myokinase with 10 μ Ci/mL of [α -³²P]-ATP in a total volume of 50 μ L. All assays were performed in duplicate. The reactions were stopped by the addition of 1 mL ice-cold solution consisting of 50 μ Ci/L [³H]-cAMP, 0.35 ATP and 0.25 mmol/L cAMP. Reaction products were separated by sequential column chromatography on Dowex and alumina columns (Biorad Laboratories). The [³²P]-cAMP counts were corrected

for column recovery of [³H]-cAMP (approximately 85%).

Measurement of Plasma Concentrations of Losartan and EXP 3174

Aortic blood samples placed in ice-chilled tubes were rapidly centrifuged at 14 000g and 4°C, for 5 min. The plasma was frozen at -80°C until the assay. Plasma concentrations of losartan and its metabolite EXP 3174 were determined in the laboratory of Dr Chantal Lambert (Department of Pharmacology, Université de Montréal) by high performance liquid chromatography as described by Furtek and Lo¹² using the internal standard L-158,854.

Solutions and Chemicals

All chemicals were supplied by Sigma Chemicals Co., except for pyruvate kinase (Calbiochem Co) and sodium nitroprusside (Hoffmann-La Roche Ltd). Radioisotopes, ICYP and 5',8-[³H]-cyclic AMP were supplied by DuPont-NEN. [α -³²P]-ATP was supplied by ICN Biomedicals. Losartan and enalaprilat were kindly provided by DuPont Merck Pharmaceutical Co and Merck Frosst Canada Inc. The internal standard L-158,854 was kindly provided by Dr Man-Wai Lo of Merck Sharp & Dohme Research Laboratories.

Statistics

Data are given as mean \pm SEM; n is the number of rats used. Maximal responses, ED₅₀, EC₅₀, V_{max}, B_{max}, K_d and K_i values were determined for each concentration-response curve. These parameters were used for statistical comparison by ANOVA followed by Scheffé's F test or Student's unpaired t test when appropriate. A value of $P < 0.05$ was considered statistically significant. All statistical tests were performed with StatView and SuperAnova statistical packages (Abacus Concepts Inc.).

Results

BP, Myocardial Hypertrophy and Catecholamine Levels

As shown in Table 1, systolic arterial BP measured by tail-cuff plethysmography was significantly increased in 12 week-old SHR compared with age-matched WKY. Chronic 12-day treatment with losartan or enalaprilat reduced significantly and similarly the BP in SHR, whereas these treatments had no significant effect on BP in WKY. The hearts of SHR demonstrated left ventricular hypertrophy, and the antihypertensive effect of losartan and enalaprilat was accompanied by the normalization of left ventricular relative weight in SHR to values similar to those in control WKY (Table 1). Neither losartan nor enalaprilat treatments had a significant effect on body weight in the different groups (Table 1). Plasma epinephrine levels appeared to be higher in untreated SHR and both antihypertensive treatments tended to increase plasma epinephrine levels in WKY and SHR, but those differences were not significant. Plasma norepinephrine concentrations were similar in control and treated WKY and SHR (Table 1). Cardiac tissue contents of norepinephrine and epinephrine were similar in untreated WKY and SHR. Treatment with losartan in SHR increased left ventricular epinephrine ($P<0.05$) and norepinephrine concentrations ($P=0.05$) whereas enalaprilat had no effects on tissue catecholamine levels (Table 1).

Ang I and Ang II-MAP Response Curves

The dose-MAP curves constructed with Ang I were similar in untreated WKY and SHR and were similarly shifted to the right by chronic treatments with losartan or enalaprilat (Fig 1). In fact, both treatments caused similar ED₅₀ increases in WKY and SHR ($P<0.05$ vs respective controls, Table 2). The maximal increases in MAP after Ang I challenge were not significantly altered by either treatment in both strains. The Ang II dose-MAP response curves were similar in untreated WKY and SHR and chronic treatments with losartan caused a similar rightward shift in both strains (Fig 1). The ED₅₀ values in untreated WKY and SHR were similarly increased after

losartan treatments ($P < 0.05$ vs respective controls, Table 2). Losartan did not affect the maxima of the dose-pressure curves to Ang II in both strains (Table 2). As expected, chronic treatment with enalaprilat had no effect on the MAP response curves to Ang II in WKY and SHR (Fig 1). The plasma levels of losartan and its major metabolite EXP 3174 measured after chronic treatment in both strains revealed no significant differences in treated WKY and SHR (Table 2).

Sympathetic Reflex Activation

Baseline MAP and heart rate are shown in Table 3 and basal aortic plasma norepinephrine and epinephrine levels in Table 1. Direct MAP measurements in conscious rats confirmed the higher BP in SHR and the potent and similar hypotensive effects of losartan and enalaprilat as demonstrated by indirect systolic BP measurements (Table 1). Basal heart rate did not differ significantly in WKY and SHR, and this parameter was not affected by losartan and enalaprilat treatments (Table 3). The hypotension induced by sodium nitroprusside infusion was similar in WKY and SHR (Δ MAP, -42.6 ± 4.8 and -31.4 ± 3.8 mm Hg). In SHR treated with losartan and enalaprilat the hypotension was significantly greater (Δ MAP, -53.4 ± 6.4 and -52.2 ± 6.5 mm Hg) although these treatments in WKY did not alter MAP responses (Fig 2A). The concomitant increases in norepinephrine, epinephrine, and heart rate were expressed as a ratio to the hypotension induced in each animal (Fig 2B, 2C, 2D). The calculated ratio of the changes from baseline values over the changes in MAP is a better representation of the reflex activation of the sympathetic system per millimeter of mercury and thereby allows a better comparison between the groups as they showed different hypotensive responses. The associated increases in plasma norepinephrine (9.6 ± 0.7 vs 4.9 ± 1.3 [Δ pg/mL]/ Δ mm Hg, $P < 0.05$), plasma epinephrine (2.8 ± 0.7 vs 1.4 ± 0.3 [Δ pg/mL]/ Δ mm Hg, $P < 0.05$) and heart rate (4.9 ± 1.0 vs 3.0 ± 0.5 Δ beats per minute/ Δ mm Hg) were higher in control SHR versus WKY although the hypotensive responses induced by nitroprusside infusion were similar. In SHR treated with losartan or enalaprilat the greater nitroprusside-induced hypotension was associated with smaller increases in plasma norepinephrine levels

(1.7 ± 0.4 and 2.8 ± 0.7 [Δ pg/mL]/ Δ mm Hg, $P < 0.05$) and heart rate (0.8 ± 0.4 and 0.4 ± 0.3 Δ beats per minute/ Δ mm Hg, $P < 0.05$) whereas these responses were unchanged in treated WKY. These results suggest an attenuation of sympathetic reactivity in SHR (Fig 2).

Myocardial β -Adrenergic Receptors

Total specific β -adrenergic receptors density (B_{max}) and their dissociation constant (K_d) are summarized in Table 4. β -Adrenoceptors density was similar in untreated WKY and SHR but β -adrenergic receptor affinity was significantly reduced of the in control SHR as expressed by the increased K_d . In SHR, both antihypertensive treatments normalized receptor affinity to values similar to those calculated in control WKY. Moreover, in SHR treated with enalaprilat, total β -adrenergic receptor density was significantly increased and affinity was increased to a greater extent than in SHR treated with losartan. In WKY, losartan and enalaprilat treatments had no significant effect on total β -adrenergic receptor density and affinity.

β_1 - and β_2 - Adrenergic Receptors Subtypes

ICI 118,551 inhibited ICYP binding with shallow biphasic curves that could be best resolved by a model with two affinity binding sites in all animal tissues - the high-affinity site representing the binding of the ligand to β_2 -adrenoceptors and the low-affinity binding site to β_1 -adrenoceptors (Fig 3A). Thus, calculation of the relative subtypes was possible in all individual preparations (Table 4). None of the treatment modified K_i values for the low and the high affinity sites of ICI 118,551. Computer analysis of these data revealed a significant decrease in the proportion of β_1 -adrenoceptors and a significant increase in the proportion of β_2 -adrenoceptors in control SHR. Losartan and enalaprilat treatments restored the relative proportions were to values similar to those calculated in control WKY (Table 4 and Fig 3B). Indeed, the absolute densities of left ventricular β_1 - and β_2 -adrenoceptors calculated for each animal revealed a greater number of β_1 -adrenoceptors than β_2 -adrenoceptors in WKY whereas in SHR, the number of β_2 -adrenoceptors was increased compared

with β_1 -adrenoceptors. There was a significant increase in β_2 -adrenoceptors density in control SHR versus WKY (20.4 ± 4.2 versus 7.8 ± 2.8 fmol/mg, $P < 0.05$) and a significant reduction in β_2 -adrenoceptors density after treatments with either losartan or enalaprilat in SHR (4.4 ± 1.8 and 7.0 ± 1.6 fmol/mg, respectively). In WKY, neither treatment affected the proportion of β_1 - and β_2 -adrenoceptors subtypes (Table 4 and Fig 3B).

β -Adrenergic Receptors Functional Coupling

Agonist competition curves in the absence of Gpp(NH)p were analyzed according to a two-site model. The competition curves in the presence of guanine nucleotides were analyzed according to a one site model, and the K_i in that case corresponded to the K_i of low affinity sites determined in isoproterenol competition curves in the absence of guanine nucleotides. Computer analysis revealed a similar proportion of the high affinity component in untreated WKY and SHR (Table 4). This suggests that β -adrenoceptors are functionally coupled to Gs to the same extent in left ventricles of WKY and SHR. Treatments with losartan or enalaprilat had no effect on β -adrenoceptor functional coupling to Gs in either group (Table 4).

Adenylyl Cyclase Activity

The activity of the β -adrenergic-coupled adenylyl cyclase signaling pathway was studied in the same membrane preparations as those that served for β -adrenergic receptors binding studies. cAMP production in the presence of different agonists is represented as dose-response curves in Fig 4 and the values of the respective parameters are presented in Table 5. Basal cAMP production was similar in control and treated WKY and SHR. The sensitivity of the adenylyl cyclase activity response curves in the presence of the different agonists is expressed by the EC_{50} , and the maximal rate of conversion of ATP to cAMP expressed by the V_{max} was calculated from a double reciprocal of each curve. In isoproterenol stimulated cAMP formation curves, the EC_{50} was similar in both strains treated or untreated. The V_{max} was slightly but significantly increased in untreated SHR compared with WKY and

treatment with enalaprilat reduced significantly the V_{max} to values near those of untreated WKY. In the presence of Gpp(NH)p, adenylyl cyclase sensitivity was similar in control WKY and SHR, but V_{max} was greater in SHR. Losartan treatment had no effect in either group whereas in both strains treated with enalaprilat the curves were significantly shifted to the right (EC_{50} decreased by half a log, Fig 4). V_{max} was reduced only in SHR treated with enalaprilat to values similar to values in control WKY (Table 5). The sensitivity of the adenylyl cyclase to forskolin was similar in control and treated WKY and SHR. However, V_{max} was markedly greater in SHR suggesting an increased activity of the catalytic enzyme itself. Enalaprilat treatment significantly reduced the forskolin-induced production of cAMP in SHR to values similar to those in untreated WKY. Thus, chronic treatment with enalaprilat in SHR reduced the increased maximal rate of conversion of ATP to cAMP stimulated by isoproterenol, Gpp(NH)p and forskolin and decreased the sensitivity of the adenylyl cyclase pathway to Gpp(NH)p.

When the maximal formation of cAMP induced by isoproterenol (0.1 mmol/L) and Gpp(NH)p (1.0 mmol/L) was normalized as a ratio of the maximal formation of cAMP stimulated by forskolin (0.1 mmol/L) for each animal, there were no differences between untreated WKY and SHR and between untreated SHR and SHR treated with enalaprilat (Table 5). This implies an altered adenylyl cyclase activity in isoproterenol and Gpp(NH)p responses. The ratio of cAMP formation induced by sodium fluoride, which activates Gs directly, to forskolin induced cAMP formation was similar in WKY and SHR, and the treatments had no effects on the Gs-adenylyl cyclase pathway (Table 5).

Discussion

Chronic treatments with losartan and enalaprilat displaced MAP response curves to exogenous Ang II and Ang I to a similar degree in WKY and SHR. Therefore, achieving a similar blockade of the RAS with equipotent doses allowed us to better compare the effects of these two drugs on haemodynamic and pre- and post-synaptic

sympathetic functions. Since the plasma levels of losartan and its major metabolite EXP 3174 were similar and losartan increased the ED₅₀ similarly in both strains, the efficacy of Ang II receptor blockade was reflected by the plasma levels of the drug and its metabolite. In normotensive rats treated with various doses of losartan and enalaprilat, we have previously demonstrated that the doses chosen in the present study produced equally efficient maximal angiotensin blockade and that higher doses of losartan were not more effective in blocking vascular Ang II receptors.¹³ In addition, both treatments attenuated angiotensin-induced inositol phosphates formation in both WKY and SHR (data not shown).¹⁴

Both chronic treatments with losartan and enalaprilat similarly reduced BP and cardiac mass suggesting that the RAS is implicated in the development and/or maintenance of hypertension and cardiac hypertrophy in SHR. Other studies have also reported that RAS blockade lowered BP in SHR, although this model is generally considered to be a normal- or low-renin type of hypertension. This suggests that angiotensin blockade interferes with BP control systems other than that expressed by circulating renin or angiotensin levels. In SHR, losartan and enalaprilat were found to reduce BP and increase plasma renin activity and Ang II levels, but left ventricular Ang II content decreased concomitantly with the regression of left ventricular hypertrophy.¹⁵⁻¹⁷ It has been demonstrated that SHR have increased levels of angiotensinogen mRNA in the hypertrophied ventricle, suggesting enhanced expression of the cardiac RAS.¹⁸ Several studies have reported that even at doses that had no effect on BP, ACE inhibitors produced a regression of cardiac hypertrophy, whereas others have suggested that Ang II induced an AT₁ receptor-mediated cardiac hypertrophy independent of mechanical stimuli.^{19,20} These results provide evidence that the blockade of tissue Ang II plays an important role in the pharmacological effects of RAS inhibitors, such as BP reduction and regression of cardiac hypertrophy.

Kinin accumulation and production of vasodilator prostaglandins also have been proposed to be responsible for the beneficial effect of ACE inhibitors.²¹ Moreover,

since aldosterone has been suspected to be a mediator of cardiac hypertrophy, a theoretical advantage of AT₁ receptors antagonists could be through achieving a greater aldosterone suppression compared with ACE inhibitors.²² However, in the present study, treatment with an AT₁ antagonist or an ACE inhibitor given at equipotent doses resulted in similar hypotensive and cardiac effects. Thus, no advantages of one drug over the other were observed indicating that the putative kinin hypotensive mechanism of the ACE inhibitor was not sufficiently important to result in additional haemodynamic effects. This observation also confirms the results of other researchers, who reported that bradykinin is not involved in the effects of ACE inhibitors in SHR.²³

Basal plasma and cardiac norepinephrine and epinephrine levels did not differ significantly in untreated normotensive and hypertensive animals and yet constitute an abnormality indicating a reduced sensitivity of baroreceptor mechanisms in SHR. Moreover, the similar fall in BP after sodium nitroprusside infusion in untreated WKY and SHR was associated with markedly greater increases in plasma norepinephrine and epinephrine and a slightly greater increase in heart rate in SHR, suggesting an important sympathetic hyperreactivity. This could be due to an impaired sensitivity of the baroreflex control and/or an increased sensitivity of the presynaptic facilitative mechanisms, as has been postulated in young SHR.²⁴ In support of that latter mechanism, we have reported a greater sensitivity of the presynaptic modulation by Ang II, via AT₁ receptors, of adrenergic neurotransmission in isolated rat atria of untreated SHR whereas chronic treatment with losartan inhibited the effect of Ang II on norepinephrine release.²⁵

Liard²⁶ reported that the arterial baroreflex is reset toward higher BP levels in SHR. One putative central effect of Ang II on the cardiovascular system could be through the attenuation of the baroreceptor reflex-mediated decrease in sympathetic nerve activity. It has been reported that the baroreflex control of heart rate is impaired after central administration of Ang II in SHR, resulting in a blunted response to the pressor

effect of phenylephrine and an exaggerated response to hypotension.^{4,27} This experimental evidence suggests the contribution of a hyperactivity of the brain RAS to hypertension and to the impairment of the baroreceptor reflex control of heart rate in SHR. If endogenous Ang II thus acts on cardiovascular centers to attenuate the baroreceptor reflex, then the reduction in Ang II biosynthesis or the blockade of its action in the brainstem could lead to the sensitization of the baroreceptor reflex. The degree to which the brain RAS is blocked by enalaprilat or losartan depends on the capacity of the drugs to reach the brain from the blood. This is likely to happen since the angiotensin-sensitive sites in the rat brain are densely vascularized and devoid of a blood-brain barrier which makes those structures reactive to both blood-borne and brain angiotensin.²⁸ Chronic treatment of SHR with EXP 3174 decreased MAP and restored baroreflex function to levels similar to those in control WKY rats.²⁹ However, it is still not known whether functional blockade of central AT₁ receptors is associated with the restoration of baroreflex function in SHR.

Despite an important BP reduction, neither losartan nor enalaprilat treatments elicited a reflex tachycardia or rise in plasma catecholamine levels in SHR. This lack of reflex sympathetic activation could indicate that the baroreflex set point was changed or that the peripheral sympathetic reactivity was attenuated. Moreover, we observed a blunted response to nitroprusside-induced hypotension in SHR treated with losartan and enalaprilat thus reversing the sympathetic hyperreactivity observed in SHR. Such sympatholytic actions could play a significant role in the antihypertensive effect of losartan and enalaprilat. These results suggest that the RAS is directly implicated in the sympathetic hyperresponsiveness in SHR.

Although the total population of cardiac β -adrenoceptors was similar in SHR and WKY rats, a reduction of their affinity constant in untreated SHR was associated with changes in the relative density of β -adrenoceptor subtypes. β_1 -Adrenoceptors were predominant in WKY, whereas cardiac β_2 -adrenoceptors were predominant subtype in SHR. The physiological role of cardiac β_2 -adrenoceptors is still not

completely understood in rats. It has been proposed that β_2 -adrenoceptors are involved in the positive chronotropic effects of β -adrenergic agonists.³⁰ Since norepinephrine is the major peripheral sympathetic neurotransmitter acting almost exclusively at cardiac β_1 -adrenoceptors under normal physiological conditions, only β_1 -adrenoceptors would regulate heart rate and contractility. Whereas epinephrine stimulates both β_1 - and β_2 -adrenoceptors, in the situation of increased epinephrine levels cardiac β_2 -adrenoceptor stimulation would also contribute to increases in heart rate or contractility. Similar differential regulation of β -adrenoceptor subtypes seems to occur in SHR, deoxycorticosterone acetate-salt hypertension in rats, and chronic heart failure in humans.³⁰⁻³³ In human heart failure cardiac β_2 -adrenoceptors have been suggested to compensate for the loss of β_1 -adrenoceptors, maintaining contractility. Since the majority of rat cardiac β_2 -adrenoceptors are found on endothelial cells and prejunctional nerve endings, β_2 -adrenoceptors-mediated facilitation of sympathetic neurotransmission was suggested to be involved in mediating the pro-hypertensive effects of circulating epinephrine in the SHR.³⁴ Transgenic mice overexpressing cardiac β_2 -adrenoceptors demonstrated increases in adenylyl cyclase activity, atrial contractility, and *in vivo* left ventricular function.³⁵ Therefore, the overexpression of β_2 -adrenoceptors in SHR might result in the maintenance of a physiological response. The treatments with losartan and enalaprilat were associated with the normalization of β -receptor affinity and with the restoration of the proportion of β_1 and β_2 subtypes. Moreover, the total population of β -adrenoceptors was slightly increased in SHR treated with enalaprilat. Since Ang II potentiates sympathetic neurotransmission, an angiotensin blockade-induced decrease in neurohumoral reactivity could contribute to the restoration of β -adrenoceptors affinity. In accordance with these results, we have previously reported an increased number of human lymphocytic β -adrenergic receptors after chronic trandolapril treatment in association with a decreased sympathetic reactivity to isometric exercise and postural changes.³⁶ It has also been reported that ACE inhibitors can resensitize the β -adrenergic receptor system in heart failure^{37,38} and after chronic catecholamine exposure.³⁹ Although the resensitization of β -adrenoceptors could be explained by the

sympatholytic effect of RAS blockade, it is unknown why ACE inhibitors and the AT₁ receptor antagonist exerted a different effect. The role of kinin needs to be explored further in this respect.

The hyperresponsiveness of adenylyl cyclase catalytic activity observed in SHR seemed to be responsible for the enhanced production of β -adrenoceptor-coupled second messengers since functional coupling was similar in WKY and SHR hearts. Our results confirm those of other researchers who reported an enhanced myocardial adenylyl cyclase activity in SHR.⁴⁰ The increased responsiveness of the β -adrenergic signaling system could be associated with the development of hypertension through an increased cardiac output as was demonstrated in young human with labile hypertension and in neonatal SHR.⁴⁰ The increased adenylyl cyclase activity in our studies suggests that modifications of the catalytic unit activity itself occurred. In contrast, other studies have reported that the adenylyl cyclase activity was greater in WKY than in SHR probably because of alterations in Gs function or of enhanced Gi activity in SHR.^{41,42} However, we and others have observed no qualitative differences in Gs or Gi proteins as measured by immunoblotting studies in both strains before and after losartan and enalaprilat treatments (data not shown).^{43,44} Another hypothesis could imply a reduced inhibitory influence of Gi on adenylyl cyclase activity, as was reported in platelets from SHR, independent of the similar levels of G protein subunits in WKY and SHR.⁴⁵ A further question that will need to be investigated is whether the expression of the type of cardiac adenylyl cyclase is altered in hypertension and/or by the treatments, as each type of adenylyl cyclase is differently regulated by G protein $\beta\gamma$ - and α -subunits.

Only the chronic treatment with enalaprilat restored significantly the adenylyl cyclase activity to values similar to those in control WKY. On the other hand, the sensitivity of the nucleotide regulatory protein-catalytic subunit complex was decreased in both WKY and SHR treated with enalaprilat, indicating a possible interaction of the drug on this coupling via alterations at the level of Gs, the catalytic subunit, or both.

However, the apparent unchanged sensitivity of the receptor-stimulated signaling pathway might be due to the potentiating effect of enalaprilat on the number and affinity of total cardiac β -adrenergic receptors, thus masking the defective coupling between the nucleotide regulatory protein and adenylyl cyclase. In right ventricular membrane preparations from WKY and SHR treated with enalaprilat we also observed a similar significant reduction in adenylyl cyclase activity and an uncoupling between G proteins and adenylyl cyclase (data not shown). Thus, enalaprilat seems to interact with the components of the β -adrenergic signaling pathway by reducing the hyperactivity of the catalytic subunit, by the uncoupling of the Gs-adenylyl cyclase complex and by increasing β -adrenergic receptor number and affinity. In contrast, losartan seems to exert an effect only on β -adrenergic receptor affinity.

Conclusion

The results of the present study support the possibility that functional alterations of the sympathetic system and RAS are involved in the pathogenesis of hypertension in SHR. Indeed, the reflex reactivity of the sympathetic system was exaggerated in conscious hypertensive animals compared with WKY, and an increased adenylyl cyclase activity concomitant with a higher proportion of β_2 -adrenoceptors was observed in left ventricular membrane preparations of SHR. The contribution of the RAS in this form of experimental hypertension was supported by the marked BP-lowering effect accompanied by the inhibition of the sympathetic hyperreactivity in SHR after chronic treatments with losartan and enalaprilat. The treatments with RAS inhibitors attenuated the sympathetic pathway hyperresponsiveness and restored the proportions of β_1 - and β_2 -adrenoceptors to values similar to those observed in WKY, suggesting an important interaction with the sympathetic system in the maintenance of an elevated BP in this hypertension model. Our study thus supports the hypothesis that the local RAS contributes to the alterations of pre- or postsynaptic adrenergic functions associated with the development or maintenance of hypertension in SHR.

Acknowledgments

The authors would like to express their gratitude to Jo-Anne Le Guerrier, Diane Papin and Carole Champagne for their technical assistance. This work was supported by grants from the Medical Research Council of Canada and from the Quebec Heart and Stroke Foundation. A.K.-Laflamme held a studentship from the Canadian Heart and Stroke Foundation (CHSF). L. Oster held a fellowship from CHSF / Merck Frosst. R. Cardinal held a scholarship from the Fonds de la Recherche en Santé du Québec. J. de Champlain holds a career investigatorship from the J.C. Edwards Foundation.

References

1. Phillips MI, Speakman EA, Kimura B: Levels of angiotensin and molecular biology of the tissue renin angiotensin systems. *Regulatory Peptides*, 1993; 43: 1-20.
2. Dzau VJ: Circulating versus local renin-angiotensin system in cardiovascular. *Circulation*, 1988; 77(Suppl I): I-4-I-13.
3. Keuneke C, Yacullo R, Metzger R, Hellmann T, Peters J, Ganten D: The role of tissue renin-angiotensin systems in hypertension and effects of chronic converting-enzyme inhibition. *Eur Heart J*, 1990; 11(Suppl D): 11-16.
4. Saxena PR: Interaction between the renin-angiotensin-aldosterone and sympathetic nervous systems. *J Cardiovasc Pharmacol*, 1992; 19 (Suppl.6): S80-S86.
5. Story DF, Ziogas J: Interaction of angiotensin with noradrenergic neuroeffector transmission. *TIPS*, 1987; 8: 269-271.
6. MacFadyen RJ, Reid JL: Angiotensin receptor antagonists as a treatment for hypertension. *J Hypertens*, 1994; 12: 1333-1338.
7. Peuler JD, Johnson GA: Simultaneous single isotope radioenzymatic assay of plasma norepinephrine, epinephrine and dopamine. *Life Sci*, 1977 ; 21: 625-636.
8. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ: Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 1951, 193: 265-275.

9. Scatchard G: The attraction of proteins for small molecules and ions. *Ann N Y Acad Sci*, 1949; 51: 660-672.
10. DeLéan A, Munson PJ, Rodbard D: Simultaneous analysis of families of sigmoidal curves: application to bioassay, radioligand assay and physiological dose-response curves. *Am J Physiol*, 1978;235: E97-E102.
11. Salomon Y: Adenylate cyclase assay. In *advances in cyclic nucleotide research*. Edited by Brooker G, Greengard P, Robison GA. New York: Raven Press 1979, 10: 35-55.
12. Furtek CI, Lo M-W: Simultaneous determination of a novel angiotensin II receptor blocking agent, losartan, and its metabolite in human plasma and urine by high-performance liquid chromatography. *J Chromatography* 1992; 573: 295-301.
13. Moreau P, Oster L, Laflamme AK, Lambert C, de Champlain: Relationship between the plasma and the efficacy of losartan during a chronic therapy in the rat. *Can J Physiol Pharmacol*, 1994; 72(suppl 1): 178. Abstract.
14. Oster L, Laflamme AK, Moreau P, de Champlain J: Effect of losartan and enalaprilat in inositol phosphate accumulation in aorta of SHR. *J Hypertens*, 1994; 12(suppl 3): S88. Abstract.
15. Mizuno K, Niimura S, Tani M, Haga H, Gomibuchi T, Sanada H, Fukuchi S: Antihypertensive and hormonal activity of MK 954 in spontaneously hypertensive rats. *Eur J Pharmacol*, 1992;215: 305-308.
16. Mizuno K, Tani M, Hashimoto S, Niimura S, Sanada H, Watanabe H, Ohtsuki M, Fukuchi S: Effects of losartan, a nonpeptide angiotensin II receptor antagonist, on cardiac hypertrophy and the tissue angiotensin II content in spontaneously hypertensive rats. *Life Sci*, 1992; 51: 367-374.
17. Nagano M, Higaki J, Mikami H, Nakamaru M, Higashimori K, Katahira K, Tabuchi Y, Moriguchi A, Nakamura F, Ogihara T: Converting enzyme inhibitors regressed cardiac hypertrophy and reduced tissue angiotensin II in spontaneously hypertensive rats. *J Hypertens*, 1991; 9: 595-599.
18. Li C, Prakash O, Re RN: Altered expression of angiotensinogen gene expression in the left ventricles of the hypertensive rats (Abstract). *Circulation*, 1989; 80

(Suppl II): II450.

19. Linz W, Schölkens BA, Ganten D: Converting enzyme inhibition specifically prevents the development and induces the regression of cardiac hypertrophy in rats. *Clin Exp Hypert*, 1989; 11: 1325-1350.
20. Dostal DE, Baker KM: Angiotensin II stimulation of left ventricular hypertrophy in adult rat heart, mediation by the AT1 receptor. *Am J Hypertens*, 1992; 5: 276-280.
21. Van Gilst WH, Scholtens E, De Graeff PA, De Langen CDJ, Wesseling H: Differential influences of angiotensin converting-enzyme inhibitors on the coronary circulation. *Circ*, 1988; 77(suppl I): I24-I29.
22. Rosolowsky LJ, Campbell WB: Bradykinin stimulates aldosterone release from cultured bovine adrenocortical cells through bradykinin B2 receptors. *Endocrinology*, 1992; 130: 2067-2075.
23. Chauvin B, Richer C, Giudicelli JF: Lack of involvement of bradykinin in the vascular sympathoinhibitory effects of angiotensin converting enzyme inhibitors in spontaneously hypertensive rats. *Br J Pharmacol*, 1995; 116: 2229-2236.
24. Borkowski KR: Effect of adrenal demedullation and adrenaline on hypertension development and vascular reactivity in young spontaneously hypertensive rats. *J Auton Pharmacol* 1991; 11: 1-14.
25. Foucart S, Patrick S, Oster L, de Champlain J.: Effects of chronic treatment with losartan and enalaprilat on [³H]-norepinephrine release from isolated atria of Wistar-Kyoto and spontaneously rats. *Am J Hypertens*, 1996; 9: 61-69.
26. Liard JF: The baroreceptor reflexes in experimental hypertension. *Clin Exp Hypertens*, 1980; 2: 479-498.
27. Guo GB, Abboud FM: Angiotensin II attenuates baroreceptor control of heart rate and sympathetic activity. *Am J Physiol*, 1984; 246: H80-H89.
28. Unger T, Badoer E, Ganten D, Lang R, Rettig R: Brain angiotensin: pathways and pharmacology. *Circulation*, 1988; 77(Suppl 77): I40-I54.
29. Bartholomeusz B, Widdop RE: Effect of acute and chronic treatment with the angiotensin II subtype 1 receptor antagonist EXP3174 on baroreflex function in

- conscious spontaneously hypertensive rats. *J Hypertens*, 1995; 13: 219-225.
30. Brodde OE: β_1 - and β_2 -adrenoceptors in the human heart: properties, function, and alterations in chronic heart failure. *Pharmacol reviews*, 1991; 43(2): 203-242.
 31. Michel MC, Wang XL, Schlicker E, Göthert M, Beckeringh JJ, Brodde OE: Increased β_2 -adrenoceptor density in heart, lung and kidney of spontaneously hypertensive rats. *J Auton Pharmacol*, 1987; 7: 41-51.
 32. Yamada S, Ishima T, Tomita T, Hayashi M, Okada T, Hayashi E: Alterations in cardiac alpha and beta adrenoceptors during the development of spontaneous hypertension. *J Pharmacol Exp Ther*, 1984; 228: 454-460.
 33. Nguyen CT, de Champlain J, Bouvier M: Tissue specific changes in β -adrenergic receptors subtypes in DOCA-Salt hypertensive rats. *Biomedical J*, 1995; 2: 34-42.
 34. Borkowski KR, Quinn P: Adrenaline and the development of spontaneous hypertension in rats. *J Auton Pharmacol*, 1985; 5: 89-100.
 35. Milano CA, Allen LF, Rockam HA, Dolber PC, McMinn TR, Chien KR, Johnson TD, Bond RA, Lefkowitz RJ: Enhanced myocardial function in transgenic mice overexpressing the β_2 -adrenergic receptor. *Science*, 1994; 264: 582-586.
 36. de Champlain J, Yacine A, Leblanc R, Bouvier M, Lebeau R, Nadeau R: Effects oftrandolapril on the sympathetic tone and reactivity in systemic hypertension. *Am J Cardiol*, 1994; 73: 18C-25C.
 37. Horn E, Corwin SJ, Steinberg SF, Chow YK, Neuberg GW, Cannon PJ, Powers ER, Bilezikian JP: Reduced lymphocyte stimulatory guanine nucleotide regulatory protein and β -adrenergic receptors in congestive heart failure and reversal with angiotensin converting enzyme inhibitor therapy. *Circ*, 1988; 78: 1373-1379.
 38. Gilbert EM, Sandoval A, Larrabee P, Renlund DG, O'Connell JB, Bristow MR: Effect of lisinopril on cardiac adrenergic drive and myocardial β -receptor density in heart failure. *Circ*, 1988; 78 (suppl. II): II-576. Abstract.
 39. Maisel AS, Phillips C, Michel MC, Ziegler MG, Carter SM: Regulation of cardiac β -adrenergic receptors by captopril, implications for congestive heart failure. *Circ* 1989; 80: 669-675.
 40. Hamet P, Orlov SN, Tremblay J: Intracellular signaling mechanisms in

- hypertension. In *Hypertension: pathophysiology, diagnosis and management*, second edition. Edited by Laragh JH and Brenner BM. New York: Raven Press, 1995: 575-607.
41. McLellan AR, Milligan G, Houslay MD, Connell JMC: G-proteins in experimental hypertension: a study of spontaneously hypertensive rat myocardial and renal cortical plasma membranes. *J Hypertens*, 1993; 11: 365-372.
 42. Anand-Srivastava MB: Enhanced expression of inhibitory guanine nucleotide regulatory protein in spontaneously hypertensive rats. *Biochem J*, 1992; 288: 79-85.
 43. Michel MC, Brodde O-E, Insel PA: Are cardiac G-proteins altered in rat models of hypertension? *J Hypertens*, 1993; 11: 355-363.
 44. Clark CJ, Milligan G, McLellan AR, Connell JMC: Guanine nucleotide regulatory proteins in the spontaneously hypertensive rat. *Hypertension*, 1993; 21: 204-209.
 45. Coquil JF, Brunelle G: Adenylate cyclase of platelets from spontaneously hypertensive rats: reduction of the inhibition by GTP. *Biochem Biophys Res Com*, 1989; 162(3): 1265-1271.

Table 1. Systolic Arterial Pressure, Body Weight, Relative Ventricular Weights, and Plasma and Cardiac Catecholamine Levels of WKY and SHR Under Control Conditions and After Chronic Treatment With Losartan or Enalaprilat.

Groups:	WKY CTL (n=19)	WKY LOS (n=11)	WKY ENA (n=21)	SHR CTL (n=26)	SHR LOS (n=14)	SHR ENA (n=24)
SBP, mm Hg	135.1 ± 1.1	128.6 ± 1.7	124.9 ± 2.1	208.5 ± 2.9 *	165.1 ± 3.6 †	161.1 ± 2.0 †
BW, g	302.2 ± 5.2	295.4 ± 5.4	291.5 ± 4.0	293.2 ± 4.1	287.4 ± 6.5	294.3 ± 3.0
LV/BW ratio, mg/g	1.84 ± 0.02	1.78 ± 0.05	1.77 ± 0.03	1.99 ± 0.03 *	1.83 ± 0.04 †	1.83 ± 0.02 †
RV/BW ratio, mg/g	0.54 ± 0.02	0.52 ± 0.01	0.51 ± 0.01	0.51 ± 0.02	0.51 ± 0.02	0.53 ± 0.02
Plasma NE, pg/mL	136.0 ± 21.3	146.6 ± 20.9	131.3 ± 9.8	137.9 ± 13.3	179.7 ± 27.2	157.4 ± 18.7
Plasma Epi, pg/mL	22.2 ± 4.1	36.7 ± 6.9	44.6 ± 8.5	35.7 ± 7.8	55.3 ± 11.3	48.6 ± 12.9
LV NE, ng/g	351.9 ± 25.5	375.5 ± 40.9	468.5 ± 44.1	378.9 ± 25.2	489.9 ± 42.6	388.0 ± 30.1
LV Epi, ng/g	12.6 ± 1.1	13.3 ± 1.9	14.6 ± 1.4	14.1 ± 1.1	19.9 ± 1.4 †	13.9 ± 0.9
RV NE, ng/g	749.5 ± 51.5	767.5 ± 42.5	901.7 ± 54.5	785.7 ± 54.2	813.6 ± 88.0	768.8 ± 42.6
RV Epi, ng/g	20.2 ± 2.1	23.7 ± 2.4	21.9 ± 1.2	21.8 ± 1.5	26.2 ± 2.9	22.4 ± 1.1

CTL indicates control; LOS, losartan; ENA, enalaprilat; SBP, systolic arterial blood pressure; BW, body weight; LV, left ventricle; RV, right ventricle; NE, norepinephrine; Epi, epinephrine. Data are mean ± SEM; n equals number of animals; plasma NE and EPI n=6-8; tissue NE and EPI n=8-15.

* $P < 0.05$ vs WKY CTL, † $P < 0.05$ vs SHR CTL.

Table 2. MAP Response Curve Parameters to Ang I and Ang II and Plasma Concentrations of Losartan and EXP 3174 in Conscious WKY and SHR Under Control Conditions and After Chronic Treatment With Losartan or Enalaprilat.

Parameter	WKY CTL	WKY LOS	WKY ENA	SHR CTL	SHR LOS	SHR ENA
Max response to Ang I, mm Hg	51.3 ± 9.0	33.7 ± 4.1	34.3 ± 5.9	62.9 ± 8.7	53.6 ± 13.1	48.3 ± 1.0
ED50, ng Ang I/kg	95.7 ± 23.0	355.3 ± 34.7 *	360.0 ± 71.1 *	124.7 ± 38.3	367.7 ± 58.0 †	414.8 ± 103.8 †
Max response to Ang II, mm Hg	57.2 ± 10.5	44.2 ± 4.4	58.0 ± 5.9	65.9 ± 4.8	60.5 ± 7.1	71.7 ± 16.1
ED50, ng Ang II/kg	20.4 ± 5.5	199.3 ± 33.2 *	47.6 ± 15.0	46.5 ± 17.4	144.4 ± 27.5 †	42.9 ± 14.1
Plasma losartan levels, ng/mL	nd	1689.0 ± 349.4	--	nd	949.7 ± 267.5	--
Plasma EXP 3174 levels, ng/mL	nd	212.3 ± 28.8	--	nd	229.3 ± 40.6	--

Rat groups are defined in Table 1. ED50 indicates dose of the agent required to produce half of the maximal response; nd: not detected. Data are given as mean ± SEM; n=5 in each group. * $P < 0.05$ vs WKY CTL, † $P < 0.05$ vs SHR CTL.

Table 3. Baseline MAP and Heart Rate in Conscious WKY and SHR Under Control Conditions and After Chronic Treatment With Losartan or Enalaprilat Before Reflex Activation of the Sympathetic System.

Parameter	WKY CTL (n=7)	WKY LOS (n=8)	WKY ENA (n=7)	SHR CTL (n=5)	SHR LOS (n=6)	SHR ENA (n=6)
MAP, mm Hg	96.1 ± 4.8	92.8 ± 2.5	90.2 ± 5.4	135.0 ± 6.1 *	110.0 ± 4.7 †	96.8 ± 9.3 †
Heart rate, bpm	326.4 ± 10.3	313.8 ± 10.6	335.5 ± 12.2	309.0 ± 7.0	334.7 ± 13.8	324.8 ± 23.2

Rat groups are defined in Table 1. Data are given as mean ± SEM; n equals number of animals.

* $P < 0.05$ vs WKY CTL, † $P < 0.05$ vs SHR CTL.

Table 4. Total Specific β -Adrenergic Receptors and β_1 - and β_2 -Subtype Parameters Measured From Displacement Curves of ICYP Binding by ICI 188,551 and β -Adrenergic Receptors Functional Coupling Measured From Displacement Curves of ICYP Binding by Isoproterenol in WKY and SHR Under Control Conditions and After Chronic Treatment With Losartan or Enalaprilat.

	WKY CTL	WKY LOS	WKY_ENA	SHR CTL	SHR LOS	SHR_ENA
Total β-AR						
Bmax, fmol/mg	22.0 \pm 1.5	21.8 \pm 1.8	25.5 \pm 1.3	23.4 \pm 1.2	21.9 \pm 1.6	29.2 \pm 1.9 \dagger
Kd, pmol/L	95.2 \pm 9.1	101.3 \pm 5.5	91.4 \pm 7.1	124.6 \pm 8.7 *	102.4 \pm 5.0 \dagger	80.1 \pm 7.1 \dagger
ICI 118,551						
Bmax _H , β_2 , %	30.9 \pm 5.3	36.3 \pm 5.7	21.8 \pm 4.9	59.5 \pm 6.4 *	22.9 \pm 8.1 \dagger	32.4 \pm 3.7 \dagger
Bmax _L , β_1 , %	69.1 \pm 5.3	63.7 \pm 5.7	78.2 \pm 4.9	40.5 \pm 6.4 *	77.1 \pm 8.1 \dagger	67.6 \pm 3.7 \dagger
Ki _H , nmol/L	11.1 \pm 8.2	14.4 \pm 8.7	10.7 \pm 6.0	2.4 \pm 0.8	17.6 \pm 11.8	18.6 \pm 12.1
Ki _L , μ mol/L	2.7 \pm 0.3	5.1 \pm 1.5	2.0 \pm 0.9	3.2 \pm 0.5	3.5 \pm 0.2	2.8 \pm 0.8
Isoproterenol						
Bmax _H , %	67.6 \pm 3.0	62.2 \pm 7.6	66.8 \pm 6.0	63.4 \pm 10.7	68.5 \pm 4.1	70.5 \pm 5.7
Bmax _L , %	32.4 \pm 3.0	37.8 \pm 7.6	31.2 \pm 6.0	36.6 \pm 10.7	31.5 \pm 4.1	29.5 \pm 5.7
Ki _H , nmol/L	3.4 \pm 0.8	12.2 \pm 7.8	6.2 \pm 3.0	12.8 \pm 7.1	9.6 \pm 4.8	6.5 \pm 2.9
Ki _L , μ mol/L	2.3 \pm 1.3	2.2 \pm 1.2	5.9 \pm 2.5	38.1 \pm 29.1	10.3 \pm 7.2	11.7 \pm 10.4
Isoproterenol+ Gpp(NH)p						
Bmax, fmol/mg	14.1 \pm 2.5	13.2 \pm 1.8	17.4 \pm 1.8	14.2 \pm 3.2	13.1 \pm 1.5	15.2 \pm 2.0
Ki, nmol/L	257.8 \pm 65.8	764.5 \pm 373.6	283.3 \pm 32.4	531.2 \pm 159.3	421.2 \pm 142.2	314.7 \pm 119.5

Rat groups are defined in Table 1. β -AR indicates β -Adrenergic receptors; Bmax, total specific β -AR density; Bmax_H, fraction of β -AR with high affinity for the selective antagonist or agonist; Bmax_L, fraction of β -AR with low affinity for the selective antagonist or agonist; Kd, equilibrium dissociation constant of total specific β -AR; and Ki_H, equilibrium dissociation constant of high-affinity (H) or low-affinity (L) sites determined by competition binding assays. Data are mean \pm SEM; n=4-8 in each group. * $P < 0.05$ vs WKY CTL, $\dagger P < 0.05$ vs SHR CTL.

Table 5. Adenylyl Cyclase Pathway Activity and Sensitivity Evaluated by Dose-Response Curves of Camp-Induced Formation With Different Agonists in Left Ventricular Membrane Preparations from WKY and SHR Under Control Conditions and After Chronic Treatment with Losartan or Enalaprilat.

	WKY CTL	WKY LOS	WKY ENA	SHR CTL	SHR LOS	SHR ENA
<i>Basal</i> , pmol cAMP/mg/min	27.3 ± 1.3	22.4 ± 0.8	26.3 ± 1.4	29.9 ± 1.1	24.9 ± 0.7	25.7 ± 1.4
<i>Isoproterenol</i>						
EC ₅₀ , log (mol/L)	-5.9 ± 0.1	-5.8 ± 0.1	-6.1 ± 0.1	-5.9 ± 0.1	-5.9 ± 0.1	-6.1 ± 0.1
V _{max} , pmol cAMP/mg/min	28.8 ± 2.8	22.3 ± 2.1	27.0 ± 1.8	35.5 ± 2.5 *	30.3 ± 1.4	26.5 ± 1.3 †
<i>Gpp(NH)p</i>						
EC ₅₀ , log (mol/L)	-4.1 ± 0.1	-4.0 ± 0.1	-3.5 ± 0.2 *	-4.2 ± 0.2	-4.1 ± 0.1	-3.7 ± 0.1 †
V _{max} , pmol cAMP/mg/min	22.1 ± 1.9	21.0 ± 1.1	16.7 ± 1.5	32.6 ± 2.8 *	30.4 ± 1.8	21.6 ± 1.4 †
<i>Forskolin</i>						
EC ₅₀ , log (mol/L)	-5.5 ± 0.1	-5.4 ± 0.1	-5.5 ± 0.1	-5.6 ± 0.1	-5.4 ± 0.1	-5.6 ± 0.1
V _{max} , pmol cAMP/mg/min	94.4 ± 9.8	93.8 ± 4.7	107.9 ± 10.9	144.7 ± 12.1 *	137.7 ± 12.3	86.0 ± 4.1 †
<i>Iso</i> (0.1 mmol/L) / <i>For</i> (0.1 mmol/L), %	27.1 ± 3.1	27.2 ± 3.2	27.4 ± 4.0	29.7 ± 5.0	22.8 ± 1.7	29.1 ± 2.5
<i>Gpp(NH)p</i> (1.0 mmol/L) / <i>For</i> (0.1 mmol/L), %	22.5 ± 4.4	24.5 ± 1.3	19.5 ± 4.0	25.9 ± 2.3	21.1 ± 1.3	21.9 ± 1.5
<i>NaF</i> (10 mmol/L) / <i>For</i> (0.1 mmol/L), %	52.8 ± 4.8	53.8 ± 10.2	45.9 ± 4.4	41.3 ± 3.5	46.9 ± 3.9	43.8 ± 3.7

Rat groups are defined in Table 1. EC₅₀ indicates concentration of the agonist required for half-maximal cAMP formation; V_{max}, maximal rate of conversion of ATP to cAMP; Iso, isoproterenol; For, Forskolin; NaF, sodium fluoride. Data are given as mean ± SEM. n=8-10 in each group.

* $P < 0.05$ vs WKY CTL, † $P < 0.05$ vs SHR CTL.

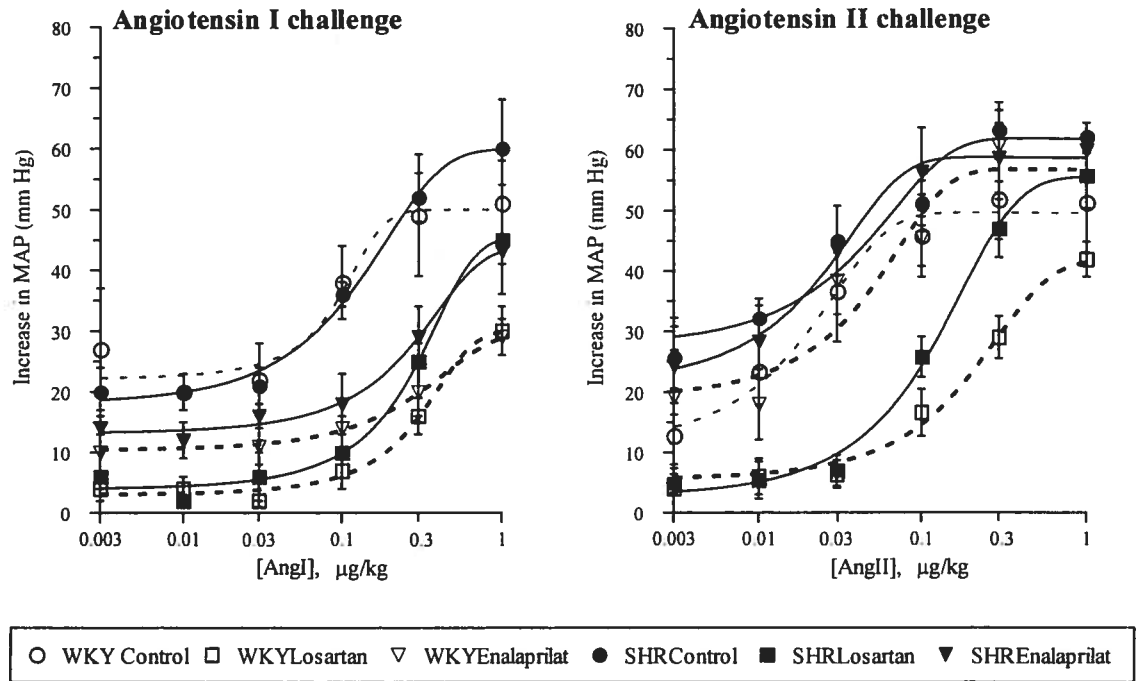


Fig 1. Inhibition of dose-pressure response curves to either Ang I or Ang II in WKY and SHR untreated (control) and treated with losartan or enalaprilat. Changes in mean arterial pressure (MAP) were measured after intravenous bolus injections of Ang I or Ang II in conscious rats.

