



L'hypertension artérielle et les désordres vasculaires induits par l'érythropoïétine recombinante humaine et le système rénine-angiotensine-aldostérone : Effet de l'exercice et des cellules T régulatrices

Tlili Barhoumi

► To cite this version:

Tlili Barhoumi. L'hypertension artérielle et les désordres vasculaires induits par l'érythropoïétine recombinante humaine et le système rénine-angiotensine-aldostérone : Effet de l'exercice et des cellules T régulatrices. Médecine humaine et pathologie. Université d'Avignon, 2011. Français. NNT : 2011AVIG0705 . tel-00924322

HAL Id: tel-00924322

<https://theses.hal.science/tel-00924322>

Submitted on 6 Jan 2014

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

**ACADEMIE D'AIX-MARSEILLE
UNIVERSITE D'AVIGNON ET DES PAYS DE VAUCLUSE**

THESE

Présentée à l'Université d'Avignon et des Pays de Vaucluse
Pour obtenir le grade de

DOCTEUR

SPECIALITE:

Sciences du Mouvement Humain

**L'hypertension artérielle et les désordres vasculaires
induits par
L'érythropoïétine recombinante humaine et le
système rénine-angiotensine-aldostérone.
Effet de l'exercice et des cellules T régulatrices.**

Par

Tlili BARHOUMI

Soutenue le 20 Octobre 2011 devant le jury composé de :

M. LAURANT Pascal, Professeur, Université d'Avignon, France	Directeur de thèse
M. SCHIFFRIN Ernesto.L, Professeur, Université McGill, Canada	Co-directeur
M. SAUMET Jean-Louis, Professeur, Université Claude Bernard Lyon 1, France	Rapporteur
M. JOVER Bernard, Docteur, Université de Montpellier, France	Rapporteur
Mme DEMOUGEOT Céline, Professeur, Université de Franche-Comté, France	Examineur
M. OBERT Philippe, Professeur, Université d'Avignon, France	Examineur
M. PARADIS Pierre, Docteur, Université McGill, Canada	Examineur

RÉSUMÉ

L'hypertension artérielle (HTA) est l'une des pathologies les plus fréquentes et les plus préoccupantes des pays occidentaux. Elle est souvent associée au surpoids, à des maladies rénales, cardiaques et aussi à un dysfonctionnement du système endocrinien. Les désordres vasculaires compliquant l'HTA induite par le traitement par l'érythropoïétine recombinante (r-HuEPO) chez les patients ayant une maladie rénale chronique ou en lien avec une perturbation du système rénine-angiotensine-aldostérone (SRAA), associent une augmentation de la rigidité artérielle, une dysfonction endothéliale, un déséquilibre endothéline-1/monoxyde d'azote (ET-1/NO) et un état inflammatoire. L'inflammation vasculaire contribue à la physiopathologie de l'HTA par l'augmentation du stress oxydatif et l'activation des cellules immunitaires. Plusieurs études ont suggéré que le système immunitaire est impliqué dans le développement des maladies cardiovasculaires. Cependant le rôle des lymphocytes T régulateurs (Treg) dans l'HTA ou d'autres formes de maladies cardio-vasculaires, reste encore largement inconnu. Bien que la majorité des études ont montré que l'HTA induite par l'r-HuEPO est associée à une dysfonction endothéliale et à un déséquilibre du rapport (ET-1/NO), les mécanismes exacts restent à être identifier. Plusieurs études ont montré que l'exercice physique d'endurance prévient l'HTA chez les patients ou les modèles animaux. L'objectif de la première partie du travail est d'étudier l'impact du *shear stress* et de l'exercice sur les désordres vasculaires et l'HTA induits par l'r-HuEPO, en présence d'un déséquilibre endothélial (ET-1/NO). Pour ce faire, trois environnements ont été utilisés (in vitro (cellules en culture), ex vivo (artères mésentériques) et in vivo (souris transgéniques sur-exprimant l'ET-1 au niveau de l'endothélium). Nos résultats montrent que l'association L-NAME/r-HuEPO est responsable d'une vasoconstriction flux-dépendante et une augmentation accrue du *shear stress* correspondant (plus de 25 dyn/cm²). Le Bosentan, inhibiteur non sélectif des récepteurs de l'ET-1, empêche la vasoconstriction flux-dépendante engendrée par la combinaison L-NAME/rHu-EPO, sans pour autant corriger la vasodilatation; Le traitement des souris transgéniques eET-1 avec l'r-HuEPO augmente la pression artérielle systolique, la concentration plasmatique en ET-1, le stress oxydatif, l'infiltration des monocytes et des macrophages aortiques (MOMA-2), le taux des cytokines pro-inflammatoires INF- γ , TNF- α et IL-6 et exacerbe la dysfonction endothéliale. L'exercice physique prévient tous les effets délétères engendrés par l'administration de l'r-HuEPO. Il est à noter aussi que l'exercice augmente le nombre des cellules Foxp3 positives dans la rate et le cortex rénal.

Quant à la deuxième partie, il s'agissait de tester l'effet du transfert adoptif des Treg sur l'HTA et les désordres vasculaires induits par l'administration d'angiotensine II ou d'aldostérone à des souris. Nos résultats montrent que le transfert adoptif des Treg prévient l'hypertension artérielle induite par l'Ang II, l'altération de la vasodilatation endothélium-dépendante, prévient l'augmentation de la rigidité des artères mésentériques, diminue le stress oxydatif et les taux plasmatiques des cytokines pro-inflammatoires (INF- γ , TNF- α et IL-6), ainsi que l'infiltration aortique et rénale des macrophages. Le transfert adoptif des Treg prévient partiellement l'augmentation de la pression artérielle systolique induite par l'Aldo, prévient l'altération de la vasodilatation endothélium-dépendante et le remodelage hypertrophique des artères mésentériques, diminue le stress oxydatif et l'infiltration des cellules immunitaires inflammatoires. Le transfert adoptif des cellules T effectrices (Teff) exacerbe la majorité des effets de l'Aldo. Nos résultats justifient, d'une part, l'importance de l'exercice comme outil préventif de l'HTA induite par l'r-HuEPO, et d'autre part, présentent les Treg comme élément essentiel dans la modulation de l'HTA et des désordres cardiovasculaires.

Mots clés: Hypertension, cellules T régulateurs, *shear stress*, endothéline-1, exercice, r-HuEPO.

ABSTRACT

Hypertension (HTN) is one of the most frequent disease and is of greatest concern in Western countries. HTN is often associated with overweight, kidney, heart and endocrine system disease. Vascular disorders, associated with HTN induced by erythropoietin (r-HuEPO) treatment in chronic kidney disease or in case of disruption of the renin-angiotensin-aldosterone system (RAAS), associated increase in arterial stiffness, endothelial dysfunction, unbalanced endothelin-1/nitric oxide ratio (ET-1/NO) and inflammation. Vascular inflammation contributes to the pathophysiology of hypertension by increasing oxidative stress and activation of immune cells. Several studies have suggested that the immune system is involved in the development of cardiovascular disease. However, the role of regulatory T cells (Treg) in HTN and other forms of cardiovascular diseases remains largely unknown. In addition, most of the studies have shown that hypertension induced by r-HuEPO is related to endothelial dysfunction and the ratio (ET-1/NO). The exact mechanisms remain to be identified. Several studies have shown that physical exercise prevents HTN in patients or animal models. The aim of the first part of this work is to study the impact of shear stress and exercise on HTN and vascular disorders induced by r-HuEPO, in the presence of an endothelial imbalance (ET-1/NO). This was carried out in three settings: in vitro (culture cells), ex vivo (mesenteric arteries) and in vivo (transgenic mice overexpressing ET-1 in endothelial cells). Our results show that the association L-NAME/r-HuEPO is responsible for a significant decrease in intravascular diameter, in response to elevated intravascular flow resulting in a flow-dependent vasoconstriction and increased corresponding shear stress (more than 25 dyn/cm²). Bosentan (a non-selective antagonist of ET-1 receptors) inhibits flow-dependent vasoconstriction induced by the combination L-NAME/rHu-EPO without correcting vasodilation. Treatment of ET-1 transgenic mice with r-HuEPO increases systolic blood pressure, ET-1 plasma concentration, oxidative stress, infiltration of aortic monocytes and macrophages (MOMA-2), pro-inflammatory cytokines levels INF- γ , TNF- α and IL-6 and exacerbate endothelial dysfunction. Exercise prevents all the deleterious effects of r-HuEPO. It is also noteworthy that exercise increases the number of Foxp3-positive cells in the spleen and renal cortex. Then, the second aim of our study was to test the effect of adoptive transfer of Treg cells on HTN and vascular disorders induced in mice treated with angiotensin II (Ang II) or aldosterone (Aldo). Our results show that adoptive transfer of Treg prevents Ang II induced hypertension, endothelial dysfunction, prevents stiffness of mesenteric arteries, decreases oxidative stress and plasma levels of pro-inflammatory cytokines (IFN- γ , TNF- α and IL-6) and the aortic and renal infiltration of macrophages. Adoptive transfer of Treg prevents the increase in systolic blood pressure induced by Aldo, prevents impaired endothelium-dependent vasodilatation and hypertrophic remodelling of mesenteric arteries, decreases oxidative stress and infiltration of inflammatory immune cells. The adoptive transfer of T effectors cells (Teff) exacerbates the majority of the Aldo effects. Our results justify, on one hand, the importance of exercise as a preventive tool for hypertension induced by r-HuEPO, and on the other hand, highlight the role of Treg as an essential component in the modulation of hypertension and cardiovascular disorders.

Keywords: hypertension, regulatory T cells, shear stress, endothelin-1, exercise, r-HuEPO.

REMERCIEMENTS

Merci dieu

Je souhaite remercier en premier lieu tous les membres du jury qui m'ont fait l'honneur d'accepter de juger ce travail.

Je remercie Monsieur le Professeur Jean-Louis SAUMET et Monsieur le Docteur Bernard JOVER de m'avoir fait le grand bonheur d'évaluer ce travail et d'en être les rapporteurs. Pour l'intérêt qu'ils y ont porté. Je voudrais leurs exprimer toute ma gratitude.

Je tiens également à remercier Monsieur le Professeur Philippe OBERT, Madame le Professeur Céline DEMOUGEOT et Monsieur le Docteur Pierre PARADIS qui m'ont fait l'honneur d'accepter d'être examinateurs de ce travail et de participer à ce jury.

"Les bons chefs font les bons ouvriers"

J'adresser ma plus sincère gratitude à mon directeur de thèse, Monsieur le Professeur Pascal LAURANT, Je tiens à vous remercier tout particulièrement pour m'avoir initié à la recherche scientifique. Votre passion et votre enthousiasme pour la recherche sont contagieux.

Merci, merci, merci Boss pour votre soutien, vos conseils et votre confiance.

À mon co-directeur de thèse, Dr Ernesto L. Schiffrin. Merci, de m'avoir accueilli au sein de votre laboratoire et de m'avoir offert l'opportunité et le privilège de travailler dans votre service à l'*Institut de recherches médicales Lady Davis, « Unité de recherche en hypertension artérielle et biologie vasculaire »*

Merci, Boss pour votre soutien, vos conseils et votre confiance.

À tous mes collègues à l'Unité de recherche en hypertension artérielle et biologie vasculaire

À tous mes anciens collègues de l'équipe EA4267 « Sciences Séparatives Biologiques et Pharmaceutiques » et aux membres de l'équipe EA4278 « Physiologie et physiopathologie des Adaptations cardiovasculaires et à l'Exercice »

A la mémoire de mon père.

À toute ma famille en Tunisie et au Canada. Particulièrement à ma mère, ma femme et mes frères et sœurs.

À tous mes amis sportifs en Tunisie, France et Canada.

Je tiens à remercier toutes les personnes m'ayant aidé de près ou de loin tout au long de mon parcours.

Table des matières

INTRODUCTION ET POSITION DU PROBLÈME	11
CHAPITRE 1-SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE	15
I. Les désordres vasculaires associés à l'hypertension artérielle (HTA).....	16
1. Le remodelage vasculaire.....	17
2. La dysfonction endothéliale	19
3. Le rôle de la cascade stress oxydatif/inflammation	20
II. L'HTA secondaire au traitement r-HuEPO: importance des facteurs hémodynamiques et des agents vasoactifs dérivés de l'endothélium (ET-1, NO).....	24
1. Les effets cardiovasculaires de l'r-HuEPO	26
2. Physiopathologie de l'HTA secondaire à un traitement à l'r-HuEPO.....	27
3. L'importance des agents vasoactifs (NO et ET-1) dans la physiopathologie de l'HTA secondaire au traitement par l'r-HuEPO.	29
III. Système rénine-angiotensine-aldostérone et HTA induite : importance du processus inflammatoire	34
1. Implication de l'Angiotensine-II dans la régulation de la fonction cardiovasculaire et la pathologie de l'HTA.....	35
2. Implication de l'aldostérone dans la fonction cardiovasculaire et l'HTA	37
IV. L'exercice physique : élément de prévention de l'HTA et des désordres cardiovasculaires	40
1. Exercice et HTA : observation cliniques et expérimentales	40
2. Exercice et dysfonction endothéliale.....	41
3. Exercice et processus inflammatoire.....	43
4. Exercice et HTA associée au traitement avec l'r-HuEPO.....	45
V. Les cellules T régulatrices (Treg): éléments cellulaires de prévention des désordres cardiovasculaires	46
1. Inflammation vasculaire et rôle du système immunitaire	46
2. Importance du système immunitaire dans la pathologie cardiovasculaire et l'HTA	52
3. Rôle des Treg dans l'HTA	53
CHAPITRE 2 -PERTINENCE ET OBJECTIFS DE RECHERCHE	58
I. Les objectifs généraux.....	59
- CHAPITRE 3 : LES ÉTUDES	61

ÉTUDE 1 -L'ÉRYTHROPOÏÉTINE RECOMBINANTE HUMAINE ALTÈRE LA VASODILATATION FLUX-DÉPENDANTE D'ARTÈRES MÉSENTÉRIQUES DE RATS PERFUSÉES IN VITRO, EN PRÉSENCE D'UN DÉSÉQUILIBRE DU RATIO ENDOTHÉLIAL ENDOTHÉLINE-1/MONOXYDE D'AZOTE	62
1. But de l'étude	63
2. Méthode (<i>voir publication jointe pour les détails</i>).....	64
2.1 Prélèvement et montage de l'artère mésentérique.....	64
2.2 Protocole de perfusion et d'incubation.....	64
2.3 Culture cellulaire	64
3. Principaux résultats	65
3.1 Effet du L-NAME et de l'r-HuEPO sur le diamètre de base de la lumière vasculaire.....	65
3.2 Effet de l'r-HuEPO sur les changements du diamètre intravasculaire induit par l'élévation du débit intravasculaire et des forces de cisaillement (<i>shear stress</i>)	65
3.3 Effet du Bosentan sur la réponse vasculaire induite par l'élévation du débit intravasculaire en présence de L-NAME/rHu-EPO	65
3.4 Effet du L-NAME et de l'r-HuEPO sur la réponse vasoconstrictrice de l'ET-1 d'artères mésentériques perfusées et pressurisées	66
3.5 Effet du L-NAME et de l'r-HuEPO sur la concentration d'ET-1 de cellules endothéliales en cultures exposées au <i>shear stress</i>	66
4. Discussion et conclusion	76
ÉTUDE 2 -L'HYPERTENSION ARTERIELLE ET LE STRESS OXYDATIF PROVOQUES PAR L'ERYTHROPOIETINE RECOMBINANTE HUMAINE SONT CORRIGES PAR L'EXERCICE CHEZ UN MODELE DE SOURIS TRANSGENIQUE SUREXPRESSANT L'ENDOTHELIN-1 ENDOTHELIALE.	78
1. But de l'étude	79
2. Méthode.....	80
2.1 Animaux	80
2.2 Protocole d'exercice	80
2.3 Étapes de l'investigation	81
3. Principaux Résultats.....	81
3.1 Effet du traitement avec l'r-HuEPO sur les souris eET-1	81
3.2 Effet de l'exercice physique	82
4. Discussion et conclusion	114
ÉTUDE 3 -HTA ET SRAA: IMPLICATION DE L'INFLAMMATION ET DU SYSTÈME IMMUNITAIRE (RÔLE DES CELLULES T RÉGULATRICES)	117
I. Les lymphocytes T régulatrices empêchent l'hypertension et les lésions vasculaires induites par l'angiotensine II	118

1. But de l'étude	118
2. Méthode.....	119
2.1 Animaux	119
2.2 Isolation et transfert adoptif des cellules Treg et des Teff	119
2.3 Évaluation de la fonction endothéliale	120
3 Résultats principaux	120
3.1 Le transfert adoptif des cellules T régulatrices prévient l'HTA induite par l'Ang II.....	120
3.2 Le transfert adoptif des Treg prévient l'altération de la vasodilatation endothélium-dépendante induite par l'Ang II	120
3.3 Le transfert adoptif des Treg prévient la rigidité des artères mésentériques induite par l'Ang II.....	120
3.4 Le transfert adoptif des Treg diminue le stress oxydatif induit par l'Ang II.....	120
3.5 Le transfert adoptif des Treg diminue les réponses immunitaires induites par l'Ang II.....	121
4 Discussion et conclusion	134
ÉTUDE 4 -IMPLICATION DE L'INFLAMMATION ET DU SYSTÈME IMMUNITAIRE (RÔLE DES CELLULES T RÉGULATRICES).....	136
I. Les lymphocytes T régulatrices empêchent l'hypertension et les lésions vasculaires induits par l'aldostérone.....	137
1. But de l'étude	137
2. Méthode.....	137
2.1 Animaux	137
2.2 Isolation et transfert adoptif des cellules Treg et des Teff	138
2.3 Évaluation de la fonction endothéliale	138
3. Résultats principaux	139
3.1 Le transfert adoptif des Treg prévient l'augmentation de la pression artérielle systolique induite par l'Aldo.	139
3.2 Le transfert adoptif des Treg prévient l'altération de la vasodilatation endothélium-dépendante induite par l'Aldo	139
3.3 Le transfert adoptif des Treg prévient le remodelage hypertrophique induit par l'Aldo sur les artères mésentériques	139
3.4 Le transfert adoptif des Treg diminue le stress oxydatif induit par l'Aldo	139
3.5 Le transfert adoptif des Treg diminue l'infiltration des cellules immunitaires inflammatoires induite par l'Aldo	139
4. Discussion et conclusion	160
DISCUSSION GÉNÉRALE ET CONCLUSION.....	162

BIBLIOGRAPHIE	169
ANNEXES	214

GLOSSAIRE

Akt : protéine kinase B
APC : cellules présentatrices d'antigène (*antigen-presenting cell*)
Ang II: angiotensine II
Aldo: aldostérone
AT1: récepteurs type 1 de l'angiotensine II
ARBs: les bloqueurs des récepteurs de l'angiotensine II (*Angiotensin II receptor blockers*)
ARNm: acide ribonucléique messenger
Ca²⁺: calcium
CE: cellules endothéliales
COX-2: cyclo-oxygénase-2
DC : cellules dendritiques (*dendritic cells*)
EDHF : facteur hyperpolarisant dérivé de l'endothélium (endothelium-derived hyperpolarizing factors)
eNOS : NO synthase endothéliale (endothelial nitric oxide synthase)
EPO : érythropoïétine
EPOR : récepteurs spécifiques à l'EPO
ET-1 : endothéline-1
ETA et ETB : récepteurs type A et B de l'endothéline-1
GCs : guanylate cyclase soluble
ECA : enzyme de conversion de l'angiotensine II
EPC : cellules précurseurs endothéliales (*endothelial precursor cells*)
FACS : Tri cellulaire activé par fluorescence (*Fluorescence-activated cell sorting*)
FOXP3 : marqueurs spécifique des Treg (*X-linked forkhead/winged helix-3*)
G6PD : glucose-6-phosphate déshydrogénase
HTA : hypertension artérielle
HDL-c : cholestérol des lipoprotéines de haute densité (High density lipoprotein cholesterol)
H₂O₂ : peroxyde d'hydrogène
H₂O : l'eau
ICAM-1 : molécule d'adhésion intracellulaire-1 (*Intercellular adhesion molecule-1*)
IL-6 : interleukine-6
IL-4 : interleukine-4
IL-10 : interleukine-10
IRC : insuffisance rénale chronique
IFN-γ : interféron-γ
JNK : *c-Jun-N-terminal kinase*
LDL-c : cholestérol des lipoprotéines de faible densité (*low density lipoprotein-cholesterol*)
L-NAME : *N-nitro-L-arginine methyl ester*
LPS : lipopolysaccharide
MAP-Kinase : protéine-kinase activée par les mitogènes (*Mitogen-activated protein kinase*)
MMP9 : métalloprotéinases 9
MMP2 : métalloprotéinases 2
MEC : matrice extra-cellulaire
MCP-1 : protéine chimotactique de monocytes de type 1 (monocyte chemotactic protein-1)
MCV : maladies cardiovasculaires

MR : récepteurs des minéralocorticoïdes
 NADPH oxydase : nicotinamide adénine dinucléotide phosphate oxydase
 NF-kappa B : facteur nucléaire-kappa B
 NO: monoxyde d'azote (*nitric oxide*)
 NOS: NO synthase (*nitric oxide synthase*)
 NK : cellules naturelles tueuses (*Natural killer cells*)
 •O₂⁻: anion superoxide
 PA : Pression artérielle
 PAS : Pression artérielle systolique
 PGI₂: prostacycline
 Q: débit cardiaque
 R: résistances périphériques vasculaires totales
 r-HuEPO : érythropoïétine recombinante humaine. (*recombinant human erythropoietin*)
 ROS: Espèces réactives de l'oxygène (*Reactive oxygen species*)
 RONS: ROS natives et azotées
 Shear stress: forces de cisaillement
 SHR: rats spontanément hypertendus
 SNP : nitroprussiate de sodium
 SRAA : système rénine-angiotensine-aldostérone
 SOD: superoxyde dismutase
 SC: sous-cutanée
 IV : intraveineuse
 Treg : cellules T régulatrices
 Teff : cellules T effectrices
 Th1: cellules T auxiliaires (*T helper cells*)
 TCR : récepteurs des cellules T (*T cell receptor*)
 TGF-β : Facteur de croissance (*Transforming growth factor*)
 TNF-α : facteur de nécrose tumorale (*Tumor necrosis factor-α*)
 VCAM-1: molécule d'adhésion vasculaire-1 (*Vascular cell adhesion molecule*)

INTRODUCTION ET POSITION DU PROBLÈME

La pression artérielle (PA) est déterminée par le débit cardiaque (Q), le volume sanguin et les résistances périphériques vasculaires totales (R) tel que $PA=Q \times R$. Les élévations passagères de la pression artérielle (par exemple à l'occasion d'un effort ou d'une émotion) sont liées principalement à une stimulation de la fonction cardiaque et une augmentation du débit cardiaque. Il existe cependant plusieurs autres causes qui font intervenir des facteurs vasculaires à l'origine de l'élévation des résistances périphériques vasculaires, notamment la stimulation sympathique, la réduction de la masse néphronique, la stimulation du système rénine-angiotensine-aldostérone (SRAA), le déséquilibre dans la production des substances vasoactives notamment l'endothéline-1 (ET-1) et le monoxyde d'azote (NO) ainsi que les traitements thérapeutiques à base d'hormones de synthèse comme l'érythropoïétine recombinante humaine (r-HuEPO).