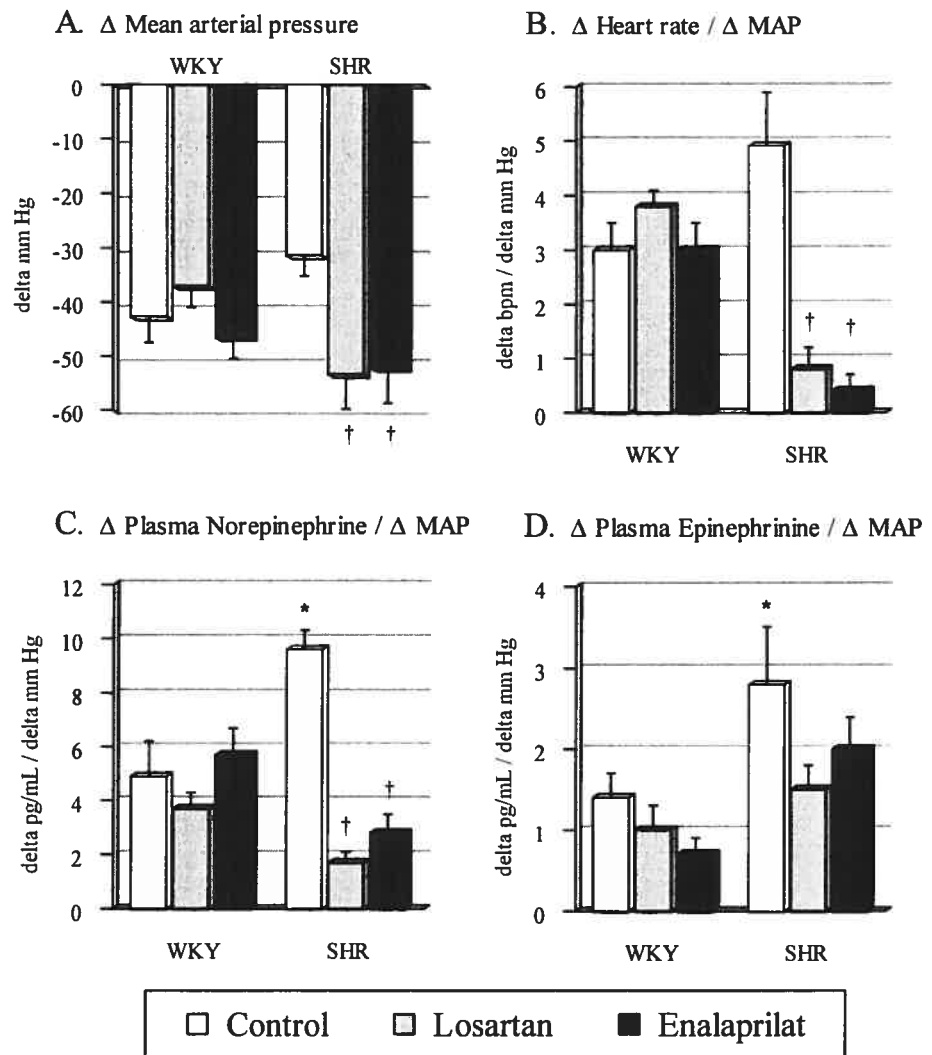


Fig 2. *In vivo* hypotensive responses induced by infusion of nitroprusside (50 μ g/kg per minute, 5 minutes). The hypotensive responses were measured by the changes in MAP in WKY and SHR, untreated (control) and treated with losartan or enalaprilat (A). Associated increases in heart rate (B) and plasma norepinephrine (C) and epinephrine (D) levels are represented as values relative to changes in MAP. * P <0.05 vs WKY control, † P <0.05 vs SHR control.

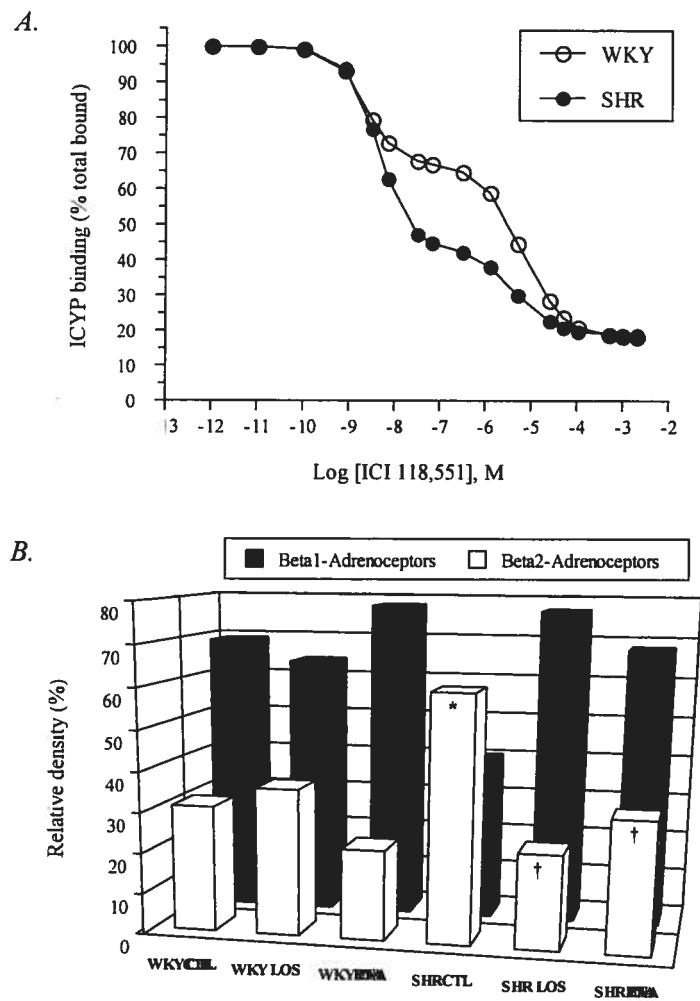


Fig 3. *A.* β_1 and β_2 -adrenoceptor relative density in left ventricular membrane preparations measured by the competition of ICYP (50 pmol/L) binding by the selective β_2 antagonist ICI 118,551. Results shown are computer-generated fits of representative experiments in untreated WKY and SHR. *B.* Proportions of β_1 and β_2 -adrenoceptors are expressed as percentage of total specific ICYP binding and represent the mean of values calculated for each rat. CTL indicates control; LOS, Losartan; and ENA, Enalaprilat. * $P < 0.05$ vs WKY CTL, † $P < 0.05$ vs SHR CTL.

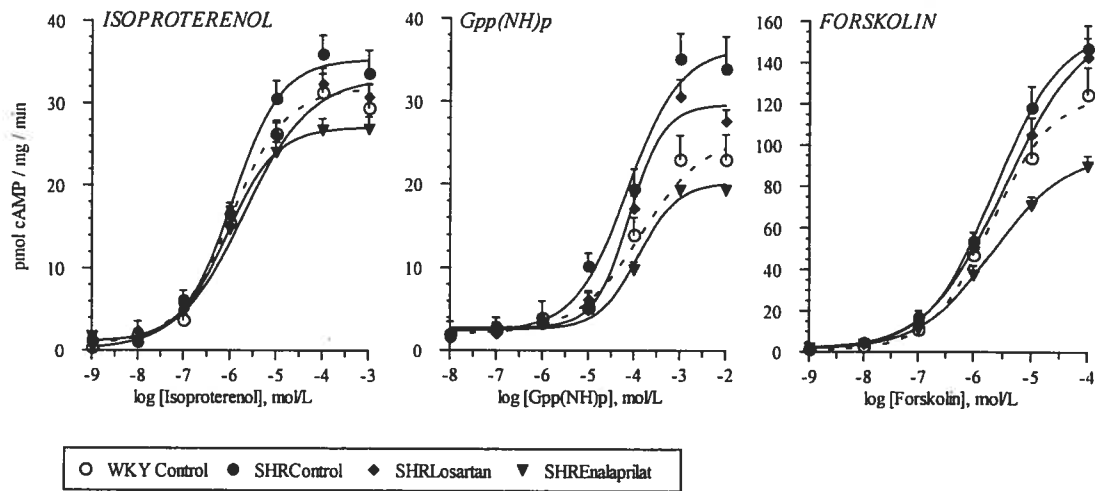


Fig 4. Adenylyl cyclase activity assessed by measurement of cAMP formation in the presence of increasing concentrations of different agents in left ventricular membrane preparations from untreated WKY and SHR (control) and SHR treated with losartan or enalaprilat. The stimulation of cAMP formation is expressed over basal cAMP formation.

ANNEXE

Additional Unpublished Figures, related to the published data:

Figure 5: Systolic arterial blood pressure in WKY and SHR untreated and treated with losartan or enalaprilat.

* This figure represents data which are presented in Table 1 of the publication.

Figure 6: Typical Scatchard analysis of 125 I-cyanopindolol binding to left ventricular membrane preparations from WKY and SHR untreated or treated with losartan or enalaprilat.

* Typical graphical representation of total specific β -adrenergic receptors parameters from one animal of each group. Mean data are presented in Table 4 of the publication.

Figure 7: Typical blots showing levels of α -subunits of G proteins detected by immunoblot analysis in myocardial plasma membranes from WKY and SHR untreated (CTL) or treated with losartan (LOS) or enalaprilat (ENA).

* * This figure represents data which are discussed in the discussion section of the publication but not shown.

Unpublished results of Inositol phosphate measurements.

Methods, Results, Discussion, Figure 8, Figure 9, Table 6.

* * This section represents data which are discussed in the discussion section of the publication but not shown.

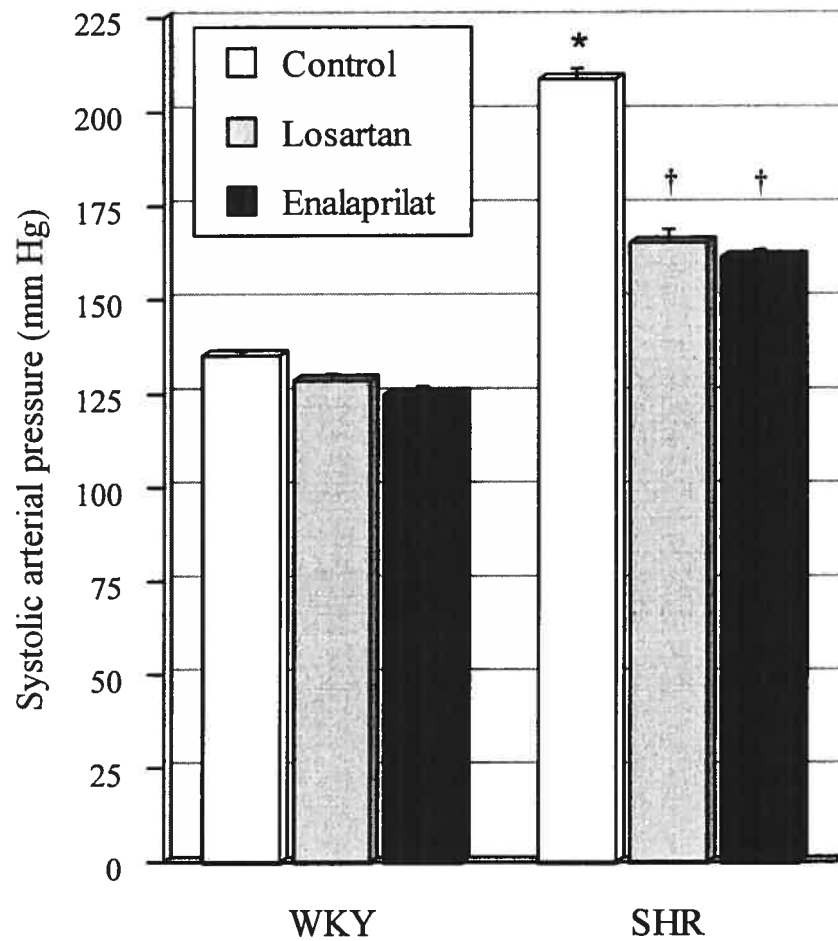


Fig 5. Systolic arterial blood pressure measured by tail-cuff plethysmography in WKY and SHR untreated (control) and treated with losartan or enalaprilat (5 or 1 mg/kg/day, respectively) by subcutaneous osmotic pumps for a period of 12 days. * $P < 0.05$ vs WKY Control, † $P < 0.05$ vs SHR Control.

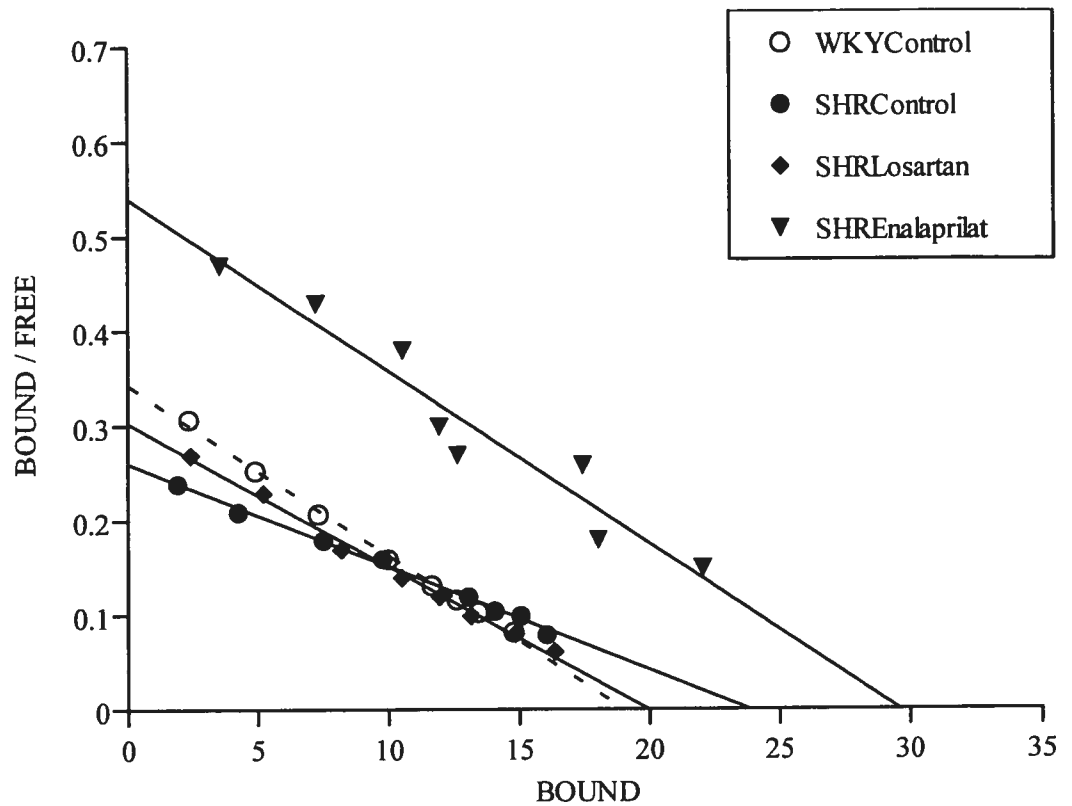


Fig 6. Typical Scatchard analysis representing specific ^{125}I -cyanopindolol binding to left ventricular membrane preparations from WKY and SHR in control conditions or treated with losartan or enalaprilat. Non specific binding was detected in the presence of alprenolol ($10 \mu\text{mol/L}$).

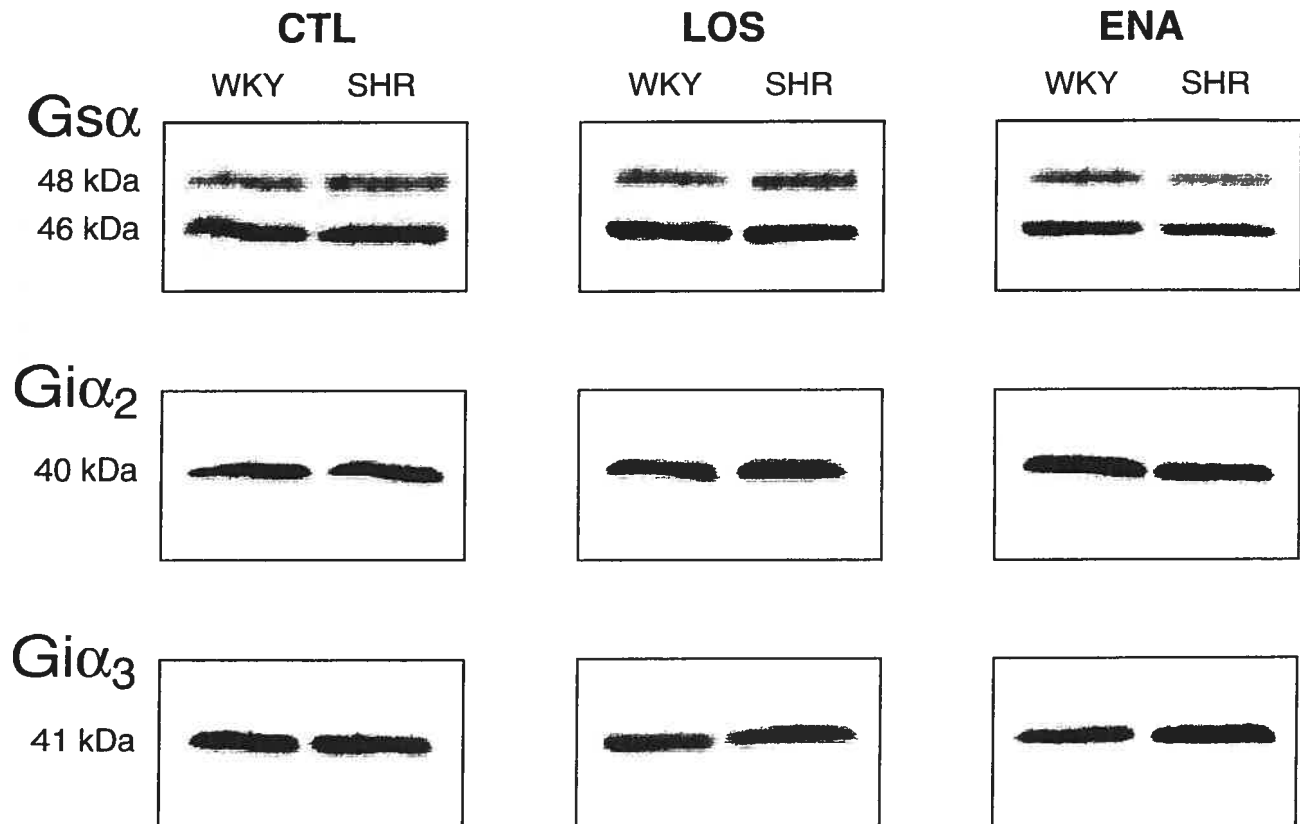


Fig 7. Typical blots showing levels of α -subunits of G proteins detected by immunoblot analysis in myocardial plasma membranes from WKY and SHR untreated (CTL) or treated with losartan (LOS) or enalaprilat (ENA).

(Unpublished results)

Inositol phosphate measurements

After the rats were sacrificed, the mesenteric artery and the aorta were excised rapidly and placed in oxygenated cold Krebs-Henseleit solution. Phosphatidylinositol labeling and inositol isolation were performed as previously described.^{1a} Briefly, the tissues were incubated for 4 hours at 37 °C in the Krebs-Henseleit buffer containing 20 µCi/ml of [³H]-myoinositol. The rings were then rinsed and incubated for 10 minutes with 50 mmol/L of LiCl. In stimulation experiments, phenylephrine (100 µmol/L), endothelin (50 nmol/L), Ang I (100 nmol/L) and Ang II (100 nmol/L) were added during 30 minutes. The vascular segments were then homogenized in cold chloroform/methanol (1:2). The tritiated inositol phosphate pool (IPP) of the aqueous phase containing IP, IP₂ and IP₃ was separated by ion-exchange chromatography (AG1-X8 resin, Bio-Rad Laboratories). The organic phase was counted for the measurement of the phosphatidylinositol lipid pool (PLP). The accumulation of inositol phosphate was expressed as a ratio of IPP over the PLP to correct for the variation in the labeling of the lipid pool.

Results

Basal and agonist-mediated stimulation of the phosphoinositide pathway activity

The formation of inositol phosphates in basal conditions and stimulated with different agonists in aorta and mesenteric arteries from WKY and SHR is depicted in Table 6. The basal accumulation of inositol phosphates (IPP) expressed as a ratio of the labeled phosphatidylinositol lipid pool (PIP) was similar in control WKY and SHR and was not altered by the treatments with losartan or enalaprilat in the mesenteric arteries. The basal production was slightly but significantly greater in the aorta of SHR but was not altered by the treatments. The α_1 -adrenergic induced inositol phosphates accumulation was slightly decreased in aorta of SHR whereas it was similar in mesenteric arteries of WKY and SHR. Endothelin and Ang I stimulations of inositol phosphates were also similar in aorta and mesenteric arteries of WKY and

SHR. Ang II stimulated inositol phosphates formation similarly in aorta of control WKY and SHR. As expected the treatments with enalaprilat reduced Ang I responsiveness. However, treatments with both losartan and enalaprilat reduced Ang II responsiveness (Fig 7). Since the mesenteric arteries of SHR seemed to be poorly responsive to Ang II stimulation, angiotensin blockade could not be evaluated properly. Treatments with losartan and enalaprilat increased the phenylephrine mediated generation of inositol phosphates, whereas only losartan treatments increased the endothelin induced inositol phosphates accumulation in both vascular tissues in SHR. The effects of chronic treatments with losartan and enalaprilat on the agonists induced formation of inositol phosphates followed a similar trend in WKY (Fig 8).

Discussion

The basal inositol phosphates formation was slightly increased in aortic rings from SHR while Ang II and endothelin induced similar responses and phenylephrine induced a lower inositol phosphates formation. In the mesenteric artery from untreated SHR the hypertension was not associated with an altered basal activity or agonists responsiveness of the phosphoinositide pathway. Several studies reported varying results on the basal activity of the vascular phosphoinositide pathway in SHR indicating either no differences in aortic rings^{1b} or an increase in vascular smooth muscle cells^{1c,1d} while α_1 -adrenoceptor induced IPP formation was found to be either decreased^{1b} or increased^{1c,1d}. In both vascular tissues, enalaprilat treatment attenuated Ang I induced inositol phosphates formation in WKY and SHR, confirming the efficacy of ACE inhibition. Surprisingly, chronic enalaprilat treatment also attenuated Ang II responsiveness in aorta suggesting a possible interference of the ACE inhibitor with Ang II receptor function. Moreover enalaprilat treatment potentiated phenylephrine responsiveness in both vascular tissues in SHR. In the aorta of WKY and SHR treated with losartan, the Ang II responses were attenuated whereas the phenylephrine and the endothelin responsiveness were both potentiated. The potentiating effect of angiotensin blockade on phenylephrine and endothelin

activation of the phosphoinositide pathway cannot be explained by the present results but suggests that Ang II could exert a negative feedback on the phosphoinositide pathway activation by NE or endothelin presumably through negative feedback control from protein kinase C. Nevertheless, since both treatments attenuated angiotensin induced inositol phosphates formation, this suggests a participation of the phosphoinositide pathway in the antihypertensive effects of losartan and enalaprilat treatments.

- 1a. Pang DC, Johns A, Patterson K, Parker-Bothelho LH, Rubayani GM: Endothelin-1 stimulates phosphatidylinositol hydrolysis and calcium uptake in isolated canine coronary arteries. *J Cardiovasc Pharmacol*, 1989; 13(Suppl 6): S75-S79.
- 1b. Pasanisi F, Hamilton CA, Wadsworth R, Pryce C, Nixon G, Reid JL: Phosphoinositide metabolism and aging in aorta from SHR and WKY rats: effects of endothelin-1 and noradrenaline. *Clin Exp Hypertens*, 1994; 16 (1): 119-133.
- 1c. Nixon G, Hamilton CA, Wadsworth R, Reid JL: Comparison of endothelin-1 and noradrenaline stimulated inositol phosphate formation in cultured aortic smooth muscle cells from spontaneously hypertensive and Wistar Kyoto rats. *Blood Pressure*, 1993; 2 (3): 221-227.
- 1d. Wu L, de Champlain J: Inhibition by cyclic AMP of basal and induced inositol phosphate production in cultured aortic smooth cells from Wistar Kyoto and spontaneously hypertensive rats. *J Hypertens*, 1996; 14: 593-599.

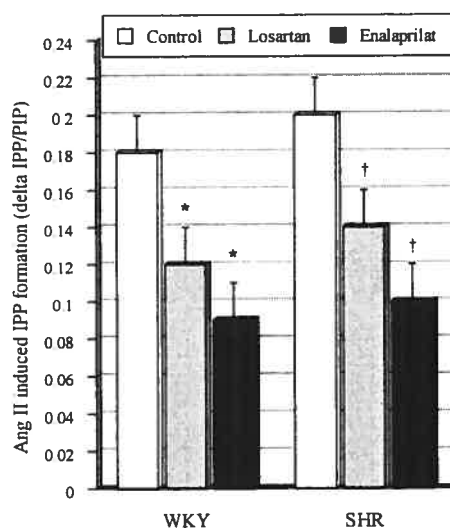


Fig 8. Ratio of [^3H]-inositol phosphates (IPP) to the [^3H]-myoinositol incorporation in the phosphatidylinositol lipid pool (PLP) during stimulation with Ang II in the aorta from untreated WKY and SHR (control) and treated with losartan or enalaprilat. Data are represented as the delta accumulation. * $P < 0.05$ vs WKY Control, † $P < 0.05$ vs SHR Control.

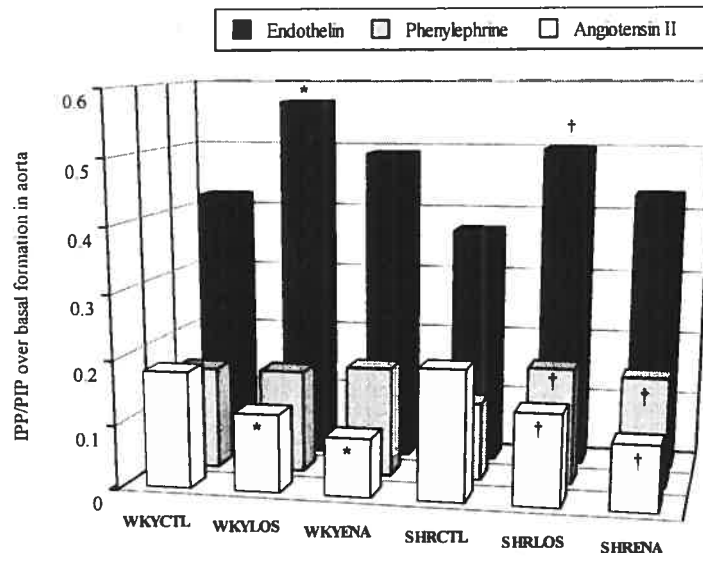


Fig 9. Formation of inositol phosphates in aorta from WKY and SHR under control conditions and after chronic treatment with losartan or enalaprilat.

Table 6. Formation of inositol phosphates in aorta and in mesenteric arteries from WKY and SHR under control conditions and after chronic treatment with losartan or enalaprilat.

Groups:	WKY CTL	WKY LOS	WKY ENA	SHR CTL	SHR LOS	SHR ENA
<i>Aorta</i>						
Basal (IPP/PIP)	0.27 ± 0.01 (28)	0.26 ± 0.02 (19)	0.29 ± 0.02 (22)	0.31 ± 0.01(31)*	0.31 ± 0.02 (21)	0.34 ± 0.02 (21)
PHE (ΔIPP/PIP)	0.16 ± 0.01 (15)	0.16 ± 0.02 (13)	0.17 ± 0.02 (10)	0.12 ± 0.01(18)*	0.18 ± 0.01(13)†	0.17 ± 0.03(8) †
ET (ΔIPP/PIP)	0.42 ± 0.04 (8)	0.57 ± 0.05 (8) *	0.49 ± 0.03 (8)	0.37 ± 0.04 (10)	0.50 ± 0.03 (8) †	0.43 ± 0.04 (8)
Ang I (ΔIPP/PIP)	0.33 ± 0.01 (4)	--	0.17 ± 0.02 (8)*	0.28 ± 0.02 (4)	--	0.15 ± 0.02 (8) †
Ang II (ΔIPP/PIP)	0.18 ± 0.02 (21)	0.12 ± 0.02 (9) *	0.09 ± 0.02(12)*	0.20 ± 0.02 (20)	0.14 ± 0.02(10)†	0.10 ± 0.02(11)†
<i>Mesenteric</i>						
Basal (IPP/PIP)	0.21 ± 0.01 (15)	0.24 ± 0.02 (9)	0.23 ± 0.01 (14)	0.22 ± 0.01 (21)	0.22 ± 0.01 (13)	0.23 ± 0.01 (16)
PHE (ΔIPP/PIP)	0.04 ± 0.01 (6)	0.13 ± 0.03(10)*	0.07 ± 0.01 (8)	0.05 ± 0.01 (9)	0.11 ± 0.01(12)†	0.12 ± 0.01 (5) †
ET (ΔIPP/PIP)	0.11 ± 0.02 (4)	0.21 ± 0.03 (5) *	0.04 ± 0.01 (4)	0.11 ± 0.02 (4)	0.23 ± 0.02 (5) †	0.13 ± 0.03 (4)
Ang I (ΔIPP/PIP)	0.05 ± 0.01 (3)	--	0.01 ± 0.01 (6) *	0.05 ± 0.01 (3)	--	0.01±0.01 (6) †

WKY indicates Wistar-Kyoto rats; SHR, spontaneously hypertensive rats; CTL, control; LOS, losartan; ENA, enalaprilat; IPP, inositol phosphates; PIP, phosphatidylinositol lipid pool; PHE, phenylephrine; ET, endothelin; Ang I, angiotensin I; Ang II, angiotensin II. See methods section for agonists concentrations. Data are given as mean ± SEM. n=(n) in each group. * $P < 0.05$ vs WKY CTL, † $P < 0.05$ vs SHR CTL.

CHAPITRE IV – Article Scientifique

**SYMPATHETIC FUNCTIONS IN L-NAME-INDUCED HYPERTENSION
AND MODULATION BY THE RENIN-ANGIOTENSIN SYSTEM.**

Journal of Hypertension, 1998, 16: 63-76

**SYMPATHETIC FUNCTIONS IN L-NAME-INDUCED HYPERTENSION
AND MODULATION BY THE RENIN-ANGIOTENSIN SYSTEM.**

Annik K.-Laflamme, Sylvain Foucart, Pierre Moreau, Chantal Lambert,
René Cardinal, Jacques de Champlain.

Research Group on the Autonomic Nervous System,
Faculty of Medicine and Faculty of Pharmacy,
Université de Montréal, Montréal, Québec, Canada, H3C 3J7.

Running head: Sympathetic Functions After Chronic NOS Inhibition

Sources of support for the work: This work was supported by grants from the Medical Research Council of Canada and from the Québec Heart and Stroke Foundation. A.K.-L is the holder of a studentship from the Canadian Heart and Stroke Foundation and P. Moreau is the holder of a studentship from the Medical Research Council. S. Foucart is the holder of a scholarship from the Fonds de la Recherche en Santé du Québec. J. de Champlain is the holder of a career investigatorship from the J.C. Edwards Foundation.

Author for correspondence:

Dr. Jacques de Champlain
Department of Physiology, Faculty of Medicine
Université de Montréal,
P.O. Box 6128, station Centre-ville
Montréal, Québec
CANADA H3C 3J7

Journal of Hypertension, 1998, 16: 63-76
Original Submission received: 14 July 1997.
Revised: 22 September 1997.
Accepted: 30 September 1997.

Abstract

Background: Nitric oxide as well as angiotensin II have been shown to attenuate cardiac β -adrenergic inotropism.

Objectives: To study of sympathetic presynaptic and postsynaptic functions after chronic nitric oxide synthesis blockade with N^G-nitro-L-arginine-methyl-ester (L-NAME, for 40 days) in association with renin-angiotensin system blockade (during the last 12 days) in order to evaluate the possible physiological interactions between these systems.

Methods: Hemodynamic parameters in conscious rats were assessed. Release of noradrenaline from isolated atria and cardiac β -adrenergic-adenylyl cyclase pathway in sham-treated and L-NAME-treated groups, with or without losartan or enalaprilat treatment were assessed.

Results: L-NAME treated rats developed a time-dependent increase in blood pressure associated with increased plasma adrenaline levels whereas plasma noradrenaline and cardiac catecholamine levels were similar to those in sham-treated rats. Field-stimulated release of noradrenaline, cardiac β -adrenoceptor density and affinity and isoproterenol-stimulated formation of cyclic AMP were similar in sham and L-NAME-treated rats. However, Gpp(NH)p, NaF and forskolin-stimulated adenylyl cyclase activity were greater in L-NAME rats although Gs and Gi protein levels were similar in sham-treated and L-NAME-treated rats. Losartan and enalaprilat treatments exerted equipotent angiotensin-pressor response blockade and hypotensive effects whereas catecholamine levels were not altered. Interestingly, only losartan treatment acted to reduced the increased Gs-adenylyl cyclase activity in L-NAME rats, without alteration in G proteins levels.

Conclusions: The nitric oxide synthase blockade-induced hypertension seems to be associated with increased adrenal-medullary and renin-angiotensin systems activities. The increased Gs-adenylyl cyclase activity after chronic inhibition of nitric oxide formation suggests that nitric oxide plays a modulatory role in formation of cyclic AMP, to which angiotensin II seems to contribute through an angiotensin II type 1 receptor-mediated mechanism.

Keywords: experimental hypertension ; N^G-nitro-L-arginine-methyl-ester ; nitric oxide ; catecholamines ; noradrenaline release ; cardiac β -adrenergic receptors ; cardiac adenylyl cyclase ; losartan ; EXP 3174 ; enalaprilat.

Introduction

The endothelium which produces various vasoactive substances, including nitric oxide (NO), plays a major role in the regulation of the vascular functions [1]. The participation of a continuous release of NO in the modulation of the vascular tone was suggested by the augmentation of arterial pressure and total vascular resistance following the acute inhibition of formation of NO by arginine analogues such as N^G-nitro-L-arginine-methyl-ester (L-NAME) in the rat [2].

A physiological role in modulating contraction of the underlying cardiac muscle has been postulated for the endocardial endothelium [3]. The effect of the tonic release of endocardin, a contraction-prolonging factor derived from the endothelial endocardium, has been proposed to be attenuated by an increased release of NO [4]. Release of NO by endocardial endothelium, exogenous and cyclic GMP (cGMP) analogues have been demonstrated to shorten duration of contraction of cardiac muscle and myocytes [5,6]. It can thus be postulated that the activation of NO-sensitive guanylyl cyclase could influence cardiac contraction. Moreover, NO synthase isoforms have been identified in several cellular types of the heart and the presence both of constitutive and inducible in rat cardiac myocytes forms has been demonstrated [7]. Also, NO has been shown to be involved in β -adrenergic coronary vasodilation and to attenuate cardiac β -adrenergic inotropic action [8,9]. These studies suggest that there are as yet undefined interactions between NO-, cGMP- and cyclic AMP (cAMP)-mediated inotropic mechanisms.

The present study was performed to assess the effect of chronic blockade of NO synthesis with L-NAME on rat blood pressure and on the putative interaction of NO with the cardiac presynaptic and postsynaptic sympathetic functions. For that purpose, the haemodynamic parameters (blood pressure, heart rate and cardiac weight) as well as the sympathetic system parameters (plasma and tissue catecholamines levels, release of noradrenaline, β -adrenergic receptors and adenylyl cyclase signalling pathway activity) were investigated.

In addition, the contribution of the renin-angiotensin system (RAS) in the long-term effect of L-NAME administration was investigated through concomitant chronic treatments with the angiotensin II (Ang II) type 1 (AT₁) receptor antagonist losartan and the angiotensin

converting enzyme (ACE) inhibitor enalaprilat. It has been speculated that the beneficial effects of ACE inhibitors are mediated not only by the inhibition of the RAS but also possibly through the prevention of degradation of bradykinin which could favour the release of NO. Indeed, the antihypertensive effect of enalapril in hypertensive hyperinsulinemic rats was found to be attenuated by L-NAME treatment, suggesting that NO contributes to its vasodilatory effect [10]. Moreover, bradykinin and Ang II AT₁ receptors have been known to exert presynaptic modulation of release of noradrenaline by sympathetic nerves [11,12]. Therefore we examined whether losartan and enalaprilat exerted different effects on blood pressure and sympathetic functions during chronic inhibition of formation of NO.

Methods

Determination of equipotent doses of losartan and enalaprilat

In an initial dose-finding study, male Sprague-Dawley rats (Charles River Laboratories, St-Constant, Québec, Canada) weighing 230-260g were anaesthetised with 50 mg/kg sodium pentobarbital intraperitoneally and osmotic pumps were implanted subcutaneously in the flank region to allow treatments with various doses of losartan or enalaprilat over a period of 12 days. Twenty-four hours before implantation, the osmotic pumps (model 2002, Alza Corp., Palo Alto, California, USA) were filled with various concentrations of losartan (dissolved in 0.9% isotonic saline) to provide infusion rates of 1, 5 or 10 mg/kg per day, with enalaprilat [dissolved in saline (0.3% Na₂CO₃)] to provide infusion rates of 0.018, 0.18 and 1 mg/kg per day or with the appropriate vehicle. All rats had free access to standard laboratory rat chow and drinking water. After 11 days of their respective treatments, the rats were chronically instrumented with catheters inserted into the left femoral artery and vein and positioned in the abdominal aorta and in the abdominal vena cava as previously described [13]. The catheters were filled with heparinized saline and the rats were placed in individual cages where they were allowed to recover from the surgery for at least 24 h.

All the *in-vivo* experiments were performed on conscious unrestrained rats. The arterial catheter was coupled to a pressure transducer (P23ID; Gould Statham, Oxford, California, USA) connected to a polygraph (Model RMP-6008, Nihon-Kohden, Tokyo, Japan). Heart rate was derived from the pressure signal through an integrated tachograph. The signals were recorded on an International Business Machines-compatible computer using an analogue-to-digital conversion board and the software Atlantis (Real Time Devices, State College,

Pennsylvania, USA). After a stabilization period of at least 20 min, the basal mean arterial pressure (MAP) and heart rate were measured. Blockade of vascular Ang II receptors after 12 days of losartan treatment was studied by constructing Ang II dose-MAP response curves. Angiotensin I (Ang I) dose-MAP response curves after 12 days of enalaprilat treatment were also plotted. Bolus injections of increasing and non-cumulative doses of Ang II or Ang I (0.003 to 1.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$) were administered at 5 min intervals through the venous catheter. For each logarithmic dose-response curve, the ED_{50} was calculated as the dose resulting in 50% of the maximal response.

Experimental design and animal preparation

Sprague-Dawley rats (weighing 130-160 g each) were treated with 100 mg/kg per day L-NAME in their drinking water for 40 days or allowed only tap water to drink (sham). During the last 12 days, chronic treatments with 5 mg/kg per day losartan or 1 mg/kg per day enalaprilat were administered via osmotic pumps implanted subcutaneously in L-NAME- and sham-treated rats. Rats in sham and L-NAME control groups were subjected to the same surgical procedure without implantation of an osmotic pump. Systolic blood pressure (SBP) in conscious rats was measured by tail-cuff plethysmography (Harvard Apparatus Ltd, South Natick, Massachusetts, USA) at the end of the treatments and was recorded on a MacLab/8 system (AD Instruments Pty Ltd, CastleHill, Australia). Six or seven blood pressure readings were obtained for each rat and averaged. Femoral arterial and venous catheters were implanted in animals assigned to *in-vivo* experiments, on day 39 for direct measurements of blood pressure and to allow blood sampling. Ang II and Ang I dose-MAP response curves were constructed for sham and L-NAME control or treated rats as described above.

Plasma and tissue catecholamine levels measurements.

Aortic blood samples (0.4 ml) taken at the end of the treatments period were placed in ice-chilled tubes containing a preservative solution (0.25 EGTA and 0.2 mol/l reduced glutathion, pH7). The samples were rapidly centrifuged at 14 000g for 5 min at 4°C. The plasma was frozen at -80°C until the assay. Parts of the left and right ventricles were rapidly dissected and weighed and kept at -80°C until the assay. Plasma and tissue noradrenaline and adrenaline concentrations were measured by radioenzymatic assay [14].

Plasma losartan and EXP 3174 Concentrations measurements.

Aortic blood samples (0.4 ml) taken at the end of the treatments period were placed in ice-chilled tubes and rapidly centrifuged at 14 000g for 5 min at 4°C. The plasma was frozen at -80°C until the assay. Plasma concentrations of losartan and its metabolite EXP 3174 were determined by high-performance liquid chromatography using the internal standard L-158,854 [15].

Release of [³H]-noradrenaline from isolated atria.

On day 40, animals other than those assigned to the *in-vivo* studies were weighed and killed by decapitation. The hearts were quickly removed and atria and ventricles were separated and dissected free from surrounding tissue. The isolated atria were prepared as previously described [16]. Briefly, each pair of atria that had been incubated with [³H]-noradrenaline, was transferred to 0.5 ml individual perfusion chambers of a suprafusion system (0.4 ml/min, 37°C, SF-6, Brandel Inc., Gaithersburg, Maryland, USA). Initially, the atria were field-stimulated (S₁; 3 Hz, 60 s, 50 mA, 1 ms pulses) for the estimation of the stimulation-induced outflow of radioactivity levels. The effect of 0.1 nmol/l to 1 μmol/l Ang II or 10 nmol/l bradykinin on stimulation-induced outflow of radioactivity was assessed by their addition 20 min before a second field stimulation period (S₂). At the end of the experiment, the atria were dissolved to estimate total tissue radioactivity and the radioactivity present in the bathing solution was also determined. The resting radioactive outflow level was measured during the 5 min period preceding the stimulation and was subtracted from the total stimulation-induced outflow (S₁ or S₂) to provide the stimulation-induced component. The stimulation-induced outflow of radioactivity measured after Ang II or bradykinin treatments (S₂) was expressed as the percentage of S₁. The values were standardised for the radioactivity present in tissue at the time of sampling and expressed as the fractional release of radioactivity using the fractional release during S₂ (FR₂) : fractional release during S₁ (FR₁) ratio.

Sarcolemmal membrane preparations.

Tissues were isolated from the left and right ventricular free walls. Cleaned and minced myocardium was homogenised in ice-cold buffer (in mmol/l; 250 sucrose, 5 TRIS, 1 MgCl₂, 1 EDTA, 1 dithiothreitol and 0.01 phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF), pH 7.4) using a Polytron homogenizer (Brinkman, Ontario, Canada) at a setting of 9, two time for 10 s and once for 5 s. The homogenate was filtered through three layers of cheesecloth and

centrifuged at 1000g for 10 min at 4°C. The supernatant that had been filtered through two layers of cheesecloth was centrifuged at 45 000g for 30 minutes at 4°C to yield membranes. The pellet was washed twice in a second ice-cold buffer (incubation buffer: in mmol/l; 50 TRIS, 10 MgCl₂, 1 EDTA, 1 dithiothreitol, 0.01 PMSF, pH 7.4). The final plasma membrane pellet was resuspended to give a final concentration of 1 mg/ml protein. The protein concentration was determined by the method of Lowry et al. [17].

Cardiac β -adrenergic receptor characteristics.

Myocardial β -adrenergic receptor binding assays were performed in purified left ventricular membrane preparations using [¹²⁵I]-cyanopindolol (ICYP). For saturation binding experiments, membrane preparations (about 40 μ g protein) were incubated with 10-250 pmol/l ICYP in incubation buffer either alone or with 10 μ mol/l alprenolol, which was used for determination of non-specific binding. The incubation was carried out at room temperature (25°C) for 2 h, in a total volume of 250 μ L. The reaction was terminated by the addition of ice-cold incubation buffer and rapid vacuum filtration through type A/C glass-fibre filters (Gelman Sciences, Montréal, Québec, Canada). The density (B_{max}) and equilibrium dissociation constant (K_d) of binding sites for ICYP were determined by linear regression analysis of saturation isotherm data, linearly transformed according to the method of Scatchard [18]. The proportions of β_1 - and β_2 -adrenoceptors subtypes were assessed from displacement curves of binding of 50 pmol/l ICYP by 12 concentrations of 10 pmol/l to 200 μ mol/l ICI 118,551 (a β_2 selective antagonist). The binding data of the displacement curves for each animal were analysed with the iterative non-linear regression program Allfit [19] to calculate equilibrium dissociation constants of the competitive inhibitor (K_i) for both receptor subtypes and their relative densities.

Adenylyl cyclase activity.

The adenylyl cyclase activity in cardiac membrane preparations was assessed by the method of Salomon [20]. Basal adenylyl cyclase activity and those stimulated with 0.1 mmol/l isoproterenol, 1 mmol/l Gpp(NH)p, 0.1 mmol/l forskolin and 10 mmol/l NaF were determined. Membrane samples containing 4 μ g of protein were incubated 15 min at 37°C in the reaction solution containing a phosphate-regenerating system (0.06 mmol/l GTP, 0.1 mmol/l ATP, 1 mmol/l cAMP, 0.1 mmol/l 3-isobutyl-1-methyl xanthine, 2.8 mmol/l phosphoenol pyruvate, 6.7 U/ml pyruvate kinase and 19 U/ml myokinase) with 10 μ Ci/ml of

[α - 32 P]-ATP in a total volume of 50 μ L. The reactions were stopped by the addition of 1 ml ice-cold solution consisting of 50 μ Ci/l [3 H]-cAMP, 0.35 mmol/l ATP and 0.25 mmol/l cAMP. Reaction products were separated by sequential column chromatography (Dowex/alumina columns, Bio-Rad Laboratories, Mississauga, Ontario, Canada). The [32 P]-cAMP counts were corrected for column recovery of [3 H]-cAMP (about 85%).

Immunoblotting of cardiac G proteins.

Left ventricular sarcolemmal membrane proteins were separated by sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis and immunoblotting with specific antipeptide antisera was then performed. Membrane preparation samples containing 50 μ g proteins were subjected to electrophoresis after immersion in boiling water for 10 min. Sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis was performed with 4 and 10% acrylamide, in the stacking and the running gel, respectively, for 240 min using a Protean II xi cell (Bio-Rad). The proteins were electrophoretically transferred to nitro-cellulose membranes with a Trans-Blot semi-dry transfer cell (Bio-Rad) and thereafter the blots were washed with 8% non-fat dry milk dissolved in phosphate-buffered saline (PBS) for 120 min. The blots were subsequently washed in PBS and then incubated overnight at room temperature with the antisera against G proteins in PBS containing 3% non-fat dry milk supplemented by 0.1% Tween-20. The antibody-labelled band complexes were detected after the blots had been incubated with goat anti-rabbit immunoglobulin G horseradish peroxidase conjugate (Bio-Rad) for 120 min at room temperature. Finally the blots were washed with PBS and used for immunodetection with enhanced-chemiluminescence Western-blotting detection reagents (Amersham Canada Ltd., Oakville, Ontario, Canada).

Solutions and chemicals

All chemicals were supplied by Sigma Chemicals Co., (St-Louis, Missouri, USA), except for pyruvate kinase (Calbiochem Co., La Jolla, California, USA). Materials including radioisotopes 1-[ring-2,5,6- 3 H]-noradrenaline, ICYP and 5',8-[3 H]-cyclic AMP were supplied by DuPont NEN (Mississauga, Ontario, Canada). [α - 32 P]-ATP was supplied by ICN Biomedicals (Costa Mesa, California, USA). Losartan and enalaprilat were kindly provided by DuPont Merck Pharmaceutical Co. (Wilmington, Delaware, USA) and Merck Frosst Canada Inc. (Kirkland, Québec, Canada). The internal standard L-158,854 was kindly

provided by Dr Man-Wai Lo of Merck Sharp & Dohme Research Laboratories (Rahway, New Jersey, USA).

Statistics

Data are given as mean \pm SEM and n is the number of rats used. Maximal responses, ED₅₀, Bmax, Kd and Ki values were determined for each concentration-response curve. Statistical comparison by analysis of variance was performed and then Scheffé's F test or by Student's unpaired t test when appropriate. $P < 0.05$ was considered statistically significant.