La r-HuEPO est une glycoprotéine thérapeutique reconnue pour traiter l'anémie. Son utilisation n'est cependant pas sans risque pour la fonction cardiovasculaire. En réponse à une vasoconstriction artérielle et/ou une hyperviscosité sanguine induite par son utilisation chronique, lorsqu'elle est administrée chez les insuffisants rénaux (Krapf et Hulter 2009), la r-HuEPO augmente la pression artérielle et peut aggraver une hypertension artérielle (HTA) déjà existante. Parmi les éléments impliqués dans l'HTA induite par la r-HuEPO citons le système de l'ET-1 (Rodrigue et al. 2003), l'inflammation, le stress oxydatif (Rancourt et al. 2010) et le SRAA (Lebel et al. 2006).

Le SRAA est l'un des régulateurs les plus importants de la PA. Il implique l'angiotensine II et l'aldostérone comme effecteurs. Le SRAA agit au niveau circulatoire, endocrinien et tissulaire. C'est le médiateur principal de la vasoconstriction, la prolifération cellulaire et la rétention de sodium (Hsueh et Wyne 2011). Il agit sur les vaisseaux, le rein et le cœur pour contrôler la PA. Les études faites sur le SRAA ont permis d'établir plusieurs approches thérapeutiques afin de comprendre et de contrôler de façon efficace les différents risques cardiovasculaires induits par le SRAA (Alreja et Joseph 2011). En cas d'HTA, l'activation chronique du SRAA conduit à la dysfonction endothéliale, l'augmentation du tonus vasculaire, la fibrose et la thrombose (Rautureau et al. 2011). Comme la r-HuEPO, le SRAA participe également au processus inflammatoire associé à l'HTA (Li et al. 1998; Rautureau et al. 2011).

L'HTA induite par le traitement avec la r-HuEPO ou par la sollicitation du SRAA est

donc associée à un processus inflammatoire vasculaire et un stress oxydatif (Rancourt et al. 2010; Rautureau et al. 2011). L'inflammation joue un rôle clé dans le remodelage et la croissance vasculaire, ainsi que la prolifération des cellules musculaires lisses vasculaires (CMLV). Elle entraîne l'augmentation de l'expression des molécules d'adhésion, l'extravasation des leucocytes, l'activation des cellules immunitaires, la production des cytokines et l'augmentation du stress oxydatif.

Le stress oxydatif et l'inflammation sont deux processus étroitement liés et qui sont présents dans tous les désordres vasculaires associés à l'HTA. Ces deux éléments agissent dans un cercle vicieux, puisque le stress oxydatif stimule l'inflammation via la production des cytokines, l'adhésion moléculaire ainsi que l'activation et la prolifération des lymphocytes. Quant à l'inflammation, elle peut être à l'origine d'un stress oxydatif en favorisant la production des radicaux libres oxygénés (ROS) (Barton et al. 2000; Ni et al. 2004).

L'interaction entre certaines populations de leukocytes telles que les neutrophiles, lymphocytes, monocytes/macrophages et les cellules vasculaires module la fonction vasculaire et participe à l'athérogénèse (Ross 1999). Ceci stimule le stress oxydatif et l'inflammation à travers l'expression accrue des molécules d'adhésion, des cytokines, des chimiokines, des métalloprotéinases matricielles et des facteurs de croissance (Ross 1999). D'où le rôle modulateur du système immunitaire dans le développement des désordres cardiovasculaires notamment l'HTA, comme l'implication des cellules T effectrices (Th1, Th2, Th17), ou les cellules T régulatrices (CD4+, CD8+, CD25+) qui semblent avoir un effet opposé à la progression de l'HTA et les désordres vasculaires induits (Harrison et al. 2010; Leibowitz et al. 2011). Les désordres vasculaires associés à l'HTA, lorsque celle-ci n'est pas contrôlée, peuvent avoir plusieurs conséquences et complications graves sur le système cardiaque: hypertrophie, détérioration du muscle cardiaque, insuffisance cardiaque, insuffisance coronaire, athérosclérose (Schulz et al. 2011). Spasmes, rétrécissement des artérioles, apparition d'exsudats ou d'hémorragies, d'œdème papillaire, thrombose, infarctus du myocarde, accident vasculaire cérébral hémorragique ou ischémique sont autant de complications associées aux désordres vasculaires (Randall 1991; Schulz et al. 2011). L'altération de la fonction rénale est souvent très précoce et modérée, mais elle est susceptible de s'aggraver progressivement pour atteindre l'insuffisance rénale.

Alors que le stress oxydatif et le système inflammatoire sont très impliqués dans la

physiopathologie de l'HTA et les désordres vasculaires induits (Meng et al. 2003; Rodriguez-Iturbe et al. 2003), l'exercice améliore la fonction endothéliale (Gielen et al. 2003), diminue le stress oxydatif (Adams et al. 2005) et joue un rôle anti-inflammatoire (Hopps et al. 2011). C'est un élément reconnu scientifiquement essentiel dans la prévention des maladies cardiovasculaires et un moyen thérapeutique efficace, sans aucun effet secondaire. L'exercice peut aussi agir sur le stress oxydatif et l'inflammation via des paramètres immunitaires (Petersen et Pedersen 2005). Le système immunitaire est impliqué dans les désordres cardiovasculaires selon une balance entre l'effet délétère des cellules T effectrices et l'effet bénéfique des cellules T régulatrices, ces derniers peuvent être la base d'une nouvelle stratégie thérapeutique dans le traitement de l'HTA.

L'objectif de ce travail sera d'étudier la physiopathologie expérimentale des désordres vasculaires induits par un traitement r-HuEPO ou l'activation du SRAA. Par ailleurs, deux stratégies thérapeutiques (l'exercice ou le transfert des cellules T régulatrices) semblent exercer des propriétés anti-inflammatoires et anti-oxydatives. Une part importante de ce travail sera consacrée à l'étude des effets de l'exercice ou du transfert des cellules T régulatrice sur les paramètres des désordres vasculaires induits par le traitement r-HuEPO ou l'activation du SRAA, souvent associés à une stimulation de la cascade inflammation/stress oxydatif.

- CHAPITRE 1-
SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE

I. Les désordres vasculaires associés à l'hypertension artérielle (HTA)

L'HTA est l'un des facteurs de risque majeurs des maladies cardiovasculaires (MCV). 10 à 15 % de la population française est concernée par l'HTA. Le nombre de personnes traitées est en croissance constante (8,6 à 10,5 millions entre 2000 et 2006). La prise en charge a coûté près de 2,3 milliards d'euros en 2006, rien que pour les médicaments antihypertenseurs. Chez deux patients traités sur trois, l'HTA n'est pas suffisamment contrôlée et ce chiffre est encore plus élevé pour les patients à haut risque cardiovasculaire: 85 % des diabétiques et 95 % des insuffisants rénaux.

La pression artérielle est un paramètre dynamique régulé par de nombreux facteurs (Fig. 1). Le débit cardiaque, les résistances périphériques vasculaires sont des paramètres hémodynamiques qui influencent directement, à court terme, la pression artérielle (PA). À long terme, les mécanismes rénaux et volumiques ajustent la balance sodée. Par ses fonctions endocrines, le rein assure une augmentation de la natriurèse devant toute élévation de PA.

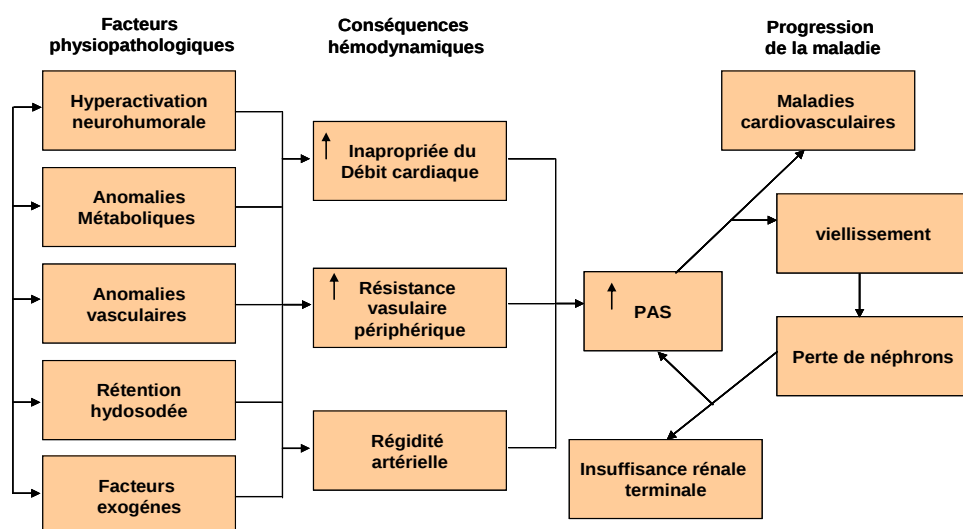


Figure 1. Physiopathologie de l'HTA.

L'HTA est associée à des modifications vasculaires caractérisées par le remodelage vasculaire, la dysfonction endothéliale et l'hyperréactivité vasculaire. Les processus cellulaires qui contrôlent ces perturbations incluent la croissance vasculaire des CMLV, l'apoptose, la fibrose, la calcification, le stress oxydatif et des altérations des voies signalétiques des cellules endothéliales et des cellules contractiles vasculaires. L'inflammation associée à une infiltration des macrophages et une expression accrue des gènes pro-inflammatoires contribue aussi au remodelage vasculaire et aux altérations fonctionnelles qui l'accompagne (Savoia et al. 2011). La plupart de ces altérations vasculaires sont observées suite à un traitement avec l'angiotensine II (Ang II) (Marchesi et al. 2008), l'aldostérone (Aldo) (Hershon 2011; Russo et al. 2007) ou l'r-HuEPO (Heidenreich et al. 1991).

1. Le remodelage vasculaire

L'augmentation des résistances périphériques artérielles, au cours de l' HTA, est due aux changements structuraux et fonctionnels identifiés par le remodelage vasculaire (Haddy et al. 1968; Rizzoni et Agabiti-Rosei 2011). Le remodelage est un processus adaptatif des cellules vasculaires, caractérisé par des modifications morphologiques de la paroi vasculaire (changement de diamètre et d'épaisseur). Il implique la production ou la dégradation de la matrice extracellulaire, la prolifération, la migration et la mort cellulaire (Gibbons and Dzau 1994). Le remodelage vasculaire est stimulé par des facteurs locaux (par exemple les peptides vasoactifs et le stress oxydatif). Il peut être externe hypertrophique (grosses artères) et interne eutrophique ou hypertrophique (les petites artères de résistance) (Fig. 2).

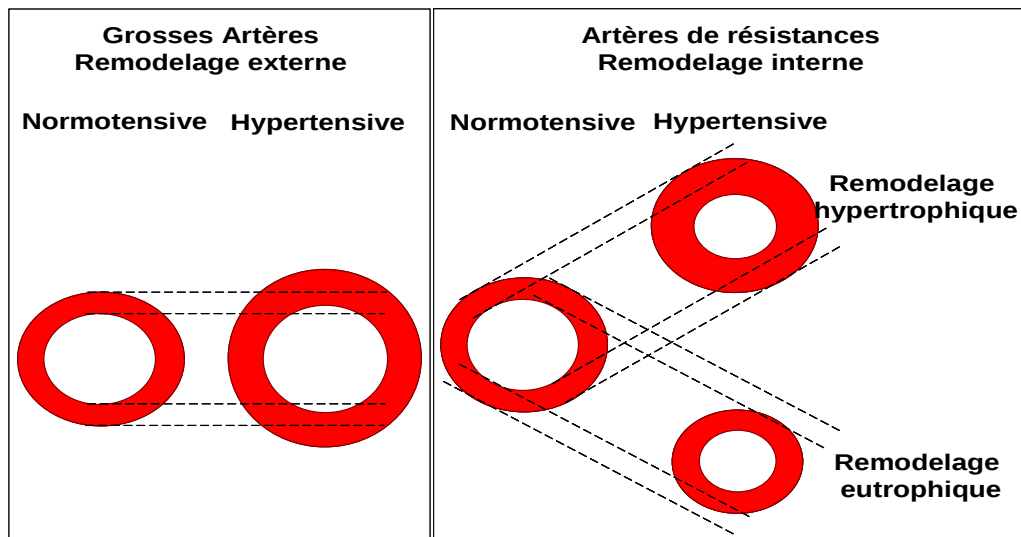


Figure 2. Remodelage vasculaire dans les grosses artères (remodelage externe) et les artères de résistances (remodelage interne): cause et/ou conséquence de l'hypertension artérielle. (Schiffrin 2004).

Le remodelage vasculaire externe se caractérise par une augmentation du diamètre de la lumière et des modifications des protéines de la matrice extra-cellulaire (MEC) suite à l'activation séquentielle de la NO synthase endothéliale (eNOS) et de la matrice métalloprotéinase9 (MMP9) (Dumont et al. 2007; Freidja et al. 2011; Schiffrin 2004; Sharifi et Schiffrin 1997). Bien que les mécanismes moléculaires qui déclenchent le remodelage vasculaire, ne soient pas bien compris, la production de NO semble être cruciale dans le processus du remodelage vasculaire. En réponse à l'élévation des contraintes mécaniques et pressives que reçoit la paroi artérielle en réponse à une élévation de la PA, une production accrue de NO inhibe la prolifération et induit l'apoptose des CMLV. Le NO stimule les MMP9 et 2 matricielles qui dégradent les protéines de la MEC (Abbruzzese et al. 1998; Cooke et Dzau 1997; Yang et al. 2007). Par ailleurs, le remodelage externe est lié au recrutement des cellules inflammatoires, suite à la stimulation par les cellules endothéliales (CE), de l'expression des molécules d'adhésion spécifiques. Les CE sont sensibles aux forces de cisaillement ou circonférentielles, liées à l'élévation du flux sanguin et de la PA (Walpoli et al. 1995).

Le remodelage vasculaire interne se caractérise par une diminution du diamètre vasculaire interne avec épaissement de l'épaisseur de la média (hypertrophique) ou non (eutrophique). L'épaississement de la média est associé à la prolifération et l'hypertrophie des CMLV et une synthèse accrue de la MEC (collagène, fibronectine et glycosaminoglycanes) (Touyz et al. 2001). Au cours de l'HTA, le remodelage hypertrophique peut être associé à l'activation du système de l'ET-1 (Schiffrin 2000).

Les vaisseaux qui présentent un remodelage vasculaire eutrophique sont caractérisés par une diminution du diamètre vasculaire et du rapport média/lumière (Schiffrin 2004). Il a été démontré chez le rat hypertendu, que le remodelage eutrophique est associé à l'activation du SRAA (Brassard et al. 2005; Schiffrin 1992).

Le blocage des récepteurs AT1 de l'Ang II empêche le remodelage eutrophique et réduit la rigidité artérielle en diminuant les composantes non élastiques (collagène et fibronectine) (Pu et al. 2008; Brassard et al. 2005). Par ailleurs, le blocage des deux types de récepteurs AT1/AT2 empêche la croissance cellulaire, réduit la synthèse du collagène de type I et de l'élastine tout en augmentant la rigidité artérielle (Oliverio et al. 1998; Schiffrin 2004). Ceci suggère l'implication des récepteurs de l'Ang II dans les changements structuraux au niveau des artères de résistance. Le remodelage vasculaire est souvent déclenché par un stimulus endothélial. A ce niveau, les CE synthétisent et libèrent plusieurs facteurs en réponse à des agents chimiques, hormonaux et aux stimulations mécaniques (exemple forces de cisaillement). Ils agissent sur le tonus vasculaire, par la synthèse et la libération de facteurs de croissance, ainsi que la différenciation des cellules musculaires lisses et des fibroblastes. Ceci entraîne aussi une stimulation des réponses inflammatoires et de l'angiogenèse (Feletou et Vanhoutte 2006; Schiffrin 1992).

2. La dysfonction endothéliale

La dysfonction endothéliale est l'altération des réponses vasomotrices caractérisée par une réduction de la production ou de la biodisponibilité du NO, une activation de l'agrégation plaquettaire et de la prolifération des CMLV (Boulanger 1999; Raij 2006). Le tonus

vasculaire est régulé par l'endothélium. Dans les cellules endothéliales, et en conditions normales, la NO synthase (eNOS) génère du NO et de la L-citrulline à partir de la L-arginine. En présence de stimuli chimiques (bradykinine, acétylcholine) ou mécaniques (contrainte de cisaillement), l'expression de la eNOS augmente ainsi que la production du NO. Le NO active la guanylate cyclase soluble (GCs) de la CMLV, qui est impliquée indirectement dans l'inhibition de la libération du calcium (Ca^{2+}), induisant ainsi une vasorelaxation (Brassard et al. 2005; Munzel et al. 2008). En cas d'HTA, la production des espèces réactives de l'oxygène (ROS), spécifiquement l'anion superoxyde (O_2^-), augmente au niveau des cellules endothéliales et tout au long de la paroi vasculaire.

Les ROS sont des inhibiteurs puissants des trois principales voies vasodilatatrices endothélium-dépendantes: le NO, la prostacycline et le facteur hyperpolarisant dérivé de l'endothélium (EDHF) (Aubin et al. 2006; Rajagopalan et al. 1996; Kojda et al. 1999; Félétou et Vanhoutte. 2004; Gao et al. 2001). La dysfonction endothéliale est associée à plusieurs pathologies retrouvées avec la plupart des facteurs de risque cardiovasculaire (HTA, diabète de type 2, vieillissement, hypercholestérolémie, obésité, et tabagisme) (Feletou et Vanhoutte 2006; Munzel et al. 2008; Rajj 2006; Taddei et al. 2003). La dysfonction endothéliale liée à l'HTA est présente au niveau de l'aorte et des artères de résistances chez les patients et les rats hypertendus (Brassard et al. 2005; Diep et al. 2002; Feletou et Vanhoutte 2006; Panza 1997; Virdis et al. 2003). L'inflammation, la vasoconstriction et le remodelage vasculaire (trois éléments essentiels de la dysfonction endothéliale), sont directement impliqués dans le développement de l'hypertension artérielle.

3. Le rôle de la cascade stress oxydatif/inflammation

Le stress oxydatif peut-être à l'origine d'une augmentation de la pression artérielle de plusieurs manières :

1/ En provoquant une baisse de la biodisponibilité du NO qui favorise l'augmentation des résistances périphériques vasculaires, la dysfonction endothéliale, le remodelage vasculaire

(accumulation de la matrice protéique et des CMLV, migration, transformation et prolifération des fibroblastes) et l'adhésion des plaquettes et des leucocytes (Vaziri 2008).

2/ Les ROS provoquent une oxydation non enzymatique de l'acide arachidonique des lipoprotéines et des phospholipides de la membrane cellulaire, ce qui conduit à la génération des produits vasoconstricteurs pro-inflammatoires (tels que l'isoprostanes) pouvant contribuer à l'augmentation de la pression artérielle et aux complications cardiovasculaires (Schnackenberg and Wilcox 1999).

3/ Les ROS peuvent augmenter le tonus des CMLV en augmentant la concentration du calcium cytoplasmique ionisé ($[Ca^{2+}]_i$) (Touyz 2005).

Le stress oxydatif est le résultat d'un déséquilibre entre la production des ROS et les défenses anti-oxydatives de l'organisme. C'est un type d'agression des constituants de la cellule dû aux ROS natives et azotées (RONS). Dans les circonstances physiologiques normales, les cellules sont en mesure d'équilibrer la production d'oxydants et d'antioxydants (comme la catalase et la superoxyde dismutase) pour rétablir l'équilibre redox. Le stress oxydatif n'est pas une altération en soi, mais un mécanisme physiopathologique qui survient lorsque les cellules sont soumises à des niveaux excessifs de ROS, ou à la suite de l'épuisement des défenses anti-oxydatives (Scandalios 2002).

Les dérivés actifs de l'oxygène sont les produits terminaux de réaction de réduction de l'oxygène, conduisant à la production du ($\bullet O_2^-$), de peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) et d'eau (H_2O). Les principales sources de ROS comprennent la chaîne de transport d'électrons mitochondriale et les enzymes oxydases, telles que la NADPH oxydases, la xanthine oxydase, la lipoxigénase, la cyclooxygénase, les enzymes du cytochrome P450 et la NOS découplée (NOSs) (Mueller et al. 2005). Plusieurs études indiquent que les ROS jouent un rôle majeur dans l'initiation et la progression des troubles cardiovasculaires associés à l'HTA, l'hyperlipidémie, le diabète, les cardiopathies ischémiques et l'insuffisance cardiaque chronique (Taniyama et Griending 2003). Les ROS peuvent aussi agir en tant que médiateurs intracellulaires dans le contrôle de la croissance, la survie et l'apoptose des cellules vasculaires (Irani 2000).