Results

In vivo determination of equipotent doses of losartan and enalaprilat in normotensive rats

The treatment with losartan slightly decreased MAP at the three doses used but this effect was significant in normotensive rats only at the dose of 5 mg/kg per day (Table 1). Similarly, administration of enalaprilat slightly lowered blood pressure at the three doses but decreased blood pressure significantly only at the dose of 1 mg/kg per day (Table 1). The heart rate was not affected by losartan and enalaprilat treatments. The dose-MAP response curves for Ang II were shifted to the right-hand side by losartan treatments (ED₅₀ values calculated for 1, 5 and 10 mg/kg per day increased in that order, Table 1). Administration of 5 and 10 mg/kg per day losartan produced, respectively, significant 4.7- and 5.8-fold shifts relative to the value obtained with untreated rats. However, there was no significant difference between the effect of these two highest doses of losartan. The maximal responses of the blood pressure to administration of Ang II were not affected by administration of losartan. Administration of enalaprilat caused a dose-dependent rightwards shift of the Ang I dose-pressure curves in terms of the calculated ED₅₀ values (Table 1). The 2.7- and fivefold shifts for the two highest doses (0.18 and 1 mg/kg per day) were statistically significant relative to data for untreated rats. The maximal responses of MAP to administration of Ang I were not significantly modified by enalaprilat treatments. Since chronic treatment with the dose of 5 mg/kg per day of losartan was as effective as that with 10 mg/kg per day at blocking vascular Ang II receptors and since 5 mg/kg per day of losartan and 1 mg/kg per day of enalaprilat produced similar shifts of their respective Ang II and Ang I dose-blood pressure curves, these doses

were chosen to assess the effects of losartan and enalaprilat on normotensive and L-NAME hypertensive rats.

The plasma levels of losartan and its major metabolite EXP 3174 were measured to verify whether the efficacy of chronic treatment with losartan to block the pressor effect of exogenously administered Ang II was related to their plasma levels (Table 1). The plasma concentrations of losartan and EXP 3174 increased on going from the 1 mg/kg per day to the 5 mg/kg per day group, but did not increase further with the highest dose. The plasma levels of losartan and EXP 3174 were mutually correlated ($r = 0.83$, $P < 0.01$) and correlated to the ED_{50} of the Ang II dose-pressure curve ($r = 0.73$ and 0.83 respectively, $P < 0.01$), but not to basal blood pressure. Thus, the plasma levels of losartan and EXP 3174 were good indices of Ang II receptor blockade as assessed by exogenous Ang II administration.

Hemodynamic parameters and catecholamine levels in L-NAME-treated rats before and after equipotent angiotensin blockade

Indirect tail-cuff measurement of SBP revealed an increase from the baseline value of 120 ± 2 mm Hg to 208 ± 4 mm Hg on day 40 with L-NAME administration ($P < 0.05$). This SBP was also greater than SBP in sham-treated rats on day 40 (Fig. 1). The rise in SBP was progressive and already significant on day 7 (164 ± 7 mm Hg) compared with respective baseline. That this hypertension had been induced by administration of L-NAME after 40 days was corroborated by direct measurement of blood pressure, revealing a significantly higher MAP than that in sham-treated rats while the heart rates in rats of both groups were similar (Table 2). Treatments with losartan and enalaprilat exerted potent and similar hypotensive effects on L-NAME-treated rats in terms of changes in direct MAP (Table 2) and indirect SBP (Fig. 1) measurements whereas heart rates in sham- and L-NAME-treated rats were not affected by losartan and enalaprilat treatments (Table 2). The dose-blood pressure curves for Ang II were similar in sham and L-NAME control groups (ED_{50} values of 42 ± 8 and 37 ± 3 ng/kg, respectively) and were similarly shifted to the right-hand side by administration of losartan for these two groups (ED_{50} values of 227 ± 38 and 182 ± 47 ng/kg, respectively; $P < 0.05$ vs respective controls; Fig. 2). There was no significant difference between the maximal responses on the Ang II dose-MAP curves for control and losartan-treated groups. The Ang I dose-blood pressure curves were similar for rats in sham and L-NAME control groups (ED_{50} values of 51 ± 14 and 46 ± 7 ng/kg, respectively) and were

similarly shifted to the right-hand side by administration of enalaprilat for these two groups (ED_{50} of 272 ± 18 and 184 ± 30 ng/kg, respectively; Fig. 2). There was no significant difference between the maximal response of MAP to administration of Ang I for control and enalaprilat-treated groups.

Basal aortic plasma noradrenaline levels did not differ between sham and L-NAME control groups and the treatments with losartan or enalaprilat had no effect on plasma noradrenaline concentration in rats of either group (Table 2). Basal adrenaline levels were increased in L-NAME control rats and those levels remained higher after the treatments with losartan and enalaprilat than those in sham control rats ($P < 0.05$) but they tended to be lower than those in rats of the L-NAME control group (Fig. 3). Losartan and enalaprilat treatments had no effect on adrenaline levels in sham-treated rats. Left ventricular noradrenaline and adrenaline concentrations were similar in rats of sham and L-NAME groups and were not altered by the treatments with losartan and enalaprilat (Table 2). Similarly, tissue catecholamine levels in the right ventricles were not altered by any treatment (data not shown).

Heart weight

The animals rendered hypertensive by L-NAME treatment did not develop cardiac hypertrophy as demonstrated by the similar ratio of left or right ventricular weight : body weight ratio being similar to that for the sham-treated group (Table 2). For rats both in sham and in L-NAME groups, the treatments with losartan and enalaprilat reduced the left ventricular weight similarly but had no detectable effect on the right ventricular weight relative to their respective controls. No significant difference in body weight was caused by any of the treatments (Table 2).

Release of [3 H]-noradrenaline from isolated atria

The resting release (R_1), the fractional release during S_1 (FR_1) and the total tissue radioactivity (TTR) values of [3 H]-noradrenaline from isolated atria were similar for rats in sham and L-NAME control groups [R_1 (%TTR) 0.21 ± 0.02 and 0.20 ± 0.02 , FR_1 (%TTR) 0.48 ± 0.03 and 0.42 ± 0.03 and TTR (10^5 disintegrations/min) 4.8 ± 0.5 and 5.4 ± 0.4]. The treatments with losartan and enalaprilat had no effect on R_1 , FR_1 and TTR values either for sham or for L-NAME groups (data not shown). The facilitatory effect of Ang II and bradykinin administrations on the release of [3 H]-noradrenaline were similar for sham and L-

NAME groups (Fig. 4). Administration of Ang II increased the noradrenaline release dose-dependently in both groups. Administration of 10 nmol/L Ang II significantly increased release of noradrenaline, by 49 and 51% in rats of sham and L-NAME control groups, respectively (Fig 4a). The treatment with losartan attenuated the facilitatory effect of 10 nmol/L Ang II in rats both of sham and L-NAME treated groups since it did not induce a significant increase in noradrenaline release (21 and 30%, respectively), therefore confirming the efficacy of presynaptic AT₁ receptor blockade (Fig 4b). Administration of 1 μmol/L Ang II significantly increased release of noradrenaline by 51 and 65% in rats of sham and L-NAME control groups, respectively (Fig 4a), whereas the treatment with losartan attenuated the facilitatory effect of this dose of Ang II in rats both of sham and L-NAME groups (33 and 40%, respectively, Fig 4b). In contrast, the potentiating effect of bradykinin was not changed by losartan treatment. The facilitatory effects of Ang II and bradykinin were not altered after enalaprilat treatment for rats either in sham-treated or L-NAME-treated groups (Fig 4c).

Cardiac β-adrenoceptors characteristics

Total specific β-adrenergic receptor density (B_{max}) and dissociation constant (K_d) were similar in rats of sham and L-NAME control groups (Table 3). Neither losartan nor enalaprilat treatments altered total β-adrenergic receptors density and affinity. ICI 118 551 inhibited ICYP binding with shallow biphasic curves that could be best resolved by a model with two affinity binding sites in all animal tissues in which the high-affinity site represented the binding of the ligand to β₂-adrenoceptors and the low-affinity binding site to β₁-adrenoceptors. Thus, calculation of the relative subtypes was possible in all individual preparations. K_i values for the low- and the high-affinity sites of ICI 118 551, at β₁- and β₂-adrenoceptors, respectively, were not modified by L-NAME treatment (Table 4). Computer analysis of these data revealed that the relative proportion of β₁- and β₂-adrenoceptors were similar in rats of sham and L-NAME control groups — β₁-adrenoceptors amounted to about ~65% and β₂-adrenoceptors to about ~35% (Table 4).

Adenylyl cyclase activity

The production of cAMP in the presence of different agonists is shown in Table 5. The basal

production of cAMP as well as the isoproterenol-stimulated formation of cAMP were similar in rats of sham and L-NAME groups. The stimulation of formation of cAMP induced by Gpp(NH)p, NaF and forskolin were greater in control L-NAME hypertensive rats. However, the increased Gs-adenylyl cyclase activity in the L-NAME group was statistically significant only with NaF stimulation (Fig 5A). Losartan treatment significantly increased formation of cAMP induced by NaF and forskolin in sham-treated rats whereas it significantly reduced the increase in formation of cAMP induced by Gpp(NH)p, NaF and forskolin in L-NAME treated rats (Table 5, Fig 5). Both in sham-treated and L-NAME-treated rats treated with enalaprilat, the Gs-adenylyl cyclase activity was no different from that in rats of their respective control groups and that in rats of sham control group. When the maximal formations of cAMP induced by isoproterenol, NaF and Gpp(NH)p were normalized as a ratio of the maximal formation of cAMP stimulated by forskolin for each animal, there were no longer differences between sham-treated and L-NAME-treated rats (Table 5). This implies that there is an alteration in activity of the adenylyl cyclase catalytic unit in the responses to NaF in L-NAME-hypertensive rats. The higher NaF:forskolin-induced cAMP formation ratio for sham-treated rats treated with losartan and enalaprilat implies that a potentiation of Gs coupling or activity occurred after RAS blockade. The same RAS blockade treatments did not potentiate the Gs-adenylyl cyclase coupling responses in L-NAME-treated rats and even reduced its activity, as shown by the reduced Gpp(NH)p/forskolin ratio in L-NAME-treated rats treated with losartan (Table 5).

Immunoblotting of cardiac G proteins

Myocardial left ventricular plasma membranes were shown to express G α , G α 2 and G α 3 subunits. Immunoblotting studies showed no differences between the levels of these subunits in rats of sham and L-NAME control groups or after treatments with losartan and with enalaprilat (Fig 6).

Discussion

The chronic administration of L-NAME for a period of 6 weeks was associated with a progressive and sustained increase in arterial blood pressure that was not associated with cardiac hypertrophy, as had been observed in previous studies [21,22]. The significant decrease in the concentration of cGMP in cardiovascular tissues in L-NAME-treated rats suggested that the inhibition of endothelium-derived formation of NO was accompanied by a

diminution in activation of smooth muscle guanylyl cyclase [23]. The decrease in production of NO was directly linked to the development of hypertension in this model, thus confirming the major role of NO in the maintenance of a normal vascular tone and in cardiac remodelling.

An enhancement in activity of the sympathetic nervous system has been suggested to contribute to the increase in blood pressure during chronic L-NAME treatment. However, Navarro et al. [24] have reported increases in circulating concentrations of noradrenaline and adrenaline only during the fifth week of L-NAME treatment, suggesting that there is a role for catecholamines in the maintenance rather than in the development of hypertension in this model. In the present study, baseline adrenaline levels were higher in L-NAME hypertensive rats, suggesting that there was an increase in adrenal-medullary activity during the maintenance of high blood pressure. Similar baseline plasma levels of noradrenaline in normotensive and L-NAME-hypertensive rats may yet constitute an abnormality suggesting that sensitivity of baroreceptor mechanisms is reduced in the presence of an elevated blood pressure. This model of hypertension has been shown to be associated with a reduction in arterial baroreflex control of heart rate and of adrenal and renal sympathetic nerve activity [25,26]. Interestingly, the participation of the sympathetic neural component in the sustained L-NAME hypertension has been shown by the demonstration of attenuations of the hypertensive response to L-NAME after sympathectomy and after ganglionic blockade [27,28]. Since it was reported that NO might play a role in the central regulation of sympathetic tone [29], the inhibition of nitric oxide synthase (NOS) activity in the cerebral tissue of L-NAME-treated rats could account for the pathogenesis of hypertension in this model [30]. The basal and the Ang II- and bradykinin-potentiated releases of noradrenaline from isolated atria were no different in sham-treated and L-NAME-treated rats, indicating that NO is not a modulator of the sensitivity of these presynaptic modulatory mechanisms in this experimental model. In contrast, the observation of nitroxidergic nerves in the adrenal led to the suggestion that there is a NO-mediated modulation of release of adrenaline [30] but no data clearly support this hypothesis.

In the present study, the administrations both of losartan and enalaprilat exerted dose-dependent efficient angiotensin blockade, as suggested by the decrease in sensitivity of the pressor response to exogenous angiotensin in conscious normotensive rats. Furthermore, it

was also noted that the plasma levels of losartan and EXP 3174, the major metabolite of losartan, were mutually correlated as well as being correlated to the ED₅₀ of the Ang II dose-response curve, suggesting that these plasma levels reflected the efficacy of losartan to block Ang II AT₁ receptors. The L-NAME treatment did not alter the effect of the equipotent administrations of losartan and enalaprilat on the sensitivity of the angiotensin pressor responses. The hypertension induced by blockade of NOS was similarly attenuated by both chronic treatments, with losartan and enalaprilat, indicating that the RAS plays a significant role in the maintenance of the elevated blood pressure in this model and that the contribution of the postulated increase in bradykinin accumulation with ACE inhibitor treatment was not significantly important for the reduction in blood pressure. The plasma renin activity has been reported to increase [22,30], to decrease [21] and to remain unchanged with longer chronic administration of NOS inhibitors [23]. These contradictory results suggest that the circulating RAS do not play a major role in the maintenance of L-NAME-induced hypertension and that the local RAS is more likely to be involved in the regulation of blood pressure in this model. Several studies have reported that, even at doses that had no effect on blood pressure, ACE inhibitors produced a regression of cardiac hypertrophy, whereas others have suggested that Ang II induced an AT₁ receptor-mediated cardiac remodelling independent of mechanical stimuli [31,32]. Our results provided support to the hypothesis that the blockade of tissue Ang II plays an important role in the pharmacological effects of RAS inhibitors, such as decreases in blood pressure and cardiac weight, on rats chronically treated with L-NAME, as had previously been demonstrated by others [21,33]. However, the elevations of baseline plasma adrenaline levels in L-NAME-treated rats after losartan and enalaprilat treatments indicates that there is possibly a RAS-independent mechanism for the increase in baseline adrenal activity.

The three NO synthases isoforms (NOS1, NOS2 and NOS3) are now understood to be distributed across a wide spectrum of cell types and tissues and one cell can express more than one isoform [34]. The enhancement of activation of constitutive NOS in cardiac myocytes induces a decline in contractile function of isolated papillary muscles within minutes, which is reversed by NOS inhibitors [35]. Moreover, cAMP, presumably due to a protein kinase A-dependent mechanism, and Ang II, via an AT₁-dependent mechanism, enhance cytokine-induced production of NO in cardiac myocytes [36-38]. The β -adrenergic-induced cytosolic incrementation of Ca²⁺ could be responsible for the activation of the Ca²⁺-

dependent activation of myocyte NOS. Baseline and adrenergic-stimulated-contraction performances of isolated papillary muscles and myocytes have been shown to be depressed by exogenous or endogenously-induced production of NO and cGMP [39,40]. Others [9,39] have reported a potentiating effect of NOS inhibitor treatment only on the positive inotropic activation by isoproterenol but no effect on basal myocyte contraction was observed. Although the effects of NO synthesis on cardiac myocytes in the basal state remain unknown, these data nevertheless indicate that NO exerts an inhibitory effect on the β -adrenergic signalling pathway. This effect could constitute a negative feedback mechanism whereby the increase in formation of NO would attenuate the increase in β -adrenergic signalling system activity. The mechanisms mediating myocardial NO effects probably involve an interaction between cGMP- and cAMP-mediated inotropic mechanisms. To date, the mechanisms of action of intracellular cGMP have been proposed to involve a reduction of influx of intracellular Ca^{2+} into cells stimulated by cAMP, either through the activation of a cAMP phosphodiesterase or through a direct effect of protein kinase G, and a protein kinase G-mediated phosphorylation of cardiac troponin I. Moreover, the possibility that there is a non-cGMP-dependent effect of NO that appears to alter myocardial energetics cannot be excluded [34].

In the present study the increased Gs-adenylyl cyclase system activity with the unchanged levels of G proteins subunits and β -adrenergic receptors after chronic L-NAME treatment would suggest for the first time that NO could exert a regulatory controlling effect on the sensitivity of the components of the signal transduction beyond the cardiac β -adrenergic receptor sites and the G proteins. Although the mechanisms for such an action are not known, the inhibition of cardiac β -adrenergic-induced formation of cAMP by exposure to cytokines which was not associated with decreases in β -adrenergic receptor levels [41] as well as the inhibition of type I adenylyl cyclase by NO (possibly through its oxidation [42]) suggest that the effect of NO could be mediated at least in part at the level of the adenylyl cyclase system either directly or via a cGMP-dependent mechanism. Another hypothesis is that there could be a decrease in inhibitory influence of G_i on adenylyl cyclase activity independently of the similar G proteins subunits observed in sham-treated and L-NAME-treated rats, as was reported in platelets from spontaneously hypertensive rats [43]. The hyper-responsiveness of the Gs-adenylyl cyclase system after L-NAME treatment could be associated with the development of hypertension through an increase in cardiac output, as

was demonstrated to occur in young subjects with labile hypertension and in neonatal spontaneously hypertensive rats [44].

The inhibition of β -adrenergic-stimulated contractility in amphibian myocytes and rabbit sinoatrial node via a NO-dependent increase in cGMP inhibiting influx of Ca^{2+} into cells was suggested to imply an increase in hydrolysis of cAMP by activation of cAMP phosphodiesterase II [45,46]. Although this effect has not been demonstrated in rat myocytes, the hypothesis of an altered phosphodiesterase activity after chronic NO inhibition cannot be valid for our study since the observed differences in Gs-adenylyl cyclase activity were observed in assays in which we used a phosphodiesterase inhibitor to protect the labelled cAMP generated. As mentioned above, a non-cGMP-dependent mechanism involving NO in the decline of the contractile process has been postulated to be mediated by a decrease in consumption of oxygen in myocardial muscle induced by an inhibitory effect of NO on mitochondrial respiration [47]. Consequently, if mitochondrial functioning is depressed by NO, this would decrease the formation of ATP and therefore impair the contractility. The systemic administration of a NOS inhibitor to dogs was shown to increase systemic vascular resistance and consumption of oxygen [48] whereas the infusion of a NO donor into isolated rat hearts was found to reduce cardiac contractile responsiveness in association to an immediate decline in ATP content [49]. Production of ATP from oxidative phosphorylation might differ between sham-treated and L-NAME-treated rats. However, since the substrate (ATP-Mg^{2+}) for adenylyl cyclase reaction in our sarcolemmal preparations was maintained at a constant level with a regeneration system, the inhibitory effect of NO on the generation of muscle ATP cannot be the only mechanism explaining the alteration of β -adrenergic contractility; it is implied that there is also an ATP-independent mechanism along the adenylyl cyclase pathway. Many other alterations may occur in this model of hypertension in which several systems have been reported to be implicated. Nevertheless, the present study indicates that the functioning of adenylyl cyclase in isolated cardiac membranes was altered after chronic NO synthase inhibition whether it was the cause or the consequence of the various neurohumoral modifications.

In rats of both groups of L-NAME-hypertensive rats, treated either with losartan or with enalaprilat, the Gs-adenylyl cyclase activity were normalized to the levels observed in sham-treated control rats. The treatment with losartan was even more potent than was that with enalaprilat in reducing the increase in Gs-adenylyl cyclase activity induced by chronic NO

blockade. It has been reported that Ang II causes an increase in formation of cAMP in cardiac myocytes and other cells via AT₁ receptors but this adenylyl cyclase activation was small compared with that induced by forskolin and it has been postulated that this effect was mediated through the modulation of the activity of the catalytic subunit [50,51]. On the other hand, it has been demonstrated that Ang II reduces the contractile response to isoproterenol in isolated cardiac papillary muscles through an endogenous production of NO and this effect was mimicked by a cGMP analogue [52]. Moreover, the AT₁ receptor was shown to be negatively coupled to adenylyl cyclase via a pertussis toxin-sensitive G protein [53]. From our studies and from those of others, a bimodal regulation by Ang II of the β -adrenergic signalling pathway can be postulated (Fig 7). Under normal conditions, the blockade of AT₁ receptors would reduce the NO- and the Gi-dependent negative modulatory control of formation of cAMP so that the stimulation with NaF of adenylyl cyclase activity would be greater in the presence of losartan treatment. Under conditions involving inhibition of NO synthesis, the facilitative modulatory mechanism of AT₁ receptors on cAMP response would be dominant since the NO-dependent negative modulatory control would be no longer present. In this latter situation, the tonic influence of Gi proteins on stimulation with NaF could explain the smaller increase in response of adenylyl cyclase observed in the rats of the L-NAME group compared to that in sham-treated rats treated with losartan (Fig 7). Also, the lower Gs-adenylyl cyclase activity response observed in L-NAME rats treated with losartan suggests that there had been an increase in influence of AT₁ receptors, favouring formation of cAMP in conditions where NO synthesis is inhibited. The normalization of the Gs-adenylyl cyclase activity might be implicated in the antihypertensive effect of losartan on L-NAME rats. Since this proposed scheme relies on a chronic experimental model, implying that there are many haemodynamic and biochemical interactions, future investigations should focus on the mechanisms responsible for the interaction between NO synthase activity and the RAS. The difference between the effects of ACE inhibition and AT₁ blockade could be explained in terms of the actions of Ang II formed by alternative pathways during ACE inhibition, which could account for the lesser decrease in formation of cAMP, since Ang II appears to potentiate Gs-adenylyl cyclase responses in L-NAME-hypertensive rats and for the lesser incrementation of formation of cAMP since Ang II has the potential to reduce adenylyl cyclase responses in sham-treated rats.

In summary, we investigated the modulation of the cardiac β -adrenergic pathway resulting from chronic treatments in L-NAME hypertension. The RAS and the adrenal-medullary increases in activity as well as the blunting of the sympathetic baroreflex response seem to play important roles in this model of hypertension. The hypotensive action by angiotensin blockade might be mediated partly through the reduction of the cardiac β -adrenergic pathway activity and through an alteration of the balance between vasoconstrictor and vasodilatory mechanisms. Our results suggest that NO and cGMP, or both, inhibit the β -adrenergic system at least in part at the level of the Gs-adenylyl cyclase system under control conditions. Moreover, the enhanced Gs-adenylyl cyclase coupling after NOS inhibition was normalized after angiotensin blockade treatments. Therefore, we suggest that the blunting of the cardiac adenylyl cyclase signalling pathway contributes to the hypotensive action of losartan and enalaprilat in L-NAME-induced hypertension.

References

1. Vanhoutte PM. **Endothelium and control of vascular function.** *Hypertension* 1989, **13**:658-667.
2. Rees DD, Palmer RJJ, Moncada S. **Role of endothelium-derived nitric oxide in the regulation of blood pressure.** *Proc Natl Acad Sci USA* 1989, **86**:3375-3378.
3. Brutsaert DL, Andries LJ: **The endocardial endothelium.** *Am J Physiol* 1992, **32**: H985-H1002.
4. Henderson AH, Lewis MJ, Shah AM, Smith JA: **Endothelium, endocardium, and cardiac contraction.** *Cardiovasc Res*, 1992, **26**: 305-308.
5. Shah AM, Lewis MJ, Henderson AH: **Effects of 8-bromo-cyclic GMP on contraction and on inotropic response of ferret cardiac muscle.** *J Mol Cell Cardiol* 1991, **23**: 55-64.
6. Smith JA, Shah AM, Lewis MJ: **Factors released from endocardium of the ferret and pig modulate myocardial contraction.** *J Physiol* 1991, **439**: 1-14.
7. Schulz R, Nava E, Moncada S: **Induction and potential biological relevance of a Ca²⁺-independent nitric oxide synthase in the myocardium.** *Br J Pharmacol* 1992, **105**: 575-580.
8. Ming Z, Parent R, Lavallée M: **β₂-adrenergic dilation of resistance coronary vessels involves K_{ATP} channels and nitric oxide in conscious dogs.** *Circulation* 1997, **95**: 1568-1576.
9. Balligand JL, Kelly RA, Marsden PA, Smith TW, Michel T: **Control of cardiac muscle cell function by an endogenous nitric oxide signaling system.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1993, **90**: 347-351.
10. Erlich Y, Rosenthal T: **Contribution of nitric oxide to the beneficial effects of enalapril in the fructose-induced hyperinsulinemic rat.** *Hypertension* 1996, **28**: 754-757.
11. Domomiak P, Simon M, Blöchl A, Brenner P: **Changes in peripheral sympathetic outflow of pithed spontaneously hypertensive rats after bradykinin and desArg-bradykinin infusions: influence of converting-enzyme inhibition.** *J Cardiovasc Pharmacol* 1992, **20** (suppl 9): S35-S38.
12. Saxena PR: **Interaction between the renin-angiotensin-aldosterone and sympathetic nervous systems.** *J Cardiovasc Pharmacol* 1992, **19** (suppl 6): S80-S88.

13. K-Laflamme A, Oster L, Cardinal R, de Champlain J: **Effects of renin-angiotensin blockade on sympathetic reactivity and β -adrenergic pathway in SHR.** *Hypertension* 1997, **30**: 278-287.
14. Peuler JD, Johnson GA: **Simultaneous single isotope radioenzymatic assay of plasma norepinephrine, epinephrine and dopamine.** *Life Sci* 1977, **21**: 625-636.
15. Furtek CI, Lo M-W: **Simultaneous determination of a novel angiotensin II receptor blocking agent, losartan, and its metabolite in human plasma and urine by high-performance liquid chromatography.** *J Chromatography* 1992, **573**: 295-301.
16. Foucart S, Patrick S, Oster L, de Champlain J: **Effects of chronic treatment with losartan and enalaprilat on [3 H]-norepinephrine release from isolated atria of Wistar-Kyoto and spontaneously rats.** *Am J Hypertens* 1996, **9**: 61-69.
17. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ: **Protein measurement with the Folin phenol reagent.** *J Biol Chem* 1951, **193**: 265-275.
18. Scatchard G: **The attraction of proteins for small molecules and ions.** *Ann New York Acad Sci* 1949, **51**: 660-672.
19. DeLéan A, Munson PJ, Rodbard D: **Simultaneous analysis of families of sigmoidal curves: application to bioassay, radioligand assay and physiological dose-response curves.** *Am J Physiol* 1978, **235**: E97-E102.
20. Salomon Y: **Adenylate cyclase assay.** In **advances in cyclic nucleotide research.** Edited by Brooker G, Greengard P, Robison GA. New York: Raven Press; 1979 (10): 35-55.
21. Arnal JF, Warin L, Michel JB: **Determinants of aortic cyclic guanosine monophosphate in hypertension induced by chronic inhibition of nitric oxide synthase.** *J Clin Invest* 1992, **90**: 647-652.
22. Ribeiro MO, Antunes E, de Nucci G, Lovisolo SM, Zatz R: **Chronic inhibition of nitric oxide synthesis: a new model of arterial hypertension.** *Hypertension* 1992, **20**: 298-303.
23. Arnal JF, El Amrani AI, Chatellier G, Ménard J, Michel JB: **Cardiac weight in hypertension induced by nitric oxide synthase blockade.** *Hypertension* 1993, **22**: 380-387.

24. Navarro J, Sanchez A, Saiz J, Ruilope LM, Garcia-Estan J, Romero JC, Moncada S, Lahera V: **Hormonal, renal and metabolic alterations during hypertension induced by chronic inhibition of NO in rats.** *Am J Physiol* 1994, **267**: R1516-R1521.
25. Lantelme P, Lo M, Sassard J: **Decreased cardiac baroreflex sensitivity is not due to cardiac hypertrophy in N^G-nitro-L-arginine methyl ester-induced hypertension.** *J Hypertens* 1994; **12**: 791-795.
26. Scrogin KE, Veelken R, Luft FC: **Sympathetic baroreceptor responses after chronic N^G-nitro-L-arginine methyl ester treatment in conscious rats.** *Hypertension* 1994, **23** (part 2): 982-986.
27. Sander M, Hansen PG, Victor RG: **Sympathetically mediated hypertension caused by chronic inhibition of nitric oxide.** *Hypertension* 1995, **26**: 691-695.
28. Cunha RS, Cabral AM, Vasquez EC: **Evidence that the autonomic nervous system plays a major role in the L-NAME-induced hypertension in conscious rats.** *Am J Hypertens* 1993, **6**: 806-809.
29. Sakuma I, Togashi H, Yoshioka M, Saito H, Yanagida M, Tamura M, Kobayashi T, Yasuda H, Gross SS, Levi R: **N^G-methyl-L-arginine, an inhibitor of L-arginine-derived nitric oxide synthesis, stimulates renal sympathetic nerve activity in vivo.** *Circ Res* 1992, **70**: 607-611.
30. Zanchi A, Schaad NC, Osterheld MC, Grouzmann E, Nussberger J, Brunner HR, Waeber B: **Effects of chronic NO synthase inhibition in rats in renin-angiotensin system and sympathetic nervous system.** *Am J Physiol* 1995, **268**: H2267-H2273.
31. Linz W, Schölkens BA, Ganten D: **Converting enzyme inhibition specifically prevents the development and induces the regression of cardiac hypertrophy in rats.** *Clin Exp Hypert* 1989, **11**: 1325-1350.
32. Dostal DE, Baker KM: **Angiotensin II stimulation of left ventricular hypertrophy in adult rat heart, mediation by the AT1 receptor.** *Am J Hypertens* 1992, **5**: 276-280.
33. Pollock DM, Polakowski JS, Divish BJ, Opgenorth TJ: **Angiotensin blockade reverses hypertension during long-term nitric oxide synthase inhibition.** *Hypertension* 1993, **21**: 660-666.
34. Kelly RA, Smith TW: **Cytokines and cardiac contractile function.** *Circulation* 1997, **95**: 778-781.

35. Finkel MS, Oddis CV, Jacob TD, Watkins SC, Hattler BG, Simmons RL: **Negative inotropic effects of cytokines on the heart mediated by nitric oxide.** *Science* 1992, **257**: 387-389.
36. Ikeda U, Yamamoto K, Ichida M, Ohkawa F, Murata M, Iimura O, Kusano E, Asano Y, Shimada K: **Cyclic AMP augments cytokine-stimulated nitric oxide synthesis in rat cardiac myocytes.** *J Moll Cell Cardiol* 1996, **28**: 789-795.
37. Oddis CV, Simmons RL, Hattler BG, Finkel MS: **Protein kinase A activation is required for IL-1-induced nitric oxide production by cardiac myocytes.** *Am J Physiol* 1996, **271**: C429-C434.
38. Ikeda U, Yoshikazu M, Kawahara Y, Yokoyama M, Shimada K: **Angiotensin II augments cytokine-stimulated nitric oxide synthesis in rat cardiac myocytes.** *Circulation* 1995, **92**: 2683-2689.
39. Brady AJB, Warren JB, Poole-Wilson PA, Willams TJ, Harding SE: **Nitric oxide attenuates cardiac myocyte contraction.** *Am J Physiol* 1993, **265**: H176-H182.
40. Mohan P, Brutsaert DL, Paulus WJ, Sys SU: **Myocardial contractile response to nitric oxide and cGMP.** *Circulation* 1996, **93**: 1223-1229.
41. Chung MK, Gulick TS, Rotondo RE, Schreiner GF, Lange LG: **Mechanism of cytokine inhibition of β -adrenergic agonist stimulation of cyclic AMP in rat cardiac myocytes. Impairment of signal transduction.** *Circ Res* 1990, **67**: 753-763.
42. Duhe RJ, Nielsen MD, Dittman AH, Villacres EC, Choi EJ, Storm DR: **Oxidation of critical cysteine residues of type 1 adenylyl cyclase by o-iodosobenzoate or nitric oxide reversibly inhibits stimulation by calcium and calmodulin.** *J Biol Chem* 1994, **269** (10): 7290-7296.
43. Coquil JF, Brunelle G: **Adenylate cyclase of platelets from spontaneously hypertensive rats: reduction of the inhibition by GTP.** *Biochem Biophys Res Com* 1989, **162**(3): 1265-1271.
44. Hamet P, Orlov SN, Tremblay J: **Intracellular signaling mechanisms in hypertension.** In *Hypertension: pathophysiology, diagnosis and management*, second edition. Edited by Laragh JH and Brenner BM. New York: Raven Press, 1995: 575-607.
45. Méry PF, Pavoine C, Belhassen L, Pecker F, Fischmeister R: **Nitric oxide regulates cardiac Ca^{2+} current: involvement of cGMP-inhibited and cGMP-stimulated**

- phosphodiesterase through guanylyl cyclase activation. *J Biol Chem* 1993, **268**: 26286-26295.
46. Han X, Shimoni Y, Giles WR: **A cellular mechanism for nitric oxide-mediated cholinergic control of mammalian heart rate.** *J Gen Physiol* 1995, **106**: 45-65.
 47. Xie YW, Shen W, Zhao G, Xu X, Wolin MS, Hintze TH: **Role of endothelium-derived nitric oxide in the modulation of canine myocardial mitochondrial respiration in vitro.** *Circ Res* 1996, **79**: 381-387.
 48. Shen W, Xu X, Ochoa M, Zhao G, Wolin MS, Hintze TH: **Role of nitric oxide in the regulation of oxygen consumption in conscious dogs.** *Circ Res* 1994, **75**: 1086-1095.
 49. Gross WL, Bak MI, Ingwall JS, Arstall MA, Balligand JL, Smith TW, Kelly RA: **Nitric oxide regulates rat heart contractile reserve and inhibits creatine kinase.** *Proc Natl Acad Sci USA* 1996, **93**: 5604-5609.
 50. Sadoshima JI, Izumo S: **Signal transduction pathways of angiotensin II-induced c-fos gene expression in cardiac myocytes in vitro. Roles of phospholipid-derived second messengers.** *Circ Res* 1993, **73**: 424-438.
 51. Johnson MC, Aguilera G: **Studies on the mechanism of the novel stimulatory effect of angiotensin-II on adenylyl cyclase in rat fetal skin fibroblasts.** *Endocrinology* 1992, **131**(5): 2404-2412.
 52. Gomez Llambi H, Manni F, LaPadula P, Carretero OA, Taquini CM: **Myocardial contractility is modulated by angiotensin II via nitric oxide.** *Hypertension* 1996, **27**: 704-708.
 53. Crawford KW, Frey EA, Cote TE: **Angiotensin II receptor recognized by DUP 753 regulates two distinct guanine nucleotide-binding protein signaling pathways.** *Mol Pharmacol* 1991; **41**: 154-162.

Table 1. Haemodynamic parameters in normotensive rats treated with various doses of losartan or enalaprilat to determine the equipotent doses.

	0	1	5	10
Losartan (mg/kg per day)				
MAP (mm Hg)	94.8 ± 2.3	86.4 ± 1.7	82.6 ± 4.6*	85.0 ± 1.8
Heart rate (beats/min)	349.8 ± 9.9	340.1 ± 6.5	339.9 ± 11.8	359.0 ± 13.4
max MAP response to Ang II (mm Hg)	44.4 ± 5.7	38.2 ± 3.1	45.2 ± 3.1	46.7 ± 1.6
Ang II ED50 (ng/kg)	49 ± 15	81 ± 10	231 ± 48*	286 ± 77*
plasma [losartan] (ng/ml)	0.0 ± 0.0	258.9 ± 50.8	707.9 ± 187.8	597.2 ± 125.8
plasma [EXP 3174] (ng/ml)	0.0 ± 0.0	30.1 ± 8.3	192.4 ± 48.1	186.5 ± 48.5
Enalaprilat (mg/kg per day)	0	0.018	0.18	1
MAP (mm Hg)	91.3 ± 1.5	86.0 ± 2.0	88.6 ± 2.7	78.4 ± 3.0*
Heart rate (beats/min)	337.5 ± 8.4	336.5 ± 8.5	359.5 ± 8.4	324.7 ± 6.3
max MAP response to Ang I (mm Hg)	52.0 ± 2.0	45.4 ± 5.8	52.4 ± 3.4	41.1 ± 2.0
Ang I ED50 (ng/kg)	55 ± 8	61 ± 10	146 ± 25*	257 ± 33*

Values are expressed as means ± SEM. Ang I, angiotensin I; Ang II, angiotensin II; MAP mean arterial pressure; Max, maximal response; ED50: dose of the agent required to produce half of the maximal response (n=6-8). * P<0.05, versus 0 mg/kg per day group.

Table 2. Haemodynamic parameters, plasma and tissue catecholamines levels and cardiac weights in normotensive sham-treated (SHAM) and N^G-nitro-L-arginine-methyl-ester (L-NAME)-hypertensive rats under control (CTL) conditions and after treatment with losartan (LOS) or enalaprilat (ENA).

Groups:	SHAM CTL	SHAM LOS	SHAM ENA	L-NAME CTL	L-NAME LOS	L-NAME ENA
MAP (mm Hg)	98 ± 2	79 ± 3*	72 ± 4*	142 ± 4*	113 ± 5†§	109 ± 4†§
Heart rate (beats/min)	365 ± 4	323 ± 13	340 ± 14	339 ± 12	303 ± 8	326 ± 11
Plasma [noradrenaline] (pg/ml)	192 ± 23	193 ± 11	199 ± 37	168 ± 21	193 ± 15	154 ± 13
Plasma [adrenaline] (pg/ml)	91 ± 14	84 ± 22	91 ± 20	256 ± 63 *	162 ± 19*§	154 ± 16*§
LVT [noradrenaline] (pg/mg)	407 ± 37	422 ± 41	408 ± 30	405 ± 37	353 ± 38	388 ± 26
LVT [adrenaline] (pg/mg)	21 ± 3	20 ± 5	16 ± 1	21 ± 3	21 ± 1	20 ± 2
Body weight (g)	409 ± 11	405 ± 14	390 ± 11	359 ± 27	368 ± 16	357 ± 12
LVW : body weight (mg/g)	1.51 ± 0.04	1.32 ± 0.05*	1.33 ± 0.04*	1.47 ± 0.03	1.30 ± 0.05*†	1.31 ± 0.04*†
RVW : body weight (mg/g)	0.47 ± 0.01	0.43 ± 0.02	0.45 ± 0.01	0.38 ± 0.02	0.42 ± 0.02	0.42 ± 0.01

Values are expressed as means ± SEM. MAP, mean arterial pressure; LVT, left ventricle tissue; LVW, left ventricle weight; RVW right ventricle weight (n=10-16). * P<0.05, versus SHAM CTL; † P<0.05, versus L-NAME CTL; § P<0.05, versus same 12 days treatment in SHAM group.

Table 3. Characteristics of cardiac β -adrenergic receptors in normotensive sham-treated (SHAM) and hypertensive N^G -nitro-L-arginine-methyl-ester (L-NAME)-treated rats under control (CTL) conditions and after treatment with losartan (LOS) or enalaprilat (ENA).

Groups	SHAM CTL	SHAM LOS	SHAM ENA	L-NAME CTL	L-NAME LOS	L-NAME ENA
Bmax (fmol/mg)	28.8 \pm 2.9	31.5 \pm 3.2	30.0 \pm 1.4	24.5 \pm 1.4	29.0 \pm 2.9	28.8 \pm 1.6
Kd (pmol/l)	117.5 \pm 6.4	122.7 \pm 13.3	122.5 \pm 4.6	104.7 \pm 9.4	144.5 \pm 14.7	108.6 \pm 3.8

Values are expressed as means \pm SEM. Bmax, total specific β -adrenergic receptor density; Kd, equilibrium dissociation constant of total specific β -adrenergic receptors (n=5-8).

Table 4. Cardiac β -adrenergic receptors subtypes in normotensive sham-treated (SHAM) and hypertensive N^G -nitro-L-arginine-methyl-ester (L-NAME)-treated rats under control (CTL) conditions.

Groups	SHAM CTL	L-NAME CTL
B_{max_L} (fmol/mg) (β_1 , %)	13.6 ± 1.9 (65.8)	15.8 ± 2.0 (62.9)
B_{max_H} (fmol/mg) (β_2 , %)	6.9 ± 1.1 (34.2)	9.4 ± 1.7 (37.1)
K_{iL} (μ mol/l)	3.8 ± 1.5	1.9 ± 1.4
K_{iH} (nmol/l)	12.2 ± 9.1	22.5 ± 13.4

Values are expressed as means \pm SEM. B_{max_L} , fraction of β -adrenergic receptors with low affinity for the selective β_2 -antagonist; B_{max_H} , fraction of β -adrenergic receptors with high affinity for the selective β_2 -antagonist; K_{iL} , equilibrium dissociation constant of low affinity sites; K_{iH} , equilibrium dissociation constant of high-affinity sites ($n=4-7$).

Table 5. Adenylyl cyclase pathway activity evaluated in terms of cyclic AMP (cAMP)-induced formation with different agonists in left ventricular membrane preparations from sham (SHAM)-treated and N^G-nitro-L-arginine-methyl-ester (L-NAME)-treated rats under control (CTL) conditions and after treatment with losartan (LOS) or enalaprilat (ENA).

Groups	SHAM	CTL	SHAM	LOS	SHAM	ENA	L-NAME	CTL	L-NAME	LOS	L-NAME	ENA
Basal (pmol cAMP/mg per min)	13.6 ± 0.7		16.4 ± 0.6		17.3 ± 1.5		14.0 ± 1.0		15.2 ± 1.2		17.3 ± 1.6	
Isoproterenol (0.1 mmol/l)	24.0 ± 2.6		26.5 ± 2.5		24.4 ± 1.9		23.6 ± 1.1		20.4 ± 1.3		22.0 ± 1.1	
Gpp(NH)p (1 mmol/l)	29.2 ± 2.6		32.1 ± 5.7		28.3 ± 1.1		35.3 ± 2.7		20.0 ± 1.6 †		28.2 ± 2.4	
NaF (10 mmol/l)	37.9 ± 1.5		55.4 ± 4.0 *		47.6 ± 2.4		46.6 ± 1.9 *		38.8 ± 1.6 †		43.5 ± 2.6	
Forskolin (0.1 mmol/l)	174.2 ± 10.2		203.0 ± 8.4 *		176.4 ± 7.9		190.9 ± 6.5		146.6 ± 6.8 †		179.2 ± 6.2	
Isoproterenol / forskolin (%)	13.2 ± 1.6		13.1 ± 0.7		13.8 ± 0.9		12.4 ± 0.5		13.9 ± 0.7		12.3 ± 0.4	
Gpp(NH)p / forskolin (%)	16.7 ± 0.7		15.2 ± 1.5		16.1 ± 0.6		18.5 ± 1.1		13.9 ± 1.4 †		15.7 ± 1.3	
NaF / forskolin (%)	22.2 ± 0.9		27.5 ± 0.6 *		27.0 ± 0.8 *		24.5 ± 1.0		26.8 ± 1.4		24.5 ± 1.6	

Values are expressed as means ± SEM. Agonist-induced cAMP formation is expressed as change in pmol cAMP/mg per min in excess of baseline formation (n=6-8). * P<0.05, versus SHAM CTL group. † P<0.05, versus L-NAME CTL group.

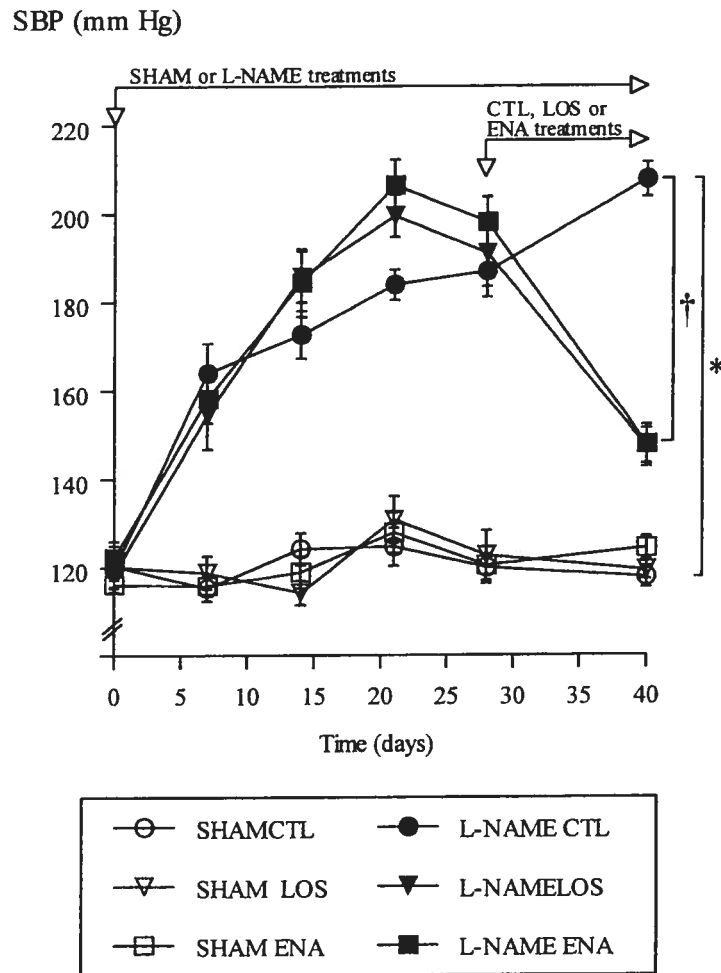


Fig. 1. Time-courses of systolic blood pressure (SBP) in sham (SHAM, open symbols) and NG-nitro-L-arginine-methyl-ester (L-NAME)-treated rats (filled symbols) not treated further (control, CTL, circles) and treated with losartan (LOS, triangles) or enalaprilat (ENA, squares). Sprague-Dawley rats were treated or not with 100 mg/kg per day L-NAME in their drinking water for 4 weeks. Thereafter, chronic treatments with 5 mg/kg per day LOS and 1 mg/kg per day ENA were administered for 12 days via osmotic pumps implanted subcutaneously ($n=12-14$). * $P<0.05$, versus sham CTL, † $P<0.05$ versus L-NAME-treated LOS and ENA.

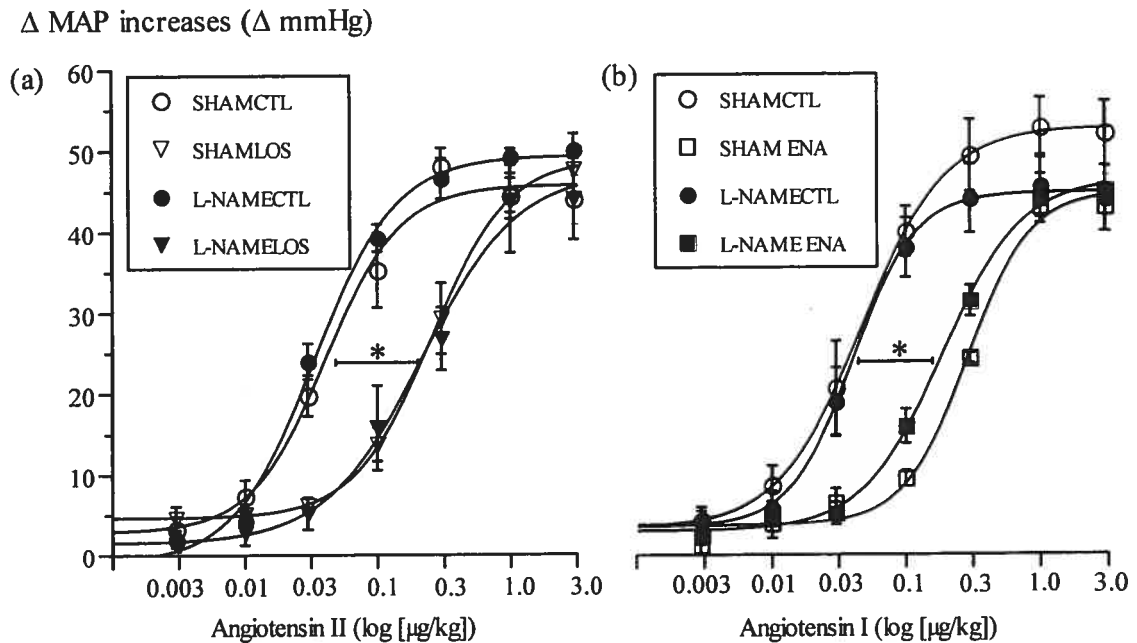


Fig. 2. (a) Inhibition of angiotensin II-induced pressor responses after chronic losartan treatment (5 mg/kg per day) and (b) inhibition of angiotensin I-induced pressor response after chronic enalaprilat treatment (1 mg/kg per day), in sham-treated and and N^{G} -nitro-L-arginine-methyl-ester (L-NAME)-treated hypertensive rats. Changes in mean arterial pressure (Δ MAP) were measured after intravenous bolus injections of non-cumulative doses of angiotensin I or angiotensin II in conscious rats ($n=5$). * $P < 0.05$ versus respective control group for calculated ED_{50} values.