L'augmentation du stress oxydatif pourrait jouer un rôle important dans l'élévation de la pression artérielle (Meng et al. 2003; Meng et al. 2002; Tian et al. 2005) et l'installation de

l'HTA dans diverses situations pathologiques comme l'insuffisance rénale chronique (IRC), le diabète et le syndrome métabolique. Elle peut également être associée à l'HTA induite par l'inhibition de la NOS ou par l'Ang II (Vaziri et al. 1998; Vaziri et al. 2005). Inversement, l'élévation de la pression artérielle provoque un stress oxydatif (Barton et al. 2001; Griendling et al. 2000). Ces observations suggèrent que le stress oxydatif est impliqué dans un cercle vicieux dans la pathogénèse de l'HTA (Vaziri 2008).

Le rôle de la NADPH oxydase dans la production de ROS par les phagocytes et les macrophages est connu depuis des décennies. Plus récemment, le prototype phagocytaires de la NADPH oxydase, (NOX2) et ses isoformes NOX1, NOX4 et NOX5 ont été identifiés dans les cellules endothéliales et les CMLV (Griendling et al. 2000b; Taniyama et Griendling 2003). Les contraintes mécaniques sur la paroi artérielle, l'Ang II et les cytokines pro-inflammatoires, reconnus comme jouant un rôle dans la pathogénèse de l'HTA, sont capables d'activer la NADPH oxydase. (Chabrashvili et al. 2002; Chandramohan et al. 2008; Vaziri et al. 1998; Zhan et al. 2004).

L'HTA systémique est souvent associée à un processus inflammatoire rénale et cardiovasculaire (Vaziri et Rodriguez-Iturbe 2006). Ce processus est caractérisé par l'infiltration rénale et vasculaire des macrophages et des lymphocytes T (Vaziri 2008). Par ailleurs, l'augmentation de l'infiltration rénale des macrophages et des lymphocytes T a été démontrée chez plusieurs modèles d'animaux hypertendus (Bravo et al. 2007; Chandramohan et al. 2008; Rodriguez-Iturbe et al. 2003).

L'infiltration des cellules immunitaires entraîne la production excessive d'anions superoxyde et l'expression de l'Ang II. Ces derniers peuvent contribuer au stress oxydatif et l'HTA (Nava et al. 2003; Rodriguez-Iturbe et al. 2003). L'inflammation joue un rôle physiopathologique important dans le développement et la progression de l'athérosclérose, mais aussi de l'HTA et autres maladies associées aux désordres vasculaires (Brasier et al. 2002). L'HTA est souvent associée à l'inflammation qui contribue à la dysfonction endothéliale (Viel et al. 2010), à l'augmentation de l'infiltration cellulaire, à la libération des ROS et à l'activation des macrophages (De et al. 2005). Au cours de l'inflammation l'activation des macrophages entraîne la sécrétion de diverses cytokines, notamment le facteur de nécrose tumorale (TNF α) qui stimule le processus inflammatoire vasculaire impliqué dans l'HTA

(Warren and Ralph 1986). L'inflammation contribue à la production des ROS et à l'épuisement des agents antioxydants, augmentant ainsi le stress oxydatif, qui à son tour est impliqué dans la dysfonction endothéliale, le remodelage vasculaire et l'altération de l'activité du NO; ce qui contribue au développement de l'HTA (Vaziri 2008).

Inversement le stress oxydatif favorise l'inflammation en activant le facteur nucléaire-kappa B (NF-kappa B) qui à son tour déclenche la sécrétion des cytokines pro-inflammatoires (Vaziri 2008c).

Le stress oxydatif induit l'activation des voies de transduction du signal redox-sensibles tels que la c-Jun N-terminal kinase (JNK), la protéine-kinase activée par les mitogènes (MAP-Kinase) (Hehner et al. 2000) et les facteurs de transcription comme NF-kappa B (impliqué dans plusieurs processus pro-inflammatoires). Par l'activation de NF-kappa B et de la *activator protein 1*, le stress oxydatif stimule la production des chimiokines, des cytokines, l'adhésion moléculaire ainsi que l'activation et la prolifération des lymphocytes, ceci entraîne l'activation, l'adhésion et l'infiltration des cellules immunitaires (Vaziri 2008; Vaziri et Rodriguez-Iturbe 2006). Tous ces éléments sont les médiateurs principaux de l'inflammation.

En revanche, l'inflammation entraîne le stress oxydatif principalement via la production des ROS. Au cours de l'inflammation, les macrophages, les cellules endothéliales, les CMLV et les fibroblastes stimulent la production des ROS. Ceci entraîne l'épuisement des enzymes antioxydantes et augmente le stress oxydatif (Vaziri et Rodriguez-Iturbe 2006). Il a été démontré que les leucocytes circulants et l'infiltration des cellules immunitaires, au niveau des reins, stimulent la production des ROS chez les animaux et patients hypertendus (Barton et al. 2000; Ni et al. 2004; Yoon et al. 2007).

Ainsi, le stress oxydatif et l'inflammation sont impliqués dans un cercle vicieux dans lequel l'activation de l'un entraîne la stimulation de l'autre, avec deux éléments intermédiaires majeurs: les ROS et NF-kappa B.

La cascade stress oxydatif/inflammation est souvent présente comme un élément majeur de la physiopathologie de tous les types d'HTA. D'ailleurs, chez des animaux avec HTA héréditaire ou acquise, il a été découvert une augmentation de l'infiltration tubulo-interstitielle rénale des lymphocytes T et des macrophages, accompagnée de l'activation de

l'expression de NF-kappa B (Chandramohan et al. 2008). Les reins jouent un rôle essentiel dans la régulation de la pression artérielle, surtout à travers le contrôle de l'équilibre sodique et l'activation du SRAA. Les médiateurs principaux de l'HTA sel- ou sodium-dépendante au niveau des reins sont l'inflammation, le stress oxydatif et l'activation du SRAA (Chandramohan et al. 2008; Rodriguez-Iturbe 2010; Tian et al. 2007; Vaziri and Rodriguez-Iturbe 2006b).

Le SRAA et la r-HuEPO sont associés à une HTA et des désordres vasculaires comme le remodelage, la dysfonction endothéliale et la cascade stress oxydatif/inflammation. Nous allons donc décrire la physio-pathologie hypertensive et le risque cardiovasculaire associé à la prise de r-HuEPO d'une part et l'activation du SRAA d'autre part.

II. L'HTA secondaire au traitement r-HuEPO: importance des facteurs hémodynamiques et des agents vasoactifs dérivés de l'endothélium (ET-1, NO)

L'érythropoïétine (EPO) est une hormone naturelle synthétisée par les cellules tubulaires du cortex rénal (90 %) et par les cellules de Kupffer du foie (10 %). Sa sécrétion est une réponse à la diminution de la biodisponibilité en O₂ dans le sang due à l'hypoxie, l'hémorragie ou l'anémie. Son rôle exclusif est de stimuler l'activité érythropoïétique pour réguler la prolifération, la différenciation et la survie des cellules érythroïdes, éléments précurseurs de la formation des hématies, situées dans la moelle osseuse en agissant sur des récepteurs spécifiques (Lombardero et al. 2011).

L'EPO agit en se fixant sur des récepteurs membranaires à activité tyrosine kinase (Fig. 3). Les récepteurs à l'EPO ont été localisés sur les mégacaryocytes (Fraser et al. 1989), dans le trophoblaste placentaire (Sawyer et al. 1989), les glandes mammaires (Juul et al. 2000), les lymphocytes B (Gogusev et al. 1994), les macrophages de la moelle osseuse (Vogt et al. 1989) ainsi que les tissus non-érythroïdes. Il s'agit du cerveau (Masuda et al. 1993), de la rétine (Grimm et al. 2002), du cœur (Wu et al. 1999), des reins (Westenfelder et al. 1999),

des cellules musculaires lisses (Ammarguella et al. 1996) et de l'endothélium vasculaire (Anagnostou et al. 1994). Ceci a été associé à la découverte de nouvelles fonctions biologiques de la signalisation endogène de l'EPO dans les tissus.

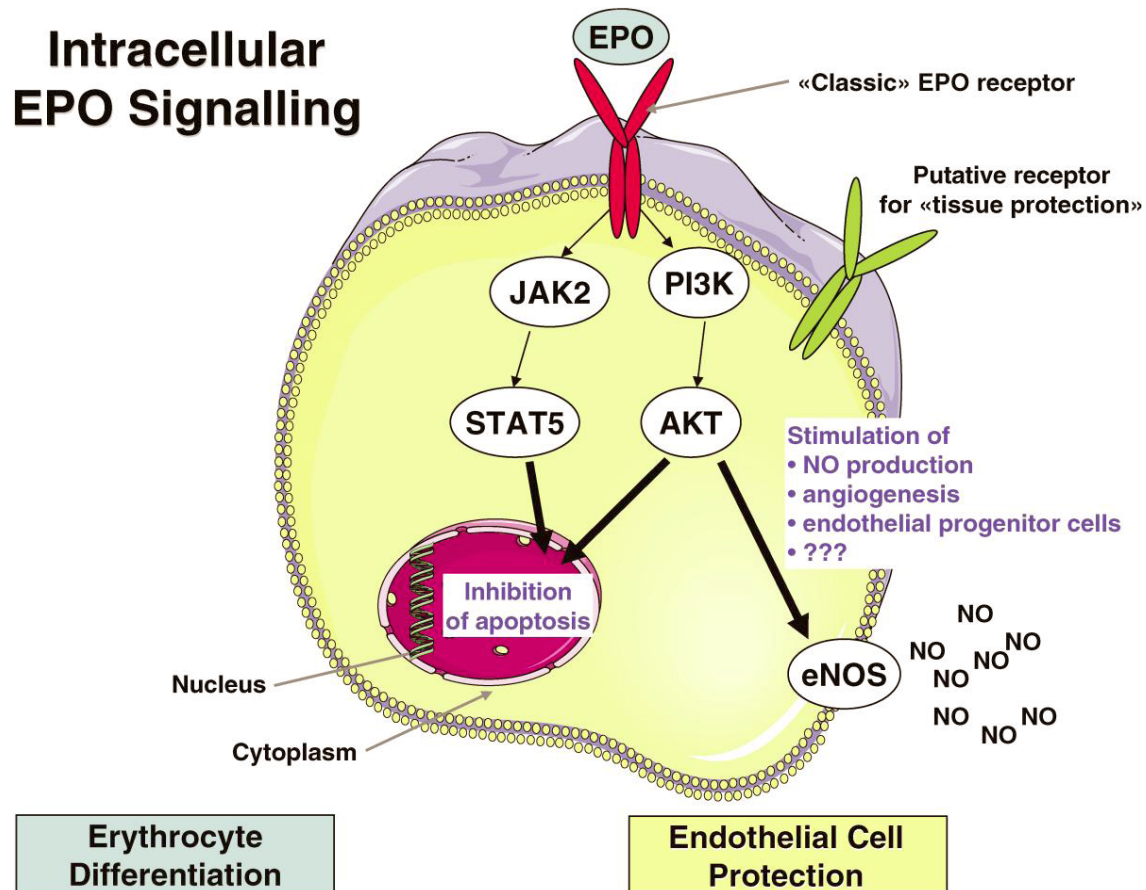


Fig. 3. Récepteur de l'érythropoïétine et la transduction du signal (Fliser et Bahlmann 2008).

En médecine, l'EPO est utilisée surtout pour le traitement des anémies dans plusieurs maladies comme: l'insuffisance rénale chronique, le cancer, l'autotransfusion, la chirurgie, le sida, ainsi que les maladies hématologiques.

L'EPO- α , l'EPO- β et la darbépoutine- α sont les trois formes commercialisées de l'érythropoïétine recombinante humaine (r-HuEPO). L'r-HuEPO est utilisée par voie sous-

cutanée (SC) ou intraveineuse (IV). Sa dose est dépendante de la maladie (généralement 100 UI/Kg, 2 à 3 fois par semaine). Les différentes formes de l'r-HuEPO montrent de légères différences de structure protéique. Les distinctions les plus marquées sont surtout au niveau de la glycosylation et du principe de stabilisation utilisé. Ce dernier permet le maintien de l'activité biologique et la prévention de l'agrégation ou de la dénaturation protéique lors de l'injection (Guyot et Margueritte 2005). Malheureusement, les résultats cliniques ont rapidement montré que le traitement par l'r-HuEPO peut être responsable d'effets secondaires notamment au niveau cardiovasculaire. En effet, il peut provoquer une HTA et des accidents thrombotiques tout en contribuant à la croissance des cellules vasculaires et à la coagulation sanguine.

1. Les effets cardiovasculaires de l'r-HuEPO

Malgré les effets bénéfiques de l'r-HuEPO sur l'angiogenèse (Chong et al. 2002), l'infarctus du myocarde (Calvillo et al. 2003; Moon et al. 2003; Parsa et al. 2003) et le système nerveux (Goldberg et al. 1992; Martinez-Estrada et al. 2003), certaines études suggèrent que des taux plasmatiques élevés d'EPO, indépendamment de la concentration d'hémoglobine, peuvent être associés à une aggravation de la maladie chez les personnes qui souffrent d'insuffisance cardiaque (Besarab et al. 1998). L'utilisation de l'r-HuEPO, chez les patients souffrant d'HTA non contrôlée, est contre-indiquée puisque l'administration de ce produit, d'une façon aiguë ou chronique, peut aggraver la situation hypertensive (Brown et al. 1989). De même, le maintien d'un traitement avec de l'r-HuEPO peut être à l'origine de fièvres, de vomissements, d'essoufflement et d'infections des voies respiratoires supérieures. Elle peut avoir comme autres effets, la thrombose vasculaire et entraîner un infarctus du myocarde (Muirhead et al. 1992).

2. Physiopathologie de l'HTA secondaire à un traitement à l'r-HuEPO

L'HTA et ses complications cardiovasculaires sont de plus en plus importantes dans le monde. Plusieurs guides de recommandations sur la prise en charge de l'HTA sont publiés en Amérique, en Europe et en France. Il est reconnu depuis longtemps que la fonction rénale affecte ou peut être affectée par l'HTA. L'HTA secondaire au traitement avec l'r-HuEPO est l'effet délétère du traitement de l'anémie chez les insuffisants rénaux (Novak et al. 2003). La prévalence de l'HTA, due au traitement avec l'r-HuEPO chez les insuffisants rénaux, dépend de l'âge du patient, de la gravité de l'insuffisance rénale, de la protéinurie ainsi que de la néphropathie sous-jacente (Ridao et al. 2001). Le traitement avec l'r-HuEPO peut engendrer une HTA souvent accompagnée par des phénomènes de compensation, caractérisés par une augmentation de la viscosité, une augmentation de la réactivité vasculaire (en cas d'hypoxie) ou des réponses vasoconstrictrices (à cause de la correction de l'anémie), ainsi qu'une augmentation de l'hématocrite en relation (Cirillo et al. 1992) ou non (Conlon et al. 2000) avec l'HTA.

Plusieurs hypothèses peuvent expliquer l'HTA induite par le traitement à l'r-HuEPO. Une des plus vraisemblables serait l'action directe de l'EPO qui agit à travers des récepteurs membranaires à activité tyrosine kinase associée. D'ailleurs, certaines études ont montré la présence des récepteurs à l'EPO dans plusieurs cellules et organes notamment celles impliqués dans la régulation cardiovasculaire (le cœur (Wu et al. 1999), les reins (Westenfelder et al. 1999), les cellules musculaires lisses (Ammarguella et al. 1996), l'endothélium vasculaire (Anagnostou et al. 1994), les lymphocytes B (Gogusev et al. 1994) et les macrophages (Vogt et al. 1989).

Les principales causes du développement de l'HTA induite par le traitement à l'r-HuEPO ne sont pas clairement élucidées. Les mécanismes potentiels incluent une augmentation inappropriée des résistances vasculaires périphériques (Lebel et al. 1998). Il a été démontré que l'EPO peut avoir un effet vasopresseur direct via la contraction des CMLV au niveau des artères de résistance (Heidenreich et al. 1991). Cet effet peut être dû en partie à l'augmentation des taux de calcium cytosolique. Cependant, dans un modèle animal, Roger et al. (1996) ont montré une augmentation de la pression artérielle chez des rats spontanément

hypertendus (SHR) et urémiques, sans une augmentation des niveaux de calcium intracellulaire. Il a été démontré par plusieurs études que l'EPO augmente le calcium (Ca^{2+}) dans différentes lignées cellulaires, y compris les CMLV (Gibbons et Dzau 1996; Neusser et al. 1993; Akimoto et al. 2001).

L'EPO exerce ses effets biologiques via des récepteurs spécifiques (EPOR) présents sur la membrane de cellules cibles comme la cellule endothéliale et la CMLV. La fonction cellulaire endothéliale peut donc être activée par l'EPO. Pendant l'hypoxie, par exemple, l'expression d'eNOS, son activité enzymatique et la production de NO augmentent en réponse à l'EPO (Beleslin-Cokic et al. 2004; Morishita et al. 1997). La production de NO semble dépendante de la concentration d'EPO. Ainsi, la faible teneur en O_2 augmente la capacité des cellules endothéliales à produire du NO en réponse à l'EPO, par induction d'eNOS. L'augmentation de l'activité eNOS et de la production de NO induite par l'EPO semble essentielle au maintien des mécanismes de normalisation vasculaires (Beleslin-Cokic et al. 2004).

L'EPO peut jouer un rôle vasopresseur sur les artères de résistance présentes dans le rein, l'artère mésentérique et l'artère caudale du rat. L'action vasopressive de l'EPO ne dépend pas de la présence de l'endothélium vasculaire. Il est direct, via la stimulation des EPOR situés sur la membrane des CMLV (Heidenreich et al. 1991; Vaziri et al. 1995).

Le rôle hypertenseur de l'EPO pourrait être en relation avec l'Ang II. Il a été démontré chez le rat que l'administration d'r-HuEPO entraîne une augmentation de la pression artérielle et que cette augmentation est prévenue par l'utilisation d'un inhibiteur spécifique de l'enzyme de conversion de l'angiotensine II (ECA) (Eggena et al. 1991; Heidenreich et al. 1991). Barrett et al. (1998) ont montré, par des études *in vitro*, que l'administration de l'r-HuEPO sur des CMLV en culture entraîne une augmentation de l'expression de l'ARNm de la rénine, de l'angiotensinogène et des récepteurs (AT1) et (AT2) de l'angiotensine II. Ceci suggère que le SRA tissulaire est impliqué. Cela a été confirmé par d'autres études qui ont montré que l'inhibition du SRA par le captopril ou le losartan prévenait l'HTA induite par l'administration d'r-HuEPO (Lebel et al. 1998; 2006).

Par ailleurs, il a été prouvé, chez des rats urémiques, que le traitement à l'r-HuEPO, augmente le stress oxydatif qui à son tour contribue au développement de l'HTA et à l'aggravation des lésions rénales (Rancourt et al. 2010). Le stress oxydatif et les complications

liées au traitement à l'r-HuEPO, pourraient être les causes d'une dysfonction endothéliale qui, à son tour, déclencherait les désordres vasculaires et l'HTA. Par ailleurs, l'altération de la production ou de la biodisponibilité du NO (due à l'augmentation des ROS) peut contribuer à l'HTA chez les insuffisants rénaux (Vaziri et al. 2003). Goicoechea (1998) a montré aussi que le traitement à l'r-HuEPO stimule la sécrétion des cytokines pro-inflammatoires comme l'interleukine-6 (IL-6), chez les patients hémodialysés.

Le NO et l'ET-1 sont deux médiateurs importants dans la régulation de la fonction endothéliale. La production d'ET-1 et l'élévation de la concentration cytoplasmique en calcium sont deux éléments majeurs impliqués dans l'HTA induite par le traitement à l'r-HuEPO, par l'altération notamment de la réponse vasodilatatrice endothéliale (Bode-Boger et al. 1992; Vaziri et al. 1995).

De nombreuses données expérimentales et cliniques faites chez des patients hypertendus (Spieker et al. 2000) ou hémodialysés (Joannides et al. 1997) montrent que l'altération de la fonction endothéliale (notamment le déséquilibre endothéliale du rapport NO/ET-1) est à l'origine de l'HTA secondaire au traitement avec l'r-HuEPO.

3. L'importance des agents vasoactifs (NO et ET-1) dans la physiopathologie de l'HTA secondaire au traitement par l'r-HuEPO.

L'effet de l'r-HuEPO sur l'HTA est en relation directe avec la balance (ET-1/NO) (Rodrigue et al. 2008; Ruschitzka et al. 2000). Face aux différents stimuli, notamment l'augmentation de la pression artérielle ou les variations du flux sanguin, l'endothélium maintient un équilibre entre vasoconstriction et vasodilatation. Il module de façon majeure le tonus et la vasomotricité des CMLV sous-jacentes et l'homéostasie du système cardiovasculaire (Davignon et Ganz 2004). Les mécanismes précis contrôlant cette homéostasie sont complexes et résultent d'interactions entre le sang, l'endothélium et les CMLV. Dans les conditions physiologiques, l'endothélium garde un équilibre dans la libération de nombreux facteurs de relaxation et de contraction, en particulier entre le NO et l'ET-1. La perturbation de cet équilibre par une altération de la production ou la

biodisponibilité du NO ou encore l'augmentation de la production de l'ET-1 peut être une source de dysfonction endothéliale, de désordre vasculaire et d'une HTA (Feletou et Vanhoutte 2006).

L'administration de l'r-HuEPO entraîne une augmentation de la production de NO et de l'excrétion urinaire des nitrites/nitrates (del et al. 1995; Teng et al. 2011) pour maintenir le tonus vasculaire (Beck et al. 2011). Cet effet est l'inverse en cas d'IRC, puisque l'utilisation de l'r-HuEPO pour corriger l'anémie, s'accompagne d'une résistance au NO expliquée par une altération des réponses hypotensives au sodium nitroprusside (SNP) au niveau de l'artère caudale des rats urémiques (Vaziri et al. 1996).

L'effet délétère de l'EPO sur la pression artérielle est toujours en relation avec la production endothéliale de NO. *In vitro*, l'r-HuEPO augmente la production basale et stimulée de NO par les cellules endothéliales (Wang and Vaziri 1999). Par ailleurs, l'inhibition de la synthèse de NO par le N-nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME) entraîne une élévation de la pression artérielle systolique EPO-dépendante chez le rat (Moreau et al. 2000).

Malgré le taux élevé d'hématocrite (>80%), les souris transgéniques sur-exprimant l'EPO ne développent pas d'HTA, ni des désordres thrombo-emboliques. Par contre, en présence de L-NAME, ces souris développent une HTA ainsi qu'une vasoconstriction artériolaire sévère et meurent quelques jours plus tard (Ruschitzka et al. 2000). Il a été également prouvé que l'r-HuEPO augmente considérablement la pression artérielle et améliore la rigidité vasculaire chez les souris déficientes en eNOS (D'Uscio et al. 2007). L'ensemble de ces travaux suggère que le NO présent ou stimulé par l'r-HuEPO permet un blocage de l'effet vasopresseur de l'r-HuEPO. Il s'agit d'un mécanisme protecteur de la fonction vasculaire.

L'ET-1, peptide sécrété par l'endothélium vasculaire, possède l'effet vasoconstricteur le plus puissant connu sur les cellules musculaires lisses et joue un rôle important dans la régulation du tonus vasculaire par l'intermédiaire de deux types de récepteurs: ETA et ETB (Awano et al. 2006) (Fig. 4). Il est produit majoritairement dans les cellules endothéliales, mais également par les cellules épithéliales, les macrophages, les fibroblastes, les cardiomyocytes et les cellules du système nerveux central (Belaidi et Godin-Ribuot 2010).

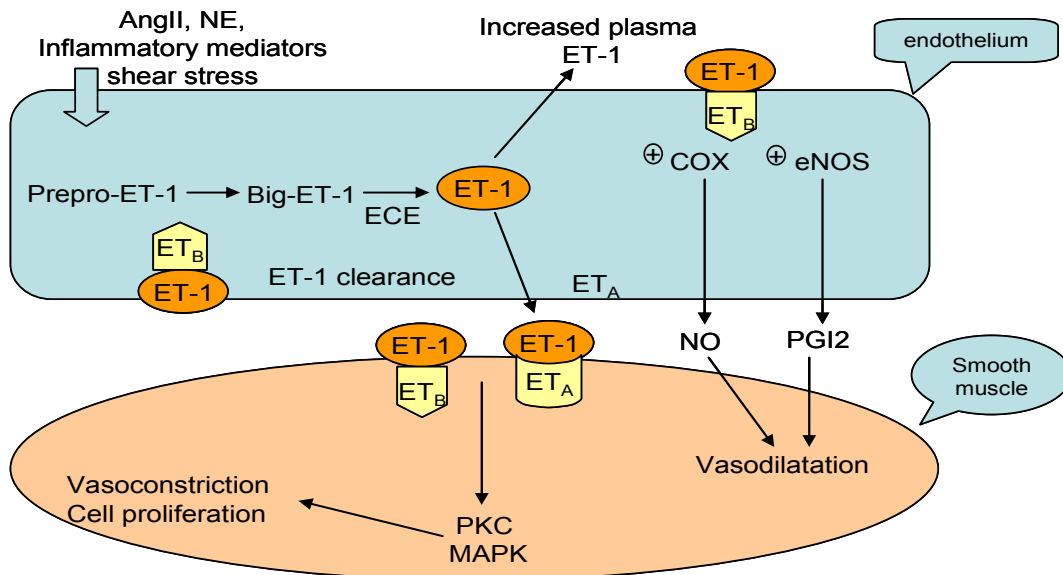


Fig. 4. Voies de signalisations de l'ET-1.

L'Ang II et l'r-HuEPO sont les principaux facteurs qui stimulent la synthèse de l'ET-1, tandis que le NO et la prostacycline (PGI_2) endothéliaux sont des inhibiteurs de l'effet vasoconstricteur de l'ET-1 (Boulanger et Luscher 1990; Prins et al. 1994; Virdis et al. 2011).

Plusieurs études ont montré que l'incubation de cellules endothéliales en culture avec de l'r-HuEPO entraîne une augmentation de la sécrétion de l'ET-1 (Bode-Boger et al. 1996; Carlini et al. 1993; Karadag et al. 2009). Ceci a aussi été démontré *in vivo*, chez le rat (Katoh et al. 1994) ou la souris qui sur-exprime l'érythropoïétine (Quaschnig et al. 2003). Chez les patients traités avec l'EPO, une augmentation du taux de l'ET-1 a été observée (Carlini et al. 1993), mais pas chez tous les patients (Brunet et al. 1994). De même, l'r-HuEPO semble être un des régulateurs de la transcription du gène de l'ET-1. Elle augmente l'expression de l'ARNm de la prépro-ET-1, précurseur de l'ET-1, dans des cellules endothéliales en culture (Carlini et al. 1995) et chez des rats urémiques (Lariviere et Lebel 2003). Cette sur-expression est associée à une élévation de la concentration de l'ET-1 vasculaire (Lebel et al. 1998; Rodrigue et al. 2003). Par contre, aucun effet de l'r-HuEPO n'a été observé sur les

concentrations vasculaires d'ET-1 chez le rat ayant une fonction rénale normale (Moreau et al. 2000).

L'ET-1 semble jouer un rôle dans l'HTA secondaire au traitement à l'r-HuEPO. Chez l'insuffisant rénal chronique, il existe une corrélation positive entre les concentrations d'ET-1 vasculaire et la pression artérielle (Rodrigue et al. 2003). De même, la progression de l'HTA induite par un traitement r-HuEPO est prévenue, suite à l'utilisation d'un antagoniste sélectif du récepteur ETA de l'ET-1 (LU 135252) (Brochu et al. 1999; Rodrigue et al. 2008).

Chez les souris transgéniques sur-exprimant l'EPO, l'érythrocytose excessive s'accompagne d'une activation marquée du système de l'endothéline tissulaire. Ceci se traduit par une mortalité accrue lorsque la production du NO est inhibée (Quaschnig et al. 2003), alors que, le traitement avec les inhibiteurs des récepteurs ETA prolonge leur survie en présence de L-NAME (Quaschnig et al. 2003).

Par contre, Brochu et al. (1999) ont montré que l'inhibition simultanée des récepteurs ETA et ETB ne prévient pas l'HTA secondaire au traitement r-HuEPO. Ceci suggère que l'effet antihypertenseur de l'administration d'un antagoniste ETA dépend en même temps de la disponibilité fonctionnelle des récepteurs ETB. Les récepteurs ETB permettraient de maintenir une pression artérielle normale au cours du traitement à l'r-HuEPO (Rodrigue et al. 2008).

L'ET-1 contribue à la maîtrise du flux et de la pression sanguine dans les artères rénales par un effet de vasoconstriction via les récepteurs ETA et un effet vasodilatateur via les récepteurs ETB (Schildroth et al. 2011).

Les cellules endothéliales sont constamment exposées à des contraintes de cisaillement par l'écoulement du sang. La transformation des stimuli mécaniques (contrainte de cisaillement, déformation cyclique ou pression hydrostatique) en signaux biochimiques intracellulaires est indispensable pour éviter le développement et la progression des maladies vasculaires. Les forces de cisaillement produites par l'écoulement du sang, sont donc ressenties par les cellules endothéliales (Shi et Tarbell 2011). En réponse à un effort de cisaillement laminaire régulier de durée suffisante et importante, les cellules endothéliales montrent une elongation et un alignement de leur longueur axiale dans la direction de l'écoulement (Fig.5).

Les forces de cisaillement (*shear stress*) stimulent la libération des substances vasoactives (Chatzizisis et al. 2007), comme le (NO) et la PGI2 (Frangos et al. 1985; Uematsu et al. 1995). L'effet des forces de cisaillement sur la synthèse ou la libération de l'ET-1, au niveau des CE est moins clair et controversé. Cela se traduit par la contradiction entre certaines études qui ont montré une augmentation (Morita et al. 1993; Yoshizumi et al. 1989) et d'autres, une diminution de la production d'ET-1 (Kuchan et Frangos 1993; Malek et al. 1993; Sharefkin et al. 1991).

L'ET-1 joue un rôle important dans la physiopathologie de l'HTA induite par l'r-HuEPO, via les récepteurs ETA. Son effet est souvent contrebalancé par le NO, d'où l'importance de maintenir l'équilibre du ratio NO/ET-1 pour éviter le développement d'une HTA. Ces données suggèrent également l'importance du rôle délétère du *shear stress* dans le cas d'un déséquilibre NO/ET-1. Nous étudierons l'importance de cet équilibre in vitro (sur des cellules endothéliales en culture) ex vivo (artères mésentériques) et in vivo (modèle de souris transgéniques sur-exprimant l'ET-1 endothélial), dans nos deux premiers travaux.

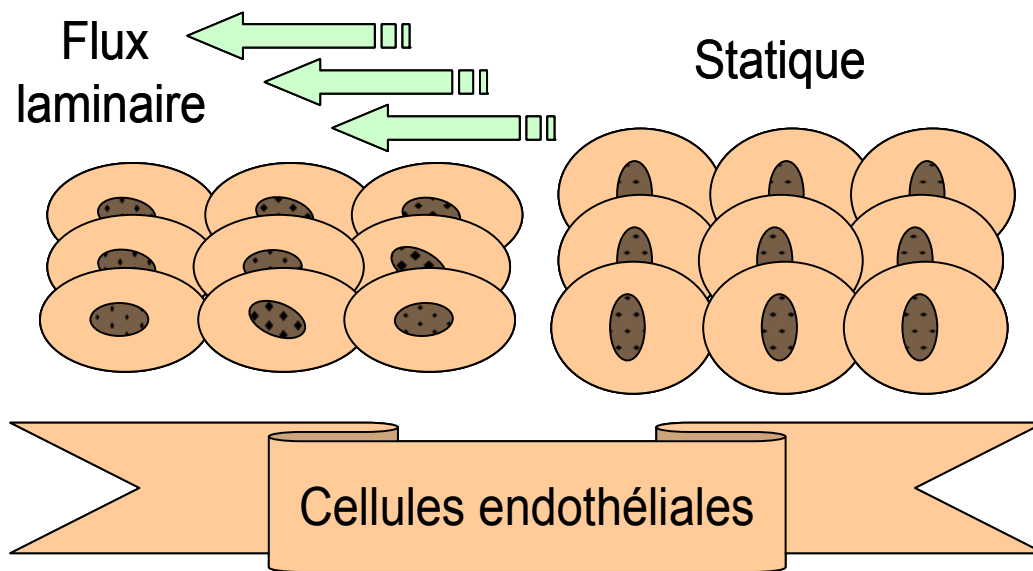


Fig. 5. L'effort de cisaillement laminaire induit l'alignement des cellules endothéliales. (Modèle schématique représenté à partir de l'expérience de Galbraith et al. sur des cellules endothéliales en culture). (Galbraith et al. 1998).

III. Système rénine-angiotensine-aldostérone et HTA induite : importance du processus inflammatoire

Le SRAA est un puissant régulateur de l'homéostasie des systèmes cardiovasculaire et rénal. C'est l'un des régulateurs les plus importants de la pression artérielle. Il implique l'Ang II et l'aldostérone comme effecteurs. Les médiateurs du SRAA interviennent dans la vasoconstriction, la prolifération cellulaire et la rétention du sodium. Le SRAA participe aussi aux réponses inflammatoires. Le dérèglement du SRAA joue un rôle essentiel dans la pathogénèse des pathologies cardiovasculaires, l'HTA, la dysfonction diastolique, la dysfonction rénale et le diabète (Nguyen 2007a; Nguyen 2007b). Les traitements par des bloqueurs du SRAA (inhibiteurs de l'enzyme de conversion de l'Ang II, des récepteurs AT1, de la rénine ou de l'aldostérone) sont efficaces contre l'HTA (Basile 2009; Zhu et al. 1997).

1. Implication de l'Angiotensine-II dans la régulation de la fonction cardiovasculaire et la pathologie de l'HTA

Classiquement, le SRAA régule l'homéostasie de la pression artérielle. En réponse à la diminution du volume sanguin ou stimulation sympathique par les récepteurs adrénergiques β_1 , la rénine est libérée par les cellules juxta-glomérulaires. Elle agit comme une protéase pour cliver l'angiotensinogène en angiotensine I (Ang I). L'Ang I inactif est ensuite convertie en Ang II par l'enzyme de conversion de l'Ang II (ECA). L'Ang II se lie avec au moins quatre types de récepteurs spécifiques (AT1-4), au niveau de la membrane cellulaire (Tran et al. 2011). L'Ang II, via le récepteur AT1, stimule la production d'aldostérone par la zone glomérulée (zone externe du cortex surrénalien) (Atlas 2007).

L'Ang II agit sur les vaisseaux, le rein et le cœur pour contrôler la pression artérielle. Son action est médiée par deux types de récepteurs, AT1 et AT2. La plupart des effets provoqués par l'Ang-II sont médiés par le récepteur AT1 (Kendall et al. 2011). L'Ang II est impliquée dans de nombreux processus pathologiques comme la fibrose, l'inflammation, le stress oxydatif et la thrombose. Il joue un rôle primordial dans la régulation de l'homéostasie cardiovasculaire en favorisant les effets mitogéniques et en facilitant la croissance cellulaire résultant d'une altération de l'expression génique. L'inhibition de l'enzyme de conversion de l'Ang II (ACE) et les bloqueurs des récepteurs de l'angiotensine (ARBs) sont devenus des piliers modernes dans le traitement de l'HTA (Tran et al, 2011).

Plusieurs études ont montré que l'inhibition du SRAA a un effet bénéfique dans la prévention et le traitement des maladies cardiovasculaires (Alreja et Joseph 2011). L'inhibition du récepteur AT1 peut contrôler plusieurs types de pathologies cardiovasculaires: l'hypertrophie du ventricule gauche (Zhu et al. 1997), la fibrillation auriculaire (Frustaci et al. 1997) et l'athérosclérose (Sasaki et al. 2010). L'Ang II intervient aussi dans le processus de dégradation du NO, augmente les cytokines pro-inflammatoires et la vasoconstriction et altère la fonction du système des endothélines (Li et al. 1998; Virdis et al. 2011).

La stimulation des récepteurs AT1 entraîne une réponse vasoconstrictrice de façon immédiate, en réponse à l'augmentation de la concentration intracellulaire en calcium. L'activation de l'appareil contractile impliquant essentiellement les CMLV est à l'origine de

l'augmentation progressive de la pression artérielle suite à l'administration de l'Ang II (Rautureau et al. 2011).

L'Ang II est bien connue comme stimulateur de la pression artérielle systémique et locale par le biais de son effet vasoconstricteur, la rétention hydrosodée au niveau des tubules rénaux, la stimulation ainsi que la libération d'aldostérone par la glande surrénale (Kim et Iwao 2000; Timmermans et al. 1993a; Timmermans et al. 1993b). Il a été démontré que l'Ang II augmente la réactivité rénale (mesurée par la réponse du flux sanguin rénale en réponse à l'Ang II) chez les rats et les souris et que la vasoconstriction induite est médiée par les récepteurs de type 1 (AT1) (Ruan et al. 1999). De même, la perfusion directe de l'Ang II dans les capillaires péri-tubulaires entraîne une vasoconstriction artériolaire (Brilla et al. 1992).

L'inflammation vasculaire est caractérisée par le recrutement des monocytes et des lymphocytes dans l'espace sous-endothéliale, la production des cytokines, l'augmentation de l'expression des molécules d'adhésion, la prolifération des CMLV, la diminution des cellules précurseurs endothéliales (EPC) et l'altération de la production et de la dégradation de la matrice extra-cellulaire (Nathan 2002). Au niveau de la paroi vasculaire, l'Ang II a des actions pro-inflammatoires en stimulant la production des ROS, des cytokines et des molécules d'adhésion (Suematsu et al. 2002).

L'Ang II module l'expression des molécules d'adhésion cellulaire vasculaire (VCAM-1), intercellulaire (ICAM-1) et E-sélectine (Pueyo et al. 2000). Dans les CMLV, l'Ang II stimule la production de VCAM-1. Elle se trouve être aussi un puissant facteur de la production de certaines chimiokines telles que les protéines chimiotactiques de monocytes de type 1 (MCP-1) et l'IL-6.

Comme on le verra dans le chapitre 5, la réponse immunitaire adaptative a un rôle important dans l'HTA et les désordres vasculaires induits.

Différents sous-ensembles des cellules T (synthétisées au niveau du thymus et qui jouent un rôle important dans les réponses immunitaires secondaires) ont un rôle crucial dans le développement de l'HTA induite par l'Ang II (Harrison et al. 2010; Schiffrin 2010). Parmi ses sous-ensembles, citons les cellules T auxiliaires (Th1) (produisant l'interféron γ), les cellules Th2 (produisant l'IL-4), les cellules Th17 (produisant de l'IL-17), les cellules T suppressseurs et les cellules T régulatrices (Treg) (exprimant le facteur de transcription Foxp3

et produisent TGF- β et IL-10). Les cellules Th17 semblent être particulièrement impliquées dans l'HTA induite par l'Ang II (Marvar et al. 2010; Vinh et al. 2010). Guzik et al (2007) ont montré que des souris déficientes en lymphocytes T sont résistantes à l'Ang II et ne développent pas l'HTA induite. Le transfert adoptif des cellules T et non B contribue au développement de l'HTA chez ces animaux. Récemment, Il a été prouvé que l'infusion chronique de l'Ang II chez des souris entraîne une augmentation de la pression artérielle qui, à son tour, favorise l'activation des cellules T, l'infiltration des leucocytes et l'inflammation vasculaire (Marvar et al. 2010). De même, l'Ang II favorise l'HTA et les lésions rénales suite à l'activation et la prolifération des cellules T (Crowley et al. 2008). Vinh et al. (2010) ont montré que l'inhibition du ligand B7 (co-stimulateur des cellules T) diminue l'HTA induite par l'Ang II, et réduit l'activation des cellules T circulatoires et vasculaires ainsi que la production des cytokines (Vinh et al. 2010).

Bien que plusieurs études récentes montrent le rôle des cellules T dans l'HTA, les mécanismes qui expliquent l'activation et l'infiltration de ces cellules sont encore peu connus.

2. Implication de l'aldostérone dans la fonction cardiovasculaire et l'HTA

Le produit final de la stimulation du SRA est la production par les glandes surrénales, entre autres organes, d'aldostérone (Aldo). L'Aldo est une hormone stéroïdienne à activité minéralocorticoïde qui est produite principalement par les glandes surrénales (en réponse à l'Ang II, les hormones corticotropes ou l'augmentation du taux de potassium sérique). L'Aldo est classiquement impliquée dans le transport des électrolytes transépithélial de sodium et de potassium au niveau des tubules rénaux, pour contrôler de la rétention et l'équilibre sodé. Elle joue donc un rôle clé dans l'HTA et les maladies cardiovasculaires, par ses effets sur le rein et la rétention hydrosalée (Briet et Schiffrin 2010; 2011; Fujita 2008). L'Aldo exerce des effets sur les reins, les vaisseaux sanguins et le cœur. Ceci peut avoir des conséquences physiopathologiques importantes. Elle est impliquée dans l'augmentation de l'inflammation rénale, la prolifération cellulaire, l'hypertrophie, la fibrose vasculaire et peut altérer la fonction endothéliale (Briet et Schiffrin 2010).

Plusieurs travaux suggèrent que l'aldostérone et/ou l'activation des récepteurs minéralocorticoïdes (MR) contribuent aux désordres cardiovasculaires et rénaux (Brown 2005).

Dans les cellules endothéliales, l'Aldo est responsable de la déficience en glucose-6-phosphate déshydrogénase (G6PD), ce qui entraîne l'augmentation de la production des ROS. Il s'en suit une diminution de la biodisponibilité de NO (Leopold et al. 2007), ce qui entraîne une altération de la vasodilatation endothélium-dépendante (Struthers et MacDonald 2004). Cet effet peut être corrigé en utilisant des antagonistes à l'aldo (Abiose et al. 2004).

L'Aldo augmente le stress oxydatif, la synthèse des molécules d'adhésion, le remodelage vasculaire (Leopold et al. 2007; Pu et al. 2003) et l'expression de l'ET-1 (Wong et al. 2007). Tous ces effets sont souvent associés à une fibrose et une rigidité artérielle (Lacolley et al. 2002).

Chez les modèles animaux, il a aussi été montré que la perfusion d'aldostérone provoque la dysfonction endothéliale via la production des ROS (Blanco-Rivero et al. 2005; Nishiyama et al. 2004). L'aldostérone augmente l'expression des sous-unités de la NADPH oxydase (p22phox, p47phox et gp91phox), selon un mécanisme MR-dépendant, alors qu'elle stimule l'expression de l'ARNm des p47phox à travers les récepteurs AT1 et MR (Calo et al. 2004; Hirono et al. 2007). En outre, l'Aldo favorise le «découplage» de la NOS, en induisant la déphosphorylation de Ser1177 par les protéines phosphatase 2A (PP2A). L'Aldo joue également un rôle dans le stress oxydatif et la dysfonction endothéliale; ceci en diminuant l'expression du G6PD (Leopold et al. 2007; Viridis et al. 2002).

La perfusion chronique de l'Aldo chez le rat augmente la fibrose myocardique (Brilla et Weber 1992). Le développement de la fibrose est précédé par une inflammation coronarienne et du muscle myocardique, caractérisée par l'infiltration des monocytes et des macrophages et une expression accrue des marqueurs de l'inflammation tels que la cyclo-oxygénase-2 (COX-2), l'ostéopontine, le MCP-1 et l'ICAM-1 (Rocha et al. 2000; Sun et al. 2004). Tous ces modifications peuvent être bloqués par les antagonistes aux MR (Brilla et Weber 1992; Rocha et al. 2000).