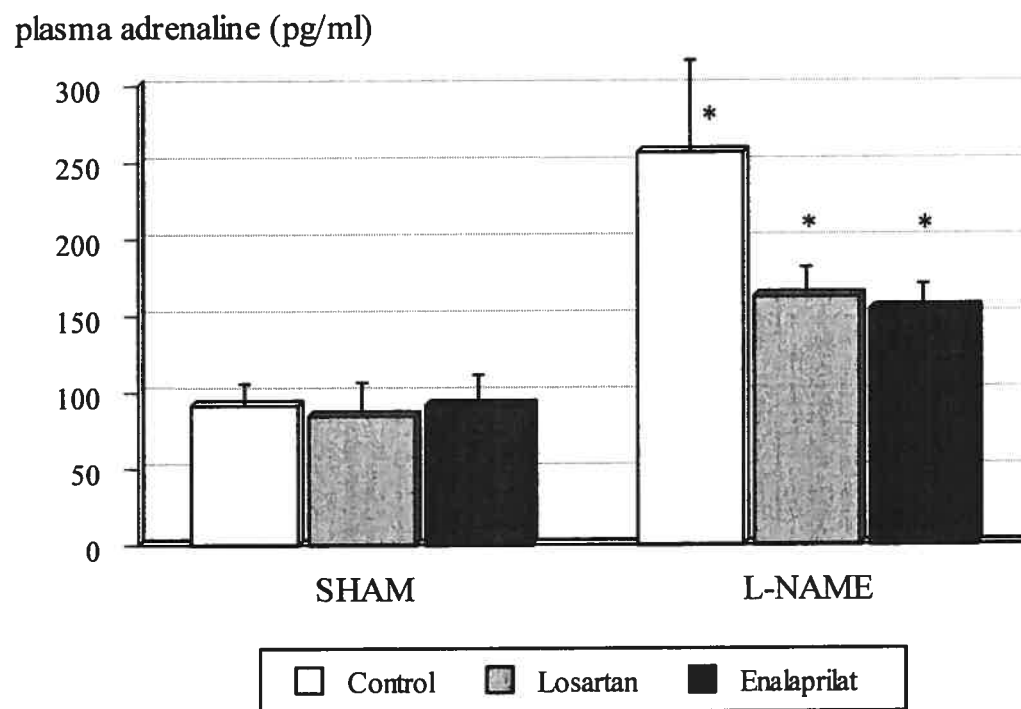


Fig 3. Basal plasma adrenaline levels measured at the end of the treatments in sham-treated and N^G-nitro-L-arginine-methyl-ester (L-NAME)-treated rats not treated further (control), treated with losartan (LOS) and treated with enalaprilat (ENA). n=10-13. **P*<0.05 vs sham-treated control.

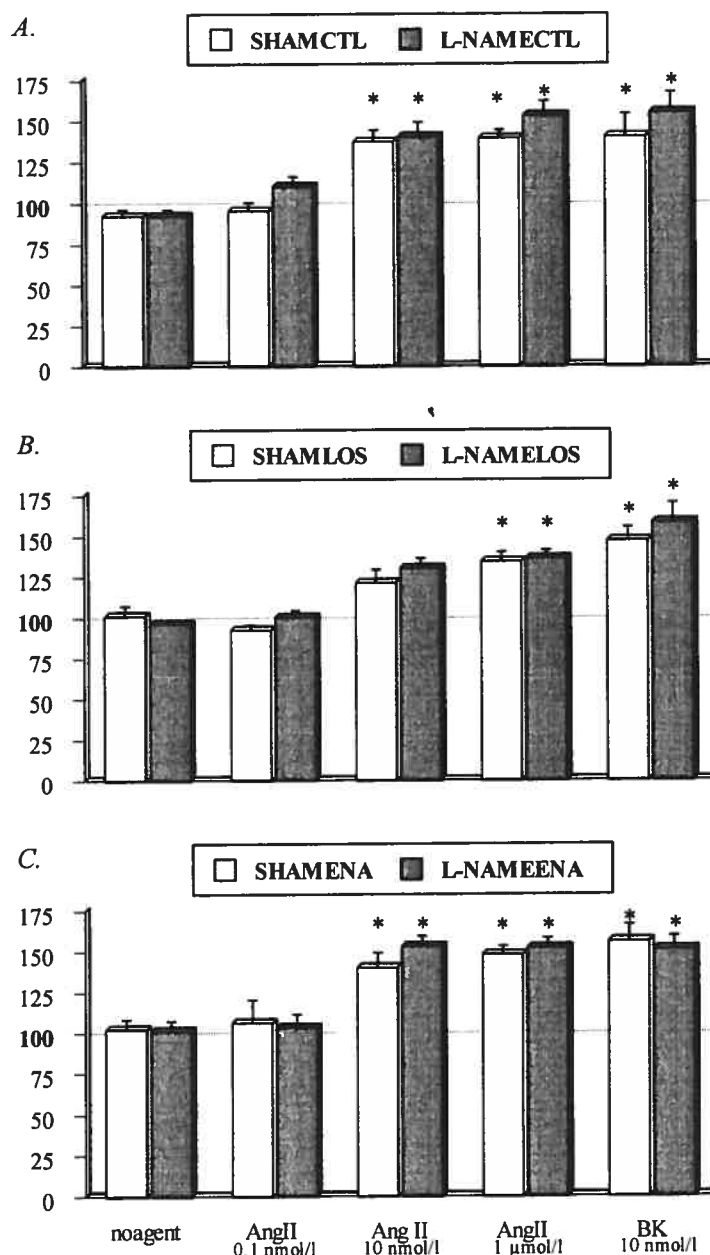
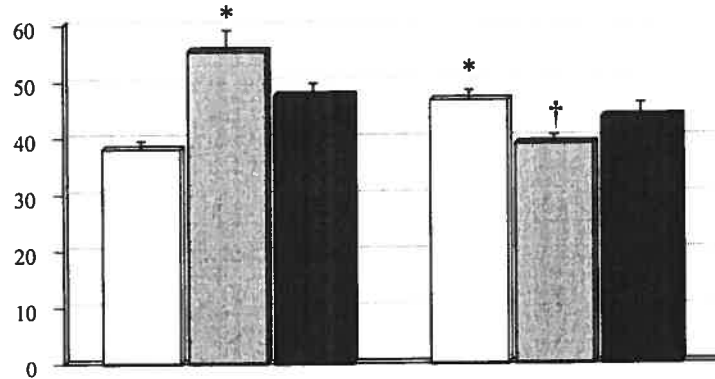
Stimulation-induced outflow of [³H]-noradrenaline (% S₂/S₁)

Fig 4. Field-stimulated release of [³H]-noradrenaline from isolated atria in the absence or in the presence of angiotensin II (Ang II) and of bradykinin (BK) expressed as a percentage of basal level of stimulation-induced outflow of radioactivity (S₁), (a) in sham-treated and N^G-nitro-L-arginine-methyl-ester (L-NAME)-treated rats under control conditions (CTL), (b) in losartan sham-treated and L-NAME-treated rats (LOS) and (c) in enalaprilat sham-treated and L-NAME-treated rats (ENA). n=4-9. *P<0.05, vs no agent.

(a) NaF 10 mmol/l

 Δ pmol cAMP/mg/min in excess of basal formation

(b) Forskolin 0.1 mmol/l

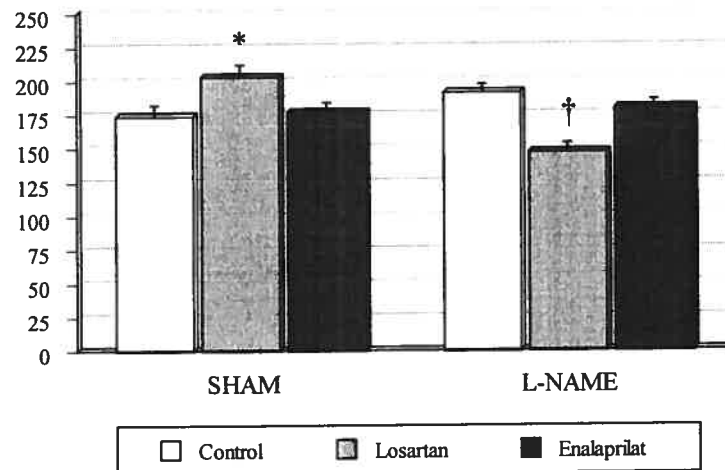
 Δ pmol cAMP/mg/min in excess of basal formation

Fig 5. Adenylyl cyclase activity measured in terms of the production of cyclic AMP (cAMP) in the presence of (a) NaF and (b) forskolin in excess of baseline formation of cAMP (Δ) in left ventricular membranes from sham-treated (SHAM) and N^G-nitro-L-arginine-methyl-ester (L-NAME)-treated control rats and rats treated with losartan and enalaprilat. * P <0.05, versus SHAM control; † P <0.05, versus L-NAME control.

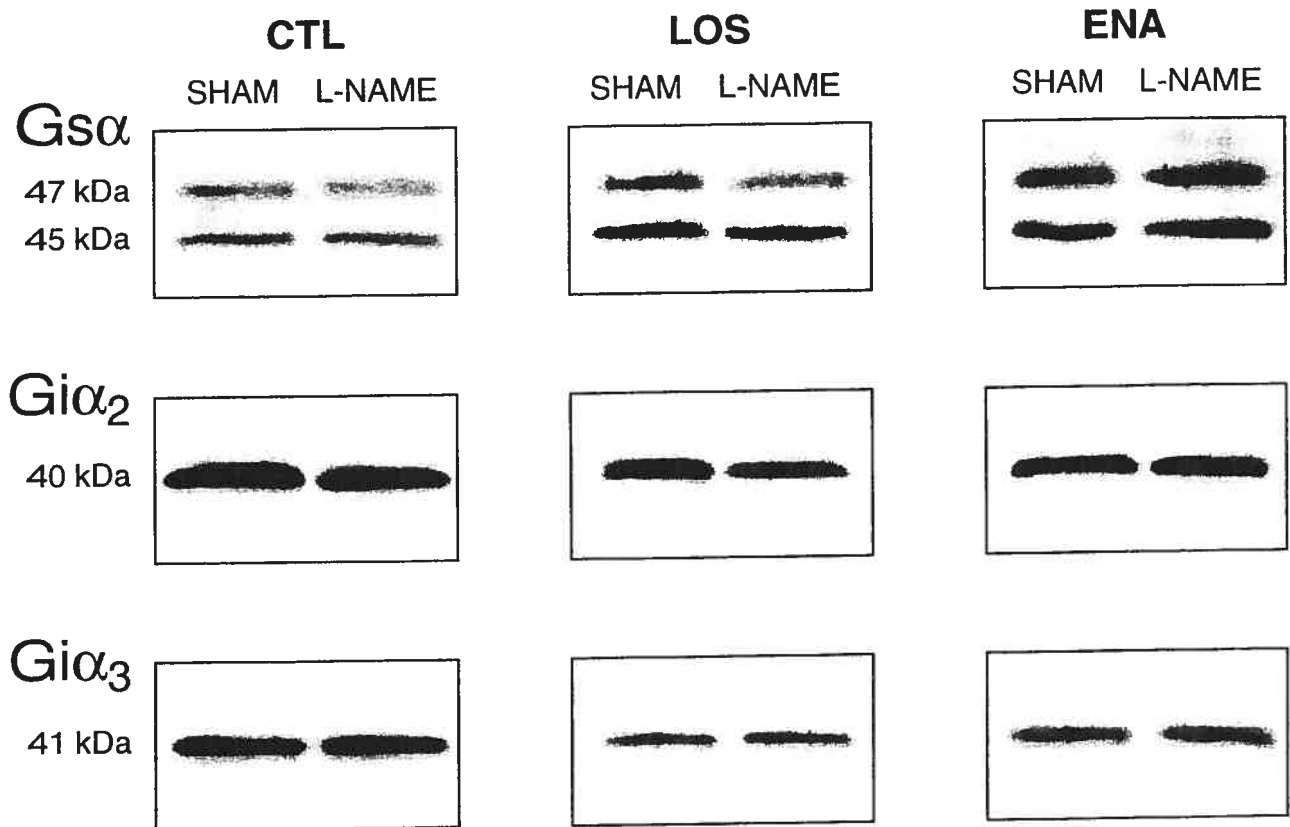


Fig 6. Typical blots showing levels of α -subunits of G proteins detected by immunoblot analysis in myocardial plasma membranes from sham-treated (SHAM) and N^G -nitro-L-arginine-methyl-ester (L-NAME)-treated control rats (CTL) and from such rats treated with losartan (LOS) and with enalaprilat (ENA).

NaF-induced cAMP formation

Δ pmol cAMP/mg/min in excess of basal formation

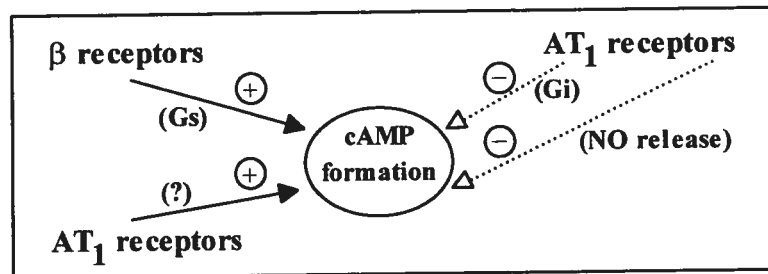
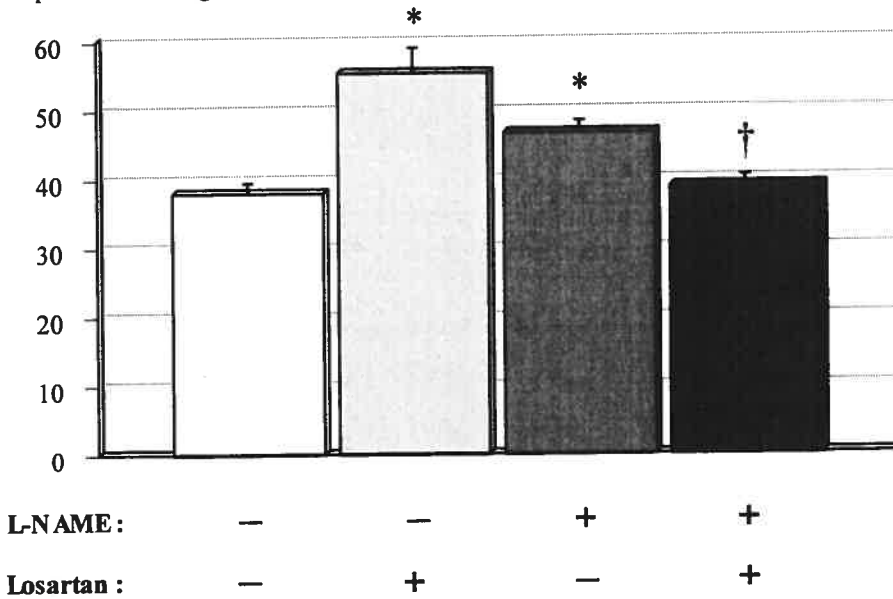


Fig 7. Adenylyl cyclase activity measured by the production of cyclic AMP (cAMP) in the presence of NaF in excess of baseline (Δ) formation of cAMP in left ventricular membranes from Sprague-Dawley rats treated (+) or not (-) N^G-nitro-L-arginine-methyl-ester (L-NAME) and losartan. The postulated mechanisms of the modulation of β-adrenergic-adenylyl cyclase pathway activity by angiotensin II via type 1 (AT₁) receptors are NO- and Gi-dependent negative modulatory control of formation of cAMP and a facilitative modulatory control of formation of cAMP. *P<0.05, versus control; †P<0.05, versus L-NAME.

CHAPITRE V – Article Scientifique

**ROLE OF NO AND ANGIOTENSIN II IN THE EARLY DEVELOPMENT OF
IMPAIRED ENDOTHELIAL FUNCTIONS AND CARDIAC HYPERTROPHY
IN DEOXYCORTICOSTERONE ACETATE-SALT HYPERTENSION.**

Canadian Journal of Physiology and Pharmacology, 1998; 76: 665-675

**ROLE OF NO AND ANGIOTENSIN II IN THE EARLY DEVELOPMENT OF
IMPAIRED ENDOTHELIAL FUNCTIONS AND CARDIAC HYPERTROPHY
IN DEOXYCORTICOSTERONE ACETATE-SALT HYPERTENSION.**

Annik K.-Laflamme, Laurence Oster, René Cardinal, Jacques de Champlain.

Research Group on the Autonomic Nervous System,
Departments of physiology and pharmacology, Faculty of Medicine,
Université de Montréal, Montréal, Québec, Canada, H3C 3J7.

Running Head: *NOS inhibition in DOCA hypertension*

Author for correspondence:

Dr Jacques de Champlain
Department of Physiology, Faculty of Medicine
Université de Montréal,
P.O. Box 6128, station Centre-ville
Montréal, Québec
CANADA H3C 3J7

Canadian Journal of Physiology and Pharmacology, 1998; 76: 665-675

Original Submission: December, 1997.

Revised Manuscript: February 26, 1998.

Abstract

This study was designed to investigate the effects of chronic inhibition of NO synthesis as well as chronic angiotensin receptor blockade with losartan in the development of hypertension, on mesenteric arterial bed reactivity as well as on the development of cardiac and kidney hypertrophy in deoxycorticosterone-salt (DOCA) hypertension. Uninephrectomized rats were divided in four experimental groups all receiving saline water to drink and treated or not with losartan over a period of 9 days. Two of these groups were administered DOCA, one of which received also N^G-nitro-L-arginine-methyl ester (L-NAME) to drink. A third group received only L-NAME, while another group received only saline. Systolic blood pressure was similarly increased in L-NAME, DOCA, DOCA-L-NAME groups. Cardiac and kidney weights were increased in DOCA but significantly reduced in DOCA-L-NAME. Losartan prevented the development of hypertension in all groups and also prevented cardiac and kidney hypertrophy in DOCA. The hyperreactivity of mesenteric arteries to phenylephrine, measured in the presence of indomethacin, was endothelium-dependent in both L-NAME groups but not in DOCA rats. Pretreatment with BQ 123 did not modify these endothelium-dependent responses in L-NAME rats. Chronic losartan prevented phenylephrine hyperreactivity endothelium-dependently only in DOCA, whereas only the removal of the endothelium attenuated the responsiveness in both L-NAME-treated groups. Vasorelaxations to acetylcholine and isoproterenol were attenuated in the three hypertensive groups and were normalized only in DOCA and L-NAME treated with losartan. In summary, in all hypertensive groups, blood pressure was normalized by losartan independently of its effects on endothelial functions. In DOCA, losartan normalized the phenylephrine-hyperreactivity through an endothelial-dependent mechanism. However, in L-NAME-treated groups an endothelial-derived contracting factor, other than angiotensin II, endothelin or vasoconstrictor prostanoids, appears to be activated. Both NO and angiotensin II seem to play a role in the early development of hypertension and organ hypertrophy in DOCA hypertension.

Keywords: experimental hypertension, N^G-nitro-L-arginine-methyl ester, deoxycorticosterone acetate, vascular reactivity, hypertrophy, losartan.

Introduction

The endothelium, which produces various vasoactive substances, plays a major role in the modulation of cardiovascular functions such as the vascular tone and structure. In the presence of a functional endothelium, the contraction of vascular smooth muscle cells is partly counteracted by the endothelium-derived relaxing factors. Evidence suggesting that an alteration of the L-arginine-nitric oxide (NO)-cGMP pathway may be involved in the enhanced vasoconstrictor responses to adrenergic stimulation has been reported (Topouzis et al. 1991). Endothelium-dependent vascular relaxations are impaired in human essential hypertension (Panza et al. 1990) and in resistance arteries of various models of experimental hypertension including genetic (Li and Joshua 1993) and deoxycorticosterone acetate-salt (DOCA) hypertension (Lockette et al. 1986). The altered endothelium-dependent vasodilation in hypertension could be due to concomitant enhanced release of contracting factors and (or) to lesser release of relaxing factors and (or) to increased oxidative stress. The aim of the present study was to investigate the effects of endothelium removal, chronic inhibition of NO synthesis, as well as chronic angiotensin receptor blockade with losartan on vascular contractile and relaxant reactivities of mesenteric arteries in the development of DOCA hypertension. The activation of the local vascular renin-angiotensin system could also be involved in the development of hypertension and in addition to their blood pressure lowering effect, angiotensin receptor antagonists may have an additional beneficial effect on endothelial-dependent relaxation. Indeed, it was reported that chronic treatment with losartan, an AT₁ receptor antagonist, restored the endothelium-mediated vasodilatation in spontaneously hypertensive rats (Dohi et al. 1994).

We have previously demonstrated that the decreased production of NO after long-term administration of N^G-nitro-L-arginine-methyl ester (L-NAME) was directly linked to the development of hypertension. Whereas the DOCA model of hypertension is associated with an increase in heart weight, the L-NAME model was not associated with cardiac hypertrophy (K.-Laflamme et al. 1998; Arnal et al. 1992; Ribeiro et al. 1992). In the present study, we investigated whether chronic L-NAME administration would influence the development of cardiac and kidney hypertrophy in DOCA hypertension, a model known to develop important cardiovascular changes. Therefore, we wanted to evaluate the effect of the postulated growth-inhibitory properties of L-NAME.

Methods

Animal models and losartan treatment

Experiments were in accordance to institutional animal ethic committee guidelines. Sprague-Dawley rats (190-210g, Charles River Laboratories, St-Constant, Qué.) were used to induce hypertension by the treatments with either L-NAME, DOCA, or DOCA-L-NAME. A subgroup of each experimental model of hypertension was concomitantly treated with losartan administered by osmotic pumps in parallel to the development of hypertension. Briefly, all rats were unilaterally nephrectomized under sodium pentobarbital anesthesia (50 mg·kg⁻¹, intraperitoneally), and osmotic pumps were implanted subcutaneously in the flank region for treatments with losartan over the period of development of hypertension, whereas the groups not treated with losartan underwent the same surgical procedure without implantation of an osmotic pump. Rats were allowed to recover from the surgery for 72 h. Twenty-four hours before their implantation, the osmotic pumps (model 2002, Alza Corp., Palo Alto, Calif.) were filled with losartan (dissolved in isotonic saline, 0.9%) to provide infusion rates of 5 mg·kg⁻¹·day⁻¹. Three days after nephrectomy, the four different experimental treatments were started (day 0), and all the rats received saline water (NaCl 1%) to drink for 12 days concomitantly with their respective experimental treatment. Untreated uninephrectomized rats receiving saline water to drink constituted the control group (CTL). The DOCA rats received injections of DOCA (5 mg subcutaneously, every three days [day 0, 3, 6, 9]) while one group received L-NAME to drink in saline water (100 mg·kg⁻¹·day⁻¹) and, finally, the DOCA-L-NAME rats were injected with DOCA and received L-NAME to drink.

Systolic blood pressure, cardiac and kidney hypertrophy

To study the development of hypertension and organ hypertrophy chronologically, subgroups of each experimental model were studied after either 6, 9 or 12 days. Systolic arterial blood pressure (SBP) was measured by tail-cuff plethysmography (Harvard Apparatus Ltd, South Natick, Mass.) in conscious rats and was recorded on a system MacLab/8 (AD Instruments Pty Ltd, CastleHill, Australia). For each rat, at least four to six blood pressure readings were averaged to obtain the blood pressure level. The animals were weighed and killed by decapitation. The kidneys and the hearts were quickly removed, from which atria, ventricles and septum were separated, dissected free of surrounding tissue, and weighed. The effect of renin-angiotensin blockade with losartan was studied in subgroups, 9 days after the beginning of L-NAME and (or) DOCA treatments.

Vascular reactivity of isolated mesenteric arterial bed

The vascular reactivity was evaluated on day 9 of the treatments. The superior mesenteric artery was cannulated with PE-50 tubing near its origin in the aorta. The ileocolonic branches were tied off and the gut removed. The isolated mesenteric arterial bed was perfused at $4 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ with a Krebs-bicarbonate solution (in $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$: NaCl 118, KCl 4.7, MgCl_2 1.2, NaH_2PO_4 1.2, CaCl_2 2.5, NaHCO_3 25, glucose 11) maintained at 37°C and oxygenated with a gas mixture containing 95% oxygen and 5% carbon dioxide. To eliminate the contribution of prostaglandins in the vascular responses, all the experiments were realized in the presence of indomethacin ($10 \text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$). Vasoconstrictions and relaxations were estimated from the changes in perfusion pressure (mm Hg, $1 \text{ mm Hg} = 133.32 \text{ Pa}$) using a strain gauge transducer (P32Dc; Gould Statham Instruments, Hatorey, Porto Rico). The isolated mesenteric arterial beds were allowed to equilibrate for 60 min, then the arteries were repeatedly contracted with the α_1 -adrenergic agonist phenylephrine (PHE, $1 \text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) at 15-min intervals until the responses remained constant. The functional state of the endothelium was assessed by the vasodilator effect of acetylcholine (ACh, $10 \text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) in arteries precontracted with PHE ($1 \text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$). Concentration-response curves were then constructed by perfusing mesenteric arterial beds with increasing but noncumulative concentrations of PHE (0.1 to $10 \text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$). Responses to PHE were expressed as maximal increases in perfusion pressure (mm Hg) and midrange sensitivity estimated from ED_{50} values (dose required to produce an increase in perfusion pressure equivalent to 50% of the maximal value). In some preparations, BQ 123 ($0.3 \text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$), a selective endothelin-A receptor antagonist, was added to the perfusate 30 min before and during the perfusion of mesenteric arterial beds with PHE. To study relaxations, some mesenteric arterial beds were perfused with normal Krebs containing PHE ($0.1\text{-}3 \text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) to produce a near 50% maximal contractile response. When the perfusion pressure reached a plateau, increasing and cumulative concentrations of ACh, isoproterenol (ISO) or sodium nitroprusside (SNP) ($0.1 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ - $10 \text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) were added to the perfusion solution. The vasodilatory effect of ACh was repeated after acute L-NAME ($100 \text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) was added to the perfusate 20 min before the induction of contraction with PHE. Both the maximal relaxation (% of the remaining initial PHE contraction) and ID_{50} (dose required to reduce the initial PHE-induced vasoconstriction by 50%) were calculated. In all preparations, the endothelium was then removed by infusing 0.5% 3-[(3-chloramidopropyl) dimethylammonio]-1-propanesulfonate (CHAPS) for 45 s. The arterial bed was then re-equilibrated in normal Krebs solution for 60

min. The absence of the endothelium was assessed by the lack of vasodilator action of ACh ($10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) in arteries precontracted with PHE ($1 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$). The protocols described above were repeated after the endothelium had been removed.

Solutions and Chemicals

All chemicals were purchased from Sigma Chemical Co. (St Louis, Mo.). Losartan was kindly provided by DuPont Merck Pharmaceutical Co. (Wilmington, Del.) and Merck Frosst Canada Inc. (Kirkland, Qué.). Isoproterenol was dissolved in $0.1 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ ascorbic acid and indomethacin in equimolar Na_2CO_3 .

Statistics

Data are given as mean \pm SEM. In all experiments, n equals the number of rats used. Maximal responses, ED_{50} and IC_{50} values were determined for each concentration-response curve. Statistical comparison was assessed by ANOVA followed by Scheffé's F test or by Student's unpaired t test when appropriate. A value of $P < 0.05$ was considered statistically significant.

Results

SBP and body weight

Indirect tail cuff measurement of SBP revealed a significant increase from the baseline value of about 120 mm Hg on day 0, reaching 178 ± 7 , 161 ± 6 and 185 ± 16 on day 12 after LNAME, DOCA and LNAME-DOCA treatments, respectively (Fig. 1). The rise in SBP was progressive and already significant on day 6 in each experimental group when compared with their respective baseline value and with the CTL group. SBP in the CTL group did not change over the period of the study. Body weight increased progressively and similarly over the 12 days of treatments in CTL rats and those receiving DOCA or L-NAME, but in the DOCA-L-NAME group, the body weight decreased significantly on day 12 (Fig. 1).

Heart and kidney weights

The L-NAME hypertensive animals did not develop cardiac hypertrophy, as demonstrated by the similar ratio of heart weight to body weight compared with the CTL group (Fig. 2A). In contrast, DOCA and DOCA-L-NAME rats had developed cardiac hypertrophy on day 6 which persisted on day 9 and 12 in DOCA, whereas the cardiac hypertrophy had significantly regressed in DOCA-L-NAME group on day 12 (Fig. 2A). Ischemic zones and

infarcts were observed on the hearts of DOCA-L-NAME rats (Fig. 3A). The kidney weights were similar in CTL and L-NAME rats but DOCA and DOCA-L-NAME rats had developed kidney hypertrophy on day 6 (Fig. 2B). In a similar fashion as for the heart weight, the kidney weight continued to increase in DOCA compared to CTL rats but it regressed significantly in DOCA-L-NAME group on days 9 and 12 (Fig. 2B and 3B). Although the body weight in DOCA-L-NAME was significantly reduced on day 12, still the ratio of cardiac to body weights was markedly smaller than in the DOCA group. However, the kidney weights are reported in total organ weight since the remodelling of that organ is not as directly linked to the degree of hypertension.

Effect of losartan on SBP and cardiac and kidney hypertrophy

The effect of chronic AT₁ receptor blockade on the development of hypertension and heart and kidney hypertrophy induced by DOCA, L-NAME or both for a period of 9 days was investigated (Figs. 4 and 5). SBP was significantly increased in LNAME, DOCA and DOCA-L-NAME without losartan treatment and the hypertension in DOCA-L-NAME was significantly greater than in DOCA (Fig. 4). The concomitant treatment with losartan attenuated the rise of SBP in each experimental model, and the blood pressure levels amongst all the groups treated with losartan were no more different as evaluated by ANOVA (Fig. 4). Moreover, in L-NAME and DOCA groups treated with losartan, the SBP was significantly lower than in the same experimental groups not treated with losartan (Fig. 4). Although the reduction was not significant in DOCA-LNAME, losartan tended to attenuate the development of hypertension in this group ($P=0.06$, Fig. 4). As described above, only the DOCA group had developed cardiac and kidney hypertrophy. Losartan treatment had no effect on cardiac or kidney weights neither in CTL group, nor in L-NAME or DOCA-L-NAME groups (Fig. 5). In contrast, in DOCA rats, the treatment with losartan prevented the increase in heart weight on day 9 and significantly attenuated kidney hypertrophy. In this protocol, one group was administered the L-NAME treatment in tap water, whereas it was administered in saline water in the other groups, to assess whether saline water had any influence. The administration of saline water to Sprague-Dawley rats did not cause a rise in blood pressure and whether L-NAME was given in saline or tap water had no significant effect on the development of hypertension, on the antihypertensive effect of losartan or on cardiac and kidney weights (Figs. 4 and 5). The body weights were similar in all the experimental groups treated or not with losartan.

Contractile responses of mesenteric arterial beds to PHE

The concentration-response curves to PHE of isolated mesenteric arterial beds are illustrated in Fig. 6. The maximal increase in perfusion pressure induced by PHE in intact arteries was significantly enhanced in the three hypertensive groups as compared to CTL rats, whereas the sensitivities were not different (ED_{50} , Table 1). This hyperreactivity was significantly greater in the DOCA-L-NAME compared with the DOCA group. Removal of the endothelium reduced markedly the maximal response to PHE in L-NAME and DOCA-L-NAME rats whereas it had no effect on the hyperreactivity observed in DOCA rats (Fig. 6, Table 1). Overall, there were no significant differences in the maximal responses or sensitivities between the groups when the arteries were denuded of their endothelium, since the vascular sensitivity tended to increase in the control vessels. Pretreatment with BQ 123 of mesenteric arteries with intact endothelium did not modify the maximal responses of the PHE curves in CTL (81 ± 4 and 75 ± 7 mm Hg, with and without BQ123) and L-NAME (117 ± 6 and 108 ± 84 mm Hg, with and without BQ123) (data not shown). In CTL rats, the concentration-response curves to PHE were not modified by chronic treatment with losartan, in the presence or absence of the endothelium (Fig. 6, Table 2). The treatment with losartan of the DOCA group reduced significantly the maximal response to PHE of arteries with intact endothelium, whereas following the removal of the endothelium the PHE response increased to values similar to those observed in the absence of losartan treatment with or without endothelium. Losartan treatment had no effect on the endothelium-dependent increased reactivity to PHE in L-NAME and DOCA-L-NAME nor on the PHE reactivity in the absence of endothelium.

Responses to ACh and SNP in PHE-precontracted mesenteric arterial beds

ACh induced concentration-dependent relaxations in PHE-precontracted mesenteric arterial beds with intact endothelium in all the groups. Mesenteric beds obtained from hypertensive L-NAME, DOCA and DOCA-L-NAME rats were significantly less sensitive to the endothelium-dependent vasodilator ACh as compared with CTL rats (Fig. 7, Table 1). The maximal effect induced by ACh was significantly decreased in L-NAME and DOCA-L-NAME treated rats compared with DOCA and CTL groups. In a similar fashion, the acute application of L-NAME to mesenteric arteries of CTL rats significantly shifted to the right (9.5 ± 0.3 vs. 250.0 ± 3.8 , $\text{nmol}\cdot\text{L}^{-1}$, ID_{50}) and decreased the maximal responses of the ACh relaxation curves ($2 \pm 1\%$ vs. $26 \pm 7\%$ of PHE response) whereas in DOCA rats the acute L-NAME pretreatment did not modify the vascular sensitivity to ACh but reduced significantly

the maximal relaxation ($5 \pm 1\%$ vs. $43 \pm 2\%$ of PHE response). The application of SNP induced similar concentration-dependent relaxations in PHE-precontracted mesenteric arterial beds with intact endothelium in CTL and DOCA groups, and removal of the endothelium did not change relaxation responses to SNP (data not shown). There were no significant effects of chronic treatments with losartan on the ACh-induced vasodilation parameters in preparations taken from CTL rats. However, in L-NAME and DOCA rats, losartan increased significantly the sensitivity to ACh (Fig. 7, Table 2). In L-NAME rats treated with losartan, the maximal response was increased to values similar to those of CTL. The treatment with losartan did not improve the relaxation to ACh in DOCA-L-NAME rats.

Vasodilatory effect of ISO on PHE-precontracted mesenteric arterial beds

Mesenteric beds obtained from hypertensive L-NAME, DOCA and DOCA-L-NAME rats were significantly less sensitive to ISO-induced dilatation as compared with CTL rats in the presence of an intact endothelium (Fig. 7, Table 1). Furthermore, the maximal effect of ISO was also reduced in the three hypertensive models. The treatment with losartan had no significant effect on the vasodilation induced by ISO in preparations from CTL rats. In L-NAME and DOCA rats treated with losartan, the sensitivity and maximal responses to ISO were normalized to values similar to those of CTL rats (Table 2). Losartan had no effect on the vascular reactivity to ISO in DOCA-L-NAME rats.

Discussion

The present study was designed to investigate the role of NO and angiotensin II (Ang II) in the early development of hypertension and cardiac and kidney hypertrophy in the experimental DOCA model. Our previous study as well as those of other researchers have reported that in contrast with DOCA hypertension, a model of hypertension known to develop a marked cardiac hypertrophy (Eid and de Champlain 1988), L-NAME hypertension is not accompanied by the development of cardiac hypertrophy (K.-Laflamme et al. 1998; Arnal et al. 1992; Ribeiro et al. 1992). In this study, LNAME, DOCA or their concomitant administration to Sprague-Dawley rats similarly induced a progressive elevation of blood pressure over the treatment period of 12 days. Despite reaching a similar hypertensive level as DOCA-hypertensive animals, DOCA-L-NAME and L-NAME hypertensive rats did not develop cardiac or kidney hypertrophy on day 12. No cardiac or kidney hypertrophy was observed in L-NAME rats on days 6, 9 and 12, in contrast with the increased cardiac and renal growth observed in DOCA rats 6 days after the beginning of development of

hypertension. The growth-inhibitory effect of L-NAME in DOCA rats could be observed by day 9, resulting in the regression of hypertrophy to tissue weights similar to those in L-NAME and control rats. Moreover, although increased plasma renin activity and immunoreactive endothelin have been associated with the greater increase in blood pressure in DOCA rats treated with L-NAME for 4 weeks, the cardiac weight was reported to be smaller than in DOCA rats (Li et al. 1996). Therefore the absence of a cardiac and renal growth-promoting mechanism in the L-NAME-induced hypertension suggests a role for NO or its oxidised metabolites in the development of hypertrophy. Li et al. (1996) also suggested that L-NAME itself exerted a growth-inhibitory effect independent of nitric oxide synthase inhibition. On the other hand, it is also possible that the intense vasoconstriction associated with L-NAME hypertension could induce multiple ischemic zones and infarcts contributing to the regression of heart and kidney weights. In fact, ischemic zones could be observed in DOCA-L-NAME ventricles. Since cardiac hypertrophy was present in DOCA-L-NAME at day 6, and regressed in the following days, it is possible that the induction of infarcts at later times in DOCA-L-NAME might be responsible for the decrease in cardiac hypertrophy, rather than the absence of a growth-promoting mechanism. Similarly, infarcts in the central nervous system have also been reported after long-term inhibition of NO synthase activity possibly due to the cerebroarterial vasoconstriction as well as to direct (removal of NO inhibition of vascular smooth muscle cells proliferation) and pressure-dependent mechanisms contributing to arteriolar thickening and fibrinoid necrosis (Blot et al. 1994).

Although the DOCA hypertension model is characterized by low circulating renin levels due to suppression of the renin-angiotensin system, the simultaneous administration of losartan attenuated the elevation of blood pressure and the development of cardiac hypertrophy and also attenuated kidney hypertrophy. These observations indicate a role for the local renin-angiotensin system in blood pressure elevation and tissue remodelling in this model. Indeed, evidence has accumulated from studies in hypertensive patients, as well as in animals, indicating that blood pressure could be lowered by converting enzyme inhibitors independently of whether or not the plasma renin-angiotensin system was stimulated and thus, the hypotensive effects may be due, in part, to the inhibition of local tissue angiotensin production and (or) its effects (Keuneke 1990). The hypotensive effect of the treatment with an AT₁ receptor antagonist in the present study suggests a role of Ang II from either the endocrine or the paracrine-autocrine systems, or both, in the early development of hypertension in DOCA and L-NAME rats and in the development of cardiovascular tissue

hypertrophy in DOCA rats. We have previously reported that chronic NO synthase blockade-induced hypertension was associated with increased renin-angiotensin system activity, since losartan and enalaprilat reduced blood pressure after 4-6 weeks of L-NAME-induced hypertension (K.-Laflamme et al. 1998). In the present study, losartan prevented blood pressure elevation to the same extent in LNAME, DOCA-L-NAME and DOCA rats, whereas it reduced organ weight only in DOCA rats. Therefore, blood pressure elevation and cardiac remodelling seem to be related in the early stage of DOCA hypertension, and our observations suggest an implication of Ang II as a promoting factor. Arterial blood pressure is considered to be an important determinant of cardiac hypertrophy in most rat models of hypertension to adapt to cardiac overload. However, the hypertension induced by L-NAME is not accompanied by hypertrophy possibly resulting from a rightward shift of the curve relating cardiac index to blood pressure compared with other models of hypertension, as previously suggested by Arnal et al. (1992). Therefore, the renin-angiotensin system and the production of NO could influence the relation between the rise in blood pressure and the degree of cardiac hypertrophy. Moreover, the previous report of a reactive rise in plasma renin activity occurring in DOCA rats treated with enalapril suggests that the feedback loop of the renin-angiotensin system is still operative despite the low plasma renin activity after 10 weeks of DOCA-induced hypertension (Karam et al. 1996). However, in that previous study, the observation that enalapril had no effect on arterial pressure in long-term DOCA hypertensive model confirmed the suppression of the renin-angiotensin system at this stage of the pathology (10 weeks of treatment). Another study also reported that cilazapril given for a period of 4 weeks from the beginning of the DOCA treatment did not affect blood pressure and cardiovascular structures (Li et al. 1996). The present study, in which the rats were studied after 9 days of treatments, suggests that Ang II formed by angiotensin-converting enzyme as well as by alternative pathways could play a role through AT₁ receptors in the early hemodynamic development of this hypertensive model. It is possible that after a longer period of mineralocorticoid treatment, other humoral factors and mechanisms would predominate, such as was postulated for endothelin after the observation that its plasma concentrations and aortic mRNA content are increased in DOCA rats after 4 and 10 weeks of treatments (Li et al. 1996; Karam et al. 1996). Interestingly, the possibility of a link with the renin-angiotensin system has been proposed since Ang II stimulates endothelin mRNA expression in vascular endothelial cells (Dohi et al. 1992).

Although the development of DOCA hypertension results from increased sodium and water

reabsorption and from the development of a positive sodium balance, the maintenance of an elevated blood pressure is usually due to increased peripheral resistance and altered vascular functions (Hamlyn and Blaustein 1986). In the presence of a functional endothelium, the contraction of vascular smooth muscle cells induced by PHE is partly counteracted by endothelium-derived relaxing factors. In the present study, the effects of short-term DOCA hypertension and of chronic NO inhibition and AT₁ receptor blockade on contractile and relaxation functions as well as the role of the endothelium in the vascular reactivity were assessed. The maximal responses of the mesenteric arterial beds to PHE were found to be enhanced in all models of hypertensive rats compared with normotensive rats. In arteries from DOCA rats, the increased maximal response to PHE was not altered after removal of the endothelium suggesting an endothelial-independent mechanism and (or) an impaired tonic endothelial modulation of the vascular contractility. Moreover, the smooth muscle responsiveness to NO was not impaired in DOCA-hypertensive rats, since the vasorelaxant responses to SNP were similar in normotensive and DOCA rats. The concomitant chronic NO synthesis inhibition in DOCA-L-NAME resulted in a greater potentiation of PHE reactivity compared with the PHE hyperreactivity in DOCA rats arteries, suggesting that NO might still exert a tonic influence in vessels of DOCA rats. However, the enhanced reactivity after chronic NO synthesis inhibition was abolished after removal of the endothelium, thus suggesting that the hyperreactivity induced by L-NAME could result from the release of an endothelium-dependent contracting factor which enhances vascular reactivity to PHE in DOCA-L-NAME and L-NAME rats. Indeed, the acute L-NAME treatment of mesenteric arteries was also found to increase the sensitivity to norepinephrine-induced contraction (Bennett et al. 1992). The release of such a contracting factor might be unmasked by the inhibition of the NO vasodilator tone. This factor does not appear to be endothelin, since it was not blocked by the endothelin-A receptor antagonist. Thus, the major difference between NO synthase inhibitor and mineralocorticoid treatments on the vascular reactivity resides in their site and mode of action, the former seems to alter the balance between endothelial factors and the latter might also affect the vascular smooth muscle cells reactivity. In the DOCA group, the hyperreactivity could be due to an enhanced sensitivity of the phosphoinositide pathway of vascular smooth muscle cells. Indeed it has been previously demonstrated in our laboratory that the DOCA model of hypertension was associated with an enhanced sympathetic activity and reactivity as well as with an increased basal and α_1 -adrenergic induced phosphatidylinositol turnover in cardiac and vascular tissues (Eid and de Champlain 1988; Calderone et al. 1994).

Impaired endothelial-dependent vasorelaxations to ACh in experimental hypertension have been previously reported (Bennett et al. 1996; Wu et al. 1996). ACh vasodilation and NO release have been reported to be decreased in kidneys from DOCA hypertensive rats, and this was largely reversed by L-arginine administration (Hayakawa et al. 1994). In the present study, the sensitivity of ACh endothelium-dependent relaxation in PHE-precontracted mesenteric arteries was reduced in the three hypertensive groups when compared with the normotensive group. Moreover, in both groups chronically treated with LNAME, the maximal relaxation response to ACh were attenuated to similar values, further suggesting that endothelial relaxing factors other than NO, participating in ACh vasorelaxation, are probably involved to the same extent whether the rats were treated or not with DOCA. Accordingly, the effect of acute application of L-NAME on ACh relaxation of mesenteric arteries from normotensive and DOCA rats similarly reduced the maximal response, thereby following a trend similar to the effect of chronic NO synthase inhibition and confirming that NO was still produced in DOCA rats but possibly to a lesser extent. It may be postulated that the reduced sensitivity to ACh relaxation in DOCA-hypertensive vessels compared with normotensive rats in the absence of L-NAME is partly due to an impairment of NO release. ACh relaxes arteries through the release of potent vasoactive substances secreted by endothelial cells such as NO, prostacyclin, and endothelium-derived hyperpolarizing factor (EDHF) (Lüscher 1992). Since all the experiments were carried out in the presence of indomethacin, vasoactive products of the cyclo-oxygenase pathway cannot be considered in the present results. The relaxation elicited by ACh was only partially antagonized by inhibitors of NO synthesis, it is therefore possible that the remaining important relaxation to ACh in arteries of L-NAME and DOCA-L-NAME rats could be mediated through EDHF release. The present results demonstrate that non-nitric oxide and non-prostanoid endothelium-dependent relaxations to ACh are similarly activated in the arteries of the groups chronically treated with L-NAME or DOCA-LNAME.

The reactivities of the mesenteric arteries to PHE, ACh, or ISO were similar in normotensive rats untreated or treated with losartan, suggesting the absence of an influence of the renin-angiotensin system in control conditions. Since the effect of *in vivo* subpressor doses of PHE decreasing the diameter and blood flow in rat mesenteric artery was reported to be attenuated by local application of losartan, this suggests that endogenous Ang II potentiates α_1 -adrenoceptor-mediated vasoconstriction (Qiu et al. 1994). In DOCA-hypertensive rats treated with losartan, the endothelium-dependent normalization of vascular hyperreactivity to α_1 -

stimulation could indicate that this beneficial effect is associated with the improvement of endothelium-dependent vasorelaxation. Among the possible mechanisms involved in the improvement of endothelial functions, losartan could inhibit the vascular Ang II induced generation of superoxide anions, which are responsible for NO inactivation, and thus allow the endothelial vasorelaxant functions to better modulate the α_1 -adrenoceptor-mediated vasoconstriction. Indeed, Ang II induced hypertension was found to be associated with increased vascular superoxide production via NADH/NADPH oxidase activation in association with impaired endothelial-dependent vascular relaxation, which were normalized with losartan treatment, demonstrating a role for the AT₁ receptor in these processes (Laursen et al. 1997; Rajagopalan et al. 1996). In the present study, the endothelial-dependent relaxations were improved with losartan in both L-NAME and DOCA models of hypertension, reflecting the beneficial effect of losartan on the endothelial functions and indicating an important role of Ang II in these alterations in hypertension. However, the absence of effect of losartan on the vascular reactivity in DOCA-L-NAME hypertensive rats indicates that the combined mechanisms of actions of L-NAME and DOCA are additive and powerful enough to overcome the beneficial effects of losartan treatment on the restoration of endothelial functions. The effect of losartan on the endothelial-dependent relaxations in L-NAME treated rats does not seem to be powerful enough to attenuate the effect of a potential endothelial contracting factor potentiating PHE reactivity, since the hyperreactivity to PHE was not attenuated by that treatment. From the present study it may be suggested that Ang II potentiates α_1 -adrenoceptor mediated constriction in arteries from DOCA-hypertensive rats, since the hyperreactivity was reversed by losartan treatment. In contrast, in L-NAME hypertension the endothelium-dependent contracting factor that potentiates α_1 -vasoconstriction was not affected by losartan treatment nor by the pretreatment of the arteries with the antagonist of endothelin-A receptors BQ123. The imbalance in endothelial function caused by NO synthase inhibition could favour the release of endothelial vasoconstrictor factors other than Ang II and endothelin, which could contribute in great part to the elevation of blood pressure and enhanced vascular reactivity to PHE in L-NAME treated rats.

The amplitude and sensitivity of β -adrenergic mediated vasorelaxation was also reduced in L-NAME, DOCA and DOCA-L-NAME hypertension. Since the contribution of endothelial-derived NO to β -vasodilatation in human and experimental studies has been suggested (Cardillo et al. 1997; Dawes et al. 1997; Ming et al. 1997), the impairment of the NO-cGMP

pathway might be partly responsible for altered isoproterenol responses in the hypertensive groups. The blunted β -adrenergic responsiveness might also result from alterations of the signalling pathway beyond the receptor sites. Indeed, alterations in the peripheral sympathetic tone and reactivity as well as in the adrenergic responsiveness of cardiac and vascular effector cells were demonstrated in DOCA-hypertensive rats (de Champlain et al. 1988). As observed with the vasorelaxation to ACh, the relaxant effect of vascular β -adrenergic receptors were improved by losartan only in L-NAME- or DOCA-hypertensive rats suggesting an improvement of β -adrenergic functions but not in the combined DOCA-L-NAME model.

We conclude that the development of hypertension and organ hypertrophy appears to be regulated in part by NO release, since the blockade of NO synthesis exerted a growth-inhibitory effect in DOCA hypertension. It is possible that the reduction of target organ blood flow following L-NAME treatment might be responsible for the reduced compensatory growth usually observed in hypertension. Moreover, the local renin-angiotensin system may play a role in cardiac and kidney remodelling in DOCA hypertension. In association to its antihypertensive and antiproliferative effects, the Ang II receptor antagonist seems to have a beneficial effect on vascular endothelial relaxant functions in DOCA rats. The inhibition of NO synthesis by L-NAME in DOCA rats, resulting in an enhanced hyperreactivity to α_1 agonist and in decreased vasorelaxant functions, prevented the beneficial effect of losartan on vascular reactivity. However, the same losartan treatment improved vasorelaxations in chronically L-NAME-treated rats, suggesting that the effect of losartan was not only dependent on NO pathway. Nevertheless, losartan prevented the elevation of blood pressure in all hypertensive models independently of its effects on vascular endothelial functions possibly by reducing Ang II mediated oxidative stress on endothelial cells. Future investigations should characterize the role of an increased oxidative stress after chronic NO synthesis inhibition and DOCA-salt treatments.

Acknowledgements

This work was supported by grants from the Medical Research Council of Canada (MRC) and from the Québec Heart and Stroke Foundation (HSF). A.K.-Laflamme is the holder of an MRC-Pfizer studentship from the Canadian Society of Hypertension and J. de Champlain is the holder of a career investigatorship from the J.C. Edwards Foundation.

References

- Arnal, J.F., Warin, L., Michel, J.B. 1992. Determinants of aortic cyclic guanosine monophosphate in hypertension induced by chronic inhibition of nitric oxide synthase. *J. Clin. Invest.* **90**: 647-652.
- Bennett, M.A., Watt, P.A.C., Thurston, H. 1992. Endothelium-dependent modulation of resistance vessel contraction: studies with N^G-nitro-L-arginine methyl ester and N^G-nitro-L-arginine. *Br. J. Pharmacol.* **107**: 616-621.
- Bennett, M.A., Hillier, C., Thurston, H. 1996. Endothelium-dependent relaxation in resistance arteries from spontaneously hypertensive rats: effect of long-term treatment with perindopril, quinapril, hydralazine or amlodipine. *J. Hypertens.* **14**: 389-397.
- Blot, S., Arnal, J.F., Xu, Y., Gray, F., Michel, J.B. 1994. Spinal cord infarcts during long-term inhibition of nitric oxide synthase in rats. *Stroke* **25**: 1666-1673.
- Calderone, A., Oster, L., Moreau, P., Rouleau, J.L., Stewart, D.J., de Champlain, J. 1994. Altered protein kinase C regulation of phosphoinositide-coupled receptors in deoxycorticosterone acetate-salt hypertensive rats. *Hypertension* **23**: 722-728.
- Cardillo, C., Kilcoyne, C.M., Quyyumi, A.A., Cannon III, R.O., Panza, J.A. 1997. Decreased vasodilator response to isoproterenol during nitric oxide inhibition in humans. *Hypertension* **30**: 918-921.
- Dawes, M., Chowienzyk, P.J., Ritter, J.M. 1997. Effects of inhibition of the L-arginine/nitric oxide pathway on vasodilation caused by β -adrenergic agonists in human forearm. *Circulation* **95**: 2293-2297.
- de Champlain, J., Eid, H., Drolet, G., Bouvier, M., Foucart, S. 1988. Peripheral neurogenic mechanisms in deoxycorticosterone acetate-salt hypertension in the rat. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* **67**: 1140-1145.
- Dohi, Y., Hahn, A.W.A., Boulanger, C., Lüscher, T.F. 1992. Endothelin stimulated by angiotensin II augments contractility of SHR resistance arteries. *Hypertension* **19**: 131-137.
- Dohi, Y., Criscione, L., Pfeiffer, K., Lüscher, T.F. 1994. Angiotensin blockade or calcium antagonist normalise endothelial dysfunction in hypertension: studies in perfused SHR mesenteric resistance arteries. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* **24**: 372-379.
- Eid, H., de Champlain, J. 1988. Increased inositol monophosphate production in cardiovascular tissues of DOCA-salt hypertensive rats. *Hypertension* **12**: 122-128.
- Hamlyn, J.M., Blaustein, M.P. 1986. Sodium chloride, extracellular fluid volume, and blood pressure regulation. *Am. J. Physiol.* **251**(20): F563-F575.
- Hayakawa, H., Hirata, Y., Suzuki, E., Imura, K., Kikuchi, K., Nagano, T., Hirobe, M., Omata, M. 1994. Long-term administration of L-arginine improves nitric oxide release from

- kidney in deoxycorticosterone acetate-salt hypertensive rats. *Hypertension* **23**(pt 1): 752-756.
- K.-Laflamme, A., Foucart, S., Moreau, P., Lambert, C., Cardinal, R., de Champlain, J. 1998. Sympathetic functions in N^G-nitro-L-arginine methyl ester-induced hypertension: modulation by the renin-angiotensin system. *J. Hypertens.* **16**: 63-76.
- Karam, H., Heudes, D., Hess, P., Gonzales, M.F., Löffler, B.M., Clozel, M., Clozel, J.P. 1996. Respective role of humoral factors and blood pressure in cardiac remodelling of DOCA hypertensive rats. *Cardiovasc. Res.* **31**: 287-295.
- Keuneke, C., Yacullo, R., Metzger, R., Hellmann, T., Peters, J., Ganten, D. 1990. The role of tissue renin-angiotensin systems in hypertension and effects of chronic converting-enzyme inhibition. *Eur. Heart J.* **11**(Suppl D): 11-16.
- Laursen, J.B., Rajagopalan, S., Galis, Z., Tarpey, M., Freeman, B.A., Harrison, D.G. 1997. Role of superoxide in angiotensin II-induced but not catecholamine-induced hypertension. *Circulation* **95**: 588-593.
- Li, F., Joshua, I.G. 1993. Decreased arteriolar endothelium-derived relaxing factor production during the development of genetic hypertension. *Clin. Exp. Hypertens.* **15**: 511-526.
- Li, J.S., Sventek, P., Schiffrin, E.L. 1996. Effect of antihypertensive treatment and N^G-nitro-L-arginine methyl ester on cardiovascular structure in deoxycorticosterone acetate-salt hypertensive rats. *J. Hypertens.* **14**: 1331-1339.
- Lockette, W., Otsuka, Y., Carretero, O. 1986. The loss of endothelium-dependent vascular relaxation in hypertension. *Hypertension* **8** (suppl II): II-61-II-66.
- Lüscher, T.F. 1992. Heterogeneity of endothelial dysfunction in hypertension. *Eur. Heart J.* **13**(suppl D), 50-55.
- Ming, Z., Parent, R., Lavallée, M. 1997. β_2 -adrenergic dilation of resistance coronary vessels involves K_{ATP} channels and nitric oxide in conscious dogs. *Circulation* **95**: 1568-1576.19.
- Panza, J.A., Quyyumi, A.A., Brush, J.E., Epstein, S.E. 1990. Abnormal endothelium-dependent vascular relaxation in patients with essential hypertension. *New Engl. J. Med.* **323**: 22-27.
- Qiu, H.Y., Henrion, D., Levy, B.I. 1994. Endogenous angiotensin II enhances phenylephrine-induced tone in hypertensive rats. *Hypertension* **24**: 317-321.
- Rajagopalan, S., Kurz, S., Münzel, T., Tarpey, M., Freeman, B.A., Griendling, K.K., Harrison, D.G. 1996. Angiotensin II-mediated hypertension in the rat increases vascular superoxide production via membrane NADH/NADPH oxidase activation. Contribution to

alterations of vasomotor tone. *J. Clin. Invest.* **97**: 1916-1923.

Ribeiro, M.O., Antunes, E., de Nucci, G., Lovisolo, S.M., Zatz, R. 1992. Chronic inhibition of nitric oxide synthesis: a new model of arterial hypertension. *Hypertension* **20**: 298-303.

Topouzis, S., Schott, C., Stoclet, J.C. 1991. Participation of endothelium-derived relaxing factor and role of cyclic GMP in inhibitory effects of endothelium on contractile responses elicited by α -adrenoceptor agonists in rat aorta. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* **18**: 670-678.

Wu, X., Mäkynen, H., Kähönen, M., Arvola, P., Pörsti, I. 1996. Mesenteric arterial function in vitro in three models of experimental hypertension. *J. Hypertens.* **14**: 365-372.

Table 1. Parameters of contraction and relaxation responses of isolated mesenteric arterial beds.

Parameters	CTL	L-NAME	DOCA	DOCA-L-NAME
<u>PHE contraction</u>				
+E; ED ₅₀ (μmol/L)	4.7 ± 1.5	2.9 ± 0.7	5.8 ± 1.4	3.8 ± 0.3
+E; max response (mm Hg)	54.2 ± 9.7	137.8 ± 7.3 *	117.9 ± 31.1 *	209.8 ± 6.3*§
-E; ED ₅₀ (μmol/L)	1.5 ± 0.5	1.3 ± 0.2	1.1 ± 0.2	2.7 ± 0.8
-E; max response (mm Hg)	84.6 ± 24	65.7 ± 9.4 †	111.7 ± 9.5	51.9 ± 8.0 †
<u>ACh relaxation</u>				
+E; ID ₅₀ (nmol/L)	11.1 ± 3.3	56.4 ± 10.4 *	246.0 ± 77.5 *	77.5 ± 19.0 *
+E; max response (%)	1.0 ± 0.9	12.2 ± 3.0 *	0.4 ± 2.3	15.7 ± 2.5 *
<u>ISO relaxation</u>				
+E; ID ₅₀ (μmol/L)	0.5 ± 0.1	1.9 ± 0.5 *	5.5 ± 3.9 *	4.3 ± 0.6 *
+E; max response (%)	0.0 ± 5.6	14.2 ± 5.2 *	20.2 ± 10.0 *	39.7 ± 7.9 *

PHE, phenylephrine; ACh, acetylcholine; ISO, isoproterenol; +E, with endothelium; -E, without endothelium; ED₅₀, ID₅₀, dose of the agent required to produce half of the maximal response (n = 4 or 5).

*P<0.05 vs. CTL, §P<0.05 vs. DOCA, †P<0.05 vs. +E (with intact endothelium in the respective experimental group).

Table 2. Parameters of contraction and relaxation responses of isolated mesenteric arterial beds in groups treated with losartan.

Parameters	CTL	L-NAME	DOCA	DOCA-L-NAME
<u>PHE contraction</u>				
+E; EC ₅₀ (μmol/L)	4.2 ± 0.5	7.1 ± 3.2	2.4 ± 0.5	2.4 ± 0.1
+E; max response (mm Hg)	61.8 ± 8.9	194.4 ± 20.8 *	35.2 ± 26.0	217.4 ± 6.7 *§
-E; EC ₅₀ (μmol/L)	2.3 ± 0.4	2.1 ± 0.4	1.8 ± 0.5	1.5 ± 0.3
-E; max response (mm Hg)	69.0 ± 9.0	75.2 ± 11.0 †	120.4 ± 15.4 *†	101.8 ± 5.6 †
<u>ACh relaxation</u>				
+E; IC ₅₀ (nmol/L)	13.0 ± 1.6	13.2 ± 4.1	19.0 ± 6.9	30.1 ± 5.9 *
+E; max response (%)	2.2 ± 1.0	1.2 ± 1.5	1.1 ± 0.9	16.5 ± 3.3 *
<u>ISO relaxation</u>				
+E; IC ₅₀ (μmol/L)	0.2 ± 0.3	0.9 ± 0.4	0.5 ± 0.3	7.2 ± 0.8 *
+E; max response (%)	4.5 ± 1.6	5.2 ± 1.5	9.2 ± 3.0	30.8 ± 4.9 *

PHE, phenylephrine; ACh, acetylcholine; ISO, isoproterenol; +E, with endothelium; -E, without endothelium; EC₅₀, IC₅₀, concentration of the agent required to produce half of the maximal response (n = 4 or 5).

*P<0.05 vs. CTL, §P<0.05 vs. DOCA, †P<0.05 vs. +E (with intact endothelium in the respective experimental group).

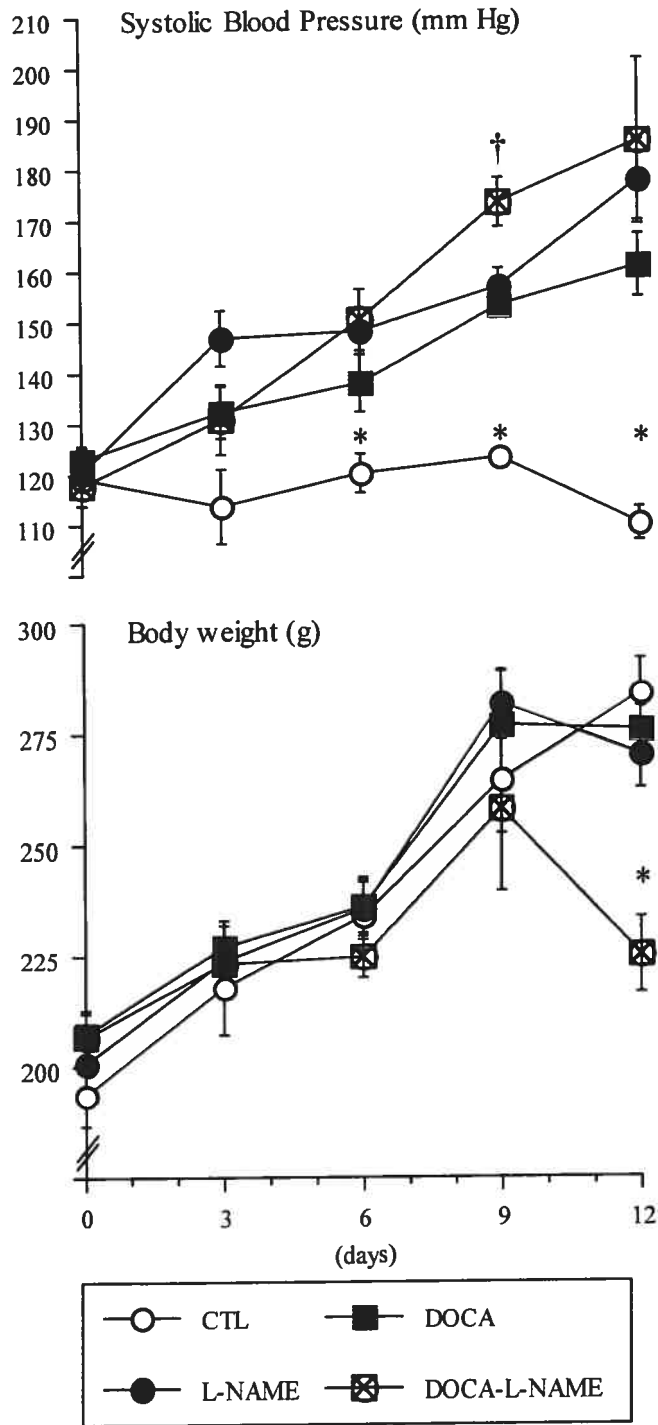


Fig. 1. Systolic blood pressure and body weight over a period of 12 days in control rats and experimental models of hypertension (n = 5-21 (or 21 to 5, from day 0 through 12); * $P < 0.05$ all experimental groups vs. CTL; † $P < 0.05$ vs. CTL, L-NAME and DOCA).

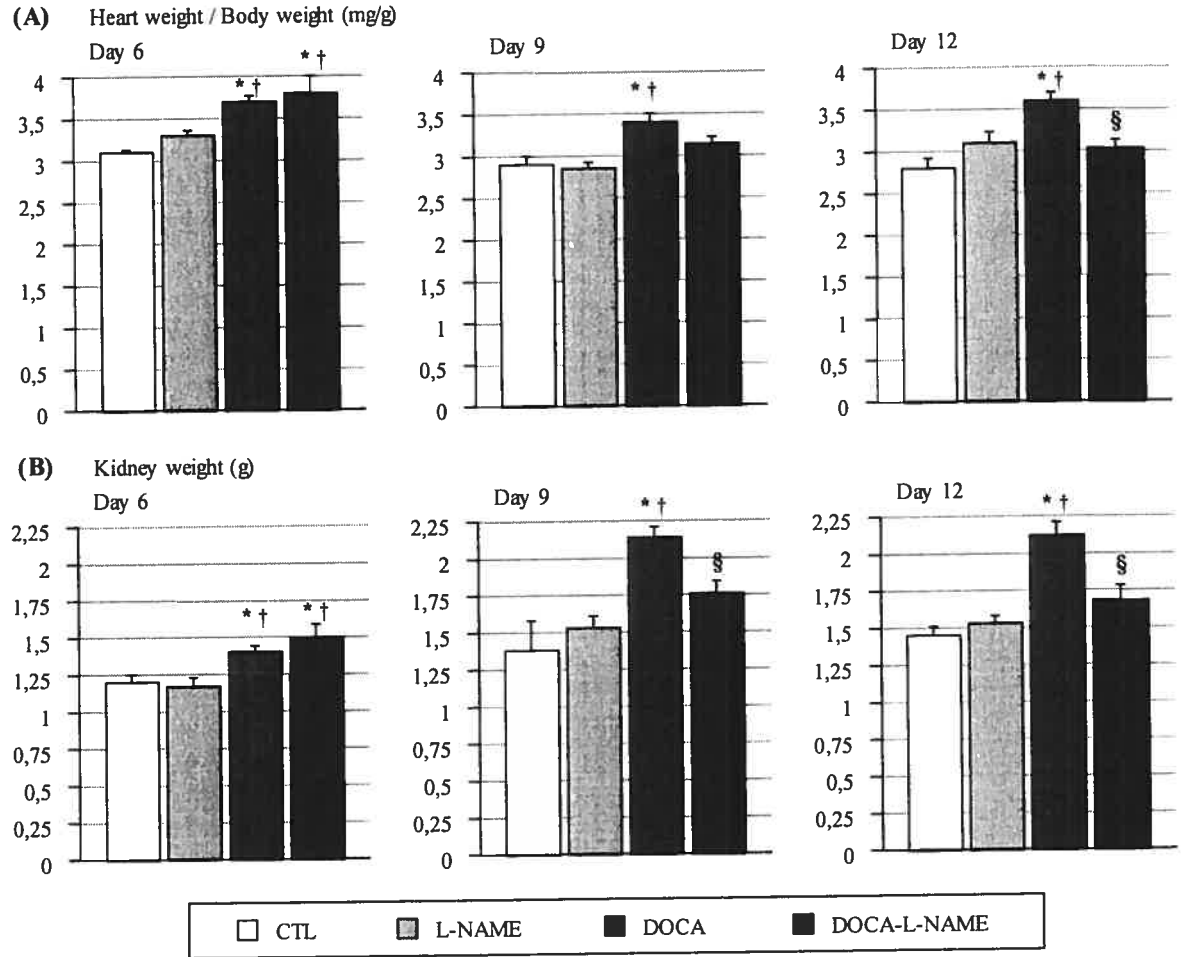


Fig. 2. (A) Heart and (B) kidney weights over a period of 12 days after the onset of the experimental models of hypertension (n = 4 or 5 on day 6, n = 5-8 on day 9, n = 6-10 on day 12; * $P < 0.05$ vs. CTL, † $P < 0.05$ vs. L-NAME, § $P < 0.05$ vs. DOCA).

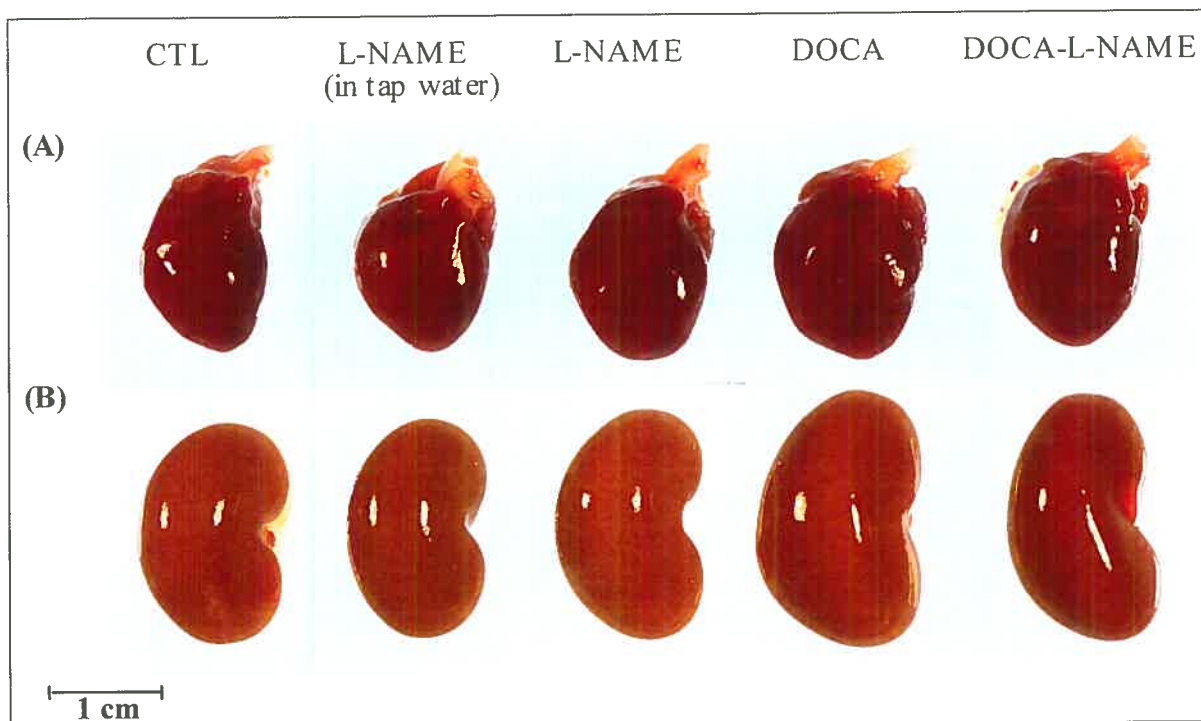


Fig. 3. Photograph of representative (A) heart and (B) kidney taken from each experimental group on day 9. The arrows indicate ischaemic zones.

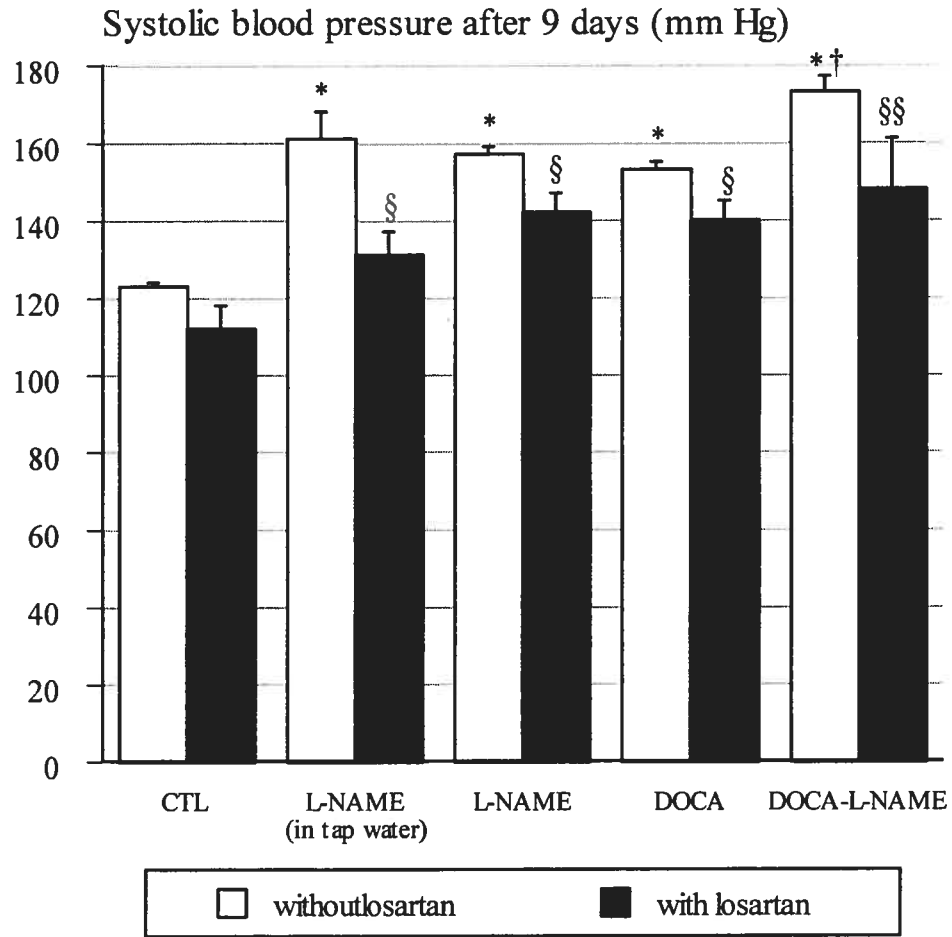


Fig. 4. Systolic blood pressure after 9 days of the various treatments in control rats and experimental models of hypertension (n = 5-8; * $P < 0.05$ vs. respective CTL, † $P < 0.05$ vs. DOCA without losartan, § $P < 0.05$ vs. same experimental group without losartan, §§ $P = 0.06$ vs. same experimental group without losartan).

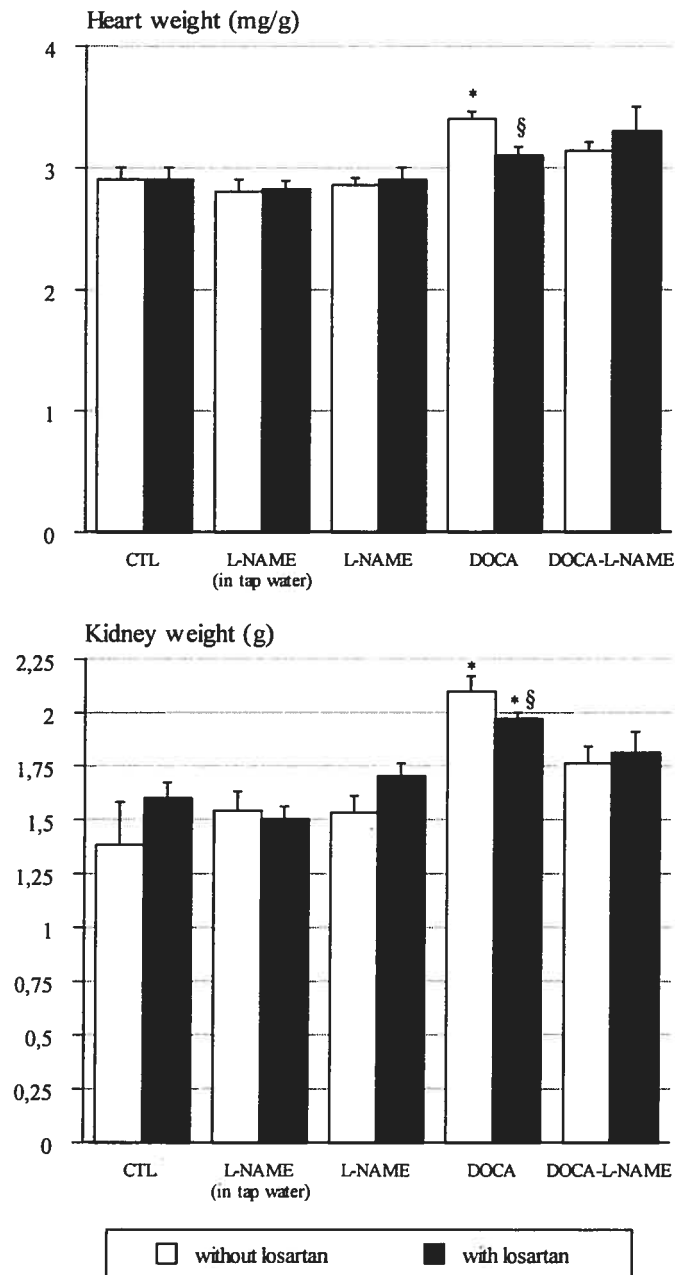
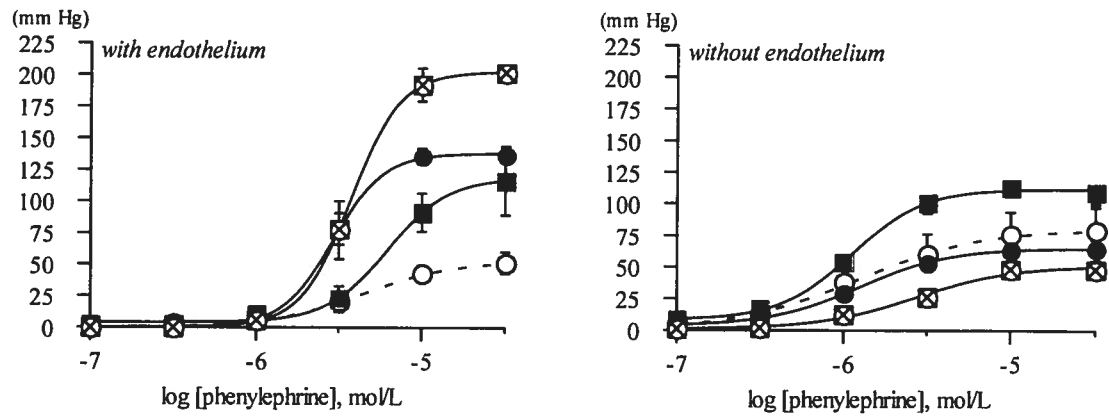


Fig. 5. Heart and kidney weights after 9 days of the various treatments in control rats and experimental models of hypertension (n = 5-8; * $P < 0.05$ vs. respective CTL, § $P < 0.05$ vs. same experimental group without losartan).

Dose response curves after 9 days of treatments



Dose response curves after 9 days of treatments concomitant with losartan

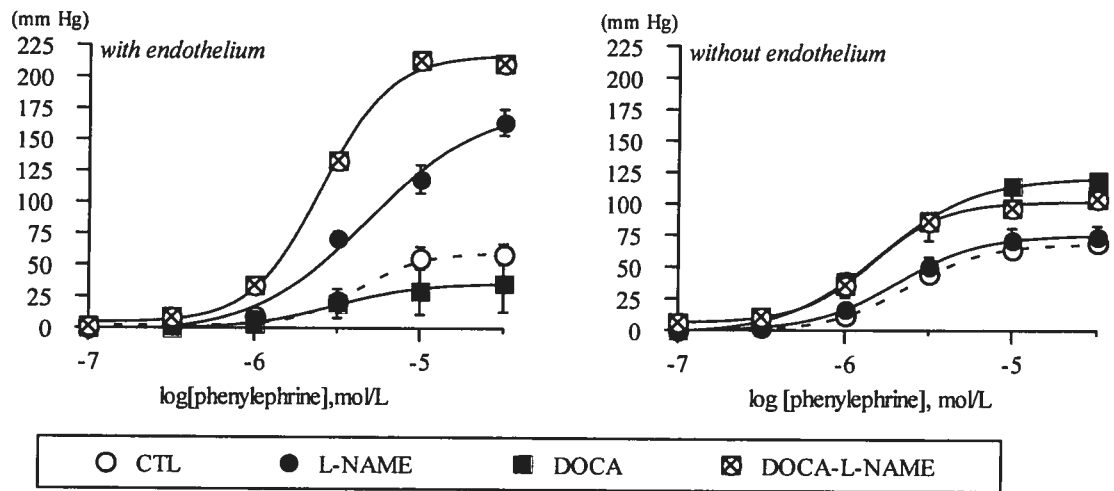
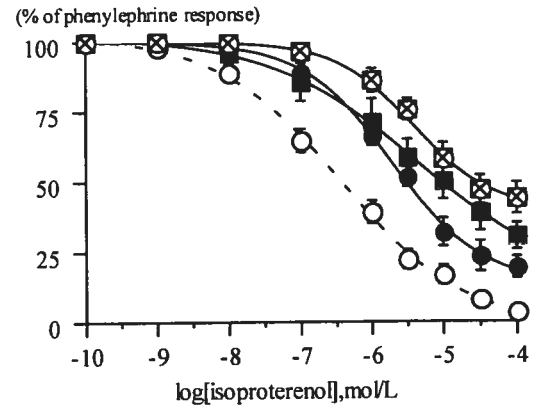
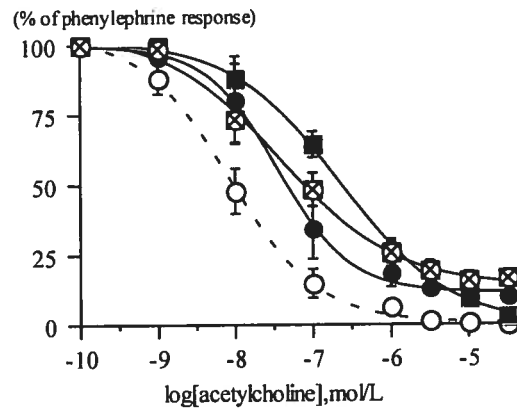


Fig. 6. Contractile reactivity of isolated mesenteric arterial beds to phenylephrine, after 9 days of the various treatments in control rats and experimental models of hypertension (n = 4 or 5).

Dose response curves after 9 days of treatments



Dose response curves after 9 days of treatments concomitant with losartan

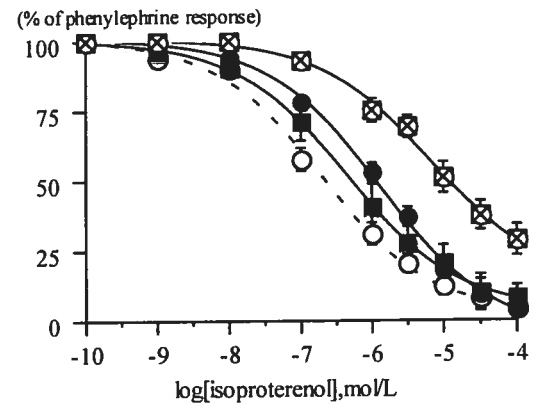
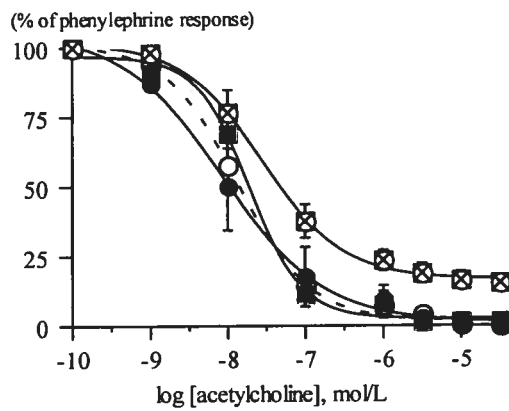


Fig. 7. Acetylcholine and isoproterenol relaxation responses of isolated mesenteric arterial beds precontracted with phenylephrine, after 9 days of the various treatments in control rats and experimental models of hypertension (n = 4 or 5).

CHAPITRE VI – Article Scientifique

**IMPAIRED BASAL SYMPATHETIC TONE AND α_1 -ADRENERGIC
RESPONSIVENESS IN ASSOCIATION WITH THE HYPOTENSIVE
EFFECT OF MELATONIN IN SPONTANEOUSLY HYPERTENSIVE RATS.**

American Journal of Hypertension, 1998; 11: 219-229

**IMPAIRED BASAL SYMPATHETIC TONE AND α_1 -ADRENERGIC
RESPONSIVENESS IN ASSOCIATION WITH THE HYPOTENSIVE EFFECT OF
MELATONIN
IN SPONTANEOUSLY HYPERTENSIVE RATS.**

**Annik K.-Laflamme, M.Sc., Lingyun Wu, MD, M.Sc.,
Sylvain Foucart, Ph.D., Jacques de Champlain, MD, Ph.D.**

Research Group on the Autonomic Nervous System,
Department of Pharmacology and Department of Physiology,
Faculty of Medicine, Université de Montréal, Montréal, Québec, Canada.

Short title: Attenuated Sympathetic Activity by Melatonin.

Am J Hypertens 1998; 11: 219-229

Original submission: February 18, 1997

Final submission: July 21, 1997

Accepted: August 19, 1997

Abstract

Early investigations have suggested a relationship between hypertension and melatonin, a pineal hormone. The aims of this study were to evaluate the implication of the sympathetic nervous system in the acute effect of melatonin on blood pressure in conscious 12-week-old spontaneously hypertensive rats (SHR) and Wistar-Kyoto rats (WKY), and to determine whether the hypotensive effect of melatonin is associated with alterations in pre- and/or postsynaptic mechanisms. Melatonin (10 mg/kg) produced a sustained time-dependent decrease of mean arterial pressure only in SHR without changes in heart rate in both groups. Until 20 min after melatonin administration, plasma epinephrine (EPI) levels were reduced by about 60% in both groups, but norepinephrine (NE) levels were decreased only in SHR by about 30%. The nitroprusside-induced hypotension responses and the associated increases in heart rate were similar in both groups before or after melatonin. Unexpectedly, the sympathetic reactivity to nitroprusside, evaluated by the increases in plasma NE and EPI, was markedly enhanced after melatonin treatment in both WKY and SHR. The stimulation-induced [³H]-norepinephrine release from isolated atria was not altered by melatonin in SHR. In cultured aortic vascular smooth muscle cells, the basal and phenylephrine induced inositol phosphates formations were greater in SHR, and the melatonin pretreatment dose-dependently attenuated the phenylephrine responses in cells from both WKY and SHR. Therefore the hypotensive action of melatonin appears to be associated with an inhibition of basal sympathoadrenal tone and could also be mediated partly by the blockade of postsynaptic α_1 -adrenergic receptor-induced inositol phosphates formation.

Keywords: Melatonin, genetic hypertension, sympathetic activity, inositol phosphate, norepinephrine release.

Introduction

Melatonin is a hormone secreted by the pineal gland. The relationship between pineal function and modulators of arterial blood pressure was suspected several years ago. However, no clear mechanisms in regard to this interaction have ever been suggested. Zanaboni and Zanaboni-Muciaccia (1967) were the first to directly demonstrate that the pineal gland may contribute to the mechanisms regulating arterial blood pressure with the observation that pinealectomy in normotensive rats was associated with an increase in blood pressure.¹ This hypertension was attributed in part to the lack of melatonin secretion by the gland because the administration of oxypertine, an agent with a structure analogous to melatonin, could prevent the development of hypertension in pinealectomized animals.² Melatonin was proposed to mediate a central antihypertensive action through the stimulation of central adrenergic pathways inhibiting the peripheral sympathetic nervous system. This hypothesis was supported by earlier suggestions that melatonin probably activates central adrenergic pathways known to inhibit aldosterone and corticosterone secretion by the adrenal glands.^{3,4} The administration of melatonin prevented the pinealectomy induced hypertension in the rat⁵ and reduced blood pressure in adult spontaneously hypertensive rats (SHR)⁶ and in essential hypertension.⁷ Therefore the involvement of melatonin in blood pressure regulation has been suggested, but the underlying antihypertensive mechanisms have yet to be clarified.

The aim of our study was to investigate whether the sympathetic nervous system was implicated in the antihypertensive effect of melatonin in SHR. First, we wanted to characterize the *in vivo* effects of acute administration of melatonin in correlation with the basal sympathetic tone as measured by arterial blood pressure, heart rate and plasma catecholamines levels. Second, we investigated the influence of melatonin treatments on the *in vivo* reflex reactivity of the sympathetic nervous system to nitroprusside induced hypotension. Finally, the effect of melatonin on norepinephrine (NE) release from isolated atria and the basal and phenylephrine stimulated activity of the phosphoinositide pathway in cultured aortic vascular smooth muscle cells were investigated to determine whether the hypotensive effect of melatonin could also result from specific alterations of local pre- or postsynaptic mechanisms.

Materials and Methods

Animal Model Twelve-week-old male Wistar-Kyoto rats (WKY) and SHR were used (Charles River Laboratories, St-Constant, Québec, Canada). All rats were given free access to standard laboratory rat chow and tap water and maintained under a day-night regimen of 12 h light/12 h dark cycle. *In vivo* experiments were carried out during the first half of the light cycle, and for *in vitro* experiments, the tissues were removed 3 h after the lights were turned on. Experiments were carried out in accordance to institutional animal ethics committee guidelines.

***In vivo* Hemodynamic Measurements** Femoral arterial and venous catheters were implanted for direct and continuous measurements of blood pressure and heart rate as well as blood sampling in conscious unrestrained rats in resting conditions. The rats were anesthetized with sodium pentobarbital (50 mg/kg, intraperitoneally) and a polyethylene tube (PE-10) welded to a PE-50 catheter was inserted into a femoral artery. The PE-10 segment was positioned in the abdominal aorta. A second catheter was inserted into a femoral vein from which the PE-10 segment was positioned in the abdominal vena cava. Both PE-50 were tunneled subcutaneously and extruded at the back of the neck where they were inserted into a protecting catheter secured at the incision site. This protecting catheter was composed of an L-shaped piece of PE-280 tubing to which a stainless steel tether was attached. The catheters were filled with heparinized saline and the rats were placed in individual cages in which they were allowed to recover for at least 24 h. The arterial catheter was coupled to a pressure transducer (Statham P23ID; Gould Statham Inc., Oxnard, CA) and the signal was amplified and recorded by a Biopac data acquisition system (MP100WS, Harvard Apparatus Canada, St-Laurent, Québec, Canada). Mean arterial pressure (MAP) and heart rate were monitored on a computerized analysis program (Acknowledge 3.0, Harvard Apparatus Canada) while rats remained undisturbed in their usual cages. When MAP and heart rate had reached a stable basal level, after at least 20 min of continuous recording, basal values were measured and a sample of 0.4 mL of blood was withdrawn from the arterial catheter for the measurement of basal aortic plasma catecholamines levels. Bolus injections of melatonin (10 or 20 mg/kg) or vehicle (ethanol

5%) were administered through the venous catheter over a period of 1 min (1 mL). Mean arterial pressure and heart rate were continuously recorded and blood samples (0.4 mL) were withdrawn from the arterial catheter for the measurement of norepinephrine (NE) and epinephrine (EPI) plasma levels at 10, 20 and 35 min after melatonin administration (10 mg/kg). The volumes withdrawn throughout the protocols were always replaced with an equal volume of heparinized saline.

Reflex Activation of the Sympathetic Nervous System In the same rats from the above described protocol, which were treated with melatonin 10 mg/kg, on another day but at the same time of the day, the basal MAP and heart rate were recorded and a blood sample of 0.4 mL was withdrawn after a stabilization period. A 5 min intravenous infusion of sodium nitroprusside (50 μ g/kg/min) was administered at a rate of 0.05 mL/min. Hemodynamic parameters and plasma catecholamines levels were measured at the end of the 5 min infusion period. For the evaluation of the influence of melatonin (10 mg/kg) on the sympathetic reflex reactivity to nitroprusside induced hypotension, the 5 min infusion of nitroprusside was started 5 min after melatonin administration and the responses of the hemodynamic parameters were therefore measured 10 min after melatonin administration.

Plasma Catecholamine Concentration Measurements Aortic blood samples were placed in ice-chilled tubes containing a preservative solution composed of 0.25 mol/L ethylene glycol-bis(β -aminoethyl ether)-N,N,N',N'-tetraacetic acid and 0.2 mol/L reduced glutathione at a pH7 immediately after they were withdrawn. The samples were rapidly centrifuged at 14,000g for 5 min at 4°C. The plasma were frozen at -80°C until the assay. Plasma catecholamines concentrations were measured by radioenzymatic assay.⁸

[³H]-NE Release from Isolated Atria Animals different from those assigned to the *in vivo* studies were used. The isolated atria were prepared as previously described.⁹ Briefly, each pair of atria, incubated with [³H]-NE, was transferred to 0.5 mL individual perfusion chambers of a suprafusion system (SF-6, Brandel Inc., Gaithersburg, MD). First, the atria were field stimulated (S₁; 3 Hz, 60 sec, 50 mA, 1 msec pulses) for the estimation of the stimulation induced outflow of radioactivity levels. The effect of melatonin on stimulation

induced outflow of radioactivity was assessed following its addition before a second field stimulation period (S_2). At the end of the experiment the atria were dissolved to estimate total tissue radioactivity and the radioactivity present in the bathing solution was also determined. The resting radioactive outflow level was measured during the 5 min period preceding the stimulation and was subtracted from the total stimulation induced outflow (S_1 or S_2) to provide the stimulation induced component. The stimulation induced outflow of radioactivity measured after melatonin treatment (S_2) was expressed as the percentage of S_1 . The values were standardized for the total tissue radioactivity measured at the end of the experiments and expressed as the fractional release of radioactivity using the fractional release during S_2 (FR_2): fractional release during S_1 (FR_1) ratio.

Aortic Smooth Muscle Cell Preparation The cultured aortic vascular smooth muscle cells (VSMC) were prepared as previously published.¹⁰ Cells were identified as smooth muscle cells by their ability to contract in the presence of KCl (30 mmol/L) as observed under phase contrast optics as well as by the fact that their α -actin was positively stained with mouse anti- α -actin antibody and anti-mouse IgG fluorescent isothiocyanate conjugate. Cells between passage 6 to 14 were seeded into 132 mm 6-well multidishes and used after 4 to 6 days when they became confluent. There was no significant difference in the phenylephrine-induced inositol formation in cultured smooth muscle cells between passage 6 to 14 from either SHR or WKY rats.

Inositol Phosphate Formation Measurements Vascular smooth muscle cells were incubated for 24 h in serum free and inositol free Dubelco's modified Eagle's medium (Gibco, Grand Island, NY) with addition of 5 μ Ci/mL of [3 H]-myoinositol. The culture medium containing unincorporated isotope was removed and the cells were rinsed three times with Earle's balanced salt solution (Gibco; in mmol/L: NaCl 117, KCl 5.3, MgSO₄ 0.8, CaCl₂ 1.8, NaHPO₄ 1, D-glucose 5.6, NaHCO₃ 25). The cells were further incubated for 30 min in the same buffer containing 20 mmol/L LiCl. In stimulation experiments, phenylephrine (50 μ mol/L, dissolved in L-ascorbic acid 1%) was added during 20 min in the cells pretreated or not with melatonin (30 or 300 μ mol/L) for 20 min. The cells were then homogenized in cold chloroform/methanol (1 :2). The tritiated inositol phosphate pool

of the aqueous phase containing IP, IP₂ and IP₃ was separated by ion exchange chromatography (AG1-X8 resin, Bio-Rad Laboratories, Mississauga, Ontario, Canada). The organic phase was counted for the measurement of the labeled phosphatidylinositol lipid pool (PLP). Individual values of IP, IP₂ and IP₃ were pooled to provide the total accumulation of inositol phosphates (IP), which was expressed as a ratio of IP over the PLP to correct for the variation in the labeling of the lipid pool.

Solution and Chemicals All chemicals were supplied by Sigma Chemical Co. (St-Louis, MO), except for sodium nitroprusside (Hoffman-La Roche Ltd, Mississauga, Ontario, Canada) and L-ascorbic acid (Fisher, Nepean, Ontario, Canada). Radioisotopes, [³H]-myoinositol and 1-[ring-2,5,6-³H]-NE were supplied by DuPont NEN (Mississauga, Ontario, Canada).

Statistical Analysis Data are given as mean ± SEM. Statistical comparison of the data was done by analysis of variance followed by Scheffé's F test or by Student's unpaired t test when appropriate. A value of $P < 0.05$ was considered statistically significant.

Results

Baseline Hemodynamic Parameters As shown in Table 1, MAP was significantly increased in 12-week-old SHR compared with age matched WKY, whereas the heart rates were similar in the two strains. Plasma NE and EPI levels were not significantly different among the two strains although the catecholamines levels tended to be higher in SHR (Table 1).