L'Aldo provoque également la fibrose et l'hypertrophie aortique chez les rats hypertendus via les MR (Benetos et al. 1997; Neves et al. 2005). De même, l'Aldo provoque

des lésions de fibrose glomérulaire et tubulo-interstitielle (Marney and Brown 2007). Les antagonistes des MR diminuent le développement des lésions glomérulaires (thrombose, sclérose en plaques et mésangiolyse) et une artériopathie chez des rats spontanément hypertendus (SHR) (Rocha et al. 1998). Il a été également montré que la pression artérielle systolique induite par l'Ang II est réduite par la spironolactone (antagoniste de l'aldostérone) (Schiffrin 2006). Sur des petites artères mésentériques, l'Ang II augmente le ratio média/lumière et altère la relaxation générée par l'acétylcholine. Ces effets ont été partiellement améliorés par la spironolactone (Schiffrin 2006). La perfusion d'Aldo annule les effets protecteurs des inhibiteurs de l'ECA et des antagonistes des récepteurs AT1 de l'Ang II (Greene et al. 1996).

Ces modifications artérielles représentent une première étape dans le développement de l'HTA, montrant ainsi l'implication de l'Aldo dans ce processus. Le traitement par des antagonistes des MR permet d'atténuer ces désordres en partie, par la réduction des médiateurs pro-inflammatoires, y compris MCP-1, IL-8, facteur de croissance basique des fibroblastes (bFGF), indépendamment de la pression artérielle (Savoia et al. 2008). Ceci suggère que l'inflammation vasculaire joue un rôle clé dans le remodelage vasculaire induit par l'Aldo (Marchesi et al. 2008).

Chez les patients qui souffrent d'HTA primaire et secondaire, la dysfonction endothéliale est souvent associée à une augmentation des taux plasmatiques d'Aldo (Nishizaka et al. 2004; Taddei et al. 1993). Chez des patients souffrant d'HTA essentielle, l'augmentation de l'Aldo plasmatique est corrélée avec la diminution de la compliance artérielle (Blacher et al. 1997). Il a aussi été montré chez des sujets sains, que la perfusion de dose physiologique d'Aldo entraîne une altération de la vasodilatation endothélium-dépendante en réponse à l'acétylcholine au niveau des artères périphériques (Farquharson et Struthers 2002) ainsi qu'une augmentation de la contractilité des artères de résistances. Ceci suggère l'implication de cette hormone stéroïde dans les désordres vasculaires notamment l'HTA, caractérisée par l'augmentation de la résistance vasculaire périphérique (Romagnani et al. 2003).

Ainsi, l'Ang II et l'Aldo contribuent aux désordres vasculaires à travers leurs effets directs principalement via les récepteurs AT1 de l'Ang II et MR de l'Aldo. De plus, il a été démontré

que l'effet de l'Ang II est dépendant de l'Aldo puisque l'inhibition des MR entraîne la disparition des effets pro-inflammatoires de l'Ang II (Neves et al. 2005).

IV. L'exercice physique : élément de prévention de l'HTA et des désordres cardiovasculaires

1. Exercice et HTA : observation cliniques et expérimentales

L'activité physique est fortement et inversement corrélée au risque de mortalité cardiovasculaire, indépendamment de l'âge et du sexe. Plusieurs études montrent incontestablement que l'activité physique joue un rôle de prévention primaire et secondaire de la mortalité cardiovasculaire liée aux événements coronariens (Jolliffe et al. 2001; Karmisholt et Gotzsche 2005; Karmisholt et al. 2005; Taylor et al. 2004), d'insuffisance cardiaque chronique (Lloyd-Williams et al. 2002; Piepoli et al. 2004), et des maladies artérielles périphériques (Garg et al. 2009; Garg et al. 2006; Richardson et al. 2004). Ces effets ont été observés aussi bien chez l'homme que le modèle expérimental correspondant (Chicco et al. 2008; Emter et al. 2005; Napoli et al. 2006).

L'activité physique, et surtout l'exercice modéré, améliore la capacité à l'effort (Casillas et al. 2007) et prévient l'ensemble des facteurs de risques cardiovasculaires notamment la pression artérielle. Plusieurs études ont montré l'effet bénéfique d'un exercice régulier sur l'HTA (Applegate et al. 1992; Kokkinos et al. 1995; Paffenbarger et Lee 1997; Turner et al. 2000). L'entraînement physique est maintenant une recommandation dans le traitement de l'HTA, en association avec un traitement médical (Hackam et al. 2010; Mancia et al. 2007; Moser 1999).

Il a été rapporté que l'exercice abaisse la pression artérielle chez des rats SHR (Zhang et al. 2006), obèses (Pinheiro et al. 2007; Touati et al. 2011) ou d'autres modèles expérimentaux d'HTA induite (Fregly 1984a; Marcus et Tipton 1985a; Shepherd et al. 1982). Plusieurs mécanismes peuvent être impliqués dans l'effet bénéfique de l'exercice sur l'HTA. Parmi eux, la réduction des résistances périphériques vasculaires, où le système nerveux sympathique (diminution de l'activité du système nerveux autonome (Fagard 2000)) et le

système rénine-angiotensine (Diminution de l'activité de la rénine plasmatique (Kohn et al 1997)) semblent être impliqués (Cornelissen et Fagard 2005). Une amélioration (correction) de la fonction endothéliale revient aussi très souvent (Higashi et al. 1999), ainsi qu'un effet anti-inflammatoire (Pedersen 2006; Petersen et Pedersen 2005).

2. Exercice et dysfonction endothéliale

La dysfonction endothéliale contribue au développement et la progression de l'HTA suite à l'augmentation des ROS et la diminution de la production et disponibilité du NO (Munzel et al. 2008), favorisant l'augmentation des résistances périphériques vasculaires (Vaziri 2008) et la génération des produits vasoconstricteurs pro-inflammatoires (Schnackenberg et Wilcox 1999). Les résultats cliniques et expérimentaux démontrent clairement que l'exercice physique corrige et prévient la dysfonction endothéliale et plus intéressant encore, l'amélioration de la fonction endothéliale est étroitement liée à la quantité de la dépense énergétique générée par l'organisme (Gielen et al. 2003), suggérant que les effets bénéfiques de l'exercice peuvent résulter d'un effet direct de l'exercice sur les cellules endothéliales. L'exercice physique modéré améliore la vasodilatation endothéliale et NO-dépendante de la plupart des populations présentant un risque cardiovasculaire (HTA, obésité, diabète de type 2, vieillissement) (Donato et al. 2007; Heidarianpour et al. 2007; Kuru et al. 2009a; Miyaki et al. 2009; Vinet et al. 2010; Yung et al. 2009) ainsi que des patients coronariens ou insuffisants cardiaques (Beck et al. 2011; Erbs et al. 2010; Hambrecht et al. 1998). Il augmente également la production du NO par les cellules progénitrices endothéliales (Sonnenschein et al. 2011).

L'amélioration de la fonction endothéliale induite par l'exercice est probablement en relation avec les contraintes mécaniques de cisaillement de la surface vasculaire, exercées par l'élévation de la vitesse de l'écoulement sanguin lors de la stimulation de la fonction cardiaque et l'élévation concomitante du débit sanguin pendant l'effort. Ces contraintes de cisaillement, stimulent des mécano-récepteurs membranaires endothéliaux, à l'origine de la phosphorylation de la eNOS via la voie AKT-dépendante (Hambrecht et al. 2003; Sonnenschein et al. 2011). Plusieurs études expérimentales confirment que l'exercice peut

avoir un effet bénéfique sur le développement des maladies cardiovasculaires par la préservation de la fonction endothéliale (De et al. 2008; Woodman et al. 2003). La sédentarité peut aussi expliquer d'une manière inverse, l'importance de l'exercice dans le maintien de la fonction endothéliale (Szostak et Laurant, 2011).

L'exercice diminue la production des ROS dans la paroi vasculaire via la réduction de l'expression des sous-unités de la NADPH oxydase (gp91^{phox}, p22^{phox} et Nox4) (Adams et al. 2005a). Il joue un rôle dans la régulation des récepteurs AT1, permettant ainsi d'atténuer la vasoconstriction induite par l'Ang II. L'inactivité physique et la sédentarité exercent directement des effets biologiques délétères par la production excessive des ROS et une diminution de la biodisponibilité de NO, contribuant à la dysfonction endothéliale et le développement de l'athérosclérose (Szostak et Laurant, 2011).

L'exercice physique empêche l'élévation de la pression artérielle chez des rats SHR (Horta et al. 2005), diminue la pression artérielle et améliore la qualité de vie chez des patients ayant une HTA moyenne et sévère (Tsai et al. 2004). Ce même constat peut être effectué chez des patients hypertendus de stade 1 et 2, (Kokkinos et al. 2001). Chez des rats obèses avec syndrome métabolique, il a été montré qu'un exercice physique modéré de 12 semaines corrige la dysfonction endothéliale NO-dépendante et abaisse la pression artérielle systolique qui pourrait être médiée par le *shear stress* et l'amélioration de la voie Akt/eNOS phosphorylée (Touati et al. 2011).

L'exercice physique améliore la vasodilatation flux-dépendante au cours de l'hypertension aiguë (Phillips et al. 2011). Chez des rats SHR, l'exercice physique augmente la production et la biodisponibilité du NO, diminue les sous-unités de la NADPH oxydase (gp91^{phox}) contribuant à la restauration de la vasodilatation endothélium-dépendante (Graham et Rush 2004). Il a été montré aussi que le même type d'exercice améliore à la fois le contrôle du baroréflexe sur la fréquence cardiaque et réduit le niveau de l'HTA chez des rats SHR (Silva et al. 1997). Un exercice de 13 semaines augmente le gain de la sensibilité des barorécepteurs aortiques du rat SHR, ce qui peut entraîner une régulation de la pression artérielle plus efficace par les baroréflexes (Brum et al. 2000).

3. Exercice et processus inflammatoire

Le stress oxydatif peut être induit par l'activation du système inflammatoire (Vaziri 2008) et inversement. Il favorise le processus inflammatoire par l'intermédiaire du NF- κ B, qui à son tour stimule la sécrétion des cytokines pro-inflammatoires. Le cercle vicieux dans lequel agissent ces deux éléments, est impliqué dans la physiopathologie de l'HTA. (Meng et al. 2003; Rodriguez-Iturbe et al. 2003) et contribue au risque cardiovasculaire.

L'altération dans la production ou la biodisponibilité du NO, observée dans la majorité des maladies cardiovasculaires notamment l'HTA, est associée au stress oxydatif, à l'inflammation, à la stimulation de l'agrégation plaquettaire, à l'augmentation de la synthèse ainsi qu'à libération des cytokines pro-inflammatoires. Les effets bénéfiques de l'exercice sur le système cardiovasculaire pourraient s'expliquer, entre autres, par l'amélioration des marqueurs de l'inflammation.

La sédentarité peut être un facteur de risque pro-inflammatoire alors que l'exercice physique a des effets anti-inflammatoires par le contrôle au moins de trois cytokines: IL-6, TNF- α et interféron- γ (IFN- γ) (Balducci et al. 2010; Fischer et al. 2007; Petersen et Pedersen 2005). Il a été montré récemment que l'exercice physique améliore les taux sériques des cytokines anti-inflammatoires: interleukine-4 (IL-4) et interleukine-10 (IL-10) chez des patients diabétiques (Hopps et al. 2011).

Chez des sujets sains, l'exercice physique réduit la libération de TNF- α plasmatique induit par les lipopolysaccharides (LPS) (Sloan et al. 2007). L'exercice semble aussi s'opposer aux effets délétères du TNF- α (résistance à l'insuline, désordres métaboliques et instabilité des plaques d'athérosclérose) (Szostak et Laurant, 2011). Il a également été montré que le taux d'IL-6 augmente pendant l'exercice physique chez des patients diabétiques de type 2. Cette production d'IL-6 aurait pour origine les fibres squelettiques musculaires en contraction (Petersen et Pedersen 2005). Par ailleurs, l'augmentation du taux d'IL-6 pendant l'exercice, entrainerait la stimulation et la libération de cytokines plasmatiques anti-inflammatoires (IL-10 et IL-1Ra (antagoniste du récepteur IL-1)) (Steensberg et al. 2003) et l'inhibition de la production d'interleukines pro-inflammatoires IL-1 α , IL-1 β , TNF- α , IL-8 ainsi que de la production de chimiokines, et de l'activation des macrophages (Moore et al. 1993). Ces

derniers jouent un rôle essentiel dans l'activation et le recrutement des cellules immunitaires sur les sites de l'inflammation (Petersen et Pedersen 2005).

L'intensité, la durée et le type d'exercice peuvent influencer les paramètres immunitaires, qui sont associés aux maladies inflammatoires chroniques (Pedersen et Hoffman-Goetz 2000; Petersen et Pedersen 2005; Ploeger et al. 2009; Timmons 2005). Par exemple, au cours de l'exercice aigu, la libération d'IL-6 peut ou pas augmenter de manière significative (Petersen et Pedersen 2005). Les neutrophiles, lymphocytes (cellules T, B et NK) et les monocytes, ainsi que les concentrations plasmatiques des cytokines pro- (TNF- α , IL-1) et anti-inflammatoires (IL-1ra, IL-10) varient selon l'intensité et la durée de l'exercice.

Chez les humains l'exercice physique régulier peut réduire les niveaux de plusieurs marqueurs inflammatoires. Parmi lesquels les protéines C-réactives (CRP) dont la production est stimulée par l'IL-6 au niveau du foie ou des adipocytes (Calabro et al. 2005), les leucocytes (Geffken et al. 2001) et les fibrinogènes plasmatiques (Geffken et al. 2001; Lakka and Salonen 1993).

Pendant l'exercice physique, les cytokines anti-inflammatoires (IL-1ra, et l'IL-10) augmentent, alors que les taux circulants de cytokines pro-inflammatoires comme le TNF- α et l'IL-1 ne changent pas (Petersen and Pedersen 2005). De même, dans des cellules en culture provenant de patients ischémiques ayant suivi un programme d'exercice physique de 6 mois, Smith, J.K (1999) (Smith et al. 1999) ont observé une réduction de la production des cytokines pro-inflammatoires IFN- γ , TNF- α et l'IL-1 β , et une augmentation de la production des cytokines anti-inflammatoires TGF- β , IL-4 et IL-10, par rapport aux niveaux de base.

La teneur en glycogène intramusculaire semble être un stimulus important pour la transcription du gène d'IL-6 (Petersen and Pedersen 2005). Il a été démontré que l'IL-6 augmente au niveau des fibres musculaires contractiles (Hiscock et al. 2004; Penkowa et al. 2003; Steensberg et al. 2002) et peut être libéré par les adipocytes tissulaires (Lyngso et al. 2002) ou le cerveau (Nybo et al. 2002). Son taux plasmatique augmente d'une façon exponentielle pendant l'exercice, cette augmentation est proportionnelle au type, durée et intensité de l'exercice (Febbraio and Pedersen 2002; Pedersen et al. 2003; Pedersen et al. 2001).

En plus de son effet anti-inflammatoire au niveau vasculaire. La production de l'IL-6 par les fibres musculaires, au cours de l'exercice, entraîne plusieurs effets métaboliques

comme la lipolyse et l'oxydation du tissu adipeux, ainsi que l'homéostasie du glucose au niveau du foie.

4. Exercice et HTA associée au traitement avec l'r-HuEPO

L'r-HuEPO, produit largement utilisé pour corriger l'anémie, a permis à de nombreux patients de reprendre leur activité quotidienne normale en raison de l'énergie fournie par son utilisation. L'augmentation de la masse globulaire circulante, par le biais de l'r-HuEPO, permet un meilleur transport de l'O₂ à destination des tissus musculaires. Ceci a pour conséquence une amélioration des capacités physiques (Elliott 2008).

Le transport d'O₂ est un facteur significatif dans l'augmentation de la production d'énergie aérobie. L'utilisation du r-HuEPO a pour effets une augmentation de la consommation en O₂, un recul du seuil ventilatoire, une diminution de la production des lactates, une meilleure utilisation des graisses de réserve ainsi qu'une épargne glycogénique. Ces effets s'apparentent pratiquement à ceux d'un entraînement idéal. Il y a donc une corrélation positive entre l'augmentation des hématies circulantes et l'amélioration des qualités ergogéniques, surtout pour les sports d'endurance. Pour cette raison, l'r-HuEPO a été employée de manière inappropriée, par plusieurs catégories de sportifs de haut niveau, comme produit dopant (Robinson et al. 2003).

Les effets pervers de l'utilisation de l'r-HuEPO chez les sportifs ont été notés sous forme d'accidents vasculaires: la thrombose, qui est encore favorisée par la déshydratation due à l'effort et la bradycardie (en particulier du sommeil). Le risque thromboembolique oblige souvent l'utilisateur à associer la prise d'EPO avec un anticoagulant (aspirine, coumarine, héparine) et une supplémentation en fer. Par ailleurs, le traitement avec l'r-HuEPO peut élever la pression artérielle, qui augmenterait encore plus lors d'un exercice physique (Gareau et al. 1996; Gauthier 2001; Piloto et al. 2009; Thein et al. 1995). Ceci pourrait être le résultat de l'augmentation simultanée de la viscosité sanguine et du nombre d'hématies, et la diminution de la vasodilatation induite par l'hypoxie. Tous ces faits pourraient conduire au développement d'une HTA et d'une tachycardie (Piloto et al. 2009).

Il a été clairement démontré que l'exercice diminue la pression artérielle et prévient l'HTA dans la plupart des modèles expérimentaux, comme par exemple l'HTA induite par le L-NAME (Kuru et al. 2009a). Cependant, Meziri et al (2011) ont récemment montré que l'r-HuEPO aggrave l'état d'HTA du rat hypertendu L-NAME, lorsque celui-ci subit un protocole d'entraînement, aggrave la dysfonction endothéliale et augmente fortement le taux de mortalité. Ceci montre que la présence d'une altération de la fonction endothéliale, pas forcément induite par l'utilisation de l'r-HuEPO, peut être un élément essentiel dans le développement de l'HTA dans le cadre d'un entraînement.

L'inhibition de la production du NO par le L-NAME entraîne le développement d'une HTA chez les souris transgéniques sur-exprimant l'r-HuEPO, avec vasoconstriction artérielle sévère et mortalité accrue. L'inhibition du NO pourrait être responsable d'un déséquilibre endothélial NO/ET-1 en faveur de l'ET-1, entraînant une augmentation du tonus vasculaire pouvant être à l'origine d'une HTA (Quaschnig et al. 2003). A l'inverse, il se trouve que le traitement de ces souris avec des antagonistes des récepteurs ETA de l'endothéline-1, en présence du L-NAME, prolonge leur survie.

Ces résultats nous amènent à postuler que l'altération de la vasodilatation NO et flux-dépendante ainsi que le déséquilibre endothélial ET1/NO, en faveur de l'ET-1, est la cause de l'HTA induite par le traitement avec l'r-HuEPO.

V. Les cellules T régulatrices (Treg): éléments cellulaires de prévention des désordres cardiovasculaires

1. Inflammation vasculaire et rôle du système immunitaire

L'inflammation est un processus de guérison, mais peut devenir dangereux lorsque les réponses inflammatoires deviennent chroniques. C'est un processus complexe qui stimule les interactions entre les cellules circulantes et les cellules vasculaires pour compenser les changements hémodynamiques graves qui affectent l'homéostasie de la paroi vasculaire. L'inflammation joue un rôle clé dans le remodelage vasculaire parallèlement à la croissance

vasculaire et la prolifération des CMLV. L'inflammation vasculaire est un processus qui implique une plus grande perméabilité de la paroi vasculaire ainsi que l'infiltration des cellules immunitaires et la réparation tissulaire (Touyz et Schiffrin 2003).

L'inflammation est une réponse adaptative qui est déclenchée par des stimuli, telles que l'infection et les lésions tissulaires (Libby 2007). Elle est caractérisée par la libération séquentielle des cytokines, des chimiokines et des facteurs de croissance qui régulent l'augmentation de la perméabilité vasculaire et le recrutement des leucocytes. Toutefois, lorsque l'inflammation persiste (inflammation chronique), elle peut endommager les tissus et provoquer la perte de leur fonction (Pullamsetti et al. 2011). L'inflammation chronique peut se manifester en raison de la persistance de l'infection, de l'antigène, des lésions tissulaires ou d'un échec des mécanismes endogènes anti-inflammatoires (Libby 2007).

La perméabilité vasculaire est un concept qui met en évidence le rôle de l'endothélium vasculaire des petits vaisseaux sanguins - interface entre le sang circulant et les tissus. Ce processus augmente lors des phénomènes inflammatoires, il est caractérisé par une contraction des cellules endothéliales et une diminution de leur adhérence mutuelle, permettant le passage des petites molécules (ions, eau, nutriments), voire des cellules entières (lymphocytes) vers l'intérieur ou l'extérieur du vaisseau.

Dans les conditions physiologiques, la perméabilité vasculaire est nécessaire pour maintenir l'homéostasie du milieu interne. Dans les conditions pathologiques, notamment liées à l'inflammation, la perméabilité vasculaire devient l'étape limitante de la progression de la maladie vasculaire. Cette dernière dépend du degré de recrutement et d'infiltration des cellules immunitaires dans les sites inflammatoires.

L'inflammation vasculaire contribue à la physiopathologie de l'HTA par l'augmentation de l'expression des molécules d'adhésion, l'extravasation des leucocytes, la production des cytokines, l'augmentation du stress oxydatif et l'activation des cellules immunitaires (Schiffrin 2002). La composante inflammatoire et immunitaire au niveau des vaisseaux altérés comprend les monocytes, les neutrophiles, les cellules dendritiques (CD), les macrophages, les lymphocytes, les fibroblastes, les cellules endothéliales et les cellules musculaires lisses. Vraisemblablement, les cellules circulantes migrent vers les sites de lésion, se rapprochent ou adhèrent aux cellules endothéliales, pour stimuler la libération d'une grande

variété de substances qui agissent sur l'environnement local et induisent le chimiotactisme (Pullamsetti et al. 2011).