Effect of Melatonin on Blood Pressure and Heart Rate The administration of the vehicle (ethanol 5%) had no significant effect on basal MAP and heart rate in WKY or SHR. The administration of melatonin at the dose of 10 mg/kg reduced MAP in SHR in a time dependent manner (Figure 1A). The analysis of blood pressure recorded over a period of 30 min revealed that the maximal effect was reached at 10 min postadministration, as reflected by the significant reduction of MAP by 18.7 ± 1.8 mm Hg compared with the initial level (Figure 1A, Table 2). In the following 20 min, the MAP remained reduced at

about the same level (Figure 1A). In WKY the 10 mg/kg dose of melatonin had no significant effect on blood pressure compared with the vehicle MAP response (Figure 1A, Table 2). The administration of the dose of 20 mg/kg reduced MAP in a time dependent manner in SHR as well as in WKY (Figure 1B). The maximal effect seemed to occur around 4 min after melatonin administration in both strains, and the reduction in MAP was significant in both strains when compared to their respective vehicle responses. The hypotensive effect of 20 mg/kg of melatonin in SHR tended to be greater than in WKY, with a maximal fall of 21.7 ± 3.9 compared with a fall of 15.0 ± 1.7 mm Hg in WKY (Figure 1B, Table 2). The heart rates measured over a period of 30 min after the administration of the vehicle or either doses of melatonin were not altered significantly in either strains (Figure 1, Table 2).

Effect of Melatonin on Basal Circulating Catecholamine Levels Blood samples were withdrawn at 10, 20, and 35 min after the administration of melatonin at the dose of 10 mg/kg for the measurement of catecholamines levels. Plasma NE concentrations were significantly decreased by 30% 20 min after melatonin injection in SHR but 15 min later the NE levels had returned to baseline levels (Figure 2). In WKY the dose of 10 mg/kg had no significant effect on NE concentrations over a period of 35 min. Plasma EPI levels were reduced similarly in both strains by 60 to 68% at 10 and 20 min after the administration of melatonin and were restored to initial levels 35 min after melatonin administration (Figure 2).

Effect of Melatonin on Hypotension Induced Reflex Activation of the Sympathetic System To study the effect of acute melatonin administration on *in vivo* reflex sympathetic functions, the sympathetic reactivity to sodium nitroprusside induced hypotension was evaluated in rats pretreated with melatonin (10 mg/kg). Baseline MAP and heart rate measurements as well as basal aortic plasma NE and EPI levels are given in Table 1. The hypotension induced by the 5 min infusion of sodium nitroprusside was slightly greater in SHR compared with WKY (-65.8 ± 4.0 v -53.7 ± 3.1 Δ mm Hg, $P < 0.05$) (Figure 3A). In SHR pretreated with melatonin the hypotension was significantly smaller (-56.0 ± 2.0 Δ mm Hg) compared with untreated SHR and similar to WKY. The pretreatment with

melatonin did not alter MAP responses in WKY (Figure 3A). The response to nitroprusside induced hypotension was characterized by increases in heart rate as well as plasma NE and EPI levels (Figures 3B,C,D). The heart rate response to nitroprusside was significantly smaller in SHR and the pretreatment with melatonin had no effect on heart rate responses in WKY and SHR (Figure 3B). The increase in plasma NE was higher in untreated SHR versus WKY (303 ± 36 v 215 ± 13 Δ pg/mL, $P < 0.05$) and the increase in plasma EPI tended to be greater in untreated SHR versus WKY (168 ± 52 v 105 ± 32 Δ pg/mL). After melatonin pretreatment, the nitroprusside induced hypotension was associated to greater increases in plasma NE in both WKY and SHR (387 ± 50 and 488 ± 25 Δ pg/mL, $P < 0.05$ respectively). The associated increases in plasma EPI were also significantly enhanced in both strains after melatonin pretreatment (WKY: 348 ± 47 Δ pg/mL, SHR: 367 ± 56 Δ pg/mL, $P < 0.05$). These results demonstrate a potentiation of the sympathoadrenal reflex reactivity to nitroprusside infusion in both WKY and SHR but without a concomitant increase in heart rate (Figure 3C, D).

Effect of Melatonin on [³H]-NE Release from Isolated Atria The resting release (R_1) of radioactivity, the fractional release during the first period of stimulation (FR_1) and the total tissue radioactivity (TTR) from the isolated atria are described in Table 3. The R_1 and FR_1 values were obtained before melatonin was added to the isolated atria. The R_1 values were significantly higher in the WKY group compared with SHR. In contrast, the FR_1 values were lower in WKY compared with SHR. Although TTR values represent the overall experimental protocol including the treatments with melatonin, TTR values could represent an index of the proper loading of atrial sympathetic fibers with [³H]-NE. Total tissue radioactivity values were higher in SHR compared with WKY. The stimulation induced outflow of radioactivity in WKY and SHR and the effects of melatonin (0.1, 1 and 10 μ mol/L) are shown in Figure 4. The pretreatment with melatonin at 0.1 and 1 μ mol/L had no effect on the stimulation induced outflow of [³H]-NE in WKY or in SHR. When a higher concentration of melatonin (10 μ mol/L) was used, only the WKY showed a significant increase in the outflow of radioactivity, whereas it was unchanged in atria from SHR. The resting release, as measured by the ratio R_2/R_1 was unchanged at all the concentrations tested.

Effect of Melatonin on Basal and α_1 -Mediated Phosphoinositide Pathway Activity

The formation of inositol phosphates in basal conditions and after phenylephrine stimulation was measured in vascular smooth muscle cells (VSMC) from WKY and SHR as depicted in Figure 5. The basal production of IP was slightly but significantly greater in SHR compared with WKY. The pretreatment with melatonin had no effects on the basal formation of IP in either strain. The phenylephrine-induced IP formation was significantly greater in VSMC of SHR. The pretreatments with melatonin at 30 and 300 $\mu\text{mol/L}$ reduced the α_1 -adrenergic-induced IP formation in a dose dependent fashion in both strains but the inhibition was significant only at the highest dose.

Discussion

Acute intravenous melatonin administration at the dose of 10 and 20 mg/kg resulted in a sustained time dependent hypotensive effect in conscious SHR in which the dose of 20 mg/kg exerted a more potent hypotensive effect. In SHR, the administration of the highest dose of melatonin induced an earlier hypotensive response that was greater than the response observed at 4 min with the lowest dose of melatonin. Only the highest dose of 20 mg/kg had a hypotensive effect in WKY. Therefore these observations suggest that the SHR were more sensitive to the hypotensive effect of melatonin than were WKY rats. The administration of ethanol 5% had no effect on cardiovascular parameters and this confirmed the observations of a previous study using 10% alcohol as the vehicle for melatonin.¹¹ The hypotensive effect of melatonin was not accompanied by any alterations of the heart rate, indicating a possible inhibitory central mechanism of action since direct vasodilators usually induce a reflex activation of the sympathetic nervous system. It has been shown that nocturnal secretion of melatonin is decreased in 15-week-old SHR compared with age matched WKY¹² and that a 5-day treatment with melatonin reduced blood pressure in adult SHR.⁶ Thus the decrease in nocturnal serum melatonin concentrations in adult SHR has been suggested to be causally related to the development of hypertension. Our results therefore confirm these earlier observations but also indicate that the acute treatment with melatonin induced a greater hypotensive response over a period of 30 min in SHR and that the decreased nocturnal serum melatonin might be responsible for the increased sensitivity

to exogenous melatonin in adult SHR compared with WKY. Likewise, low serum melatonin concentrations were also observed in patients with essential hypertension, and melatonin administration for 1 week was shown to reduce blood pressure in hypertensive patients.⁷ Interestingly, melatonin treatment in SHR tended to decrease plasma renin concentration,⁶ whereas an increased sympathetic activity was suggested to be responsible for the increase in plasma renin activity and aldosterone secretion in pinealectomized rats.^{13,14} Consistent with this hypothesis, we have also demonstrated an increased sympathetic tone and reactivity as well as an implication of the renin-angiotensin system in the maintenance of hypertension in SHR.¹⁵ The hypotensive effect of melatonin has also been suggested to be related to a decreased brain serotonin release and to a reduced sympathetic efferent activity, as spinal transection abolished its hypotensive effect.¹¹ The hypothesis of the present study was to evaluate the role of the sympathetic nervous system reactivity in the acute hypotensive effect of melatonin on blood pressure and to determine whether alterations of pre- and/or postsynaptic mechanisms are implicated.

The dose of 10 mg/kg was chosen for the evaluation of the effect of melatonin on sympathetic functions because it induced different pressor responses in WKY and SHR. Although a similar EPI reduction occurred in WKY, the reduction in EPI levels could explain the hypotensive effect observed only in the SHR, considering the greater sensitivity of SHR to adrenergic stimuli. In fact, a greater sensitivity of the β_2 -adrenergic presynaptic facilitatory mechanism, which is mainly activated by EPI, has been postulated in the maintenance of high blood pressure in SHR.¹⁶ Therefore, the reduced EPI stimulation of presynaptic β_2 -receptors following melatonin administration would result in a reduced presynaptic β_2 -induced NE release by sympathetic nerves, thus contributing to the reduction of blood pressure. The decrease of plasma NE levels observed only in the SHR 20 min after the administration of melatonin could also contribute to its hypotensive effect. This latter possibility is supported by the fact that a greater vascular responsiveness to α_1 -adrenergic stimulation as well as an enhanced formation of inositol phosphates in VSMC under basal conditions or after α_1 -adrenergic stimulation have previously been reported in the SHR.^{17,10} The greater attenuating effect of melatonin on plasma EPI levels than on NE levels suggests a preferential inhibitory effect on the sympathetic efferent fibers innervating the adrenals.

The lack of reflex sympathetic activation of heart rate in the presence of a fall in

blood pressure with melatonin indicated that either the baroreflex setpoint was changed or that the sympathetic reactivity was blunted. Because melatonin decreased the plasma catecholamine concentrations concomitantly to the hypotensive effect, we hypothesized that this could represent one of its mechanism of action. Therefore, to further explore the ability of melatonin to inhibit the release of catecholamines, the reflex responses to nitroprusside induced hypotension, measured by the variations in hemodynamic parameters as well as in NE and EPI levels, were assessed after the administration of melatonin to the rats. The hypotension induced by nitroprusside was associated with a potentiated increase in NE levels, whereas the increase in EPI tended to be greater in SHR compared with WKY. The enhanced catecholamine increases suggested a sympathetic or sympathoadrenal hyperreactivity in this model of hypertension. Unexpectedly, when both WKY and SHR were pretreated with melatonin, the nitroprusside induced hypotension was associated with a 0.7- and a 1.7-fold increase in NE and EPI levels, respectively. Our results demonstrate that melatonin pretreatments potentiated the sympathoadrenal reflex reactivity to nitroprusside in both WKY and SHR. These findings suggest that the inhibition of the basal sympathetic tone by melatonin must occur through a mechanism independent of the baroreflex.

Because melatonin concentrations are maximal during the dark phase and are minimal during the day, one might be concerned whether the effect of melatonin on sympathetic basal tone and reactivity could vary depending on the period of day during which the experiments are carried out. Diurnal variations in the effect of melatonin on various physiological functions have been reported such as for the inhibition of neurohypophysial hormones¹⁸ or dopamine release from rat hypothalamus.¹⁹ The diurnal variations in these responses to melatonin have been suggested to result from a diurnal increase in the number of melatonin receptors related to circadian rhythm of melatonin concentration in the circulation as well as the desensitization of these receptors on exposure to high concentrations of melatonin during the dark period.²⁰ On the other hand, Laitinen et al have reported that experimental manipulations of plasma melatonin levels do not influence the status of the melatonin receptors.²¹ Because our studies were carried out at the same time of the day, circadian variations could not account for the differences observed between SHR and WKY.

In adult SHR, melatonin receptors density in the area postrema was found to be greater than in age-matched WKY.²² This brain area is sensitive to circulating melatonin which could modulate its blood pressure control function. Therefore, the alterations in melatonin receptors number in the area postrema could be responsible for the greater sensitivity of SHR to the action of exogenous melatonin observed in the present study. On the other hand, melatonin receptors have not yet been identified in peripheral beds other than caudal and cerebral arteries and therefore a selective direct vasodilatory action of melatonin cannot be suggested. A direct vascular effect of melatonin, characterized by a potentiation of sympathetic stimulation, seems to be restricted to the caudal artery and would reflect its thermoregulatory role in this particular vascular bed²³ whereas no direct modulatory effects of melatonin were demonstrated in femoral and mesenteric arteries.²⁴

In an attempt to uncover a presynaptic modulation of the NE release by melatonin, field stimulated release of [³H]-NE from isolated atria in the presence of increasing concentrations of melatonin was assessed. Only the high dose of 10 µmol/L produced a facilitation of [³H]-NE release and this was observed only in atria from WKY. This probably indicate a non-selective effect of melatonin that could occur either via its potent antioxidative properties or its ability to activate mechanisms within cells that do not require receptors because of its high lipid solubility.²⁵ The lower R₁ and the higher TTR values in SHR compared to WKY confirm our previous observation.⁹ In this latter and the present studies, the increased TTR in SHR may be due to an enhanced sympathetic uptake or vesicular storage capacity in the nerve terminals, to an increase in sympathetic innervation or to an increased atrial mass. The increased response to stimulation (FR₁) in SHR would suggest a potentiated release of NE from the atria of SHR.

The main signal transduction pathway of high-affinity melatonin receptors (ML₁) in neuronal and non-neuronal tissues is mediated through the inhibition of cAMP formation involving a pertussis toxin-sensitive inhibitory G protein while the activation of the putative ML₂ sites has been postulated to increase the hydrolysis of phosphoinositides.²⁶ In tissues devoid of membrane-bound receptors, melatonin can access cytosolic sites to mediate its various effects.²⁷ Melatonin has been shown to be one of the most potent antioxidant and to be a very efficient neutralizer of free radicals and these actions take place independently of membrane receptor sites.²⁵ We have recently demonstrated that superoxide anion radical

generation induced an important increase of IPs formation in VSMC from WKY and that this effect was even greater in VSMC from SHR. Interestingly, this effect was markedly and similarly attenuated by pretreatments with either superoxide dismutase or melatonin.²⁸ The reduced phenylephrine-induced formation of IPs observed in VSMC pretreated with melatonin from both WKY and SHR might result from the scavenging antioxidative properties of this hormone and the dose-dependent effect indicate a rather selective pharmacologic action. Therefore melatonin can attenuate the α_1 -adrenergic signaling pathway mediating the vasoconstrictive responses. This effect could attenuate the sympathetic effect on the vascular tissues and thus significantly contribute to the hypotensive effect of melatonin.

Conclusions

The present results suggest that melatonin might participate in the regulation of cardiovascular functions as an endogenous hypotensive factor. Melatonin may act as a central antihypertensive agent by stimulating central inhibitory adrenergic pathways, thereby diminishing the peripheral sympathetic nervous system basal tone. The hypotensive effect could result, at least partly, from an attenuation of the basal sympatho-adrenal tone which appears to be independent of adrenergic presynaptic mechanisms. Finally, the effect of melatonin could also result from the inhibition of α_1 -adrenergic mediated stimulation of vascular phosphoinositide pathway activity.

Acknowledgments

This work was supported by grants from the Medical Research Council of Canada (MRC) and from the Quebec Heart and Stroke Foundation. A.K.-Laflamme was the holder of a MRC-Pfizer studentship from the Canadian Society of Hypertension. S. Foucart was the holder of a scholarship from the FRSQ (Fonds de la Recherche en Santé du Québec). J. de Champlain is the holder of a career investigatorship from the J.C. Edwards Foundation.

References

1. Zanaboni A, Zanaboni-Muciaccia W: Experimental hypertension in pinealectomized rats. *Life Sci* 1967; 6:2327-2331.

2. Karppanen H, Airaksinen MM, Sarkimaki I: Effects in rats of pinealectomy and oxyperline on spontaneous locomotor activity and blood pressure during various light schedule. *Ann Med Exp Biol Fenn* 1973; 51: 93-103.
3. Kinson G, Singer B: Effect of pinealectomy on adrenocortical secretion in normal rats and in rats with experimental renal hypertension *J Endocrinol* 1967; 37: 37-38.
4. Motta M, Schiaffini O, Piva F, et al: Pineal principles and the control of adrenocorticotropin secretion. In: *The pineal gland*. Ed. Wolstenholme and Knight. A Ciba Foundation Symposium, p.279-291. Churchill, Livingstone, Edinburgh, London 1971.
5. Holmes SW, Sugden D: The effect of melatonin on pinealectomy-induced hypertension in the rat. *Br J Pharmacol* 1975; 56: 360P-361P.
6. Kawashima K, Miwa Y, Fujimoto K, et al: Antihypertensive action of melatonin in the spontaneously hypertensive rat. *Clin Exp-theory and practice*, 1987; A9(7): 1121-1131.
7. Birau N, Peterssen U, Meyer C, et al: Hypotensive effect of melatonin in essential hypertension. *IRCS Med Sci* 1981; 9: 906.
8. Peuler JD, Johnson GA: Simultaneous single isotope radioenzymatic assay of plasma norepinephrine, epinephrine and dopamine. *Life Sci* 1977; 21: 625-636.
9. Foucart S, Patrick S, Oster L, et al: Effects of chronic treatment with losartan and enalaprilat on [³H]-norepinephrine release from isolated atria of Wistar-Kyoto and spontaneously rats. *Am J Hypertens* 1996; 9: 61-69.
10. Wu L, de Champlain J: Inhibition by cyclic AMP of basal and induced inositol phosphate production in cultured aortic smooth muscle cells from Wistar-Kyoto and spontaneously hypertensive rats. *J Hypertens* 1996;14: 593-599.
11. Chuang JI, Chen SS, Lin MT: Melatonin decreases brain serotonin release, arterial pressure and heart rate in rats. *Pharmacol* 1993; 47: 91-97.
12. Kawashima K., Nagakura A, Wurzbarger R.J., et al: Melatonin in serum and the pineal of spontaneously hypertensive rat. *Clin Exp-theory and practice* 1984; A6(8): 1517-1528.
13. Karppanen H, Vapaatalo H, Lahovaara S, et al: Studies with pinealectomized rats. *Pharmacol* 1970; 3: 76-84.

14. Karppanen H, Vapaatalo H: Effects of an aldosterone antagonist, spironolactone, on pinealectomized rats. *Pharmacol* 1971; 6: 257-264.
15. K-Laflamme A, Oster L, Cardinal R, et al: Effects of renin-angiotensin blockade on sympathetic reactivity and β -adrenergic pathway in SHR. *Hypertens* 1997; 30 (part 1): 278-287.
16. Borkowski KR: Effect of adrenal demedullation and adrenaline on hypertension development and vascular reactivity in young spontaneously hypertensive rats. *J Autonom Pharmacol* 1991; 11: 1-14.
17. Oster L, Laflamme AK, Foucart S, et al: Losartan improves endothelial functions of mesenteric arteries in three experimental models of hypertension. *Hypertens* 1995 : 25(6): 1360. Abstract
18. Yasin SA, Grossman A, Forsling ML: Diurnal variation in the effect of melatonin on neurohypophysial hormone release from the rat hypothalamus. *Brain Res Bulletin* 1996; 39(1): 1-5.
19. Zisapel N, Egozi Y, Laudon M: Circadian variations in the inhibition of dopamine release from adult and newborn rat hypothalamus by melatonin. *Neuroendocrinology* 1985; 40: 102-108.
20. Gauer F, Masson-Pevet M, Skene D, et al: Daily rhythm of melatonin binding sites in rat par tuberalis and suprachiasmatic nuclei : Evidence for a regulation of melatonin receptors by melatonin itself. *Neuroendocrinology* 1993; 57: 120-126.
21. Laitinen JT, Viswanathan M, Vakkuri O, et al: Differential regulation of rat melatonin receptors: Selective age-associated decline and lack of melatonin-induced changes. *Endocrinology* 1992 ; 130 : 2139-2144.
22. Viswanathan M, Laitinen JT, Saavedra JM: Differential expression of melatonin receptors in spontaneously hypertensive rats. *Neuroendocrinology* 1992; 56: 864-870.
23. Krause DN, Barrios VE, Duckles SP: Melatonin receptors mediate potentiation of contractile responses to adrenergic nerve stimulation in rat caudal artery. *Eur J Pharmacol* 1995; 276: 207-213.
24. Krause DN, Barrios VE, Duckles SP: Melatonin ML-1 receptors potentiate adrenergic mediated contraction in rat caudal but not femoral or mesenteric arteries. *Can J Physiol Pharmacol* 1994; 72(Suppl.1): 156.

25. Reiter RJ, Melchiorri D, Sewerynek E, et al: A review of the evidence supporting melatonin's role as an antioxidant. *J Pineal Res* 1995 ; 18: 1-11.
26. Dubocovich ML : Melatonin receptors : are there multiple subtypes ? *TIPS* 1995 ; 16 :50-56.
27. Menendez-Pelaez A, Reiter RJ: Distribution of melatonin in mammalian tissues : the relative importance of nuclear versus cytosolic localization. *J Pineal Res* 1993; 15: 59-69.
28. Wu L, Wang R, de Champlain J: Enhanced inhibition by melatonin of alpha-adrenoceptor-induced aortic contraction and inositol phosphate production in vascular smooth muscle cells from spontaneously hypertensive rats. *J Hypertens*, 1998; 16(3): 339-47.

Table 1. Basal hemodynamic parameters in WKY and SHR.

	WKY	SHR
MAP (mm Hg)	93.3 ± 1.7	134.3 ± 7.6 *
Heart rate (beats/min)	317.9 ± 7.4	336.6 ± 6.7
Plasma NE (pg/mL)	139.9 ± 9.7	171.4 ± 17.0
Plasma EPI (pg/mL)	56.9 ± 6.9	66.9 ± 10.3
n	14	12

MAP indicates mean arterial pressure; NE, norepinephrine; EPI, epinephrine; n, number of rats in each group.

* $P < 0.05$ vs WKY.

Table 2. Effect of melatonin on mean arterial pressure and heart rate in WKY and SHR.

	Change in MAP (Δ mm Hg)		Change in HR (Δ beats/min)	
	WKY	SHR	WKY	SHR
Vehicle 10 min after administration	-4.5 \pm 1.9 (8)	-5.9 \pm 1.3 (7)	13.9 \pm 8.4 (8)	-4.6 \pm 10.1 (7)
Melatonin (10 mg/kg) 10 min after administration	-7.5 \pm 1.4 (14)	-18.7 \pm 1.8 * \dagger (12)	8.5 \pm 5.3 (14)	-2.8 \pm 9.0 (12)
Vehicle 4 min after administration	-3.4 \pm 1.9 (8)	1.0 \pm 2.5 (7)	13.6 \pm 10.4 (8)	17.9 \pm 22.0 (7)
Melatonin (20 mg/kg) 4 min after administration	-15.0 \pm 1.7 * (4)	-21.7 \pm 3.9 * (4)	8.5 \pm 5.3 (4)	-2.8 \pm 9.0 (4)

Numbers in parentheses indicate number of rats in each group. MAP, mean arterial pressure; HR, heart rate.

* $P < 0.05$ v respective vehicle response.

$\dagger P < 0.05$ v WKY melatonin.

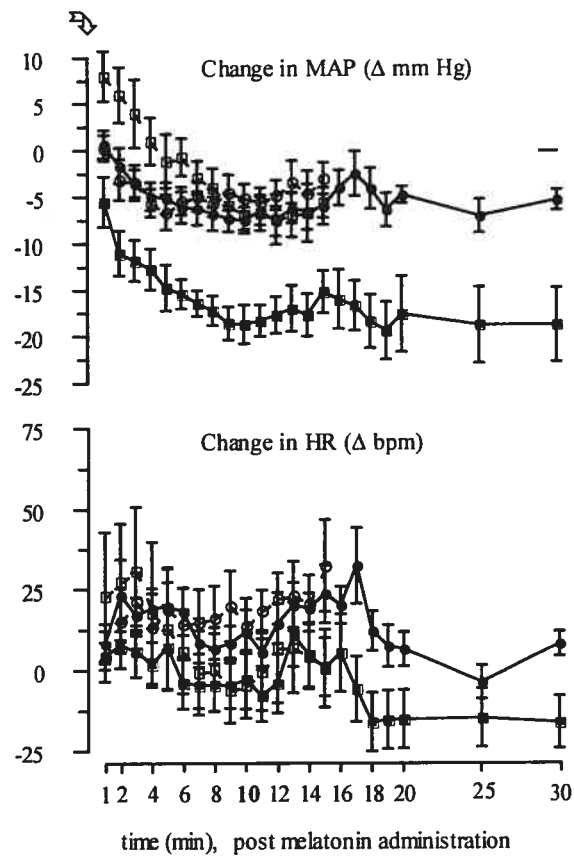
Table 3. Resting release (R_1), fractional release during S_1 (FR_1), and total tissue radioactivity (TTR) values of [3 H]-NE in isolated atria from WKY and SHR.

	R_1 (% TTR)	FR_1 (% TTR)	TTR (disintegrations/min $\times 10^3$)
WKY (n=25)	0.31 ± 0.02	0.23 ± 0.01	649.4 ± 38.7
SHR (n=25)	0.25 ± 0.02 *	0.28 ± 0.02 *	967.0 ± 57.9 *

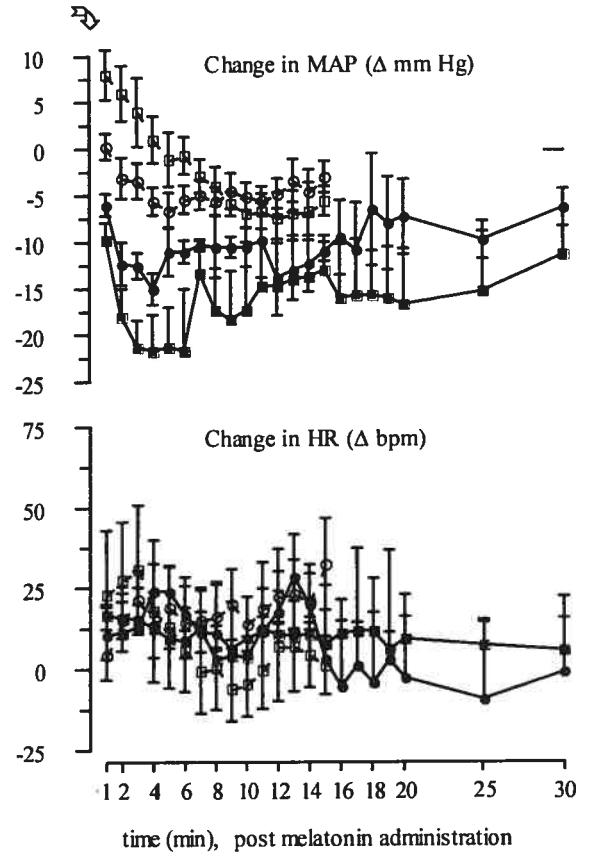
NE indicates norepinephrine.

* $P < 0.05$ v WKY.

A. melatonin, 10 mg/kg, bolus



B. melatonin, 20 mg/kg, bolus



—○— WKY vehicle —●— WKY melatonin —□— SHR vehicle —■— SHR melatonin

Figure 1: Changes in mean arterial blood pressure (MAP) and in heart rate (HR) in WKY and SHR measured over a period of 30 min after vehicle or melatonin administration (10 or 20 mg/kg, intravenously). Both doses of melatonin decreased MAP in SHR ($P < 0.05$ SHR melatonin v SHR vehicle, 1 to 30 min postadministration). Only the dose of 20 mg/kg reduced MAP in WKY ($P < 0.05$ WKY melatonin v WKY vehicle, 2 to 8 min postadministration). Heart rate was not altered significantly in either strains following the administration of either dose of melatonin. $n = 12$ to 14 in each group in 10 mg/kg protocol ; $n = 4$ in each group in 20 mg/kg protocol.

Melatonin, 10 mg/kg, bolus

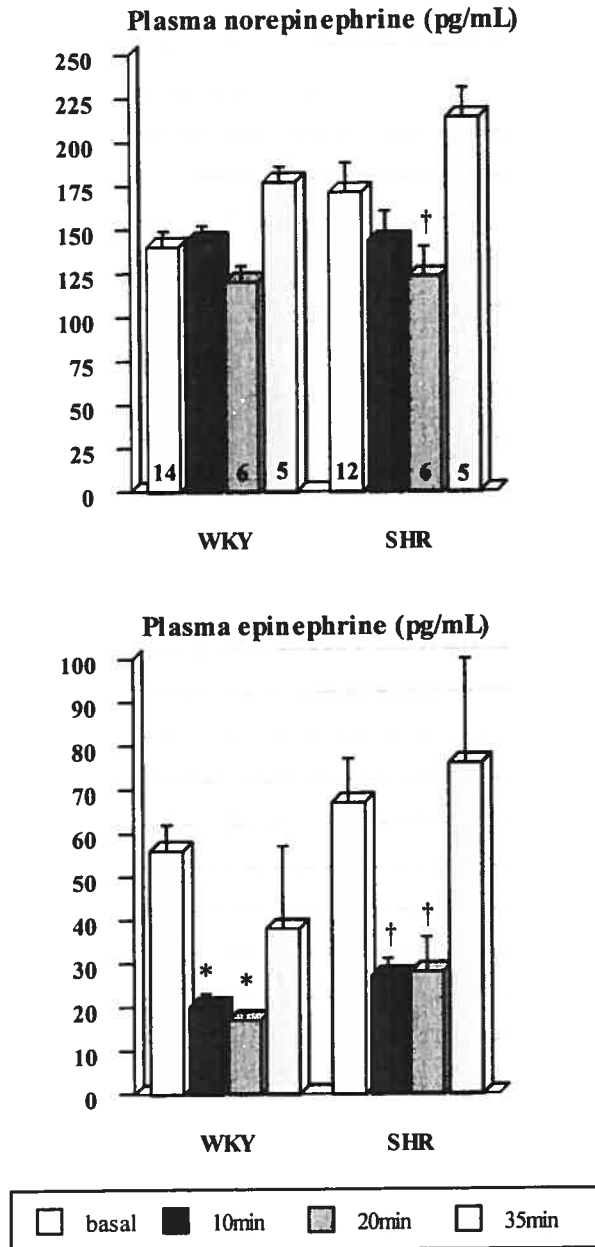


Figure 2: Plasma norepinephrine (NE) and epinephrine (EPI) levels in basal condition and at various times after melatonin administration (10 mg/kg, intravenously). Plasma norepinephrine was reduced 20 min after melatonin administration in SHR but at 35 min after melatonin administration, NE levels were returned to initial values. Epinephrine levels were similarly reduced in both strains 10 and 20 min after administration of melatonin and were restored to basal levels 35 min after melatonin. n is indicated in each bar. * $P < 0.05$ v WKY basal; † $P < 0.05$ v SHR basal.

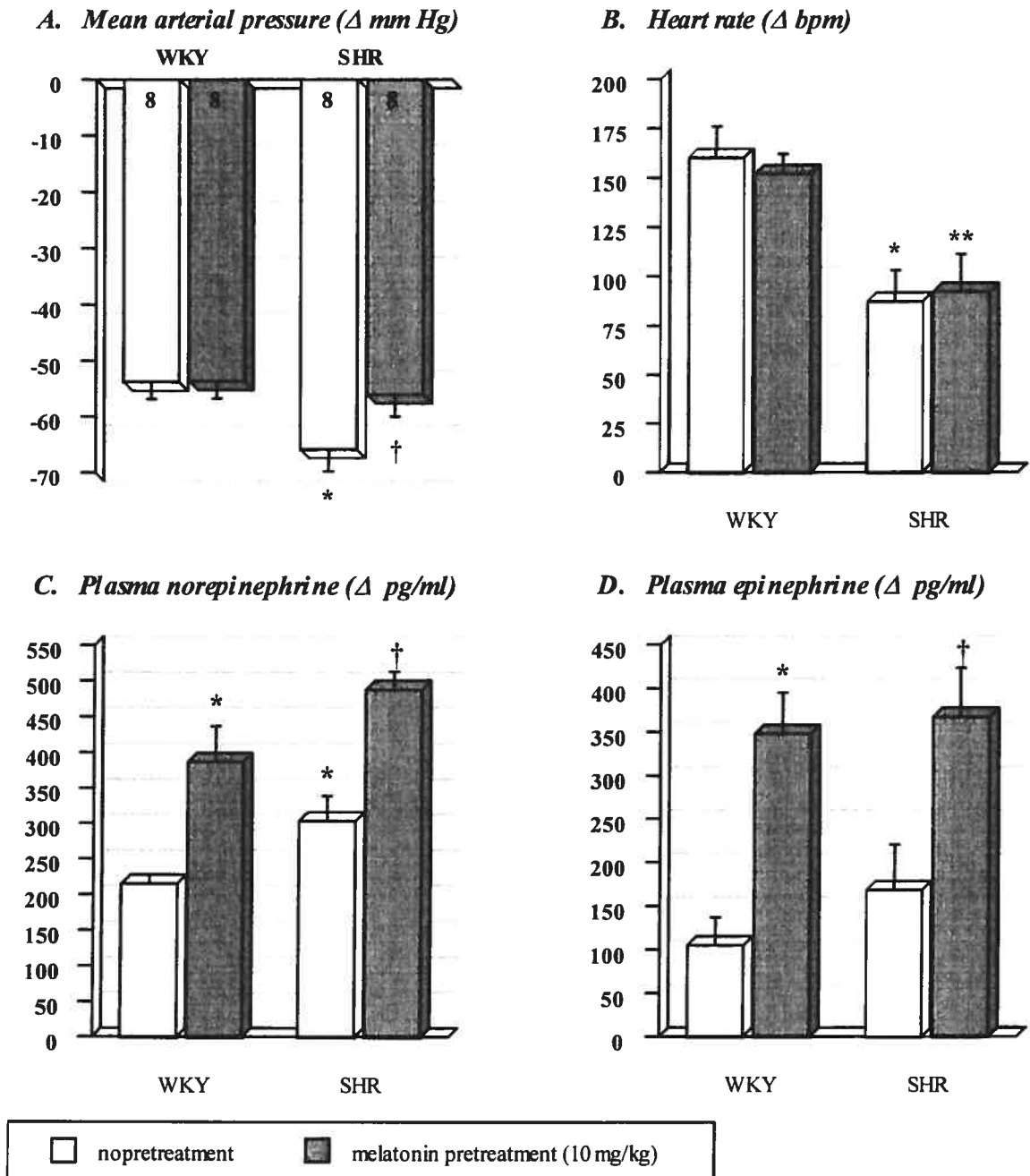


Figure 3: Hemodynamic and catecholamines responses to nitroprusside-induced hypotension (50 μ g/kg/min, intravenously, 5 min). In WKY and SHR pretreated with melatonin (10 mg/kg, intravenously), the parameters were measured at 10 min after melatonin treatment. The sympathoadrenal reactivity was potentiated by melatonin pretreatment. $n=8$ in each group. * $P<0.05$ v untreated WKY; ** $P<0.05$ v WKY melatonin treated; † $P<0.05$ v untreated SHR.

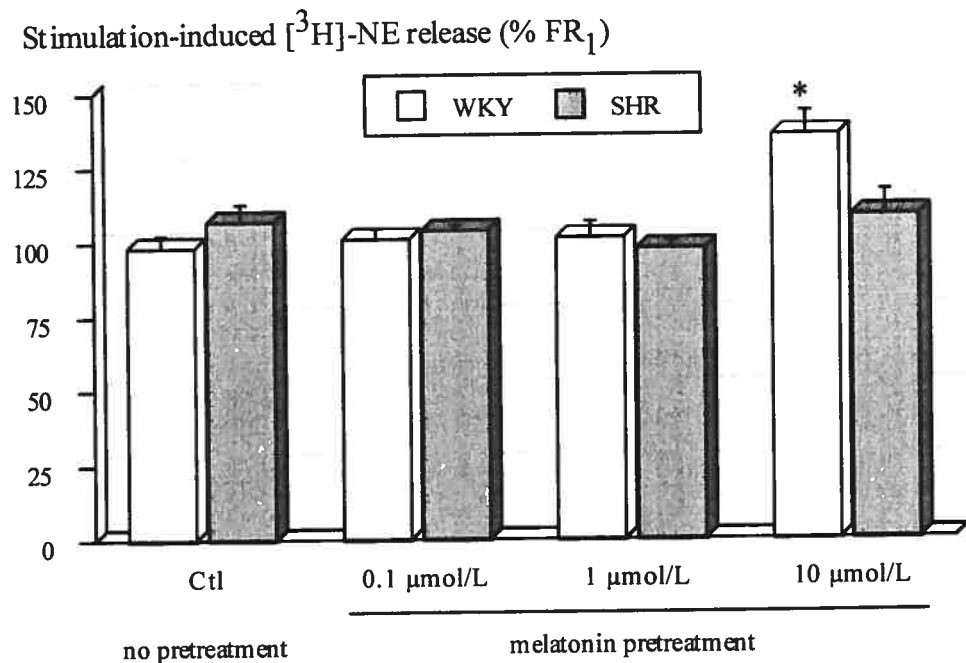


Figure 4: Field stimulated release of [³H]-norepinephrine (NE) from isolated atria in the absence or presence of melatonin. The higher dose of melatonin (10 μmol/L) potentiated the stimulation-induced outflow of NE only in WKY, whereas it was unchanged in SHR. n=6 in each group. **P*<0.05 v WKY and SHR Control (Ctl) or pretreated with melatonin.

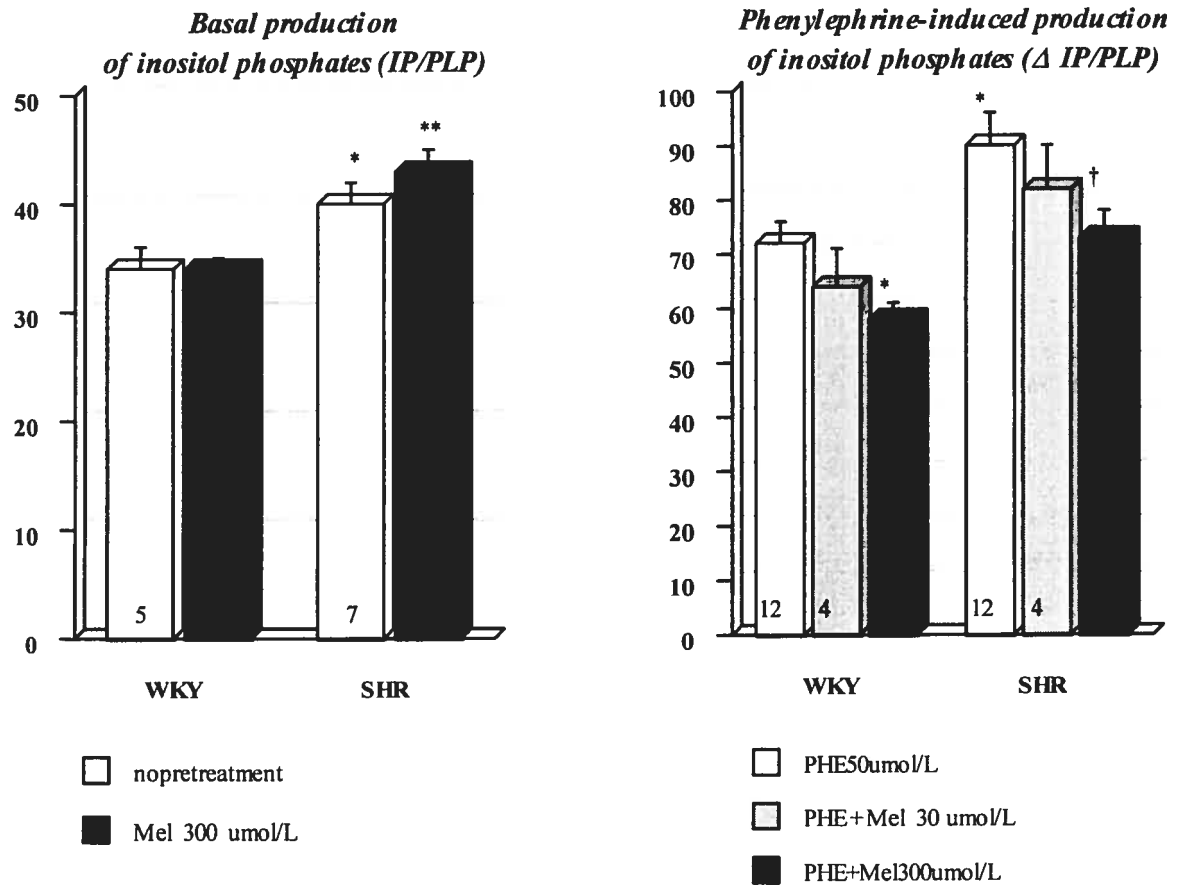


Figure 5: Inositol phosphates (IP) production in VSMC pretreated or not with melatonin (Mel). Melatonin pretreatment had no effect on basal IP production but attenuated dose dependently the phenylephrine (PHE) induced IP production. * $P < 0.05$ v untreated WKY; ** $P < 0.05$ v WKY melatonin treated; † $P < 0.05$ v untreated SHR.

CHAPITRE VII

Discussion

CHAPITRE VII – DISCUSSION

En principe l'hypertension serait le résultat d'augmentation du débit cardiaque ou de la résistance périphérique ou les deux. Cependant la cause de l'hypertension est connue que dans peu de cas. Ainsi dans environ 95% des cas, la cause de l'augmentation de la constriction artériolaire demeure inconnue. D'ailleurs, le concept que l'hypertension était une réaction adaptative essentielle fut une croyance commune et doit relever de sa désignation dans les années 1920 d'hypertonie essentielle – hypertension essentielle, en plus de croire que la pression artérielle élevée était nécessaire pour un débit sanguin adéquat aux organes vitaux chez les gens plus âgés. Ceci a contribué à la lente évolution du traitement de l'hypertension et/ou de la cause. Parmi les nombreuses hypothèses on peut retrouver les prédispositions génétiques, l'excès d'ingestion de sodium, l'excès de tonus sympathique.

Le système rénine-angiotensine (SRA) est couramment considéré comme un régulateur central de la tension artérielle chez les mammifères. La rénine a été décrite pour la première fois en 1898 mais ce n'est que vers la fin des années 1970 et au début des années 1980 que la contribution importante du SRA fut réellement reconnue. L'importance relative du SRA et sa contribution aux maladies cardiovasculaires en générale et à l'hypertension en particulier ne font pas de doutes. Il est bien établi qu'une hyperactivité du SRA favorise le développement de l'hypertension et de plusieurs autres effets adverses cardiovasculaires qui peuvent, du moins en partie, être prévenus par l'inhibition de l'ECA ou par le blocage des récepteurs de l'angiotensine II.

Nous avons déjà rapporté un tonus et une réactivité sympathique accrue chez des patients hypertendus ainsi que dans un modèle expérimental d'hypertension

suggérant une diminution de la sensibilité des mécanismes baroréflexes et/ou une augmentation de la sensibilité des mécanismes présynaptiques facilitateurs (de Champlain 1994, K.-Laflamme 1997). Les traitements avec des inhibiteurs de l'enzyme de conversion ou avec un bloqueur des récepteurs AT₁ dans ces études étaient accompagnés par une réduction de la réponse sympathique à l'hypotension suggérant une normalisation du seuil d'activation du baroréflexe. La réduction de l'activité réflexe à des niveaux encore plus bas que chez les rats normaux indiquait aussi une inhibition non seulement de l'action exagérée de l'angiotensine II mais aussi de son contrôle tonique de l'activité réflexe sympathique. Cette action sympatholytique pourrait participer dans l'effet hypotenseur. Par ailleurs, il a été rapporté que l'angiotensine II endogène au niveau du système nerveux central atténue le contrôle baroréflexe sympatho-inhibiteur de l'activité nerveuse sympathique rénale chez le rat dont la diète basse en contenu sodique est caractérisée par des niveaux plus élevés de l'activité de la rénine plasmatique et de l'activité neuronale rénale (DiBona 2003). De plus, dans cette étude, l'administration d'un antagoniste des récepteurs AT₁, oralement, augmentait l'amplitude des réponses sympatho-inhibitrice rénales suite à la stimulation afférente électrique des nerfs déresseurs (vague et aortique). Ainsi l'angiotensine II qui agit au niveau central, via les récepteurs AT₁, augmente de façon tonique l'activité nerveuse sympathique rénale alors que le blocage du récepteur AT₁ diminue le niveau de base de l'activité nerveuse sympathique rénale. De plus, dans un autre modèle d'hypertension neurogénique chez le rat, caractérisé par une augmentation de l'activité du système nerveux central et du système nerveux sympathique rénal, l'effet antihypertenseur du losartan serait en partie dû à l'inhibition du système nerveux sympathique central et périphérique (Ye 2002). Ceci était observé lorsque le losartan était administré soit de façon intraveineuse ou soit dans le ventricule latéral cérébral. L'expression génétique de l'ARNm de la NOS dans le noyau postérieur de l'hypothalamus de ces rats hypertendus étaient diminuée, alors que le traitement avec le losartan chez ce modèle a conduit à une augmentation dose-dépendante de l'ARNm de la NOS cérébrale. Cette étude suggère donc que l'action inhibitrice du losartan sur le système nerveux sympathique serait médiée, du

moins en partie, par l'activation de la NOS neuronale, un important modulateur de l'activité du système nerveux sympathique central. Ainsi l'isoforme neuronal de la NOS (NOS_n) participerait au contrôle négatif tonique de l'activité sympathique du système nerveux central.

Ainsi, le NO produit au niveau du système nerveux central participe à la régulation du tonus sympathique périphérique. L'activité sympathique est augmentée après le blocage de la production de NO central ou diminuée après l'application locale de donneurs de NO dans les noyaux cérébraux, indiquant que le NO affecterait l'activité sympathique à plusieurs sites dans le cerveau. Qadri et coll. (2003) ont observé une réduction de l'activité de la NOS dans le cortex cérébral de jeunes SHR en stage précédant l'hypertension qui ont également une activité augmentée du système nerveux sympathique, suggérant ainsi que la réduction de l'activité de la NOS activerait le système nerveux sympathique et jouerait un rôle dans la pathogenèse de l'hypertension dans ce modèle. Chez le SHR adulte hypertendu (12-13 semaines), l'activité de la NOS était augmentée dans l'hypothalamus suggérant une réponse compensatrice à la tension artérielle élevée, entre autres puisque l'infusion intracérébroventriculaire de L-NAME augmentait la tension artérielle chez le SHR mais pas chez les contrôles WKY. L'administration orale de losartan ou d'énalapril chez les SHR adultes diminuait la tension artérielle et normalisait l'activité de la NOS dans l'hypothalamus, alors que la diminution de la tension artérielle avec l'hydralazine ne modifiait pas l'activité de la NOS (Qadri 2003).

Tel que discuté précédemment, le losartan avait induit une augmentation de l'ARNm de la NOS dans noyau postérieur de l'hypothalamus dans un autre modèle d'hypertension neurogénique chez le rat (insuffisance rénale chronique) tout en réduisant l'activité du système nerveux sympathique rénal (Ye 2002). Ainsi, l'effet du losartan sur l'expression de la NOS_n pourrait dépendre du modèle expérimental d'hypertension ou pourrait différer selon la région cérébrale observée. Quoiqu'il en soit, l'action hypertensive de l'administration chronique de L-NAME, ou

d'inhibiteurs non sélectif de NOS a souvent été attribuée à l'inhibition de la NOS endothéliale (NOSe). Chez le SHR, il y a une modification de l'activité de la NOS dans le système nerveux central en comparaison avec les WKY normotendus et la réduction de la tension artérielle avec les bloqueurs du SRA affecte l'activité du système NO.

Dans les premières phases du développement de l'hypertension essentielle, l'élévation de la tension artérielle est souvent soutenue par une augmentation du débit cardiaque d'origine neuronale, qui évolue en une augmentation de la résistance périphérique. Une augmentation de l'activité nerveuse synaptique dans le coeur des patients hypertendus est délétère en élevant le rythme cardiaque et en contribuant au développement de l'hypertrophie ventriculaire gauche et d'arythmies ventriculaires.

L'interaction entre le système nerveux sympathique et le SRA est bidirectionnelle. D'une part les nerfs sympathiques rénaux contribuent à la libération de rénine et d'autre part, l'angiotensine facilite le système nerveux sympathique. En effet, les évidences d'une influence stimulatrice de l'angiotensine sur le système nerveux sympathique qui se sont accumulées suggèrent une action au-delà du système nerveux central mais irait jusqu'à impliquer presque tous les éléments de l'axe neuronal tel une facilitation de la transmission ganglionnaire, une augmentation de la libération de noradrénaline présynaptique, une inhibition de la recapture neuronale de noradrénaline, une sensibilisation des récepteurs adrénergiques, une amplification de la transduction des signaux adrénergiques, et, une stimulation de la libération de catécholamines par les médullosurrénales. De toutes les interactions, celle qui est la mieux supportée par les données expérimentales chez l'animal et chez l'homme est l'augmentation de la libération de noradrénaline présynaptique (Esler 2002).