Les cytokines et les facteurs de croissance ainsi produits, stimulent les effets de l'inflammation via la communication inter-cellulaire, au niveau vasculaire. Ces interactions contribuent au remodelage vasculaire, à travers le remodelage matriciel, le dépôt de collagène, la prolifération et la migration de tous les types de cellules vasculaires (Davis et al. 2003).

On distingue deux types principaux d'immunité naturelle: innée et acquise, pouvant être à l'origine d'une inflammation vasculaire.

Immunité innée

L'immunité innée est une immunité élémentaire qui est adaptée seulement à un nombre très réduit d'antigènes. Parmi ses éléments, on distingue les cellules dendritiques (CD), les mastocytes et les macrophages/monocytes.

Les CD, cruciales dans l'activation des cellules T naïves, jouent un rôle important en tant que cellules présentatrices d'antigène. Ce sont des modulateurs clés dans l'initiation du processus inflammatoire (Perros et al. 2007). L'accumulation de ces cellules permet la présentation des anticorps aux cellules endothéliales, aux fibroblastes et aux antigènes nucléaires (Perros et al. 2007; Tamby et al. 2005).

Les mastocytes sont des cellules effectrices majeures dans les réactions de défense immunitaire. Lors de l'activation, les mastocytes stimulent un large spectre de cytokines pro-inflammatoires, de facteurs de croissance, de substances vasoactives et des protéases (tryptase et chymase). Les mastocytes sont une source riche d'interleukines (IL-4). Elles sont rares dans le système vasculaire normal mais, leurs taux vasculaires augmentent en cas de pathologies hypertensives par exemple (Heath and Yacoub 1991; Miyata et al. 2000).

Le recrutement des macrophages et des cellules mononucléaires (exemple neutrophiles), ainsi que leur infiltration vasculaire, sont souvent associés à l'inflammation. Leur activation peut conduire à la libération d'une variété de cytokines pro-inflammatoires (la MCP-I et métalloprotéases matricielles) qui sont capables de provoquer une vasoconstriction, une augmentation de la perméabilité vasculaire et une prolifération induite (Heath et Yacoub 1991; Itoh et al. 2006).

Immunité acquise

L'immunité acquise se produit sous forme de réponse secondaire (immunité à mémoire), suite à la réapparition du même antigène. Parmi ses éléments :

Les lymphocytes B (cellules B) sont des cellules fondamentales pour la réponse immunitaire humorale, en raison de leur potentiel à se différencier en cellules produisant des anticorps. Les cellules B jouent également un rôle crucial dans la régulation immunitaire à médiation cellulaire, grâce à la présentation des antigènes, la production de diverses cytokines, la différenciation des cellules T effectrices, et la collaboration avec les cellules dendritiques présentatrices de l'antigène (Nicolis et al. 2005).

Les lymphocytes T (ou cellules T) jouent un rôle central dans l'immunité à médiation cellule-cellule. Ils se distinguent des autres types de lymphocytes, telles que les cellules B et cellules tueuses naturelles (cellules NK), par la présence d'un récepteur spécifique sur leurs surfaces, appelées récepteurs des cellules T (TCR). Il existe plusieurs types de cellules T, parmi lesquels on trouve :

Les lymphocytes T cytotoxiques (CTL ou CD8+) qui détruisent les cellules infectées, les lymphocytes T auxiliaires (T-Helper ou Th) qui sont des intermédiaires de la réponse immunitaire et les lymphocytes T régulatrices (Treg). Les Treg sont très importants pour le maintien de l'homéostasie. Leur rôle principal est de réprimer l'activité des cellules immunitaires, soit auto-immune, soit en fin de réaction immunitaire. Ils se distinguent facilement des autres lymphocytes T car ils portent à leur surface les marqueurs CD4 et CD25 à leur état basal, et expriment la molécule FOXP3 (marqueurs spécifique des Treg) dans leur cytosol.

Les lymphocytes NKT sont un type de lymphocytes présentant des marqueurs de cellule T (CD3) et des marqueurs de cellules NK. Ils sont donc un lien entre le système immunitaire inné et le système immunitaire adaptatif.

La réponse inflammatoire

Pendant le processus inflammatoire, les signaux immunitaires de types inné et acquis interagissent et convergent sur deux types majeurs de cellules: les cellules épithéliales et les

cellules mésenchymateuses des organes cibles (Libby 2007). Ces signaux modulent les réponses tissulaires telles que le recrutement des leucocytes impliqués dans l'inflammation chronique, le remodelage de la matrice extracellulaire, la prolifération ou la mort cellulaire, sans oublier l'angiogenèse (Fig. 2). Les lymphocytes T auxiliaires sont abondants au cours du processus inflammatoire dans de nombreux organes, y compris les artères, notamment les plaques d'athérosclérose (Libby 2007). Les aspects fondamentaux de l'inflammation impliquent la migration sélective et séquentielle des cellules du sang dans les tissus et ainsi l'activation locale et l'interaction de ces cellules avec des cellules de tissus locaux (Libby 2007).

Dans les conditions normales, les cellules endothéliales vasculaires résistent à un contact prolongé avec les leucocytes. Cependant, suite à l'exposition à un stimulus d'activation (constituants microbiens, cytokines pro-inflammatoires), l'endothélium exprime VCAM-1 et les éléments de la famille des sélectines, P et E (Cybulsky et Gimbrone 1991; Lasky et al. 1989). Le VCAM-1 se lie aux monocytes et aux lymphocytes T. La P-sélectine se lie aux monocytes et aux neutrophiles tandis que la E-sélectine se lie aux neutrophiles (Bevilacqua et al. 1989; Libby 2007). Après l'adhésion à la surface endothéliale, les monocytes migrent dans la paroi artérielle médiée par des chimiokines telles que les MCP-1 (Libby 2006).

Une fois présent dans les tissus tels que la paroi de l'artère, les cellules du système immunitaire produisent des ROS, des cytokines procoagulants, et d'autres petites molécules qui amplifient et soutiennent la réponse inflammatoire.

Les cellules épithéliales et mésenchymateuses répondent aux signaux pro-inflammatoires produits par les phagocytes mononucléaires et lorsqu'elles sont activées, participent activement à la propagation de la réponse inflammatoire par la production d'un spectre similaire de médiateurs comme les phagocytes.

Il a été montré que l'exposition des cellules endothéliales à des stimuli tels que les endotoxines bactériennes ou TNF recombinante humaine, entraîne l'expression de l'IL-1 α et l'IL-1 β (Libby et al. 1986). Des travaux ultérieurs ont complété le tableau des cytokines et autres protéines pathogènes exprimées par l'endothélium et le muscle lisse vasculaire (IL-1 β , IL-1 α , IL-6, IL-18, TNF, M-CSF, MCP-1, ICAM-1) (Kranzhofer et al. 1999; Yu et al. 1992).

Les cellules immunitaires sont attirées vers les sites d'inflammation pour stimuler la migration et la prolifération cellulaire ainsi que la synthèse des protéines dans la paroi vasculaire. L'infiltration des cellules immunitaires est une étape cruciale dans le processus inflammatoire. L'infiltration des neutrophiles est une étape cruciale de la réponse inflammatoire. Elle induit des lésions vasculaires par une production accrue des ROS. L'endommagement vasculaire est associé à l'activité des cellules endothéliales, les CMLV et les cellules immunitaires (lymphocytes, macrophages, DC et d'autres lignées cellulaires) (Fig. 6).

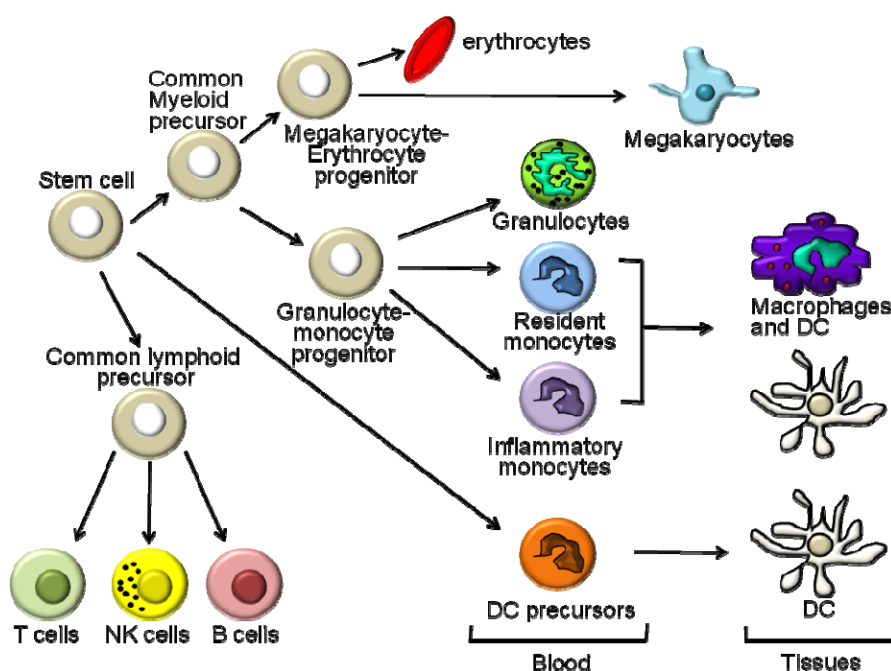


Figure 6. Origine et différenciation hématopoïétique des cellules immunitaires. Imhof et al. (Imhof and Aurrand-Lions 2004).

Il est à noter aussi qu'une réponse vasculaire inflammatoire efficace dépend des interactions cellule-cellule. Les cellules T sont des régulateurs importants de la réponse inflammatoire, d'ailleurs ils sont présents dans l'adventice de l'aorte avant et après l'inflammation (Galkina et al. 2006).

2. Importance du système immunitaire dans la pathologie cardiovasculaire et l'HTA

L'inflammation vasculaire qui est caractérisée par une infiltration des cellules immunitaires est un mécanisme important dans le développement des maladies cardiovasculaires et l'HTA (Eriksson et al. 2001; Schiffrin 2002; Touyz et Schiffrin 2003). Elle se traduit par une expression accrue des molécules d'adhésion, une extravasation des leucocytes, une activation des cellules immunitaires avec production de cytokines et augmentation du stress oxydatif (Schiffrin 2010).

Les désordres vasculaires induits par l'inflammation sont caractérisés par une accumulation de cellules immunitaires dans les différentes couches de la paroi vasculaire : macrophages, cellules dendritiques, cellules naturelles tueuses (NK) et lymphocytes T et B. Les cellules de l'immunité innée (macrophages, granulocytes et cellules NK) comme celles de l'immunité acquise (cellules dendritiques et lymphocytes) contribuent à la pathologie hypertensive (Verlohren et al. 2009).

Récemment, il a été démontré que l'infiltration des macrophages et des lymphocytes T dans l'adventice est associée au développement de l'HTA et au remodelage vasculaire (Guzik et al. 2007). La souris déficiente en macrophages vasculaires, par contre, est incapable de développer une HTA et d'induire un remodelage vasculaire suite à l'administration d'Ang II (De et al. 2005) ou de la combinaison DOCA-sel (Ko et al. 2007).

L'HTA voit l'accumulation des cellules T activées dans la graisse périvasculaire et dans les reins. Dans ces sites, ces cellules libèrent des cytokines qui agissent sur les cellules vasculaires adjacentes et l'épithélium tubulaire du rein (Harrison et al. 2010). Conformément à ce concept, plusieurs études récentes ont appuyé l'idée que les cytokines produites par les cellules T et d'autres cellules inflammatoires contribuent à l'HTA. Le traitement par des antagonistes du TNF α diminue la pression artérielle de rats spontanément hypertendus (Tran et al. 2009), prévient la dysfonction vasculaire et l'HTA provoquée par l'Ang II (Guzik et al. 2007), et abaisse la pression artérielle de souris présentant une inflammation chronique (Venegas-Pont et al. 2010). De même le traitement avec des antagonistes de TNF α diminue l'inflammation rénale chez des rats transgéniques hypertendus (Muller et al. 2002). Il a été prouvé que les cytokines proinflammatoires IL-6 et IL-17 sont impliquées dans l'HTA induite par l'Ang II (Schrader et al. 2007; Madhur et al. 2010).

Les cellules T et NK sont entièrement équipés avec les composants du SRAA et sont potentiellement capables de produire et livrer l'Ang II aux sites d'inflammation (Jurewicz et al. 2007).

Ces données soutiennent le rôle de l'immunité innée dans le mécanisme des réponses inflammatoires lors de l'HTA. Le rôle de l'immunité acquise dans l'HTA n'a été démontré que récemment, plus particulièrement l'implication des lymphocytes T dans les réponses immunitaires adaptatives et leurs effets dans le processus inflammatoire. Cette immunité acquise contribue à l'élévation de la pression artérielle et au remodelage vasculaire. Guzik et al. (2007) ont utilisé des souris RAG-1^{-/-} (*recombination activating genes*) qui sont déficientes à la fois en lymphocytes T et B. Le transfert adoptif des cellules T a un effet hypertenseur sur ce type de souris traitées avec l'Ang II, associé à un stress oxydatif (augmentation du taux des •O₂- aortique) et une dysfonction endothéliale (altération de la vasodilatation en réponse à l'acétylcholine).

3. Rôle des Treg dans l'HTA

Les Treg sont des immunosuppresseurs qui se développent dans le thymus (Treg naturel [n]) (Stephens and Shevach 2007). Ils agissent ensuite au niveau des tissus périphériques en exerçant un effet inhibiteur sur les cellules T pro-inflammatoires. Lors d'une réponse, les Treg peuvent également se différencier dans la périphérie (Treg induite [i]) (Taleb et al. 2008).

Les Treg expriment les CD4, CD25 (récepteur IL-2), CD45RB (commun à tous les leucocytes), CD62L (molécule d'adhésion L-sélectine), CD103, et les antigènes cytotoxiques des lymphocytes T (ACTL). Les cellules Treg agissent sur plusieurs types cellulaires (Th1, Th2, Th17, cellules B, CD et autres) pendant le processus immunitaire (fig. 7).

Le facteur de transcription *forkhead box protein 3* positive (Foxp3+) est spécifique aux Treg et régule son effet inhibiteur sur les cellules T pathogènes. L'IL-2 est essentielle en quantité minimale pour l'entretien des Treg, alors que de grandes quantités d'IL-2 sont cruciales pour effectuer la différenciation des cellules T et leur prolifération (de la Rosa et al. 2004; Thornton et Shevach 1998). En régulant la transcription d'IL-2, les Treg Foxp3+ régulent les réponses pro-inflammatoires. Les cellules naïves CD4⁺ CD25⁻ se trouvent à la

périphérie. Elles peuvent se différencier en cellules CD4⁺ CD25⁺ Foxp3⁺ (Treg) soit en présence d'IL-10 ou en présence de TGF- β (Carrier et al. 2007; Levings et al. 2005). Les effets inhibiteurs des Treg sont basés sur l'expression des cytokines inhibitrices, au niveau du cytosol, sur les perturbations métaboliques et sur l'inhibition de la fonction des cellules dendritiques (CD).

L'action inhibitrice des Treg sur les cellules T activées s'explique en trois modes de suppression qui ne sont pas complètement élucidés. Il s'agit notamment de la suppression des cellules de manière contact-dépendante, la limitation des facteurs de croissance tels que IL-2 et la production des cytokines inhibitrices (Taleb et al. 2008). Le contact cellule-cellule implique les récepteurs CTLA-4, exprimés sur les Treg avec les molécules CD80 (exprimé sur les lymphocytes T effecteurs) ou avec les molécules CD80/CD86 sur les cellules présentatrices d'antigène (APC) (Paust et al. 2004). L'interaction entre les Treg et APC conduit à une diminution des réponses des lymphocytes T effectrices par catabolisme du tryptophane (Fallarino et al. 2003).

Une fois activées, les cellules T effecteurs (Teff) sécrètent de l'IL-2, qui se lie au Treg. Elles entretiennent et activent les gènes des Treg comme les Foxp3. Par cette activation, et par un effet de rétroaction, les Treg suppriment et privent les lymphocytes Teff du facteur de croissance essentiel IL-2.

Les Treg peuvent aussi inhiber l'activité des lymphocytes T. Ceci, par la production de cytokines solubles inhibitrices telles l'IL-10, le TGF- β et l'IL-35 (Collison et al. 2007). Le facteur de transcription Foxp3 est nécessaire à la médiation de l'effet inhibiteur des Treg sur les cellules T pathogènes. Il est important de mentionner qu'aucune fonction suppressive n'a été observée sur des Treg isolées de souris knockout Foxp3 (Fontenot et al. 2003).

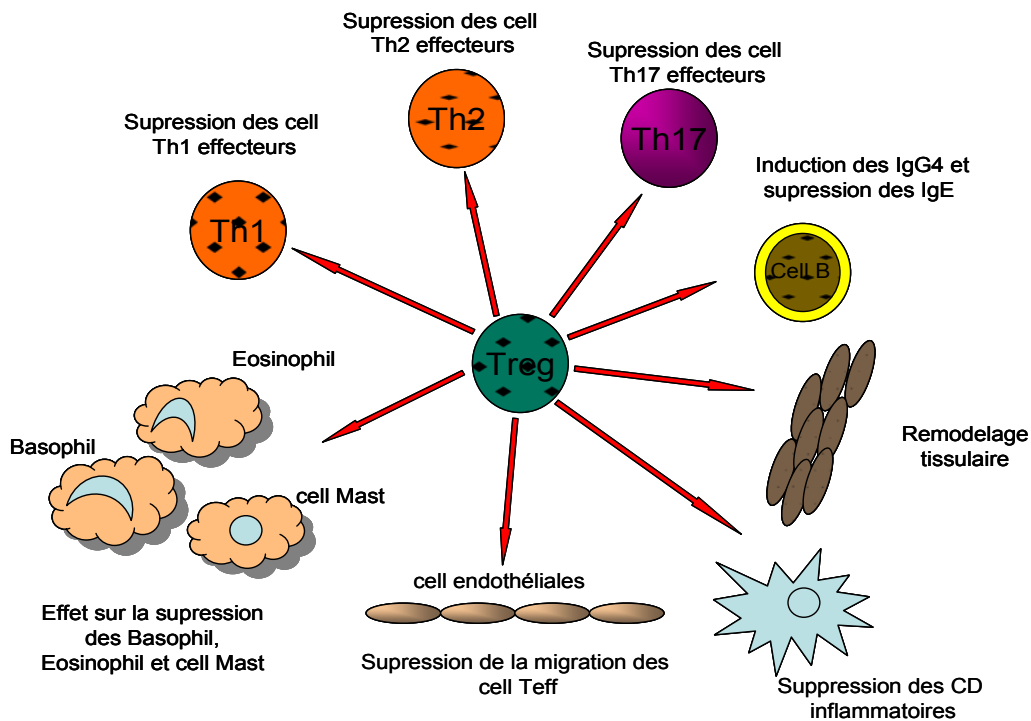


Fig.7 Sites d'action des cellules Treg au cours du processus inflammatoire (Akdis 2009)

Rôle des lymphocytes T dans l'hypertension

Chez des rats rendus hypertendus par l'infusion d'Ang II, il a été montré que la production d'IFN- γ (produit par les Th1), au niveau des reins et de la rate, augmente parallèlement à une diminution de la production d'IL-4 (cytokine produit par les Th2) (Shao et al. 2003). Ceci montre que les cellules Th1 et Th2 sont impliquées dans l'HTA induite par l'Ang II surtout que le blocage des récepteurs AT1 restaure leurs taux.

La première étude qui a clairement mis en évidence l'implication des lymphocytes T effecteurs (Th1) dans l'HTA et le remodelage vasculaire, chez des souris infusées par l'angio II ou par l'association Doca-sel, est celle de Guzik et al. (2007).

Il a également été mis en évidence que la réduction des cellules dendritiques (cd8a+), la réduction des cellules NK et l'altération des cellules T mémoires (cd8) chez des souris, empêche l'élévation de la pression artérielle induite par l'infusion d'Ang II. Par contre, la

greffe de moelle osseuse permet de rétablir l'effet de l'Ang II chez ces souris (Gratze et al. 2008).

L'IL-17 produit par les Th17 joue un rôle important dans l'HTA et les désordres vasculaires induits par l'Ang II. Ceci se justifie par le fait qu'il a été prouvé que le taux d'IL-17 augmente dans les cellules provenant des souris traitées avec l'Ang II et que l'absence d'IL-17 (souris IL-17^{-/-}) empêche l'élévation de la pression artérielle induite par l'Ang II, avec diminution de l'infiltration des cellules T dans les tissus adipeux périvasculaires et de la production d'anions superoxyde au niveau de l'aorte (Madhur et al. 2010).

Le système nerveux central (SNC) peut stimuler la participation des lymphocytes T dans l'inflammation et l'HTA périphérique suite à une augmentation du stress oxydatif dans les tissus périventriculaires du cerveau. Cela a été démontré par l'inactivation du gène de la superoxyde dismutase extracellulaire dans le système nerveux central de souris. Cette inactivation du dit gène, qui a été suivie par une production accrue d'anions superoxyde dans le cerveau (Lob et al. 2010), est associée à une élévation de la pression artérielle parallèlement à une augmentation de l'infiltration rénale et vasculaire des Th1 et de celle des médiateurs inflammatoires. Les mécanismes exacts et les voies de signalisations à l'origine de ce processus restent à établir.

Rôle des Treg dans l'HTA

Le transfert adoptif (transfert passif des cellules dans un nouvel organisme dans le but de transférer les fonctionnalités et les caractéristiques immunologiques) des Treg réduit considérablement l'activation et l'infiltration des macrophages. Il réduit également la libération des cytokines proinflammatoires (TNF- α) et améliore la relaxation artériolaire coronaire endothélium-dépendante. Ceci montre que les Treg ont un rôle important dans le développement de la dysfonction endothéliale coronaire dans l'hypertension (Matrougui et al. 2011).