Ainsi, le SRA est impliqué dans le développement de l'hypertension chez le SHR et il a aussi été suggéré qu'une expression génétique différentielle des récepteurs AT1 au niveau de l'axe hypothalamo-hypophysaire-surrénale chez les SHR et WKY

(Jöhren 2003). Ceci propose une participation des récepteurs AT1 dans la réponse exagérée au stress endocrine à l'angiotensine II. L'angiotensine II circulante et celle produite au niveau central stimulent l'activité du système nerveux sympathique et les bloqueurs du SRA tel l'énalapril et le losartan, empêchent cet effet.

Chez les SHR âgés de 12 semaines, nous avons rapporté une réduction de l'affinité des récepteurs β -adrénergiques cardiaques ainsi qu'une réduction de la fonction relaxante de l'isoprotérénol dans les lits mésentériques alors que les traitements avec le losartan et l'énalaprilat normalisaient ces fonctions (K.-Laflamme 1997, Oster 1995). L'augmentation de l'activité du système nerveux sympathique peut conduire à la désensibilisation des récepteurs β -adrénergiques. En effet, la désensibilisation ou le découplage des récepteurs β -adrénergiques a été démontré dans plusieurs modèles d'hypertension artérielle chronique et d'insuffisance cardiaque. Puisque l'angiotensine II facilite la neurotransmission sympathique, la diminution de la réactivité sympathique par le blocage du SRA pourrait contribuer à la normalisation de l'affinité des récepteurs β -adrénergiques cardiaques. La proportion des sous-types de récepteurs adrénergiques cardiaques était normalisée par les traitements chroniques avec le losartan ou l'énalaprilat chez les SHR (K.-Laflamme 1997). Nos études ainsi que celles de plusieurs chercheurs ont démontré que le traitement avec un inhibiteur de l'ECA dans l'hypertension et l'insuffisance cardiaque augmentait la sensibilité et/ou la densité des récepteurs β -adrénergiques qui étaient réduites dans ces états pathologiques (de Champlain 1994, Horn 1988, Gilbert 1988). De plus, une modification de la densité relative des sous-types de récepteurs β_1 et β_2 a été observée dans le développement de l'hypertension chez les SHR, les rats DOCA-sel et dans l'insuffisance cardiaque chez l'humain et ceci s'exprimait par une augmentation de la proportion des récepteurs β_2 -adrénergiques (Brodde 1991, Michel 1987, Yamada 1984, Nguyen 1995). Dans les situations où les taux d'adrénaline seraient augmentés, l'activation des récepteurs β_2 -adrénergiques pourrait soit maintenir une réponse physiologique, soit compenser la perte de récepteurs β_1 -adrénergiques pour maintenir la contractilité ou soit, en facilitant la neurotransmission présynaptique, être

impliquée dans le développement de l'hypertension. L'effet sympatholytique du blocage du SRA pourrait induire la resensibilisation ainsi que la normalisation de la proportion des sous-types de récepteurs adrénergiques et des fonctions β -adrénergiques.

Une augmentation de l'activité du système Gs-adénylyl cyclase après l'inhibition chronique de la formation de NO, mais qui n'était pas accompagnée par des modifications des caractéristiques des récepteurs β -adrénergiques ou des protéines G, suggérait que le NO devait avoir une influence sur la sensibilité de la sous-unité catalytique soit directement par son oxydation ou indirectement par un mécanisme dépendant de la GMP cyclique (K.-Laflamme 1998b). En effet, nous avons observé une normalisation de l'hyperactivité du système Gs-adénylyl cyclase chez les rats L-NAME traités par des inhibiteurs du SRA. Ainsi la voie de signalisation β -adrénergique cardiaque peut être modulée par l'angiotensine II et la voie de signalisation du NO.

L'effet possible du stress oxydatif sur la fonction cellulaire inclut l'inactivation de protéines membranaires à la suite de réactions des protéines avec les radicaux libres ou par la perturbation des membranes lipidiques. Il a été suggéré que la réduction de l'efficacité des agonistes β -adrénergiques par le stress oxydatif serait probablement due à la réduction de la formation d'AMP cyclique suite à un découplage entre le récepteur et l'adénylyl cyclase (Haenen 1990). Dans cette étude, l'effet du stress oxydatif sur la fonction β -adrénergique a été déterminé par l'exposition de membranes isolées de bovins et de cœurs de rats isolés à un hydroperoxyde organique synthétique. Dans les préparations membranaires, la production d'AMP cyclique induite par l'activation de l'adénylyl cyclase était plus vulnérable au stress oxydatif que les propriétés du récepteur β -adrénergique (densité ou affinité). Dans des études de la fonction β -adrénergique mesurée par la force de contraction dans les organes isolés, l'efficacité d'agonistes β -adrénergiques était réduite d'environ 30%, mais ceci n'était pas lié à une modification de l'affinité ou de

la densité des récepteurs. La production d'AMP cyclique était réduite dans les membranes de ces tissus, de façon similaire. Cependant, l'efficacité de la forskoline et le dibutyryl AMP cyclique sur la réponse inotropique des oreillettes n'était pas affectée par le stress oxydatif. Ainsi, il a été suggéré par cette étude, que le stress oxydatif aurait réduit la fonction de la protéine Gs, plutôt que de modifier ou inactiver l'adénylyl cyclase. Dans des conditions physiopathologiques où la production de radicaux libres est augmentée, tel que l'ischémie-reperfusion, il est suggéré que la libération de catécholamines et l'activation augmentée du système β -adrénergique serait néfaste. Ainsi, si le stress oxydatif réduit la fonction β -adrénergique ceci pourrait représenter un mécanisme protecteur physiologique.

Il existe maintenant plusieurs évidences que l'angiotensine II augmente le stress oxydatif ainsi que la vasoconstriction. L'activation du SRA tissulaire, via l'activation des récepteurs AT1, augmente la production vasculaire d'espèces radicalaires de l'oxygène, en partie via l'activation des enzymes NADH et NADPH oxydases (Rajagopalan, 1996). Ces enzymes sont présents dans les cellules endothéliales et les cellules musculaires lisses entre autres, et l'augmentation de leur activité augmente la production d'espèces radicalaires de l'oxygène en inactivant la superoxyde dismutase par exemple (Sowers 2002). Il semble que la résultante étant l'augmentation de la dégradation du NO et/ou son inactivation par les espèces radicalaires de l'oxygène joue un rôle important dans l'altération de la vasodilatation endothélium-dépendante. Ainsi, une augmentation de production d'espèces radicalaires cause une réduction de la disponibilité du NO. Les radicaux libres de l'oxygène en réagissant avec le NO produisent le peroxy-nitrite, un agent oxydant puissant qui contribue aussi au dommage vasculaire, à la vasoconstriction et, aux lésions. Les conséquences du stress oxydatif incluent aussi les réponses inflammatoires, la perpétuation de l'hypertension et ainsi une prédisposition à l'athérosclérose.

L'inactivation accrue du NO dérivé de l'endothélium est commune à la dysfonction endothéliale et aux maladies vasculaires. Chez l'animal il a été démontré

que la réduction de la synthèse de NO augmente le stress oxydatif intracellulaire. Cependant, la pathogenèse d'une augmentation de la formation de superoxyde à la suite d'une réduction de la synthèse de NO n'est pas clairement établie. Il a été démontré que l'inhibition chronique de la synthèse de NO par l'administration de L-NAME augmente l'anion superoxyde et qu'un traitement avec un antagoniste des récepteurs AT1 de l'angiotensine prévient ce changement indépendamment de l'hypertension induite par le L-NAME (Kitamoto 2000). Ces auteurs ont suggéré une augmentation du stress oxydatif via l'action de l'angiotensine II sur les récepteurs AT1. En effet, l'activité du SRA local serait augmentée dans la première semaine de l'administration de L-NAME et l'administration d'un antagoniste de l'ECA ou d'un antagoniste de récepteur AT1 peut prévenir le dommage vasculaire et myocardique (Takemoto 1997b). Jusqu'à présent il n'y a que dans les vaisseaux humains où l'on a rapporté des données qui peuvent supporter ces hypothèses *in vivo*. Guzik et coll. (2002) ont démontré l'existence de la balance relative entre le NO, l'anion superoxyde et le peroxyde nitrite dans les vaisseaux humains chez des patients devant subir une chirurgie coronarienne. Le retrait de l'endothélium ou l'inhibition de la NOS augmentait la libération de superoxyde et induisait une réduction correspondante de la formation de peroxyde nitrite. La perte d'une bioactivité du NO associée avec une augmentation de superoxyde peut jouer un rôle potentiellement important dans la pathogenèse de la dysfonction endothéliale associée à des conditions telles que l'hypertension et l'athérosclérose, ainsi que d'autres pathologies caractérisées par une augmentation de l'activation du SRA tissulaire.

En parallèle, d'autres données chez l'humain ont été rapportées en tentant de faire un lien entre le SRA, le NO et le stress oxydatif. Un polymorphisme d'insertion/délétion dans le gène de l'ECA a été découvert en 1990 par Rigat et coll. suggérant un rôle du génotype de l'ECA dans les maladies cardiovasculaires. Selon l'étude ECTIM (Étude Cas-Témoin de l'Infarctus du myocarde), les homozygotes pour la délétion (allèle D) ont un risque plus élevé pour les infarctus du myocarde comparativement aux homozygotes pour l'insertion (allèle I) (Cambien 1992). Une

augmentation de l'ECA pourrait augmenter la production d'angiotensine II et ainsi de la génération d'anions superoxyde qui dégrade le NO alors que l'augmentation de la dégradation de bradykinine résulterait aussi en la réduction des effets du NO. Chez des sujets normaux et jeunes (25 ± 6 ans) présentant le génotype DD pour l'ECA les réponses à l'acétylcholine et au nitroprussiate de sodium sont atténuées (débit sanguin de l'artère brachiale) comparativement à des sujets normaux et jeunes (24 ± 4 ans) présentant le génotype II pour l'ECA (Butler 1999). Les différents types de génotypes n'avaient pas d'influence sur la vasoconstriction dépendante ou indépendante de l'endothélium. Ainsi, le génotype DD de l'ECA est associé à une dysfonction artérielle limitée à la voie du NO déjà observable chez les jeunes hommes.

Dans le modèle expérimental d'hypertension artérielle induit par l'administration de L-NAME chez le rat, une augmentation de l'activité de l'enzyme de conversion de l'angiotensine dans le tissu cardiaque a été observée (Takemoto 1997b). D'autres parts, il a été démontré que dans ce modèle expérimental les traitements avec un inhibiteur de l'enzyme de conversion et un bloqueur des récepteurs AT₁ prévenaient les changements structuraux vasculaires (le ratio paroi:lumen et la fibrose périvasculaire) suggérant ainsi un effet de l'angiotensine II via ses récepteurs AT₁ alors que le blocage des récepteurs de la bradykinine n'atténuait pas l'effet bénéfique du bloqueur de l'enzyme de conversion (Takemoto 1997a). Ainsi, l'activation du système rénine-angiotensine, joue un rôle important dans le développement du remodelage cardio-vasculaire. Dans nos travaux, que l'angiotensine II ait été formée et libérée par le SRA tissulaire ou le SRA systémique, l'utilisation d'un bloqueur des récepteurs AT₁ révèle le rôle de l'angiotensine II autant d'origine endocrine que paracrine et autocrine et ce, tôt dans le développement de l'hypertension dans les modèles expérimentaux DOCA, L-NAME et dans l'hypertrophie tissulaire cardio-vasculaire chez les DOCA. Quoique nous n'ayons pas observé une hypertrophie cardiaque, le blocage du SRA a réduit les poids cardiaques démontrant l'importance de l'angiotensine dans la croissance tissulaire.

Il existe maintenant de plus en plus d'évidences expérimentales suggérant que en plus des effets connus de l'angiotensine II, l'heptapeptide angiotensine(1-7) est aussi un composé biologiquement actif du SRA. Dans les cellules endothéliales, l'angiotensine(1-7) est dérivé des dégradations carboxy-terminales de l'angiotensine I et de l'angiotensine II par une endopeptidase ou des carboxypeptidases, respectivement. L'angiotensine(1-7) contre-régule les actions cardiovasculaires de l'angiotensine II en agissant entre autres comme un modulateur local du tonus vasculaire. Le récepteur de l'angiotensine(1-7) sur les cellules endothéliales serait distinct du récepteur AT1. L'habileté de l'angiotensine(1-7) à stimuler la libération de NO a été indirectement démontrée par l'inhibition de son effet vasodilatateur en éliminant l'endothélium ou en utilisant des inhibiteurs de la NOS (Heitsch 2001). Aussi, la libération de NO a été directement mesurée dans des cultures de cellules endothéliales et l'angiotensine(1-7) causait une libération dépendante de la concentration, qui était inhibée par l'inhibition de NOS. Chez les rats SHR, l'enzyme de conversion de l'angiotensine II (ECA2), qui est un mono-peptidase hydrolysant l'angiotensine II en angiotensine(1-7), est exprimé à des taux moindres que chez les rats contrôles normotendus WKY (Crackower 2002). Cependant la contribution relative de ces 2 voies de l'angiotensine I in vivo n'est pas encore comprise.

La pathogenèse de l'hypertension due à l'augmentation des espèces radicalaires de l'oxygène a été attribuée à une dysfonction endothéliale causée par l'inactivation du NO, la génération d'agent vasoconstricteur (isoprostanes) dérivés de la peroxydation de l'acide arachidonique, et, une activité vasoconstrictrice directe ou vasodilatatrice réduite. De plus il a été démontré que des doses sous-pressives d'angiotensine II causaient l'augmentation d'isoprostanes F2 (un vasoconstricteur puissant) chez le rat et que de faibles doses croissantes d'angiotensine II sont responsables de l'augmentation de la tension artérielle et le maintien de l'hypertension via la stimulation du stress oxydatif mesuré par l'augmentation des niveaux d'isoprostanes (Romero 1999). D'autres parts il a été rapporté que les niveaux d'antiradicalaires (chélateurs de radicaux libres) tel que le superoxyde

dismutase sont réduits chez les sujets hypertendus et les modèles expérimentaux (Nakazono 1991). La production de superoxyde est augmentée dans le modèle d'hypertension DOCA-sel et le traitement avec le tempol, un analogue du superoxyde dismutase à perméabilité cellulaire, diminuait la pression artérielle (Beswick 2001). Aussi, chez le SHR, la pression artérielle peut être réduite avec le tempol ou une diète riche en antioxydants (Rodriguez-Iturbe 2003)

Il a déjà été suggéré que le losartan possède un potentiel antioxydant. En effet, dans un modèle expérimental où le stress oxydatif est induit par la déplétion de glutathion avec l'administration de buthionine-sulfoximine (BSO), le losartan atténue l'augmentation d'isoprostane et prévient l'augmentation de thromboxane A₂ (Bayorh 2003). Dans cette étude le losartan fut administré avec le BSO et comparativement avec une administration unique de BSO, le losartan atténuait l'hypertension induite par le BSO, après une semaine de traitement. De plus l'administration de losartan a été associée à une augmentation de l'activité d'enzymes antioxydants.

Il a aussi été observé chez les sujets hypertendus, que l'inhibition des récepteurs AT₁ renverse la dysfonction endothéliale tel que démontrée par l'amélioration de la dilatation dépendante du flux (« *flow-mediated dilation* ») et la réduction du stress oxydatif et des cytokines inflammatoires (Koh 2003). Ceci supporte les hypothèses pour les effets pléiotropiques de l'angiotensine II.

Les antagonistes des récepteurs AT₁ sont aussi reconnus pour causer l'augmentation de la concentration plasmatique d'angiotensine II et la vasodilatation par les récepteurs AT₂ (Volpe 2003). Ainsi la réduction de la tension artérielle par le blocage des récepteurs AT₁ serait due partiellement à la stimulation des récepteurs AT₂ en induisant une augmentation des taux de bradykinine, NO, et de GMP cyclique. Dans un modèle rénal d'hypertension, le blocage des récepteurs AT₂ causait une augmentation de la tension artérielle qui prévenait l'action antihypertensive du

blocage des récepteurs AT1, et ceci était associé à une diminution de la production rénale de bradykinine, NO et GMP cyclique (Siragy 1999).

Il semble que les récepteurs AT2 aient aussi un rôle important dans les tissus cardiaques. En effet, Liu et coll. (1997) ont démontré que la prévention du remodelage cardiaque obtenu avec le blocage des récepteurs AT1 est presque totalement abolie avec le blocage des récepteurs AT2, chez le rat. Cependant, l'extrapolation du rôle des récepteurs AT2 à la pathophysiologie humaine semble incertaine jusqu'à présent autant que la nécessité d'en augmenter l'activation dans le but de traitement pharmacologique. D'autant plus, que plusieurs études cliniques évaluant les effets des inhibiteurs de l'enzyme de conversion et des antagonistes des récepteurs AT1 démontrent des bénéfices comparables. Des évidences directes sont donc nécessaires afin de démontrer l'action protectrice de l'activation des récepteurs AT2. Néanmoins, lors du blocage des récepteurs AT1, le transfert de l'angiotensine II vers les récepteurs AT2 pourrait amplifier l'effet de l'antagonisme des récepteurs AT1 en plus d'une augmentation de l'expression génétique des récepteurs AT2. Ainsi, les propriétés auxiliaires des antagonistes AT1 pourraient les différencier des inhibiteurs de l'ECA et pourraient être accentuées par les composés ayant une affinité ou une sélectivité accrue pour les récepteurs AT1.

Finalement, il avait été suggéré que la mélatonine serait un des plus puissants antioxydants pouvant neutraliser de façon très efficace les radicaux libres. Il a d'ailleurs été démontré dans notre laboratoire que la génération d'anion superoxyde radicalaire induisait une augmentation importante de la formation d'inositol phosphates (IP) dans les cellules musculaires lisses de SHR et cet effet était atténué par des prétraitements avec la superoxyde dismutase ou la mélatonine (Wu 1998). Nous avons démontré que la mélatonine pourrait participer au contrôle de la fonction cardio-vasculaire du moins par son effet hypotenseur dû en partie par l'atténuation du tonus basal sympatho-adrénergique et l'inhibition de la stimulation alpha-adrénergique de la voie des phosphoinositides.

En clinique, plusieurs études de mortalité et de morbidité sur les inhibiteurs de l'ECA et sur les antagonistes des récepteurs de l'angiotensine ont été menées et d'autres sont en cours pour évaluer les effets chez les sujets atteints de coronaropathie. Il sera intéressant de voir jusqu'à quel point dans l'avenir, nos observations dans les différents modèles expérimentaux seront reflétées par ces études cliniques. Par exemple, l'étude ONTARGET (*Ongoing Telmisartan Alone and in Combination With Ramipril Global Endpoint Trial*) compare le telmisartan (un antagoniste des récepteurs AT1) administré en monothérapie, au ramipril (un inhibiteur de l'ECA) et, à l'association de ces 2 médicaments chez des patients à risque élevé souffrant de diabète ou de maladie cardio-vasculaire (Yusuf 2002). Les paramètres étudiés sont la mort d'origine cardiovasculaire, l'infarctus du myocarde, l'accident vasculaire cérébral et l'hospitalisation pour insuffisance cardiaque.

Quoiqu'il en soit, jusqu'à présent, les études d'envergures de morbidité et de mortalité ayant pour objectifs de comparer les classes thérapeutiques ne semblent pas démontrer d'avantages clairs sur les paramètres primaires mais possiblement sur certains paramètres secondaires dus à leurs différents mécanismes d'actions. Une maîtrise tensionnelle énergique et précoce serait la clé pour réduire les manifestations cardiovasculaires.

CHAPITRE VIII

Conclusion

CHAPITRE VIII – CONCLUSION

Quoique l'hypertension est le facteur de risque, voire même une des maladies, des plus répandues dans les sociétés occidentales et représente un facteur de risque des plus important pour la morbidité et la mortalité cardiovasculaire, les mécanismes patho-physiologiques sous-jacents à cette élévation de la tension artérielle restent encore à clarifier. Cependant depuis la dernière décennie, plusieurs travaux de recherches expérimentales et cliniques ont suggérés que l'hypertension essentielle doit être reliée au SRA et au système nerveux autonome. En effet, l'efficacité des inhibiteurs de l'ECA ou des antagonistes des récepteurs AT1 à réduire la tension artérielle est maintenant démontrée, même dans des situations où les taux plasmatiques d'angiotensine II sont normaux ou légèrement élevés. D'autres parts, l'angiotensine II stimule le stress oxydatif qui active des mécanismes vasopresseurs, potentialisant l'effet vasoconstricteur de l'angiotensine II. Le losartan en bloquant le récepteur AT1 est reconnu pour causer une vasodilatation, une hypernatrémie et une dépression de l'activité du système nerveux sympathique, laquelle contribue à l'effet hypotenseur. Nos études dans des modèles expérimentaux d'hypertension supportent l'hypothèse de mécanismes d'hétérorégulation entre le système nerveux sympathique, le SRA et le stress oxydatif.

Dans l'ensemble de nos projets de recherche présentés dans cette thèse, nous avons caractérisé les fonctions du système nerveux sympathique dans différents modèles de maladies cardiovasculaires chez le rat (hypertension génétique (SHR), hypertension induite par l'administration chronique de LNAME, hypertension DOCA-sel) et l'interaction des mécanismes de transduction sympathique avec d'autres systèmes humoraux (rénine-angiotensine, monoxyde d'azote) décrivant des altérations fonctionnelles accompagnant le développement de l'hypertension et des complications cardiovasculaires associées. Nous avons démontré chez les rats génétiquement hypertendus que l'effet antihypertenseur du losartan et de l'énalaprilat était caractérisé

par l'atténuation de la réactivité réflexe sympathique, par l'inhibition de l'effet facilitateur de l'angiotensine II exogène sur la libération de noradrénaline par les oreillettes isolées et par l'augmentation de l'affinité des récepteurs β -adrénergiques cardiaques. Dans le modèle d'hypertension induit par le LNAME nous avons caractérisé une augmentation de la participation du tonus médullo-surrénalien ainsi qu'une altération de la réactivité vasculaire, tandis que le système β -adrénergique- adénylyl cyclase cardiaque ne semblait pas modifié. L'action hypotensive du losartan et de l'énalaprilat accompagnée de la régression des poids cardiaques suggère une participation importante du système rénine-angiotensine dans le maintien de l'hypertension et le remodelage cardiaque et de plus, le monoxyde d'azote ou ses métabolites oxydatifs pourraient participer dans le mécanisme de l'hypertrophie cardiaque et rénale. Les modèles d'hypertension LNAME, DOCA-sel et DOCA-sel-LNAME étaient tous associés à hyperréactivité endothélium-dépendante à la phényléphrine et une vasorelaxation à l'acétylcholine réduite. Nous avons aussi caractérisé le rôle du système nerveux sympathique dans l'effet hypotenseur aigu de la mélatonine chez le SHR qui semble liée à une inhibition du tonus basal sympatho-adrénal et possiblement à une inhibition de la formation d'inositol phosphates induite par la phényléphrine dans les cellules musculaires lisses vasculaires. La mélatonine possède des propriétés antioxydantes puissantes et est un neutralisant efficace de radicaux libres. Nous avons démontré que la génération d'anions superoxydes induit une augmentation de la formation d'inositol phosphates chez le SHR et que cet effet est atténué autant par la superoxyde dismutase que par la mélatonine. Ainsi, des évidences expérimentales indiquent l'existence d'interactions pré- et postsynaptiques du système sympathique avec le système rénine-angiotensine et le monoxyde d'azote. De telles interactions pourraient être d'une importance majeure dans la modulation de la sensibilité des cellules effectrices à une activation sympathique.

Il existe aussi maintenant des évidences cliniques sur l'importance du SRA dans le traitement des patients hypertendus à haut risque de morbidité cardio-vasculaire. Les inhibiteurs de l'ECA et les bloqueurs des récepteurs AT1 auraient potentiellement

plusieurs effets bénéfiques additionnels à la baisse de la tension artérielle, qui doivent dépendre d'effets pléiotropiques qui sans doute incluent le système nerveux sympathique et le stress oxydatif.

Finalement, l'hypertension devrait être considérée comme un risque majeur responsable de la progression de la maladie athérosclérotique. Un traitement approprié devrait viser le contrôle de l'ensemble des facteurs de risques associés. Par exemple deux autres facteurs essentiels dans la prise en charge de l'hypertension sont la modification des habitudes de vie et l'observance thérapeutique. En clinique, l'atteinte des taux cibles reste actuellement un défi. Il est toutefois nécessaire d'associer différents agents pharmacologiques chez la majorité des patients tel que démontré par plusieurs études cliniques d'envergures dans lesquelles en moyenne une association de trois agents pharmacologiques et plus est nécessaire pour l'atteinte des taux cibles de la pression artérielle.

CHAPITRE IX

Sources Bibliographiques

CHAPITRE IX – Sources Bibliographiques

- Ahlquist RP: A study of the adrenotropic receptors. *Am J Physiol*, 1948; 153: 586-600.
- Akimoto Y, Horinouchi T, Shibano M, Matsushita M, Yamashita Y, Okamoto T, Yamaki F, Tanaka Y, Koike K: Nitric oxide (NO) primarily accounts for endothelium-dependent component of beta-adrenoceptor-activated smooth muscle relaxation of mouse aorta in response to isoprenaline. *J Smooth Muscle Res*, 2002; 38(4-5): 87-99.
- Andrews CO, Crim JW, Hartle DK: Angiotensin II binding in area postrema and nucleus tractus solitarius of SHR and WKY rats. *Brain Res Bull*, 1993; 32: 419-424.
- Bayorh MA, Ganafa AA, Socci RR, Eatman DE, Silvestrov N, Abukhalaf IK: Effect of losartan on oxidative stress-induced hypertension in Sprague-Dawley rats. *Am J Hypertens*, 2003; 16: 387-392.
- Benetos A, Thomas F, Bean K, Gautier S, Smulyan H, Guize L. Prognostic value of systolic and diastolic blood pressure in treated hypertensive men. *Arch Intern Med*, 2002; 162: 577-581.
- Berecek KH, Swords BH, Lo S, Kirk KA: Effect of angiotensin converting enzyme inhibitors upon brain angiotensin II binding. *J Hypertens* 1992; 10: 545-552.
- Berridge MJ: Cell signalling. A tale of two messengers. *Nature*, 1993; 30; 365(6445): 388-389.
- Berridge MJ: The biology and medicine of calcium signalling. *Mol Cell Endocrinol*, 1994; 98(2):119-24.
- Beswick RA, Dorrance AM, Leite R, Webb RC: NADH/NADPH oxidase and enhanced superoxyde production in the mineralocorticoid hypertensive rat. *Hypertension*, 2001; 38: 1107-1111.
- Birnbaumer L, Birnbaumer M. Signal transduction by G proteins: 1994 edition. *Signal transduction Res*, 1995; 15: 213-252
- Bishop VS, Haywood JR: Hormonal control of cardiovascular reflexes. In : *Reflex control of the circulation*. Zucker IH, Gilmore JP (Eds). Boca Raton, FL : CRC, 1991, 253-271.
- Boulanger CM, Vanhoutte PM: G proteins and endothelium-dependent relaxations. *J Vasc Res*, 1997; 34: 175-185.
- Boulanger CM, Heymes C, Benessiano J, Geske RS, Levy BI, Vanhoutte PM: Neuronal nitric oxide synthase is expressed in rat vascular smooth muscle cells: activation by angiotensin II in hypertension. *Circ Res*, 1998; 83: 1271-1278.
- Bouvier M, Hausdorff WP, De Blasi A, O'Dowd BF, Kobilka BK, Caron MG, Lefkowitz RJ: Removal of phosphorylation sites from the beta2-adrenergic receptor delays onset of agonist-promoted desensitization. *Nature*, 1988; 333: 370-373.

- Bouvier M, Collons S, O'Dowd BF, Campbell PT, de Blasi A et al: Two distinct pathways for cAMP-mediated down-regulation of the β_2 -adrenegoc receptor. *J Biol Chem*, 1989; 264: 16, 786-16, 792.
- Brady AJB, Warren JB, Poole-Wilson PA, Willams TJ, Harding SE: Nitric oxide attenuates cardiac myocyte contraction. *Am J Physiol*, 1993, 265: H176-H182.
- Brodde OE: β_1 - and β_2 -adrenoceptors in the human heart: properties, function, and alterations in chronic heart failure. *Pharmacol reviews*, 1991; 43(2): 203-242.
- Burt VL, Whelton P, Roccella EJ, Brown C, Cutler JA, Higgins M, Horan MJ, Labarthe D: Prevalence of hypertension in the US adult population. Results from the Third National Health and Nutrition Examination Survey, 1988-1991. *Hypertension*, 1995; 25(3): 305-13.
- Butler R, Morris AD, Burchell B, Struthers AD: DD Angiotensin-converting enzyme gene polymorphism is associated with endothelial dysfunction in normal humans. *Hypertension* 1999, 33: 1164-1168.
- Cachofeiro V, Maeso R, Rodrigo E, Navarro J, Ruilope LM, Lahera V: Nitric oxide and prostaglandins in the prolonged effects of losartan and ramipril in hypertension. *Hypertension*, 1995; 26: 236-243.
- Cambien F, Poirier O, Lecerf L, Evans A, Cambou JP: Deletion polymorphism in the gene for angiotensin-converting enzyme is a potent risk factor for myocardial infarction. *Nature*, 1992, 359: 641-644.
- Campbell BC Sturani A, Reid JL: Evidence of parasympathetic activity of the angiotensin converting enzyme inhibitor, captopril, in normotensive man. *Clin Sci*, 1985, 68: 49-56.
- Campbell DJ: Circulating and tissue angiotensin systems. *J Clin Invest*, 1987; 79: 1-6.
- Cardillo C, Kilcoyne CM, Quyyumi AA, Cannon III RO, Panza JA: Decreased vasodilator response to isoproterenol during nitric oxide inhibition in humans. *Hypertension*, 1997; 30: 918-921.
- Chapman CB, Mitchell JH: *Starling on the heart*, London, Dawsons.
- Chen K, Zhang X, Dunham EW, Zimmerman BG: Kinin-mediated antihypertensive effect of captopril in deoxycorticosterone acetate-salt hypertension. *Hypertension*, 1996; 27 (1): 85-89.
- Chidiac P, Hebert TE, Valiquette M, Dennis M, Bouvier M: Inverse agonist activity of β -adrenergic antagonists. *Mol Pharmacol*, 1994; 45: 490-499.
- Chung MK, Gulick TS, Rotondo RE, Schreiner GF, Lange LG: Mechanism of cytokine inhibition of β -adrenergic agonist stimulation of cyclic AMP in rat cardiac myocytes. Impairment of signal transduction. *Circ Res*, 1990, 67: 753-763.
- Clapham DE: Calcium signaling. *Cell*, 1995; 80: 259-268.
- Clauser E, Gaillard I, Wei L, Corvol P: Regulation of angiotensinogen gene. *Am J Hypertens*, 1989; 2: 403-410.
- Cohen RA, Vanhoutte PM : Endothelium-dependent hyperpolarization : beyond nitric oxide and cyclic GMP. *Circulation*, 1995; 92: 3337-3349.
- Conklin B, Bourne HR: Structural elements of $G\alpha$ subunits that interact with $G\beta\gamma$ receptors and effectors. *Cell*, 1993; 73: 631-641.

- Cox BF, Bishop VS: Neural and humoral mechanisms of angiotensin-dependent hypertension. *Am J Physiol*, 1991; 261: H1284-H1291.
- Crackower MA, Sarao R, Oudit GY, Yagil C, Koziaradzki I, Scanga SE, Oliveiras-dos-Santos AJ, da Costa J, Zhang L, Pei Y, Scholey J, Ferrario CM, Manoukian AS, Chappell MC, Backx PH, Yagil Y, Penninger JM: Angiotensin-converting enzyme 2 is an essential regulator of heart function. *Nature*, 2002; 417(6891): 822-828.
- Crawford KW, Frey EA, Cote TE: Angiotensin II receptor recognized by DUP 753 regulates two distinct guanine nucleotide-binding protein signaling pathways. *Mol Pharmacol*, 1991; 41: 154-162.
- Davis JO, Freeman RH: Mechanisms regulating renin release. *Physiol Rev*, 1976; 56: 1-56.
- Davis MJ, Sharma NR: Calcium-release-activated calcium influx in endothelium. *J Vasc Res*, 1997; 34: 186-195
- Dawes M, Chowienczyk PJ, Ritter JM: Effects of inhibition of the L-arginine/nitric oxide pathway on vasodilation caused by β -adrenergic agonists in human forearm. *Circulation*, 1997; 95: 2293-2297.
- de Gasparo M, Catt KJ, Wright JW, Unger T: International Union of Pharmacology. XXIII. The Angiotensin II receptors. *Pharmacol Rev*, 2000; 52: 415-472.
- Delpy E, Coste H, Gouville AC: Effects of cyclic GMP elevation on isoprenaline-induced increase in cyclic AMP and relaxation in rat aortic smooth muscle: role of phosphodiesterase 3. *Br J Pharmacol*, 1996; 119(3): 471-8.
- DiBona GF, Jones SY: Endogenous angiotensin affects responses to stimulation of baroreceptor afferent nerves. *J Hypertens*, 2003; 21: 1539-1546.
- Dixon RAF, Kolbika BK, Strader DJ et al.: Cloning of the gene and cDNA for mammalian β 2-adrenergic and homology with rhodopsin. *Nature* 1986, 321: 75-79.
- Duhe RJ, Nielsen MD, Dittman AH, Villacres EC, Choi EJ, Storm DR: Oxidation of critical cysteine residues of type 1 adenylyl cyclase by o-iodosobenzoate or nitric oxide reversibly inhibits stimulation by calcium and calmodulin. *J Biol Chem*, 1994; 269 (10): 7290-7296.
- Dzau VJ, Sasamura H, Hein L: Heterogeneity of angiotensin synthetic pathways and receptor subtypes: physiological and pharmacological implications. *J Hypertens*, 1993; 11 (suppl.3): S13-S18).
- Dzau VJ: Possible prorenin activating mechanism in the blood vessel wall. *J Hypertens*, 1987; 5 (suppl.2): S15-S18.
- Dzau VJ: Circulating versus local renin-angiotensin system in cardiovascular. *Circulation*, 1988; 77(Suppl I): I-4-I-13.
- Esler M: Differentiation in the effects of the angiotensin II receptor blocker class on autonomic function. *J Hypertens* 2002; 20(suppl 5):S13-S19.
- Ezzati M, Lopez AD, Rodgers A, Vander Hoorn S, Murray CJ; Comparative Risk Assessment Collaborating Group. Selected major risk factors and global and regional burden of disease. *Lancet*, 2002; 360(9343): 1347-60.

- Fabiato A: Calcium-induced release of calcium from the cardiac sarcoplasmic reticulum. *Am J Physiol*, 1983; 245(1): C1-14.
- Ferguson SS, Menard L, Barak LS, Koch WJ, Colapietro AM, Caron MG: Role of phosphorylation in agonist-promoted β_2 -adrenergic receptor sequestration. *J Biol Chem*, 1995; 270(42):24782-24789.
- Fleming I, Bauersachs J, Busse R: Calcium-dependent and calcium-independent activation of the endothelial NO synthase. *J Vasc Res*, 1997; 34: 165-174.
- Furchgott RF, Zawadzki JV : The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature*, 1980; 288: 373-376.
- Gilbert EM, Sandoval A, Larrabee P, Renlund DG, O'Connell JB, Bristow MR: Effect of lisinopril on cardiac adrenergic drive and myocardial β -receptor density in heart failure. *Circ*, 1988; 78 (Suppl. II): II-576.
- Go LO, Moschella MC, Watras J, Handa KK, Fyfe BS, Marks AR: Differential regulation of two types of intracellular calcium release channels during end-stage heart failure. *J Clin Invest*, 1995; 95(2): 888-94.
- Goldsmith SR, Hasking GJ: Effect of a pressor infusion of angiotensin II on sympathetic activity and heart rate in normal humans. *Circ Res*, 1991; 68: 263-268.
- Gomez Llambi H, Manni F, LaPadula P, Carretero OA, Taquini CM: Myocardial contractility is modulated by angiotensin II via nitric oxide. *Hypertension*, 1996; 27: 704-708.
- Gomma AH, Fox KM: The EUROPA trial: design, baseline demography and status of the substudies. *Cardiovasc Drugs Ther*, 2001;15(2):169-79.
- Gotze K, Jacobs KH: Unoccupied β -adrenoceptor-induced adenylyl cyclase stimulation in turkey erythrocyte membranes. *Eur J Pharmacol*, 1994; 268: 151-158.
- Graier WF, Simecek S, Bowles DK, Sturek M : Heterogeneity of caffeine- and bradykinin-sensitive Ca^{2+} stores in vascular endothelial cells. *Biochem J*, 1994; 300 : 637-641.
- Gudermann T, Kalkbrenner F, Schultz G: Diversity and selectivity of receptor-G protein interaction. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 1996; 36: 429-459.
- Guo GB, Abboud FM: Angiotensin II attenuates baroreceptor control of heart rate and sympathetic activity. *Am J Physiol*, 1984; 246: H80-H89.
- Guzik TJ, West NEJ, Pillai R, Taggart DP, Channon KM: Nitric Oxide Modulates Superoxide Release and Peroxynitrite Formation in Human Blood Vessels. *Hypertension*, 2002; 39: 1088-1094.
- Haenen GRMM, Veerman M, Bast A: Reduction of β -adrenoceptor function by oxidative stress in the heart. *Free Radical Biol & Med*, 1990; 9: 279-288.
- Hanoune J: Les adénylyl cyclases des mammifères. *Médecine Sciences*, 1994; 10: 444-447.
- Hein L and Kobilka BK: Adrenergic receptors from molecular structure to in vivo function. *Trends Cardiovasc Med*, 1997; 7L 137-145.
- Heitsch H, Brovkovich S, Malinski T, Wiemer G: Angiotensin-(1-7)-stimulated nitric oxide and superoxide release from endothelial cells. *Hypertension*, 2001; 37: 72-76.

- Heart Outcomes Prevention Evaluation (HOPE) Study Investigators: Effects of an angiotensin-converting-enzyme inhibitor, ramipril, on cardiovascular events in high-risk patients. *N Engl J Med*, 2000; 342(3): 145-53.
- Hille B: G protein-coupled mechanisms and nervous signalling. *Neuron*, 1992; 9: 187-195.
- Horn E, Corwin SJ, Steinberg SF, Chow YK, Neuberg GW, Cannon PJ, Powers ER, Bilezikian JP: Reduced lymphocyte stimulatory guanine nucleotide regulatory protein and β -adrenergic receptors in congestive heart failure and reversal with angiotensin converting enzyme inhibitor therapy. *Circ*, 1988; 78: 1373-1379.
- Hu ZW, Shi XY, Okazaki M, Hoffman BB: Angiotensin II induces transcription and expression of alpha 1-adrenergic receptors in vascular smooth muscle cells. *Am J Physiol*, 1995; 268: H1006-1014.
- Huckle WR and Earp HS: Regulation of cell proliferation and growth by angiotensin II. *Prog Growth Factor Res*, 1994; 5: 177-194.
- Hyman DJ and Pavlik VN: Characteristics of Patients with Uncontrolled Hypertension in the United States. *N Engl J Med*, 2001; 345: 479-486.
- Ikeda U, Yoshikazu M, Kawahara Y, Yokoyama M, Shimada K: Angiotensin II augments cytokine-stimulated nitric oxide synthesis in rat cardiac myocytes. *Circulation*, 1995; 92: 2683-2689.
- Iyengar R: Molecular and functional diversity of mammalian Gs-stimulated adenylyl cyclases. *FASEB J*, 1993; 7: 768-75.
- Joannides R, Richard V, Haefeli WE, Benoist A, Linder L, Lüscher TF, Thuillez C : Role of nitric oxide in the regulation of the mechanical properties of peripheral conduit arteries in humans. *Hypertension*, 1997; 30: 1465-1470.
- Joffres MR, Hamet P, MacLean, DR, L'italien GJ, Fodor G et al. Distribution of blood pressure and hypertension in Canada and the United States. *Am J Hypertens*, 2001; 14: 1099-1105.
- Johnson MC, Aguilera G: Studies on the mechanism of the novel stimulatory effect of angiotensin-II on adenylyl cyclase in rat fetal skin fibroblasts. *Endocrinology*, 1992; 131(5): 2404-2412.
- Johren O, Golsch C, Dendorfer A, Qadri F, Häuser W, Dominiak P: Differential Expression of AT1 Receptors in the Pituitary and Adrenal Gland of SHR and WKY. *Hypertension*, 2003; 41: 984-990.
- Jover B, Herizi A, Ventre F, Dupon M, Mimran A: Sodium and angiotensin in hypertension induced by long-term nitric oxide blockade. *Hypertension*, 1993; 21: 944-948.
- Julius S, Kjeldsen SE, Brunner H, Hansson L, Platt F, Ekman S, Laragh JH, McInnes G, Schork AM, Smith B, Weber M, Zanchetti A; VALUE Trial. VALUE trial: Long-term blood pressure trends in 13,449 patients with hypertension and high cardiovascular risk. *Am J Hypertens*, 2003; 16(7):544-8.
- Julius S, Kjeldsen SE, Weber M, Brunner HR, Ekman S, Hansson L, Hua T, Laragh J, McInnes GT, Mitchell L, Plat F, Schork A, Smith B, Zanchetti A, for the VALUE trial group. Outcomes in hypertensive patients at high cardiovascular risk treated

- with regimens based on valsartan or amlodipine: the VALUE randomised trial. *Lancet*, 2004; 363: 2022–31.
- K.-Laflamme A, Oster L, Cardinal R, de Champlain J: Effects of renin-angiotensin blockade on sympathetic reactivity and β -adrenergic pathway in the spontaneously hypertensive rat. *Hypertension*, 1997; 30(part 1): 278-287.
- K.-Laflamme A, de Champlain J: Interactions des systèmes sympathique et rénine-angiotensine. *Thérapie*, 1998a; 53: 245-252.
- K.-Laflamme A, Foucart F, Moreau P, Lambert C, Cardinal R, de Champlain J: Sympathetic functions in NG-nitro-L-arginine-methyl-ester-induced hypertension: modulation by the renin-angiotensin system. *J of Hypertens*, 1998b; 16: 63-76.
- K.-Laflamme A, Oster L, Cardinal R, de Champlain J: Role of NO and angiotensin II in the early development of endothelial functions impairment and cardiac hypertrophy in deoxycorticosterone acetate–salt hypertension. *Can J Physiol Pharmacol*, 1998c; 76: 665-675.
- K.-Laflamme A, Wu L, Foucart S, de Champlain J: Impaired basal sympathetic tone and α 1-adrenergic responsiveness in association with the hypotensive effect of melatonin in spontaneously hypertensive rats. *Am J Hypertens*, 1998d; 11: 219-229
- Katz AM: Molecular biology in cardiology, a paradigmatic shift. *J Mol Cell Cardiol*, 1988; 20: 355-366.
- Kawano Y, Yoshida K, Matsuoka H, Omae T: Chronic effects of central and systemic administration of losartan on blood pressure and baroreceptor reflex in spontaneously hypertensive rats. *Am J Hypertens*, 1994; 7: 536-542.
- Keuneke C, Yacullo R, Metzger R, Hellmann T, Peters J, Ganten D: The role of tissue renin-angiotensin systems in hypertension and effects of chronic converting-enzyme inhibition. *Eur Heart J*, 1990; 11(Suppl D): 11-16.
- Khan NA, McAlister FA, Campbell NRC, Feldman RD, Rabkin S, Mahon J, Lewanczuk R, Zarnke KB, Hemmelgarn B, Lebel M, Levine M, Herbert C, for the Canadian Hypertension Education Program: The 2004 Canadian recommendations for the management of hypertension: Part II – Therapy. *Can J Cardiol*, 2004; 20(1):41-54.
- Kitami Y, Okura T, Marumoto K, Wakamiya R, Hiwada K: Differential gene expression and regulation of type-1 angiotensin II receptor subtypes in the rat. *Biochem Biophys Res Commun*, 1992; 188: 446-452.
- Kitamoto S, Egashira K, Kataoka C, Usui M, Koyanagi M, Takemoto M, Takeshita A: Chronic inhibition of nitric oxide synthesis in rats increases aortic superoxide anion production via the action of angiotensin II. *J Hypertens*, 2000; 18: 1795-1800.
- Kloner RA, Birnbaum Y: *Cardiovascular Trials Review*. 7th Edition. Kloner and Birnbaum 2002.
- Kobayashi M, Furukawa Y, Chiba S : Positive chronotropic and inotropic effects of angiotensin II in the dog heart. *Eur J Pharmacol*, 1978; 50: 17-25

- Kobilka BK, Kobilka TS, Regan JW, Caron MG, Lefkowitz RJ: Chimeric α_2 - β_2 adrenergic receptors: delineation of domains involved in effector coupling and ligand binding specificity. *Science*, 1988; 240: 1310-1316.
- Koch WJ, Rockman HA, Samana P et al: Cardiac function in mice overexpressing the β -adrenergic receptor kinase or a β ARK1 inhibitor. *Science*, 1995; 268: 1350-1353.
- Koh KK, Ahn JY, Han SH, Kim DS, Jin DK, Kim HS, Shin MS, Ahn TS, Choi IS, Shin EK: Pleiotropic effects of angiotensin II receptor blocker in hypertensive patients. *J Am Coll Cardiol*, 2003; 42: 905-910.
- Konhilas JP, Irving TC, de Tombe PP. Frank-Starling law of the heart and the cellular mechanisms of length-dependent activation. *Pflugers Arch*, 2002; 445(3): 305-310.
- Laher I, Thompson LP, Gagne L : Protein kinase C as a modulator of response amplification in vascular smooth muscle. *Blood Vessels*, 1990; 27: 333-340.
- Laursen JB, Rajagopalan S, Galis Z, Tarpey M, Freeman BA, Harrison DG: Role of superoxide in angiotensin II-induced but not catecholamine-induced hypertension. *Circulation*, 1997; 95: 588-593.
- Levi AJ, Brooksby P, Hancox JC: One hump or two? The triggering of calcium release from the sarcoplasmic reticulum and the voltage dependence of contraction in mammalian cardiac muscle. *Cardiovasc Res*, 1993; 27(10):1743-57.
- Liu YH, Yang XP, Sharov VG, Nass O, Sabbah HN, Peterson E, Carretero OA: Effect of angiotensin-converting enzyme inhibitors and angiotensin II type 1 receptor antagonists in rats with heart failure. *J Clin Invest*, 1997; 99: 1926-1935.
- Lohse MJ, Benovic JL, Caron MG, Lefkowitz RJ: Multiple pathways of rapid beta-2-adrenergic receptor desensitization. Delineation with specific inhibitor. *J Biol Chem*, 1990; 265: 3202-3211.
- Loscarzo J, Welch G : Nitric oxide and its role in the cardiovascular system. *Prog Cardiovasc Dis*, 1995; 38: 87-104.
- Lückoff A, Busse R: Calcium influx into endothelial cells and formation of endothelium-derived relaxing factor is controlled by the membrane potential. *Pflügers Arch*, 1990; 416: 305-311.
- Lückoff A, Pohl U, Mülsch A, Busse R: Differential role of extra- and intracellular calcium in the release of EDRF and prostacyclin from cultured endothelial cells. *Br J Pharmacol*, 1988; 95: 189-196.
- Lumbers ER, McCloskey DI, Potter EK : Inhibition by angiotensin II of baroreceptor-evoked activity in cardiac vagal efferent nerves in the dog. *J Physiol (Lond)*, 1979; 294: 69-80.
- Lunde PK, Sejersted OM: Intracellular calcium signalling in striated muscle cells. *Scand J Clin Lab Invest*, 1997; 57(7): 559-68.
- Luo W, Grupp IL, Harrer J, Ponniah S, Grupp G, Duffy JJ, Doetschman T, Kranias EG: Targeted ablation of the phospholamban gene is associated with markedly enhanced myocardial contractility and loss of beta-agonist stimulation. *Circ Res*, 1994; 75(3): 401-9.
- Lüscher TF: Imbalance of endothelium-derived relaxing and contracting factors. A new concept in hypertension ? *Am J Hypertens*, 1990; 3: 317-330.

- Maeso R, Navarro-Cid J, Munoz-Garcia R, Rodrigo E, Ruilope LM, Lahera V, Cachofeiro V : Losartan reduces phenylephrine constrictor response in aortic rings from spontaneously hypertensive rats. Role of nitric oxide and angiotensin II type 2 receptors. *Hypertension*, 1996; 28: 967-972.
- Maisel AS, Phillips C, Michel Mc, Ziegler MG, Carter SM: Regulation of cardiac β -adrenergic receptors by captopril, implications for congestive heart failure. *Circ*, 1989; 80: 669-675.
- Majima M, Katori M, Ogino M et al.: Lack of contribution of circulatory kinin elevated by captopril to induce hypotension in normotensive and hypertensive rats. *Immunopharmacology*, 1996; 33 (1-3): 291-293.
- Matsukawa S, Reid IA: Role of the area postrema in the modulation of the baroreflex control of heart rate by angiotensin II. *Circ Res*, 1990; 67: 1462-1473.
- Mensah GA. The global burden of hypertension: good news and bad news. *Cardiol Clin*, 2002; 20(2): 181-185.
- Michel MC, Wang XL, Schlicker E, Göthert M, Beckeringh JJ, Brodde OE: Increased β_2 -adrenoceptor density in heart, lung and kidney of spontaneously hypertensive rats. *J Auton Pharmacol*, 1987; 7: 41-51.
- Milano CA, Allen LF, Rockman HA et al: Enhanced myocardial function in transgenic mice overexpressing the β_2 -adrenergic receptor. *Science*, 1994; 264: 582-586.
- Ming Z, Parent R, Lavallée M: β_2 -adrenergic dilation of resistance coronary vessels involves K_{ATP} channels and nitric oxide in conscious dogs. *Circulation*, 1997; 95: 1568-1576.
- Mohan P, Brutsaert DL, Paulus WJ, Sys SU: Myocardial contractile response to nitric oxide and cGMP. *Circulation*, 1996; 93: 1223-1229.
- Moncada S, Higgs A: The L-arginine-nitric oxide pathway. *N Engl J Med*, 1993; 329: 2002-2012.
- Mulrow PF. In: Izzo JL Jr, Black HR, eds. *Hypertension Primer: The Essentials of High Blood Pressure*. 2nd ed. Dallas, Tex: American Heart Association, 1999:271-273.
- Nagao T, Vanhoutte PM: Hyperpolarization as a mechanism for endothelial-dependent relaxations in the porcine coronary artery. *J Physiol (London)*, 1992; 445: 355-367.
- Nakazono K, Watanabe N, Matsuno K, Sasaki J, Sato T, Inoue M: Does superoxyde underlie the pathogenesis of hypertension? *Proc Natl Acad Sci USA*, 1991; 88: 10045-10048.
- Nathan C: Nitric oxide as a secretory product of mammalian cells. *FASEB J*, 1992; 6: 3051-3064.
- National Center for Health Statistics. NHANES 1999-2000 (CD-ROM).
- Neaton JD, Wentworth D. Serum cholesterol, blood pressure, cigarette smoking, and death from coronary heart disease. Overall findings and differences by age for 316,099 white men. Multiple Risk Factor Intervention Trial Research Group. *Arch Intern Med*, 1992; 152(1):56-64.

- Nguyen CT, de Champlain J, Bouvier M: Tissue specific changes in β -adrenergic receptor subtypes in DOCA-salt hypertensive rats. *Biomedical J*, 1995, 2: 34-42.
- NIH: The Sixth Report of the Joint National Committee on Prevention, Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Pressure. NIH publication 98-4080, 1997.
- Opie LH: Mechanisms of cardiac contraction and relaxation. In: *Heart disease, a textbook of cardiovascular medicine*. 6th edition. Braunwald, Zipes, Libby, 2001; 443-478.
- Oster L, K-Laflamme A, Foucart S, de Champlain J. Losartan improves endothelial functions of mesenteric arteries in three experimental models of hypertension. *Hypertension*, 1995; 25: 1360.
- Osterziel KJ, Dietz R, Schmid W, Mikulaschek K, Manthey J, Kubler W: ACE inhibition improves vagal reactivity in patients with heart failure. *Am Heart J*, 1990, 120: 1120-1129.
- Panza JA, Garcia CE, Kilcoyne CM, Quyyumi A, Cannon RO III: Impaired endothelium-dependent vasodilation in patients with essential hypertension: evidence that nitric oxide abnormality is not localised to a single signal transduction pathway. *Circulation*, 1995; 91: 1732-1738.
- Park D, Jhon DY, Lee CW, Lee KH, Rhee SG: Activation of phospholipase C isozymes by G protein $\beta\gamma$ subunits. *J Biol Chem*, 1993; 268: 4573-4576.
- Park PSH, Filipek S, Wells JW, Palczewski K: Oligomerisation of G protein-coupled receptors: past, present, and future. *Biochemistry*, 2004; 43 (50): 15643-15656.
- Parsaee H, Mc Ewan JR, Sunil J, MacDermot J: Differential sensitivities of the prostacyclin and nitric oxide biosynthetic pathways to cytosolic calcium in bovine aortic endothelial cells. *Br J Pharmacol*, 1992; 107: 1013-1019.
- Peach MJ Bumpus FM, Khairallah PA : Inhibition of norepinephrine uptake in hearts by angiotensin II and analogs. *J Pharmacol Exp Ther*, 1969; 167: 291-299.
- Pfeffer MA, Domanski M, Rosenberg Y, Verter J, Geller N, Albert P, Hsia J, Braunwald E. Prevention of events with angiotensin-converting enzyme inhibition (the PEACE study design). *Prevention of Events with Angiotensin-Converting Enzyme Inhibition*. *Am J Cardiol*, 1998; 82(3A): 25H-30H.
- Pfeffer MA, McMurray J, Leizorovicz A, Maggioni AP, Rouleau JL, Van De Werf F, Henis M, Neuhart E, Gallo P, Edwards S, Sellers MA, Velazquez E, Califf R: Valsartan in acute myocardial infarction trial (VALIANT): rationale and design. *Am Heart J*. 2000; 140(5): 727-750.
- Potter EK: Angiotensin inhibits action of vagus nerve at the heart. *Br J Pharmacol*, 1982; 75: 9-11.
- Primatesta P, Brookes M, Poulter NR: Improved Hypertension Management and Control, Results From the Health Survey for England 1998. *Hypertension*, 2001; 38: 827-832.
- Putney JW Jr: A model for receptor-regulated calcium entry. *Cell Calcium*, 1986; 7: 1-12.

- Qadri F, Arens T, Schwarz EC, Häuser W, Dendorfer A, Dominiak P: Brain nitric oxide synthase activity in spontaneously hypertensive rats during the development of hypertension. *J Hypertension*, 2003; 21(9):1687-1694.
- Qiu HY, Henrion D, Levy BI: Endogenous angiotensin II enhances phenylephrine-induced tone in hypertensive rats. *Hypertension*, 1994; 24: 317-321.
- Rajagopalan S, Kurz S, Münzel T, Tarpey M, Freeman BA, Griendling KK, Harrison DG: Angiotensin II-mediated hypertension in the rat increases vascular superoxide production via membrane NADH/NADPH oxidase activation. Contribution to alterations of vasomotor tone. *J Clin Invest*, 1996; 97: 1916-1923.
- Re RN, Bryan SE: Functional intracellular renin-angiotensin system may exist in multiple tissues. *Clin Exper Hypertension Theory and Practice*, 1984; A6 (10 & 11): 1739-1742.
- Re RN: Toward a theory of intracrine hormone action. *Regulatory peptides*, 2002; 106: 1-6.
- Rees DD, Palmer RJJ, Moncada S: Role of endothelium-derived nitric oxide in the regulation of blood pressure. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1989; 86:3375-3378.
- Reid IA: Interactions between Ang II, sympathetic nervous system, and baroreflexes in regulation of blood pressure. *Am J Physiol*, 1992; 262: E763-E778.
- Rigat B, Hubert C, Alhenc-Gelas A, Cambien F, Corvol P, Soubrier F: An insertion/deletion polymorphism in the angiotensin I-converting-enzyme (ACE) gene accounting for half the variance of serum enzyme levels. *J Clin Invest*, 1990; 86: 1343-1346.
- Robertson A, Khairallah PA: Angiotensin II: rapid localization in nuclei of smooth and cardiac muscle. *Science*, 1971; 72: 1138-1139.
- Robertson MJ, Dougall IG, Harper D, McKechnie KCW, Leff P: Agonist-antagonist interactions at angiotensin receptors: application of a two-state receptor model. *TIPS*, 1994; 15: 364-369.
- Rodriguez-Iturbe B, Zhan CD, Quiroz Y, Sindhu RK, Vaziri ND: Antioxidant-rich diet relieves hypertension and reduces renal immune infiltration in spontaneously hypertensive rats. *Hypertension*, 2003; 41: 341-346.
- Romero JC, Reckelhoff JF: Role of Angiotensin and Oxidative Stress in Essential Hypertension. *Hypertension*, 1999; 34: 943-949
- Sadoshima JI, Izumo S: Signal transduction pathways of angiotensin II-induced c-fos gene expression in cardiac myocytes in vitro. Roles of phospholipid-derived second messengers. *Circ Res*, 1993; 73: 424-438.
- Sasaguri T, Teruya H, Ishida A, Abumiya T, Ogata J: Linkage between $\alpha 1$ Adrenergic Receptor and the Jak/STAT Signaling Pathway in Vascular Smooth Muscle Cells. *Biochem Biophys Res Com*, 2000; 268: 25-30.
- Sauvé R, Parent L, Simoneau C, Roy G: External ATP triggers a biphasic activation process of a calcium-dependent K^+ channel in cultured bovine aortic endothelial cells. *Pflügers Arch*, 1988; 412: 469-481.
- Saward L, Zahradka P: Angiotensin II activates phosphatidylinositol 3-kinase in vascular smooth muscle cells. *Circ Res*, 1997; 81: 249-257.

- Schulz R, Nava E, Moncada S: Induction and potential biological relevance of a Ca²⁺-independent nitric oxide synthase in the myocardium. *Br J Pharmacol*, 1992; 105: 575-580.
- Seki T, Hagiwara H, Naruse K, Kadowaki M, Kashiwagi M, Demura H, Hirose S, Naruse M: In situ identification of messenger RNA of endothelial type nitric oxide synthase in rat cardiac myocytes. *Biochem Biophys Res Com*, 1996; 218: 601-605.
- Shah AM, Lewis MJ, Henderson AH: Effects of 8-bromo-cyclic GMP on contraction and on inotropic response of ferret cardiac muscle. *J Mol Cell Cardiol*, 1991; 23: 55-64.
- Siragy HM, Carey RM: Protective role of the angiotensin AT₂ receptor in a renal wrap hypertension model. *Hypertension*, 1999; 33: 1237-1242.
- Smith JA, Shah AM, Lewis MJ: Factors released from endocardium of the ferret and pig modulate myocardial contraction. *J Physiol*, 1991; 439: 1-14.
- Sowers JR: Hypertension. Angiotensin II, and oxidative stress. *N Engl J med*, 2002; 346: 1999-2001.
- Starling EH: *The Lineacre lecture on the law of the heart*. London, UK: Longmans, Grenn and Co., 1918.
- Suzuki J, Matsubara H, Urakami M, Inada M: Rat angiotensin II (type 1A) receptor mRNA regulation and subtype expression in myocardial growth and hypertrophy. *Circ Res*, 1993; 73: 439-447.
- Taddei S, Virdis A, Ghiadoni L, Magagna A, Salvetti A: Cyclooxygenase inhibition restores nitric oxide activity in essential hypertension. *Hypertension*, 1997; 29(pt 2) : 274-279.
- Taddei S, Favilla S, Duranti P, Simonini N, Salvetti A: Vascular renin-angiotensin system and neurotransmission in hypertensive persons. *Hypertension*, 1991; 18: 266-277
- Takemoto M, Egashira K, Tomita H, Usui M, Okamoto H, Kitabatake A, Shimokawa H, Sueishi K, Takeshita A: Chronic Angiotensin-Converting Enzyme Inhibition and Angiotensin II Type 1 Receptor Blockade : Effects on Cardiovascular Remodeling in Rats Induced by the Long-term Blockade of Nitric Oxide Synthesis. *Hypertension*, 1997; 30: 1621-1627
- Takemoto M, Egashira K, Tomita H, Usui M, Okamoto H, Kitabatake A, Shimokawa H, Sueishi K, Takeshita A: Chronic angiotensin-converting enzyme inhibition and angiotensin II type 1 receptor blockade. Effects on cardiovascular remodeling in rats induced by the long-term blockade of nitric oxide synthesis. *Hypertension*, 1997a; 30: 1621-1627.
- Takemoto M, Egashira K, Usui M, Numaguchi K, Tomita H, Tsutsui H, Shimokawa H, Sueishi K, Takeshita A: Important role of tissue angiotensin-converting enzyme activity in the pathogenesis of coronary vascular and myocardial structural changes induced by long-term blockade of nitric oxide synthesis in rats. *J Clin Invest*, 1997b; 99: 278-287.
- Tewksbury DA: Angiotensin: Biochemistry and molecular biology. In Laragh JH and Brenner BM (eds). *Hypertension: Pathophysiology, diagnosis and management*, Raven Press, New York. 1990.

- The ALLHAT Officers and Coordinators for the ALLHAT Collaborative Research Group: Major outcomes in high-risk hypertensive patients randomized to angiotensin-converting enzyme inhibitor or calcium channel blocker vs diuretic: the Antihypertensive and Lipid-Lowering Treatment to Prevent Heart Attack Trial (ALLHAT). *JAMA*, 2002; 288: 2981-2997.
- Toda N, Kitamura Y, Okamura T: Neural mechanism of hypertension by nitric oxide synthase inhibitor in dogs. *Hypertension*, 1993; 21: 3-8.
- Togashi, H, Sakuma I, Toshioka M, Kobayashi T, Yasuda H, Kitabatake A, Saito H, Gross SS, Levi R: A central nervous system action of nitric oxide in blood pressure regulation. *J Pharmacol Exp Ther*, 1992; 262: 343-347.
- Townend JN, Al-Ani M, West JN, Littler WA, Coote JH: Modulation of cardiac autonomic control in humans by angiotensin II. *Hypertension*, 1995; 25: 1270-1275.
- Urata H, Kinoshita A, Misono KS, Bumpus FM, Husain A: Identification of a highly specific chymase as the major angiotensin II-forming enzyme in the human heart. *J Biol Chem*, 1990; 265: 22348-22357.
- Vaca L, Kunze DL: Depletion of intracellular Ca^{2+} stores activates a Ca^{2+} -selective channel in vascular endothelium. *Am J Physiol*, 1994; 267: C920-C925.
- Vaca L, Schilling WP, Kunze DL: G protein mediated regulation of a Ca^{++} -dependent K^{+} channel in cultured vascular endothelial cells. *Pflügers Arch*, 1992; 422:66-74
- Van Breemen C, Wang X: A symposium on signal transduction in the endothelium. *J Vasc Res*, 1997; 34: 149-151.
- Van de Voorde J, Vanheel B, Leusen I: Endothelium-dependent relaxation and hyperpolarization in aorta from control and renal hypertensive rats. *Circ Res*, 1992; 70: 1-8.
- Vanhoutte PM. Endothelium and control of vascular function: *Hypertension*, 1989; 13: 658-667.
- Van Kleef EM, Smits JF, De Mey JG, Cleutjens JP, Lombardi DM, Schwartz SM, Daemen MJ: Alpha 1-adrenoreceptor blockade reduces the angiotensin II-induced vascular smooth muscle cell DNA synthesis in the rat thoracic aorta and carotid artery. *Circ Res*, 1992; 70(6): 1122-1127.
- Volpe M, Musumeci B, De Paolis P, Savoia C, Morganti A: Angiotensin II AT2 receptor subtype: an uprising frontier in cardiovascular disease ? *J Hypertens*, 2003; 21: 1429-1443.
- Von Zastrow M, Kobilka BK: Ligand-regulated internalization and recycling of human beta 2-adrenergic receptors between the plasma membrane and endosomes containing transferrin receptors. *J Biol Chem*, 1992; 267(5): 3530-3538.
- Wall MA, Coleman DE, Lee E, Iniguez-Lluhi JA, Posner BA, Gilman AG, Sprang SR: The structure of the G protein heterotrimer $G_{i\alpha 1\beta 1\gamma 2}$. *Cell*, 1995; 8: 1047-1058.
- Wexler RR, Carini DJ, Duncia JV, Johnson AL, Wells GJ, Chiu AT, Wong PC, Timmermans PBMWM: Rationale for the chemical development of angiotensin II receptor antagonists. *Am J Hypertens*, 1992; 5: 209S-220S.

- Wolny A, Clozel JP, Rein J, Mory P, Vogt P, Turino M, Kiowski W, Fischli W: Functional and biochemical analysis of angiotensin II-forming pathways in the human heart. *Circ Res*, 1997; 80: 219-227.
- Wong PC, Hart SD, Zaspel AM, Chiu AT, Ardecky RJ, Smith RD, Timmermans PBMWM: Functional studies of nonpeptide angiotensin II receptor subtype-specific ligands : DuP 753 (AII-1) and PD123177 (AII-2). *J Pharmacol Exp Ther*, 1990; 255: 584-592.
- World Health Organization: World Health Report 2002. Geneva, Switzerland. Site web: www.who.int/whr
- Wu L, Wang R, de Champlain J: Enhanced inhibition by melatonin of alpha-adrenoceptor-induced aortic contraction and inositol phosphate production in vascular smooth muscle cells from spontaneously hypertensive rats. *J Hypertens*, 1998; 16(3): 339-47.
- Yamada S, Ishima T, Tomita T, Hayashi M, Okada T, Hayashi E: Alterations in cardiac alpha and beta adrenoceptors during the development of spontaneous hypertension. *J Pharmacol Exp Ther*, 1984; 228: 454-460.
- Ye S, Zhong H, Duong VN, Campese VM: Losartan reduces central and peripheral sympathetic nerve activity in rat model of neurogenic hypertension. *Hypertension*, 2002; 39: 1101-1106.
- Yusuf S. From the HOPE to the ONTARGET and the TRANSCEND studies: challenges in improving prognosis. *Am J Cardiol*, 2002; 89(2A): 18A-25A; discussion 25A-26A.
- Zanchetti AS: Neural regulation of renin release: experimental-evidence and clinical implications in arterial-hypertension. *Circulation*, 1977, 56: 691-698.
- Zeicher AM, Drexler H, Saubier B, Just H: Endothelium-mediated coronary blood flow modulation in humans. Effects of age, atherosclerosis, hypercholesterolemia, and hypertension. *J Clin Invest*, 1993; 92: 652-662.
- Zhang X, Xie YW, Nasjletti A, Xu X, Wolin M, Hintze TH: ACE inhibitors promote nitric oxide accumulation to modulate myocardial oxygen consumption. *Circulation*, 1997; 95: 176-182.
- Zhuo J, Allen AM, Yamada H, Sun Y, Mendelsohn FAO: Localization and properties of the angiotensin converting enzyme and angiotensin receptors in the heart. In : Lindpainter K, Ganten D (editors) : *The Cardiac Renin-Angiotensin System*. New York : Futura 1994, pp 63-68.

Curriculum Vitae

*Curriculum Vitae, Sommaire***Annik K.-LAFLAMME**

PROFESSIONAL AND SCIENTIFIC MEMBERSHIPS AND ACTIVITIES

- American Heart Association (AHA), American Stroke Association, professional membership, 2003-present
- AHA Council on arteriosclerosis, thrombosis and vascular biology, 2003- present
- AHA Council on high blood pressure research, 2003- present
- AHA Interdisciplinary working group on atherosclerotic peripheral vascular disease, 2003- present
- Quebec Heart failure Society, corporate membership and executive board member, 2004.
- Quebec Hypertension Society, 1992- present
- Quebec Hypertension Society, executive board member 1993-1994
- Canadian Hypertension Society, 1992- present
- Autonomic nervous system Research group (GRSNA), 1989-present.
- Biomedical Modelisation Research group (GRMB) since 1989.

HONORS, AWARDS, AND SELECTED GRANTS AND RESEARCH SCHOLARSHIPS

- University of Montréal – Faculty of post-graduate studies : Research scholarship, 1992-1993.
- Fonds de la Recherche en Santé du Québec (FRSQ) : Research scholarship, 1992-1993.
- Fonds pour la Formation de Chercheurs et l'Aide à la Recherche (FCAR) : Research scholarship and Ph.D. award, 1993-1994 and 1994-1995.
- Canadian Heart and Stroke Foundation : Research scholarship, 1993-1994; 1994-1995; 1995-1996.
- University of Montréal - Maternity leave - Faculty of post-graduate studies : Research scholarship (peer review of curriculum), 1995
- Canadian Medical Research Council : Research scholarship in collaboration with Canadian Hypertension Society –Pfizer, Ph.D. honored, 1996-1997.
- Quebec Hypertension Society - Pfizer Canada Inc. : presentation award of the annual meeting, January 1994.
- Canadian Hypertension Society - Hoffman-La Roche Limited : presentation award of the annual meeting September 1994.
- Autonomic nervous system Research group (GRSNA): presentation award of the annual meeting, December 1994
- Canadian Hypertension Society - Hoffman-La Roche Limited : presentation award of the annual meeting, September 1995.
- Canadian Hypertension Society - Hoffman-La Roche Limited : presentation award of the annual meeting, Septembre 1996.
- Autonomic nervous system Research group (GRSNA) : presentation award of the annual meeting, December 1996.
- Gabriel Plaa Research Day - Department of Pharmacology : presentation award of the annual meeting, May 1997.

- Ph.D. Pharmacology, University of Montréal.
Directors : Dr Jacques de Champlain and Dr René Cardinal
Research group on the Autonomic Nervous System (GRSNA)
Departments of Physiology and Pharmacology, University of Montreal
Title : "Study of the modulation of the activity of the adrenergic signal transduction pathway in cardiovascular diseases: role of the renin-angiotensin system and of nitric oxide."
- M.Sc. Pharmacology, University of Montréal.
Directors: Dr René Cardinal and Dr Chantal Lambert
 Hôpital du Sacré-Coeur de Montréal,
Department of Pharmacology, University of Montreal
Title: "Effects of a new calcium antagonist on atrio-ventricular conduction and modifications of its pharmacokinetics parameters in heart failure."
- B.Sc. Biology, sp. Microbiology, University of Montréal.

PROFESSIONAL TRAINING

1. Stakeholder management and leader behavior, by OP-Group, June 2002
2. Creative thinking and Innovation Seminar, by F. Rosenzweig, June 2002.
3. Facilitators role and responsibility, skills training, Aug 2003
4. Business communication Training, by IWCC, April 2000
5. Strategic planning process training.
6. Rx&D code-2004. Canada's research-based pharmaceutical companies, code of marketing practices.
7. Study planning and design, 3-day/3-modules training, April 2003
8. Privacy and Security Training Session. By Deloitte & Touche, Nov. 2003.
9. Good Clinical Practice Training Course, by PERI, 4-day course, December 1999.
10. Drug submission Assembly tool training session, Jan 2003.

SELECTED PUBLICATIONS AND COMMUNICATIONS / PRESENTATIONS

Publications:

1. R. Cardinal, M. Vermeulen, C. Bouchard, A. Laflamme: Reduced tolerance of canine preparations of heart failure to a new benzothiazepine calcium channel blocker: TA-3090. *European Journal of Pharmacology*, 1990; 183(3): p777-778.
2. A. K.-Laflamme, G. Caillé, D. Croteau, R. Cardinal, C. Lamoureux, C. Lambert: Effect of congestive heart failure on clentiazem pharmacokinetics in a dog model. *Biopharmaceutics and drug disposition*, 1992; 13: p513-520.
3. A. K.-Laflamme, C. Bouchard, C. Lambert, M. Vermeulen, R. Cardinal: Effects of clentiazem on atrio-ventricular node function in normal canine preparations and heart failure. In M.Sc. thesis.
4. A. K.-Laflamme: Effets d'un antagoniste calcique sur la conduction auriculo-ventriculaire et modifications de sa pharmacocinétique dans l'insuffisance cardiaque. In M.Sc. thesis, 15 May 1992, Faculté de médecine, Université de Montréal.
5. P. Moreau, L. Lamarche, A. K.-Laflamme, A. Calderone, N. Yamaguchi, J. de Champlain: Chronic hyperinsulinemia and hypertension: role of the sympathetic nervous system. *Journal of Hypertension*, 1995; 13(3): p333-340.

6. J. de Champlain, A. K.-Laflamme, S. Foucart: Renin-angiotensin and sympathetic nervous systems interactions. *Receptors in cardiovascular disease*, 1997; 4(1): 1-6.
7. A. K.-Laflamme, L. Oster, R. Cardinal, J. de Champlain: Effects of renin-angiotensin blockade on sympathetic reactivity and β -adrenergic pathway in SHR. *Hypertension*, 1997; 30(1): 278-287.
8. A. K.-Laflamme, L. Oster, S. Foucart, R. Cardinal, J. de Champlain: Sympathetic functions in N^{G} -nitro-L-arginine-methyl-ester-induced hypertension: modulation by the renin-angiotensin system. *Journal of Hypertension*, 1998; 16: 63-76.
9. A. K.-Laflamme, L. Wu, S. Foucart, J. de Champlain: Impaired basal sympathetic tone and α_1 -adrenergic responsiveness in association to the hypotensive effect of melatonin in spontaneously hypertensive rats. *American Journal of Hypertension*, 1998; 11: 219-229.
10. A. K.-Laflamme, L. Oster, R. Cardinal, J. de Champlain: Role of NO and angiotensin II in the early development of deoxycorticosterone acetate-salt hypertension and cardiac hypertrophy. *Can J Physiol Pharmacol*, 1998; 76: 665-675.
11. A. K.-Laflamme, J. de Champlain: Interactions des systèmes sympathiques et rénine-angiotensine. *Thérapie*, 1998; 53: 245-252.
12. L. Oster, A. K.-Laflamme, J. de Champlain: Effect of losartan and enalaprilat on the endothelium-dependent relaxation in spontaneously hypertensive rats and chronic nitric oxide blockade-induced hypertension in rats. *In preparation*.

Abstracts and Communications:

13. A. K.-Laflamme, C. Lambert, R. Cardinal: Effets du TA-3090 sur la conduction A-V: comparaison entre le chien conscient et le chien anesthésié sous bloc sympathique. "Journée Scientifique du Groupe de Recherche sur le Système Nerveux Autonome", Université de Montréal, Montréal, Québec, Décembre 1990.
14. A. K.-Laflamme, C. Lamoureux et C. Lambert: Modifications de la pharmacocinétique du clentiazem chez le chien insuffisant cardiaque. "Club de Recherche Clinique du Québec", 1991. *Médecine Sciences*, 1991; 7(1): p10.
15. A. K.-Laflamme, R. Cardinal, C. Lambert: Effect of congestive heart failure on clentiazem pharmacokinetics in a dog model. "Journée scientifique sur la Recherche Fondamentale avec le Clentiazem", Laboratoires Nordic, Inc., Montréal, Québec, Mai 1991.
16. A. K.-Laflamme, R. Cardinal, C. Lambert: Modifications de la pharmacocinétique du clentiazem chez le chien insuffisant cardiaque. "Journée de la Recherche du Département de Médecine", Hôpital du Sacré-Coeur de Montréal, Montréal, Québec, Mai 1991.
17. A. K.-Laflamme, R. Cardinal, J. LeGuerrier, D. Papin and J. de Champlain: Enhanced sensitivity of adenylyl cyclase during the development of cardiac hypertrophy in a rat model of myocardial infarct. "Sixth European Meeting on Hypertension", Société Européenne d'Hypertension 1993, Supp 95, p383.
18. A. K.-Laflamme, R. Cardinal et J. de Champlain: Activité du système β -adrénergique cardiaque dans un modèle expérimental d'infarctus du myocarde. "4ième Journée Scientifique du Groupe de Recherche sur le Système Nerveux Autonome", Université de Montréal, Montréal, Québec, Décembre 1993.
19. A. K.-Laflamme, R. Cardinal et J. de Champlain: Modifications de la sensibilité de la voie de signalisation transmembranaire β -adrénergique dans un modèle d'hypertrophie cardiaque. "XIII^es Journées de l'Hypertension Artérielle", Paris, France, Décembre 1993. *Journal of Hypertension*, 1994, 12(9): p1120-1121.
20. L. Oster, A. K.-Laflamme, P. Moreau, J. de Champlain: Effet d'un traitement chronique par le losartan sur la fonction endothéliale vasorelaxante chez le rat spontanément hypertendu. "XIII^es Journées de l'Hypertension Artérielle", Paris, France, Décembre 1993. *Journal of Hypertension*, 1994, 12(9): p1122-1123.
21. A. K.-Laflamme, L. Oster, P. Moreau, R. Cardinal, J. de Champlain: Effets du losartan et de l'énalaprilat sur la sensibilité du système β -adrénergique cardiaque chez le rat spontanément hypertendu. "2^e Réunion scientifique annuelle de la société Québécoise d'Hypertension Artérielle", Montréal, Québec, Janvier 1994.
22. A. K.-Laflamme, L. Oster, P. Moreau, R. Cardinal, J. de Champlain: Effect of chronic treatment with losartan and enalaprilat on β -adrenergic signal transduction sensitivity in the heart of SHR. "15th Scientific Meeting of the International Society of Hypertension", Melbourne, Australie, Mars 1994. *Journal of Hypertension*, 1994; 12 (Supp 3): p S492.

23. L. Oster, **A. K.-Laflamme**, P. Moreau, J. de Champlain: Effect of losartan and enalaprilat on the endothelium-dependent relaxation in spontaneously hypertensive rats. "15th Scientific Meeting of the International Society of Hypertension", Melbourne, Australie, Mars 1994. *Journal of Hypertension*, 1994; 12 (Supp 3): p S485.
24. L. Oster, **A. K.-Laflamme**, P. Moreau, J. de Champlain: Effect of losartan and enalaprilat on inositol phosphate accumulation in aorta of SHR. "15th Scientific Meeting of the International Society of Hypertension", Melbourne, Australie, Mars 1994. *Journal of Hypertension*, 1994; 12 (Supp 3): pS486.
25. **A. K.-Laflamme**, L. Oster, R. Cardinal, J. de Champlain: Influence of losartan and enalaprilat on cardiac adenylyl cyclase pathway in long-term nitric oxide blockade-induced hypertension. "IUPHAR", Montréal, Québec, Juillet 1994. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*, 1994; 72 (Supp 1): p133.
26. L. Oster, **A. K.-Laflamme**, S. Foucart, J. de Champlain: Effect of losartan on the function of mesenteric arteries after chronic nitric oxide synthase inhibition in the rat. "IUPHAR", Montréal, Québec, Juillet 1994. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*, 1994; 72 (Supp 1): p133.
27. P. Moreau, L. Oster, **A. K.-Laflamme**, C. Lambert, J. de Champlain: Relationship between the plasma level and the efficacy of losartan during a chronic treatment in the rat. "IUPHAR", Montréal, Québec, Juillet 1994. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*, 1994; 72 (Supp 1): p178.
28. **A. K.-Laflamme**, L. Oster, R. Cardinal, J. de Champlain: Effect of angiotensin inhibitors on β -adrenergic coupled adenylyl cyclase sensitivity in the heart of spontaneously hypertensive rats. "The Royal College of Physicians and Surgeons of Canada, Annual Meeting", Toronto, Ontario, Septembre 1994. *Clinical and Investigative Medicine*, 1994; 17 (Supp B): p B67.
29. L. Oster, **A. K.-Laflamme**, S. Foucart, J. de Champlain: Effect of losartan on endothelial function of mesenteric arteries after long-term nitric oxide synthase inhibition. "The Royal College of Physicians and Surgeons of Canada, Annual Meeting", Toronto, Ontario, Septembre 1994. *Clinical and Investigative Medicine*, 1994; 17 (Supp B): p B68.
30. **A.K.-Laflamme**, L. Oster, R. Cardinal, J. de Champlain: Caractérisation du modèle d'hypertension induit par le L-NAME chez le rat. "5ième Journée Scientifique du Groupe de Recherche sur le Système Nerveux Autonome", Université de Montréal, Montréal, Québec, Décembre 1994.
31. **A.K.-Laflamme**, L. Oster, R. Cardinal, J. de Champlain: Caractérisation du rôle des systèmes sympathique et rénine-angiotensine dans le modèle d'hypertension induit par l'administration chronique de L-NAME chez le rat. "XIV^{es} Journées de l'Hypertension Artérielle", Paris, France, Décembre 1994. *Archives des maladies du coeur et des vaisseaux*, décembre 1994; 87: p45
32. **A.K.-Laflamme**, L. Oster, R. Cardinal, J. de Champlain: Implications du système sympathique et de l'angiotensine II dans le développement de l'hypertension induite par le L-NAME chez le rat. "3^e Réunion Scientifique Annuelle de la Société Québécoise d'Hypertension Artérielle", Québec, Québec, Janvier 1995. *Médecine Sciences*, 1995; 11 (Supp 1): p9.
33. L. Oster, **A. K.-Laflamme**, S. Foucart, J. de Champlain: Réactivité vasculaire α -adrénergique et rôle de l'endothélium dans l'hypertension induite par le L-NAME chez le rat. "3^e Réunion Scientifique Annuelle de la Société Québécoise d'Hypertension Artérielle", Québec, Québec, Janvier 1995. *Médecine Sciences*, 1995; 11 (Supp 1): p12.
34. **A.K.-Laflamme**, L. Oster, S. Foucart, R. Cardinal, J. de Champlain: Effect of angiotensin inhibitors on the sympathetic system function and reactivity in spontaneously hypertensive rats. "Seventh European Meeting on Hypertension", Milan, Italie, Juin 1995. *Société Européenne d'Hypertension* 1995, Supp 103, p100-101.
35. L. Oster, **A. K.-Laflamme**, S. Foucart, J. de Champlain: Effect of losartan on endothelial functions of mesenteric arteries in experimental models of hypertension. "Seventh European Meeting on Hypertension", Milan, Italie, Juin 1995. *Société Européenne d'Hypertension* 1995, Supp no 103, p140.
36. **A.K.-Laflamme**, S. Foucart, L. Oster, R. Cardinal, J. de Champlain: Effect of renin-angiotensin system blockade on basal and reflex cardiovascular and sympathetic functions in spontaneously hypertensive rats. "The Inter-American Society of Hypertension", Montréal, Québec, Juin 1995. *Hypertension*, 1995; 25(6), p1360.
37. L. Oster, **A. K.-Laflamme**, S. Foucart, J. de Champlain: Losartan improves endothelial functions of mesenteric arteries in three experimental models of hypertension. "The Inter-American Society of Hypertension", Montréal, Québec, Juin 1995. *Hypertension*, 1995; 25(6), p1373.
38. **A.K.-Laflamme**, L. Oster, R. Cardinal, J. de Champlain: Regression of cardiac and kidney hypertrophy in DOCA-salt hypertension with chronic L-NAME administration in the rat. "The Royal College of Physicians and Surgeons of Canada, Annual Meeting", Montréal, Québec, Septembre 1995. *Clinical and Investigative Medicine*, 1995; 18(4): pB73.

39. A.K.-Laflamme, R. Cardinal, J. de Champlain: Hypotensive effect and inhibition of basal sympathetic tone by acute melatonin treatment in spontaneously hypertensive rats. "16th Scientific Meeting of the International Society of Hypertension", Glasgow, UK, Juin 1996. *Journal of Hypertension*, 1996; 14 (Supp 1): pS110.
40. A.K.-Laflamme, L. Wu, R. Cardinal, J. de Champlain: Attenuated sympathetic system in the hypotensive effect of acute melatonin treatment in spontaneously hypertensive rats. "The Royal College of Physicians and Surgeons of Canada, Annual Meeting", Halifax, Nouvelle-Écosse, Septembre 1996. *Clinical and Investigative Medicine*, 1996; 19(4): pS38.
41. A.K.-Laflamme, L. Wu, R. Cardinal, J. de Champlain: Antihypertensive action of melatonin associated to attenuated sympatho-adrenal tone and postsynaptic sympathetic activity in spontaneously hypertensive rats. "The VII International Symposium of the Autonomic Nervous System", Montreal, Québec, Octobre 1996. *Clinical Autonomic Research*, 1996; 6(5): 293-294.
42. A.K.-Laflamme, L. Wu, S. Foucart, J. de Champlain: Réduction du tonus basal sympathique et de la réactivité α_1 -adrénergique impliquée dans le mécanisme hypotenseur de la mélatonine chez les SHR. "7ième Journée Scientifique du Groupe de Recherche sur le Système Nerveux Autonome", Université de Montréal, Montréal, Québec, Décembre 1996.
43. A.K.-Laflamme, R. Cardinal, J. de Champlain: Effets des bloqueurs du système rénine-angiotensine sur la modulation des récepteurs β -adrénergiques chez le SHR. "XV^es Journées de l'Hypertension Artérielle", Paris, France, Décembre 1996. *Archives des maladies du coeur et des vaisseaux*, Tome 89, Décembre 1996; 7.
44. A.K.-Laflamme, L. Wu, S. Foucart, J. de Champlain: Réduction du tonus basal sympathique et de la réactivité α_1 -adrénergique impliquée dans le mécanisme hypotenseur de la mélatonine chez les SHR. "5^e Réunion Scientifique Annuelle de la Société Québécoise d'Hypertension Artérielle", Québec, Québec, Janvier 1997. *Médecine Sciences*, 1997; 13(Supp 1): 19.
45. A.K.-Laflamme, R. Cardinal, J. de Champlain: Modulation des récepteurs β_1 et β_2 -adrénergiques par les traitements chroniques avec des bloqueurs du système rénine-angiotensine. "5^e Réunion Scientifique Annuelle de la Société Québécoise d'Hypertension Artérielle", Québec, Québec, Janvier 1997. *Médecine Sciences*, 1997; 13(Supp 1): 19.
46. A.K.-Laflamme, L. Wu, S. Foucart, J. de Champlain: Réduction du tonus basal sympathique et de la réactivité α_1 -adrénergique impliquée dans le mécanisme hypotenseur de la mélatonine chez les SHR. "Journée de la Recherche Gabriel Plaa", Université de Montréal, Montréal, Québec, Mai 1997.
47. A.K.-Laflamme, J. de Champlain: The beneficial effect of losartan is partly mediated through the attenuation of the sympathetic pre- and postsynaptic reactivity in SHR. "1st International Symposium on Angiotensin Antagonism", London, UK, Septembre 1997.
48. A.K.-Laflamme, J. de Champlain: The sympathetic reflex reactivity, cardiac β -adrenergic pathway and vascular reactivity are impaired in the SHR but improved after renin-angiotensin blockade. "9th International Symposium on SHR and Cardiovascular Genetics", Montréal, Québec, Novembre 1997.
49. A.K.-Laflamme, R. Cardinal, J. de Champlain: Impaired endothelial functions and regression of hypertrophy with chronic LNAME in DOCA-induced hypertension. "17th Scientific Meeting of the International Society of Hypertension", Amsterdam, Netherlands, Juin 1998.

ANNEXE

Accord des co-auteurs pour l'inclusion
de chacun des articles dans la présente thèse de doctorat

Thèse : *Étude de la Modulation de l'Activité du Système Nerveux Sympathique
dans les Maladies Cardio-Vasculaires:
Rôle du Système Rénine Angiotensine et du Monoxyde d'Azote.*

Par
Annik K.-Laflamme
Département de Pharmacologie,
Université de Montréal

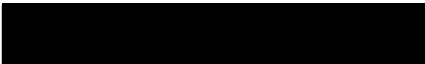

Déclaration des coauteurs d'un article.

Lorsqu'un étudiant n'est pas le seul auteur d'un article inclut dans sa thèse, l'accord doit avoir été obtenu à cet effet et la déclaration ci-dessous signée.

Article 1: EFFECTS OF RENIN-ANGIOTENSIN BLOCKADE ON SYMPATHETIC REACTIVITY AND B-ADRENERGIC PATHWAY IN SHR.

Auteurs : Annik K.-Laflamme, Laurence Oster, René Cardinal, Jacques de Champlain. Groupe de Recherche sur le Système Nerveux Autonome, Département de Pharmacologie (A.K.-L., R.C.) et Département de Physiologie (L.O., J. de C.), Faculté de Médecine, Université de Montréal, Montréal, Québec, Canada, H3C 3J7.
Hypertension 1997; 30(part 1): 278-287.

À titre de co-auteur de l'article mentionné ci-dessous, je suis d'accord pour que Annik K.-Laflamme ait inclus cet article dans sa thèse dont le titre est mentionné ci-haut.

Laurence Oster	signature	date
		13 OCTOBRE 2007
René Cardinal	signature	date
		07/10/2004
Jacques de Champlain	signature	date

N.B. : En 1995, Mme Laurence Oster en quittant le Canada a laissé par procuration l'autorité à Jacques de Champlain d'autoriser tout droits d'auteurs liés aux travaux de recherches fait avec sa collaboration dans ce laboratoire.

Thèse : *Étude de la Modulation de l'Activité du Système Nerveux Sympathique
dans les Maladies Cardio-Vasculaires:
Rôle du Système Rénine Angiotensine et du Monoxyde d'Azote.*

Par

*Annik K.-Laflamme
Département de Pharmacologie,
Université de Montréal*


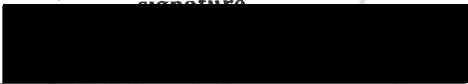



Déclaration des coauteurs d'un article.

Lorsqu'un étudiant n'est pas le seul auteur d'un article inclut dans sa thèse, l'accord doit avoir été obtenu à cet effet et la déclaration ci-dessous signée.

Article 2: SYMPATHETIC FUNCTIONS IN L-NAME-INDUCED HYPERTENSION AND MODULATION BY THE RENIN-ANGIOTENSIN SYSTEM.

Auteurs : Annik K.-Laflamme, Sylvain Foucart, Pierre Moreau, Chantal Lambert, René Cardinal, Jacques de Champlain. Research Group on the Autonomic Nervous System, Faculty of Medicine and Faculty of Pharmacy, Université de Montréal.
Journal of Hypertension, 1998, 16: 63-76

À titre de co-auteur de l'article mentionné ci-dessous, je suis d'accord pour que Annik K.-Laflamme ait inclus cet article dans sa thèse dont le titre est mentionné ci-haut.

Sylvain Foucart	signature 	date 19/10/2004
Pierre Moreau	signature 	date 12/10/04
Chantal Lambert	signature 	date 13 OCTOBER 2004
René Cardinal	signature 	date 07/10/2004
Jacques de Champlain	signature 	date

Thèse : *Étude de la Modulation de l'Activité du Système Nerveux Sympathique
dans les Maladies Cardio-Vasculaires:
Rôle du Système Rénine Angiotensine et du Monoxyde d'Azote.*

Par

Annik K.-Laflamme

Département de Pharmacologie,

Université de Montréal

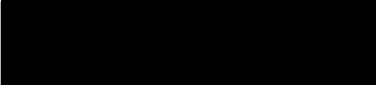
Déclaration des coauteurs d'un article.

Lorsqu'un étudiant n'est pas le seul auteur d'un article inclut dans sa thèse, l'accord doit avoir été obtenu à cet effet et la déclaration ci-dessous signée.

Article 2: SYMPATHETIC FUNCTIONS IN L-NAME-INDUCED HYPERTENSION AND MODULATION BY THE RENIN-ANGIOTENSIN SYSTEM.

Auteurs : Annik K.-Laflamme, Sylvain Foucart, Pierre Moreau, Chantal Lambert, René Cardinal, Jacques de Champlain. Research Group on the Autonomic Nervous System, Faculty of Medicine and Faculty of Pharmacy, Université de Montréal.
Journal of Hypertension, 1998, 16: 63-76

À titre de co-auteur de l'article mentionné ci-dessous, je suis d'accord pour que Annik K.-Laflamme ait inclus cet article dans sa thèse dont le titre est mentionné ci-haut.

<i>Sylvain Foucart</i>		<i>3 MAR 2005</i>
Sylvain Foucart	signature	date
Pierre Moreau	signature	date
Chantal Lambert	signature	date
René Cardinal	signature	date
Jacques de Champlain	signature	date

Thèse : *Étude de la Modulation de l'Activité du Système Nerveux Sympathique
dans les Maladies Cardio-Vasculaires:
Rôle du Système Rénine Angiotensine et du Monoxyde d'Azote.*

Par



*Annik K.-Laflamme
Département de Pharmacologie,
Université de Montréal*

Déclaration des coauteurs d'un article.

Lorsqu'un étudiant n'est pas le seul auteur d'un article inclut dans sa thèse, l'accord doit avoir été obtenu à cet effet et la déclaration ci-dessous signée.

Article 3: ROLE OF NO AND ANGIOTENSIN II IN THE EARLY DEVELOPMENT OF IMPAIRED ENDOTHELIAL FUNCTIONS AND CARDIAC HYPERTROPHY IN DEOXYCORTICOSTERONE ACETATE-SALT HYPERTENSION.

Auteurs : Annik K.-Laflamme, Laurence Oster, René Cardinal, Jacques de Champlain. Research Group on the Autonomic Nervous System, Departments of physiology and pharmacology, Faculty of Medicine, Université de Montréal.
Canadian Journal of Physiology and Pharmacology, 1998; 76: 665-675

Laurence Oster	signature	date
		13 OCTUBRE 2004
René Cardinal	signature	date
		07/10/2004
Jacques de Champlain	signature	date

N.B. : En 1995, Mme Laurence Oster en quittant le Canada a laissé par procuration l'autorité à Jacques de Champlain d'autoriser tout droits d'auteurs liés aux travaux de recherches fait avec sa collaboration dans ce laboratoire.

Thèse : *Étude de la Modulation de l'Activité du Système Nerveux Sympathique
dans les Maladies Cardio-Vasculaires:
Rôle du Système Rénine Angiotensine et du Monoxyde d'Azote.*

Par

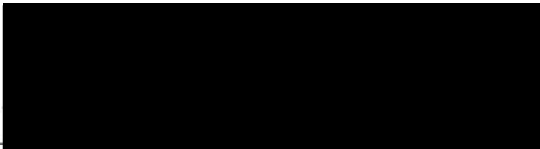
Annik K.-Laflamme

Département de Pharmacologie,

Université de Montréal

Article 4: IMPAIRED BASAL SYMPATHETIC TONE AND α 1-ADRENERGIC RESPONSIVENESS IN ASSOCIATION WITH THE HYPOTENSIVE EFFECT OF MELATONIN IN SPONTANEOUSLY HYPERTENSIVE RATS.

Auteurs : Annik K.-Laflamme, Lingyun Wu, Sylvain Foucart, Jacques de Champlain, Research Group on the Autonomic Nervous System, Department of Pharmacology and Department of Physiology, Faculty of Medicine, Université de Montréal.
Am J Hypertens 1998; 11: 219-229

Lingyun Wu		March 1, 2025
	signature	date
Sylvain Foucart	signature	date
Jacques de Champlain	signature	date

Thèse : *Étude de la Modulation de l'Activité du Système Nerveux Sympathique
dans les Maladies Cardio-Vasculaires:
Rôle du Système Rénine Angiotensine et du Monoxyde d'Azote.*

Par

Annik K.-Laflamme

Département de Pharmacologie,

Université de Montréal

Article 4: IMPAIRED BASAL SYMPATHETIC TONE AND α 1-ADRENERGIC RESPONSIVENESS IN ASSOCIATION WITH THE HYPOTENSIVE EFFECT OF MELATONIN IN SPONTANEOUSLY HYPERTENSIVE RATS.

Auteurs : Annik K.-Laflamme, Lingyun Wu, Sylvain Foucart, Jacques de Champlain, Research Group on the Autonomic Nervous System, Department of Pharmacology and Department of Physiology, Faculty of Medicine, Université de Montréal.
Am J Hypertens 1998; 11: 219-229

Lingyun Wu

signature

date

Sylvain Foucart

signature

date

Jacques de Champlain

signature

date

07/10/2004

Thèse : *Étude de la Modulation de l'Activité du Système Nerveux Sympathique
dans les Maladies Cardio-Vasculaires:
Rôle du Système Rénine Angiotensine et du Monoxyde d'Azote.*

Par

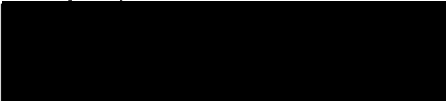
Annik K.-Laflamme

Département de Pharmacologie,

Université de Montréal

Article 4: IMPAIRED BASAL SYMPATHETIC TONE AND α 1-ADRENERGIC RESPONSIVENESS IN ASSOCIATION WITH THE HYPOTENSIVE EFFECT OF MELATONIN IN SPONTANEOUSLY HYPERTENSIVE RATS.

Auteurs : Annik K.-Laflamme, Lingyun Wu, Sylvain Foucart, Jacques de Champlain, Research Group on the Autonomic Nervous System, Department of Pharmacology and Department of Physiology, Faculty of Medicine, Université de Montréal.
Am J Hypertens 1998; 11: 219-229

Lingyun Wu		date
Sylvain Foucart	signature	3 MARS 2005
Jacques de Champlain	signature	date