Il a été montré que la déficience partielle en Treg potentialise les lésions rénales induites par la reperfusion ischémique. La réduction du nombre des Treg entraîne une augmentation des neutrophiles, des macrophages et de la production des cytokines (Kinsey et al. 2009).

Le groupe de Schiffrin a montré, pour la première fois, que les Treg sont impliquées dans un modèle d'HTA génétique sensible au sel, marqué par un système d'endothéline *up-régulé*. Sur ce modèle génétique, la participation du chromosome 2 (qui porte de nombreux gènes pro-inflammatoires) explique le rôle de la génétique dans la détermination de la réponse immunitaire conduisant à une élévation de la pression artérielle et au remodelage vasculaire (Viel et al. 2010a). Ils ont étudié une souche consomic (SSBN2), contenant le génome des rats Dahl sensibles au sel (souche hypertendus) et le chromosome 2 issu d'une souche témoin normotendue, afin d'évaluer les influences génétiques sur les réponses inflammatoires dans l'HTA. Ils ont observé une augmentation des marqueurs des cellules Treg (CD4⁺ CD25⁺ ; CD8⁺ CD25⁺, lymphocytes (nombre et activité), Foxp3, IL-10 et TGF- β). Ils ont mis en évidence une augmentation des lymphocytes T (CD45⁺ CD3⁻, CD45⁺ CD3⁺) et des cellules Treg (CD4⁺ CD25⁺ et CD8⁺ CD25⁺) dans le sang et la rate. Celle-ci a été associée à une augmentation de la pression artérielle et de l'inflammation vasculaire (Viel et al. 2010).

Le système vasculaire des rats hypertendus présente un dysfonctionnement des Treg. Ces derniers expriment des niveaux faibles de Foxp3b et ne produisent pas de médiateurs immunosuppresseurs (TGF- β et IL-10), ce qui conduit ainsi à une exagération de la réponse inflammatoire (Viel et al. 2010). Les cellules Treg ont aussi un effet sur le remodelage cardiaque secondaire à une élévation de la pression artérielle induite par l'Ang II. En effet, le transfert adoptif des Treg améliore les lésions cardiaques et les réponses aux stimulations électriques chez des souris infusées avec l'Ang II, sans pour autant diminuer la pression artérielle (Kvakan et al. 2009).

Bien que l'implication du système immunitaire dans le développement des maladies cardiovasculaires soit suggéré par plusieurs études (Ait-Oufella et al. 2006; Galkina et al. 2007; Taleb et al. 2008; Valaperti et al. 2008), la mise en évidence du rôle des Treg dans l'HTA et d'autres formes de maladies cardio-vasculaires est à ses premiers balbutiements.

Nos deux dernières études expérimentales sont parmi les premières publications qui étudient l'effet du transfert adoptif des Treg sur l'HTA et les désordres vasculaires induits.

- CHAPITRE 2 - PERTINENCE ET OBJECTIFS DE RECHERCHE

I. Les objectifs généraux

L'HTA est l'une des pathologies cardiovasculaires les plus fréquentes au monde. Plusieurs millions de patients hypertendus sont traités en France et son coût économique est considérable. Elle est souvent associée aux désordres vasculaires des grosses artères comme des artères de résistances localisées au niveau des organes tels le cœur, les reins, le cerveau et même les yeux. L'HTA peut être contrôlée par le changement du mode de vie, en luttant par exemple contre l'obésité, le tabagisme, la consommation des boissons alcoolisées et l'excès d'utilisation du sel. Dans la même veine, des moyens pharmacologiques (médicaments antihypertenseurs) peuvent être également utilisés chez des patients pour lesquels les mesures usuelles ne suffisent pas à atteindre un contrôle de la pression artérielle, l'exercice physique d'endurance restant toujours un moyen de prévention recommandé.

Toutefois, les mécanismes cellulaires et endocriniens qui sont à l'origine de l'HTA et des désordres vasculaires associés ne sont pas totalement compris. Aussi, la recherche sur l'étiologie de ces troubles physiopathologiques demeure un enjeu majeur de l'amélioration de la qualité de vie et de la santé des patients qui en souffrent.

Plusieurs facteurs peuvent être à l'origine des désordres vasculaires associés à l'HTA. Parmi ceux-ci, citons le traitement avec la r-HuEPO (en cas d'insuffisance rénale chronique) et la stimulation du SRAA. Ces deux éléments sont impliqués dans la dysfonction endothéliale, le remodelage vasculaire, le stress oxydatif et l'inflammation.

Plusieurs études ont mis en avant le fait que l'HTA et les désordres vasculaires sont les effets délétères du traitement de l'anémie par la r-HuEPO (facteur limitant de ce traitement). Cependant, à notre connaissance, aucune étude n'a été faite sur les effets thérapeutiques de l'exercice physique sur l'HTA induite par la r-HuEPO.

L'objectif de la première partie de cette thèse, était d'étudier l'impact du *shear stress* et de l'exercice sur les désordres ou dysfonctions vasculaires induits par la r-HuEPO, en présence d'un déséquilibre endothélial (ET-1/NO). Pour ce faire, trois environnements ont été utilisés (in vitro (cellules en culture), in vitro (artères mésentériques isolées) et in vivo (souris transgéniques sur-exprimant l'ET-1 endothéliale).

L'exacerbation du SRAA est impliquée dans l'augmentation de la PA et les désordres vasculaires. Les traitements avec des bloqueurs des composantes de l'angiotensine II et de l'aldostérone sont efficaces pour lutter contre l'HTA. Toutefois, les résultats de quelques récentes études suggèrent l'implication du système immunitaire (spécialement des lymphocytes T) dans la physiopathologie de l'HTA induite par l'activation du SRAA.

Aussi, la seconde partie de cette thèse consistait à examiner l'importance du système immunitaire dans la physiopathologie de l'HTA et des désordres vasculaires, lorsque le SRAA est exacerbé. Il s'agissait également de déterminer le rôle des cellules T régulatrices comme éléments de prévention.

L'intérêt général de ce travail était de démontrer que des stratégies thérapeutiques autres que pharmacologiques peuvent être tout aussi efficaces pour prévenir ou traiter les désordres vasculaires et l'HTA.

Le présent document a été rédigé selon le mode « thèse par articles ». Il comporte quatre manuscrits originaux, articulés autour de ces deux grandes parties.

- CHAPITRE 3 - LES ÉTUDES

Étude 1

L'ÉRYTHROPOÏÉTINE RECOMBINANTE
HUMAINE ALTÈRE LA VASODILATATION
FLUX-DÉPENDANTE D'ARTÈRES
MÉSENTÉRIQUES DE RATS PERFUSÉES IN
VITRO, EN PRÉSENCE D'UN DÉSÉQUILIBRE
DU RATIO ENDOTHÉLIAL ENDOTHÉLINE-
1/MONOXYDE D'AZOTE

Human recombinant erythropoietin alters the flow-dependent vasodilatation of in vitro perfused rat mesenteric arteries with unbalanced endothelial endothelin-1/nitric oxide ratio.

Tlili BARHOUMI, Isabelle JALLAT, Alain BERTHELOT and Pascal LAURANT

Publication acceptée dans *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology* (IF 2010: 1, 85)

1. But de l'étude

Notre but était d'étudier, in vitro, les effets directs de l'r-HuEPO sur la vasodilatation NO-dépendante induite par l'élévation du flux intravasculaire des artères de résistance pressurisées et perfusées provenant de rats. Dans un second temps, il s'agissait d'étudier cette même vasodilatation endothélium- et NO-dépendante, lorsque le NO endothélial est inhibé par un agent pharmacologique comme le L-NAME. Face aux différents stimuli, notamment mécaniques tels que l'augmentation de la pression artérielle ou les variations de flux sanguin, l'endothélium maintient un équilibre entre vasoconstriction et vasodilatation. Il module de façon majeure le tonus et la vasomotricité des cellules musculaires lisses sous-jacentes ainsi que l'homéostasie du système cardiovasculaire (Davignon and Ganz 2004). Il a été démontré que l'EPO peut avoir un effet vaso-presseur direct via la contraction des CMLV au niveau des artères de résistance (Heidenreich et al. 1991). L'effet de l'r-HuEPO sur l'HTA est en relation directe avec la balance ET-1/NO (Rodrigue et al. 2008; Ruschitzka et al. 2000). Nous supposons que le traitement par l'r-HuEPO inhibe la vasodilatation endothéliale flux-dépendante induite par l'élévation des forces de cisaillement. Il est aussi suggéré que, dans les conditions expérimentales combinant r-HuEPO et L-NAME, l'élévation du débit de perfusion (en stimulant les forces de cisaillement à la surface endothéliale) provoque un effet vasoconstricteur paradoxal, dont l'élément initiateur serait un déséquilibre du rapport NO/ET-1.

2. Méthode (voir publication jointe pour les détails)

2.1 Prélèvement et montage de l'artère mésentérique

Le jour du sacrifice, des rats mâles *Sprague-Dawley* (âgés de 12 semaines) sont anesthésiés au pentobarbital sodique (50 mg/Kg). Après laparotomie, la première anse intestinale est prélevée et placée dans une solution physiologique. Sous une loupe binoculaire, une artère mésentérique de 2ème ordre est isolée et nettoyée. Un segment de l'artère est ensuite prélevé et monté dans la chambre de pressurisation entre deux canules selon le protocole expérimental défini par Laurant et al. (1997).

2.2 Protocole de perfusion et d'incubation

Après un protocole défini de stabilisation de la préparation artérielle, les artères sont perfusées pendant 15 minutes, soit avec une solution physiologique contrôle, soit une solution physiologique contenant 10^{-4} M de L-NAME et/ou 10 UI/mL de l'r-HuEPO et/ou 10^{-5} M de Bosentan. Après 10 minutes de repos, le flux intravasculaire est augmenté par étape de 10 μ l/min (de 0 à 100 μ l/min) toutes les 3min. Pour chacune des valeurs de flux, on mesure les variations du diamètre de la lumière induite par l'élévation du flux intravasculaire.

2.3 Culture cellulaire

Une lignée de cellules (EA.hy926) est maintenue dans un milieu de culture DMEM, à 37°C avec 5% de CO₂. Pour étudier l'effet du *shear stress* sur les cellules, les expériences ont été réalisées avec le dispositif (Streamer TM) qui génère les contraintes de cisaillement (*shear stress*).

Les cellules sont exposées à deux degrés de *shear stress*: 2 ou 14 dynes/cm². Les cellules sont des contrôles ou incubées avec 10^{-4} M de L-NAME et/ou 10 UI/mL d'r-HuEPO,

pendant 30 min. Les surnageants de culture sont recueillis pour mesurer la concentration d'ET-1 par la méthode ELISA.

3. Principaux résultats

3.1 Effet du L-NAME et de l'r-HuEPO sur le diamètre de base de la lumière vasculaire

L'incubation avec l'r-HuEPO seule ou en présence de L-NAME provoque une diminution du diamètre luminal (vasoconstriction), le L-NAME seul n'ayant aucun effet significatif. La vasoconstriction est plus grande en présence de L-NAME/r-HuEPO que celle obtenue avec l'r-HuEPO seule.

3.2 Effet de l'r-HuEPO sur les changements du diamètre intravasculaire induit par l'élévation du débit intravasculaire et des forces de cisaillement (*shear stress*)

L'r-HuEPO inhibe partiellement la vasodilatation flux-dépendante. Le L-NAME seul inhibe complètement l'élévation progressive du débit intravasculaire flux-dépendante. Par contre, l'association L-NAME/r-HuEPO est responsable d'une diminution significative du diamètre intravasculaire en réponse à une élévation du flux intravasculaire, se traduisant par une vasoconstriction flux-dépendante et une augmentation accrue du *shear stress* correspondant (plus que 25 dyn/cm²)

3.3 Effet du Bosentan sur la réponse vasculaire induite par l'élévation du débit intravasculaire en présence de L-NAME/rHu-EPO

Le Bosentan, inhibiteur non sélectif des récepteurs de l'ET-1, empêche la vasoconstriction flux-dépendante induite par la combinaison L-NAME/rHu-EPO, sans pour autant corriger la vasodilatation.

3.4 Effet du L-NAME et de l'r-HuEPO sur la réponse vasoconstrictrice de l'ET-1 d'artères mésentériques perfusées et pressurisées

La vasoconstriction provoquée par l'ET-1 n'est pas modifiée par l'incubation avec le L-NAME ou l'r-HuEPO. Par contre, l'association L-NAME/r-HuEPO accentue significativement la réponse vasoconstrictrice de l'ET-1.

3.5 Effet du L-NAME et de l'r-HuEPO sur la concentration d'ET-1 de cellules endothéliales en cultures exposées au *shear stress*

Indépendamment de la valeur de *shear stress* appliquée (2 ou 14 dyn/cm²), la concentration d'ET-1 est plus grande dans les cellules traitées avec r-HuEPO, L-NAME et r-HuEPO/L-NAME que dans les cellules non traitées.

Les concentrations d'ET-1 ne dépendent pas du niveau de *shear stress*. La concentration d'ET-1 est cependant plus élevée dans les cellules traitées avec l'r-HuEPO et exposées à un *shear stress* de 14 dyn/cm² comparativement à celui de 2 dyn/cm².

Human recombinant erythropoietin alters the flow-dependent vasodilatation of in vitro perfused rat mesenteric arteries with unbalanced endothelial endothelin-1 / nitric oxide ratio

Tlili Barhoumi, Isabelle Jallat, Alain Berthelot, and Pascal Laurant

Abstract: Chronic use of human recombinant erythropoietin (r-HuEPO) is accompanied by serious vascular side effects related to the rise in blood viscosity and shear stress. We investigated the direct effects of r-HuEPO on endothelium and nitric oxide (NO)-dependent vasodilatation induced by shear stress of cannulated and pressurized rat mesenteric resistance arteries. Intravascular flow was increased in the presence or absence of the NO synthase inhibitor *N*^G-nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME; 10^{-4} mol/L). In the presence of r-HuEPO, the flow-dependent vasodilatation was attenuated, while L-NAME completely inhibited it. The association of r-HuEPO and L-NAME caused a vasoconstriction in response to the rise in intravascular flow. Bosentan (10^{-5} mol/L), an inhibitor of endothelin-1 (ET-1) receptors, corrected the attenuated vasodilatation observed with r-HuEPO and inhibited the vasoconstriction induced by flow in the presence of r-HuEPO and L-NAME. r-HuEPO and L-NAME exacerbated ET-1 vasoconstriction. At shear stress values of 2 and 14 dyn/cm² (1 dyn = 10^{-5} N), cultured EA.hy926 endothelial cells incubated with r-HuEPO, L-NAME, or both released greater ET-1 than untreated cells. In conclusion, r-HuEPO diminishes flow-induced vasodilatation. This inhibitory effect seems to implicate ET-1 release. NO withdrawal exacerbates the vascular effects of ET-1 in the presence of r-HuEPO. These findings support the importance of a balanced endothelial ET-1:NO ratio to avoid the vasopressor effects of r-HuEPO.

Key words: erythropoietin, shear stress, vascular flow, nitric oxide, endothelin-1, L-NAME, culture cells, bosentan.

Résumé : L'utilisation chronique d'érythropoïétine recombinante humaine (EPOrHu) s'accompagne d'effets secondaires vasculaires graves liés à l'augmentation de la viscosité du sang et des contraintes de cisaillement. Nous avons examiné les effets directs de l'EPOrHu sur l'endothélium et la vasodilatation dépendante de NO induite par la contrainte de cisaillement d'artères de résistance mésentériques canulées et sous pression de rats. Le débit intravasculaire a augmenté en présence ou en absence de l'inhibiteur de la NO-synthase, L-NAME (10^{-4} M). L'EPOrHu a atténué la vasodilatation dépendante du débit, alors que L-NAME l'a totalement inhibée. L'association EPOrHu/L-NAME a causé une vasoconstriction en réponse à l'augmentation du débit intravasculaire. Le bosentan (10^{-5} M), un inhibiteur des récepteurs de l'endothéline-1 (ET-1), a corrigé l'atténuation de la vasodilatation observée avec l'EPOrHu et inhibé la vasoconstriction induite par le débit en présence de EPOrHu/L-NAME. L'association EPOrHu/L-NAME a exacerbé la vasoconstriction induite par l'ET-1. Aux valeurs de cisaillement de 2 et 14 dyn/cm², les cellules endothéliales EA.hy926 cultivées, incubées avec l'EPOrHu, L-NAME, ou les deux, ont libéré davantage d'ET-1 que les cellules non traitées. En conclusion, l'EPOrHu diminue la vasodilatation induite par le débit. Cet effet inhibiteur semble impliquer la libération d'ET-1. L'élimination de NO amplifie les effets vasculaires de l'ET-1 en présence de l'EPOrHu. Ces résultats confirment l'importance d'un rapport ET-1/NO endothélial équilibré pour éviter les effets vasopresseurs de l'EPOrHu.

Mots-clés : érythropoïétine, contrainte de cisaillement, débit vasculaire, monoxyde d'azote, endothéline-1, L-NAME, cellules cultivées, bosentan.

[Traduit par la Rédaction]

Introduction

Human recombinant erythropoietin (r-HuEPO) is known to stimulate erythropoiesis and to treat anemia associated with chronic renal failure (Moreno et al. 2000). Its chronic use is

often associated with hypertension and thromboembolism, causing a high rate of cardiovascular mortality in renal failure patients (Raine 1988). Although elevation of blood pressure is considered to be the main adverse effect under r-HuEPO therapy, the precise mechanism is still unknown. Excessive

Received 17 April 2011. Accepted 2 May 2011. Published at www.nrcresearchpress.com/cjpp on 21 July 2011.

T. Barhoumi and P. Laurant. EA4278, Laboratoire de pharm-écologie cardiovasculaire, Pôle sportif et de recherche universitaire,

Université d'Avignon et des Pays de Vaucluse, 15 Boulevard Limbert, 84000 Avignon, France.

I. Jallat. EA3920, Physiopathologie cardiovasculaire et prévention, Université de Franche-Comté, Besançon, France.

A. Berthelot. EA4267, Sciences séparatives biologiques et pharmaceutiques, Université de Franche-Comté, Besançon, France.

Corresponding author: Pascal Laurant (e-mail: pascal.laurant@univ-avignon.fr).

erythrocytosis and blood hyperviscosity have been proposed (Bertinieri et al. 1998). Existence of EPO receptors on vascular endothelial and smooth muscle cells (Anagnostou et al. 1994) supports the hypothesis of a direct effect on the vessel wall. r-HuEPO stimulates production and release of endothelin-1 (ET-1), a potent vasoconstrictor peptide (Carlini et al. 1993; Katoh et al. 1994; Nagai et al. 1995). However, several reports demonstrate that some subjects can cope with excessive erythrocytosis (Santolaya et al. 1989; Juvonen et al. 1991). Transgenic mice overexpressing EPO and reaching hematocrit levels of up to 0.89 have an unaffected heart rate, cardiac output, and blood pressure. In these mice, hypertension and thromboembolism are prevented by markedly enhanced bioavailability of nitric oxide (NO) (Ruschitzka et al. 2000; Vogel et al. 2003).

Vascular tone in small arteries is dependent on endothelial function because endothelial cells are constantly subjected to mechanical stresses in the form of shear stress generated by blood flow. In response to blood flow, mechanical stress exerted on the endothelial surface triggers a balanced endothelium-dependent dilatation via regulation of the expression of genes encoding various vasoactive mediators, among them endothelial nitric oxide synthase (eNOS) and ET-1. Laminar shear stress increases eNOS expression, and the released NO largely contributes to flow-induced vasodilatation (Topper et al. 1996; Ziegler et al. 1998). ET-1 is also regulated by shear stress, although the manner of response remains controversial. Most studies, however, reveal that ET-1 release is downregulated by laminar shear stress in a dose-dependent manner (Groenendijk et al. 2007). A balanced endothelial release of these opposite mediators has been proposed to regulate vascular tone and blood pressure. Although the principal factor of NO release is the shearing forces applied to the endothelial surface, less is known about the direct effect of r-HuEPO on the balanced endothelial regulation of blood flow. Transgenic mice overexpressing EPO develop hypertension, peripheral vasoconstriction, and cardiac complications when NO synthesis is blocked by *N*^G-nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME), activating the ET-1 system (Quaschnig et al. 2003). In hypertensive hemodialysis patients treated with r-HuEPO, a positive correlation has been found between blood pressure and plasma ET-1/NO ratio (Shimada et al. 2003). These findings suggest that the hypertensive effect of r-HuEPO is masked if NO is present and appears when the balanced endothelial ET-1/NO ratio is disrupted and rises.

Since shear stress is involved in the regulation of vascular tone, we hypothesize that r-HuEPO perturbs the mechanical environment, leading to altered shear stress- and flow-induced vasodilatation in isolated and perfused rat mesenteric arteries, and that these alterations may be potentiated by a rise in the ET-1/NO ratio.

Materials and methods

Isolated and perfused mesenteric resistance artery experiments

Male Sprague-Dawley rats (12 weeks old) (Charles River, L'Arbresle, France) were used. Animal care and experimental procedures were carried out in compliance with applicable guidelines formulated by the European Union for the care

and use of laboratory animals (L358-86/609/EEC). Rats were anesthetized with sodium pentobarbital (50 mg/kg). A median laparotomy was performed, and a segment of mesenteric artery (~100 µm internal diameter, 2–3 mm in length) was carefully dissected and cleaned of all adherent connective tissue under a dissecting microscope. It was then cannulated at both ends and mounted in a video-monitored perfusion system (Living System Instrumentation Inc., Burlington, Vt., USA) (Laurant et al. 1997). The artery was bathed in a 10 mL organ bath containing a cold physiological salt solution (PSS) of the following composition: 120 mmol/L NaCl; 25 mmol/L NaHCO₃; 4.7 mmol/L KCl; 1.2 mmol/L KH₂PO₄; 1.2 mmol/L MgSO₄; 2.5 mmol/L CaCl₂; 0.026 mmol/L EDTA; and 5.5 mmol/L glucose. PSS was bubbled with 95% O₂ and 5% CO₂ to give a pH of 7.4–7.45 and was maintained at 37 °C. The bath solution was changed continuously at a rate of 10 mL/min. The pressure at both ends of the artery was monitored by pressure transducers. Intravascular flow and pressure were adjusted by means of a pressure servo system (Living System Instrumentation Inc.). After intravascular pressure and flow were established, the arterial segments were checked for leaks, which were identified by a reduction in the preset intraluminal pressure. The arterial segments were then equilibrated for 1 h under a pressure of 60 mm Hg.

The viability of each artery was tested before the experimental protocol. Arterial segments were considered viable and used in the study if they fully constricted in response to high-potassium PSS (120 mmol/L NaCl replaced by an equimolar amount of KCl), containing 10 mmol/L norepinephrine (Sigma-Aldrich, Saint-Quentin Fallavier, France) in PSS. The integrity of endothelium was confirmed if norepinephrine-precontracted segments fully dilated in response to 10 mmol/L acetylcholine (Sigma-Aldrich) in PSS.

After a 30 min equilibration, equilibrium internal diameters were measured with a microcomputer-based video-imaging system in each segment when intravascular flow was increased in steps of 10 µL/min from 0 to 100 µL/min. Stepwise increases in flow were subsequently repeated after addition of either L-NAME (10⁻⁴ mol/L) (Sigma-Aldrich) (Barhoumi et al. 2011), r-HuEPO (Epoietin beta, NeoRecormon, 10 U/mL) (Roche, Rosny-sous-Bois, France), or both for 30 min. The concentration of r-HuEPO used in our study corresponded to the therapeutic dose subcutaneously administered in patients (Engert 2005; McFarlane et al. 2010) and was higher than physiological levels of circulating EPO (i.e., 5–20 mU/mL) (Bruneval et al. 1993). In a separate series of the same experiments, the effect of bosentan (10⁻⁵ mol/L) (gift from Actelion Pharmaceutical, Allschwil, Switzerland), a dual ET-1 receptor antagonist, was assessed on flow-induced dilatation. Flow-induced relaxation was expressed as an increase in internal diameter as well as a function of shear stress due to flow in vessels subjected to an intraluminal pressure of 60 mm Hg (preliminary studies have shown that vessels developed an optimal level of myogenic tone under this pressure value). Shear stress (τ , dyn/cm²) ($1 \text{ dyn} = 10^{-5} \text{ N}$) was calculated as previously described (Matrougi et al. 1997): $\tau = 4\eta Q/\pi r^3$, where η is the viscosity of the medium (0.01 dyn/cm² as water viscosity at 37 °C), Q is the flow rate (mL/s), and r is the radius (cm).

In one set of experiments, cumulative concentration-

Published by NRC Research Press

response curves to ET-1 (10^{-11} – 10^{-7} mmol/L) (Sigma Chemical Co., St. Louis, Mo., USA) were performed by extraluminal application of the drug in the presence of L-NAME and (or) r-HuEPO. The mesenteric arteries were stimulated until the maximal decrease in lumen diameter was obtained.

Cell culture and shear stress experiments

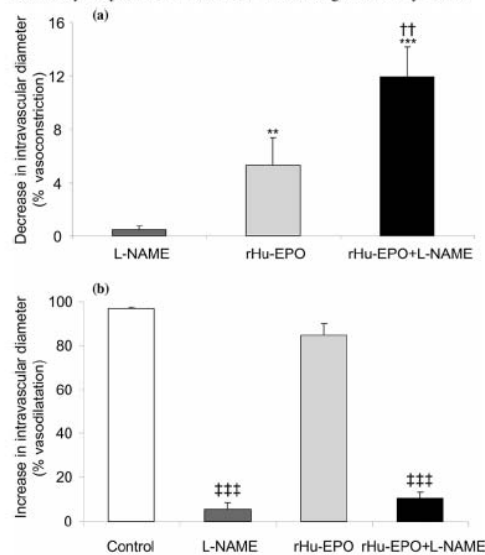
We used the immortalized endothelial cell line EA.hy926, kindly provided by the Service of Vascular Medicine (Lausanne University Hospital, Switzerland). This cell line has been previously characterized with regard to the expression and release of EPO receptor (Ribatti et al. 1999) and was found to behave very much like human umbilical vein endothelial cells, from which it was initially derived (Edgell et al. 1983). The endothelial cells were maintained in Dulbecco's modified minimal Eagle medium (DMEM + GlutaAX-1), containing 4.5 g/L D-glucose and pyruvate (Invitrogen, Cergy Pontoise, France) supplemented with 10% fetal bovine serum (Invitrogen), 100 U/mL penicillin and 100 mg/mL streptomycin (Pen Strepto Penicillin–Streptomycin, GIBCO) (Invitrogen) and cultured at 37 °C with 5% CO₂. After reaching confluence under static condition, endothelial cells were trypsinized from the T-75 flasks, seeded on collagen-coated culture slides (CS-C culture slips, collagen type I) (Dunn Labortechnik GmbH, Asbach, Germany), and grown to confluence. Flow studies were performed with the Streamer shear stress device (Flexcell STR-4000), which is a parallel-plate flow system for stimulation of cultured cells with laminar shear stress. Six culture slides with confluent cells were inserted into the parallel-plate flow system equipped with 6 chambers and exposed to flow with either low (2 dyn/cm²) or elevated (14 dyn/cm²) shear stress. Streamsoft software controls a flow pump, thereby regulating the flow rate into the chambers and the magnitude of fluid-induced shear stress applied to cells. The Streamer was incorporated into a recirculation loop fed with the perfusion medium from a medium reservoir. The medium was driven by peristaltic roller pumps, and the loop included pulse dampeners to ensure steady laminar flow. The entire flow device was placed in a 37 °C humidified 5% CO₂ incubator (Hosoya et al. 2005).

Endothelial cells cultured on culture slides were treated with r-HuEPO (10 U/mL) and (or) L-NAME (10^{-4} mol/L) for 30 min under static conditions and subsequently exposed to flow for 30 min, to reproduce the experimental protocol used with perfused mesenteric arteries described above. After the flow exposure, cells on culture slides were cultured in fresh medium under static conditions for 30 min. Media and cells were collected and stored at –80 °C before media assay. The ET-1 concentration in the cell culture medium was measured by an enzyme-linked immunosorbent assay (R&D Systems Europe, Lille, France) according to the manufacturer's protocol. Results were normalized versus protein concentration.

Statistical analysis

All data are presented as mean $\pm$ SEM. Statistical significance of the differences was determined by ANOVA (one-way or two-way ANOVA for consecutive measurements). Means were compared by a Dunnett's test or Student's *t* test when appropriate. Results with $p < 0.05$ were considered to be significant.

Fig. 1. Consecutive effects of L-NAME (10^{-4} mol/L), rHu-EPO (10 U/mL), and rHu-EPO plus L-NAME on (a) the intravascular diameter of pressurized mesenteric resistance arteries in the basal condition and on (b) acetylcholine-induced vasodilatation (10^{-5} mol/L) when arteries were precontracted with norepinephrine. Data are shown as mean $\pm$ SEM. **, $p < 0.01$, and ***, $p < 0.001$ vs. L-NAME; (Fig. 1a) ††, $p < 0.01$ vs. rHu-EPO; (Fig. 1b) †††, $p < 0.001$ vs. control and rHu-EPO; $n = 5$ –6; rHu-EPO, human recombinant erythropoietin; L-NAME, *N*^G-nitro-L-arginine methyl ester.



Results

Effect of r-HuEPO and L-NAME on vascular tone of the isolated mesenteric arteries

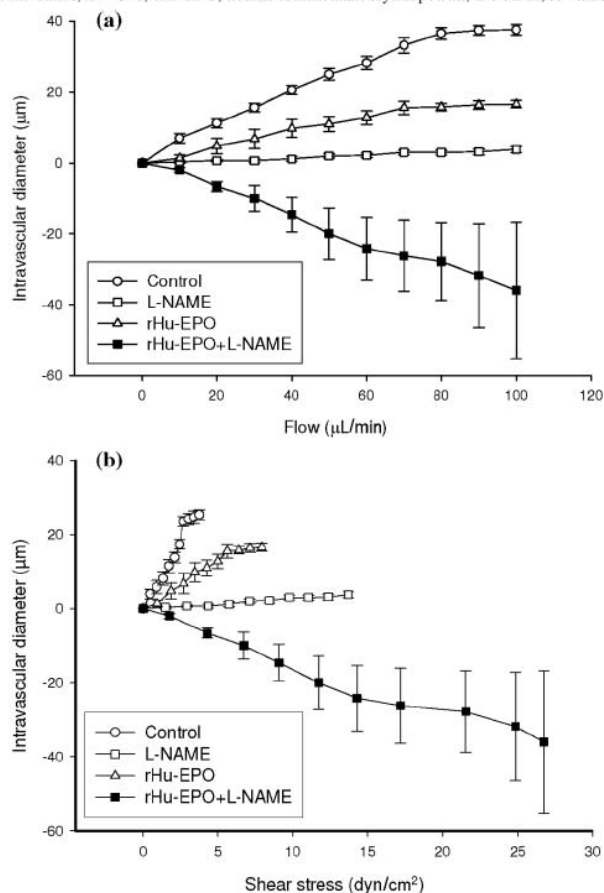
The addition of r-HuEPO to the bath significantly decreased the basal lumen diameter of the isolated perfused arteries ($p < 0.01$). L-NAME did not change the lumen diameter. The association of r-HuEPO and L-NAME induced a vasoconstriction significantly greater than that observed with r-HuEPO alone ($p < 0.01$) (Fig. 1A). In norepinephrine-constricted arteries, r-HuEPO did not modify the complete dilatation induced by 10^{-5} mol/L acetylcholine (Fig. 1B). L-NAME, however, markedly blocked the acetylcholine-induced vasodilatation (~5% decreased lumen diameter). The r-HuEPO did not modify the inhibitory effect of L-NAME (Fig. 1B).

Effect of r-HuEPO on the flow- and shear stress-induced change in intravascular diameter

To oppose the increase of shear stress on the endothelial surface, mesenteric arteries reacted by flow-dependent vasodilatation (Fig. 2). Stepwise increases in intravascular flow

Published by NRC Research Press

Fig. 2. Consecutive effects of L-NAME (10^{-4} mol/L), rHu-EPO (10 U/mL), and rHu-EPO plus L-NAME on (Fig. 2a) flow- and (Fig. 2b) shear stress-induced vasodilation in cannulated and pressurized mesenteric arteries. Data are shown as mean $\pm$ SEM. Each of the curves is significantly different from the others; $n = 5-6$; rHu-EPO, human recombinant erythropoietin; L-NAME, N^G -nitro-L-arginine methyl ester.



and shear stress significantly increased lumen diameter in control mesenteric arteries. Flow- and shear stress-induced vasodilation was partially decreased in arteries incubated with r-HuEPO ($p < 0.05$) and completely inhibited in those incubated with L-NAME ($p < 0.001$) (Fig. 2). When arteries were incubated with both L-NAME and r-HuEPO, the progressive elevation of flow rate and shear stress caused a decreased lumen diameter, indicating that flow and shear stress induced a vasoconstriction of the perfused arteries ($p < 0.05$).

Effect of Bosentan on the flow- and shear stress-induced change in intravascular diameter

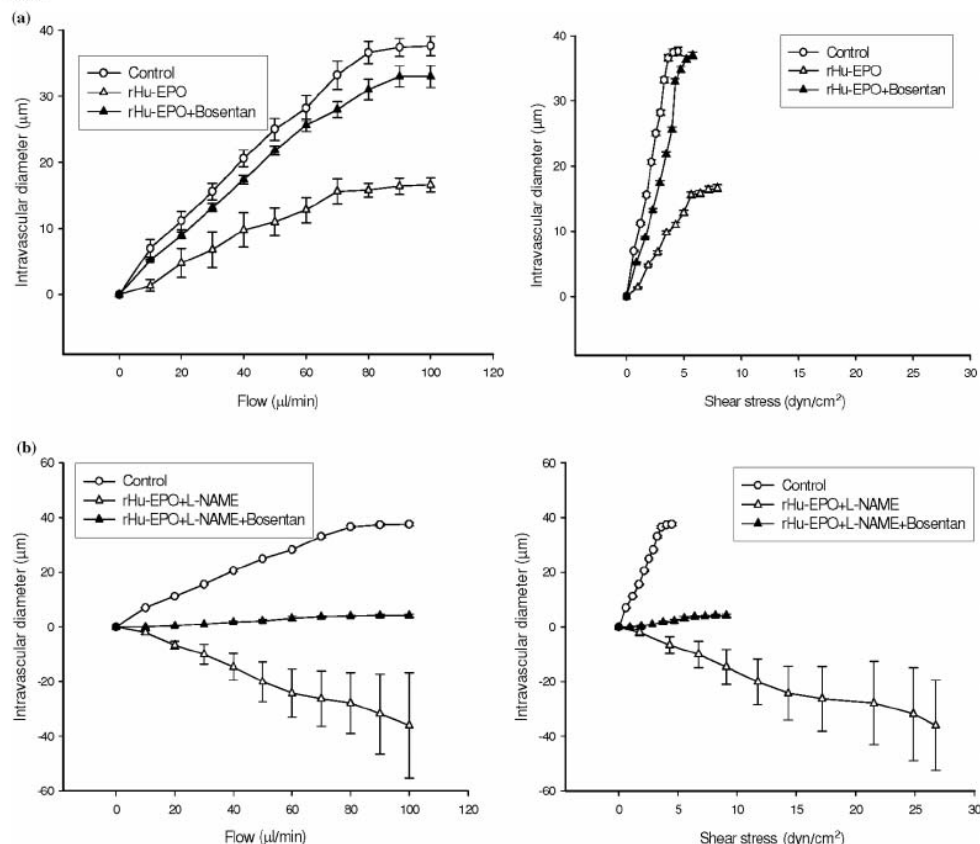
In the presence of Bosentan (10^{-5} mol/L), the altered flow-

and shear stress-induced vasodilation and shear stress obtained in arteries perfused with r-HuEPO was partially corrected ($p < 0.05$) (Fig. 3). Bosentan significantly inhibited the entire flow- and shear stress-induced vasoconstriction observed in arteries bathed with L-NAME and r-HuEPO ($p < 0.01$). Bosentan did not restore the vasodilation of the arteries treated with L-NAME and r-HuEPO. Bosentan had no effect on mesenteric arteries incubated with L-NAME.

Effect of L-NAME and r-HuEPO on the vasoconstrictive response of ET-1

ET-1 applied extraluminally caused a concentration-dependent constriction of the isolated arteries. L-NAME and r-HuEPO did not significantly change the vasoconstrictive

Fig. 3. Consecutive effects of Bosentan (10^{-5} mol/L) on flow- and shear stress-induced vasodilatation in cannulated and pressurized mesenteric arteries bathed with (Fig. 3a) rHu-EPO; 10 U/mL and (Fig. 3b) rHu-EPO plus L-NAME. Data are shown as mean $\pm$ SEM. Each of the curves is significantly different from the others; $n = 5-6$; rHu-EPO, human recombinant erythropoietin; L-NAME, N^G -nitro-L-arginine methyl ester.



tion of ET-1. The dose-response curve to ET-1 was, however, significantly shifted to the left in the presence of L-NAME and r-HuEPO ($p < 0.05$), indicating an enhanced vasoconstriction of mesenteric arteries in response to ET-1 (Fig. 4).

Effect of L-NAME and r-HuEPO on ET-1 release from cultured endothelial cells exposed to flow and shear stress

Cultures of the endothelial cell line EA.hy926 cells constantly generated and released ET-1 into the cell culture medium. Independently of the shear value applied (2 or 14 dyn/cm^2), ET-1 levels were greater in the media containing cells treated with r-HuEPO, L-NAME, and both r-HuEPO and L-NAME than in those containing untreated cells ($p < 0.05$) (Fig. 5). ET-1 release was not dependent on the shear level

in untreated, L-NAME-, and both L-NAME and r-HuEPO-treated cells. The ET-1 concentrations were, however, greater in r-HuEPO-treated cells exposed to a shear stress value of 14 dyn/cm^2 than in those exposed to a value of 2 dyn/cm^2 ($p < 0.05$).

Discussion

In the present study we showed that r-HuEPO inhibited the flow- and shear stress-induced vasodilatation of isolated mesenteric arteries. NO is essential to counterbalancing the inhibitory effect of r-HuEPO, since in the presence of L-NAME, r-HuEPO induces an opposite effect characterized by a vasoconstriction with elevated shear stress values. We also demonstrated that the inhibitory effect of r-HuEPO on flow-induced vasodilatation was mediated by ET-1 release

Fig. 4. Vasoconstriction induced by endothelin 1 (ET-1) in cannulated and pressurized mesenteric arteries bathed with L-NAME (10^{-4} mol/L), rHu-EPO (10 U/mL), and rHu-EPO plus L-NAME. Data are shown as mean $\pm$ SEM. *, $p < 0.05$ vs. other groups; $n = 5-6$; rHu-EPO, human recombinant erythropoietin; L-NAME, N^G -nitro-L-arginine methyl ester.

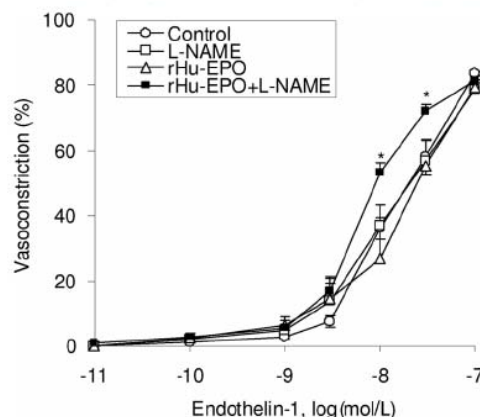
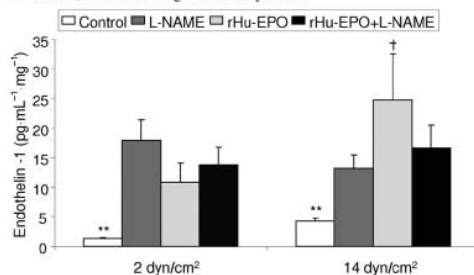


Fig. 5. Consecutive effects of L-NAME (10^{-4} mol/L), rHu-EPO (10 U/mL), and rHu-EPO plus L-NAME on endothelin 1 (ET-1) release into the endothelial cell culture medium from cultured cells previously exposed to a shear stress of 2 or 14 dyn/cm². Data are shown as mean $\pm$ SEM. **, $p < 0.01$ vs. other groups at respective shear stress values; †, $p < 0.05$ vs. rHu-EPO with shear stress of 2 dyn/cm²; $n = 5-6$; rHu-EPO, human recombinant erythropoietin; L-NAME, N^G -nitro-L-arginine methyl ester.



and that the absence of NO exacerbated the vasoconstriction to ET-1 in the presence of rHuEPO.

Increases in blood flow at the vessel wall and the resulting flow-dependent mechanical stress exerted on the endothelial surface increase the lumen diameter of arteries. The increased lumen diameter reduces the mechanical effects of shear stress applied to the endothelial surface, thus creating a vascular adaptation according to variations in blood flow to regulate blood perfusion of the muscles in activity during exercise (Laughlin et al. 2008). The mechanism of flow-dependent vasodilatation in resistance arteries contributes to the regula-

tion of peripheral vascular resistance and thus blood pressure (Bergaya et al. 2004). At a given vessel radius, when flow increases, shear stress also increases in the vessel wall. Acutely, flow-induced vasodilatation increases the vessel radius and thereby returns shear stress toward normal levels. Flow- and shear stress-dependent vasodilatation is an adaptive response that requires the presence of a functional endothelium and the release of endothelial factors. There is growing evidence that increased shear stress is a signal for local increase in eNOS and decrease in ET-1 gene expression in endothelial cells (Topper et al. 1996; Malek et al. 1999; Ohura et al. 2003; Groenendijk et al. 2007). Furthermore, the maintenance of a correct blood flow-induced vasodilatation is achieved by a balanced endothelial release of NO, a potent vasodilator, and of its functional counterpart, ET-1, the most potent known vasoconstrictor. In the present study, the flow-dependent vasodilatation of the mesenteric arteries was completely inhibited in the presence of L-NAME, and the frictional forces on the vascular surface were much higher, confirming that NO strongly participates in the protective and dilator response to increased flow to regulate vascular tone and peripheral vascular resistance (Pyke and Tschakovsky 2005).

In the presence of rHuEPO, flow- and shear stress-dependent vasodilatation was diminished in mesenteric arteries. Although rHuEPO was extraluminally applied to directly act on vascular smooth muscle cells, it is likely that rHu-EPO might affect the endothelial eNOS signaling pathway. Indeed, extraluminal administration of rHuEPO inhibited the endothelium- and NO-dependent flow-induced vasodilatation, suggesting an action of the protein on endothelial cells. The inhibitory effect of rHuEPO may be mediated by a diminished eNOS expression and NO release (Wang and Vaziri 1999). However, several studies have reported inverse effects (Banerjee et al. 2000). Furthermore, we showed that exposition to rHuEPO increased the endothelial secretion of ET-1 in a shear stress-dependent manner, as has been previously described in cultured endothelial cells and isolated vascular tissue (Carlini et al. 1993; Katoh et al. 1994). The observation that Bosentan restored the flow and shear stress-dependent vasodilatation indicates that the vasoconstrictor ET-1 contributes to the impaired flow-dependent vasodilatation induced by rHuEPO, probably by reducing the vasodilator effect of NO. Interestingly, rHuEPO induced vasoconstriction (that was blocked by Bosentan) in response to the rise in intravascular flow when the perfused mesenteric arteries were incubated with L-NAME. In these experimental conditions, the absence of NO contributed to unmasking the vasoconstrictor effect of ET-1 and thus to developing constriction and elevated vascular tone in response to flow and shear stress in the presence of rHuEPO. Our findings confirm that the presence of NO is necessary to counterbalancing the vasoconstrictor effect of ET-1, whose release is increased by rHuEPO. Furthermore, the presence of NO is also necessary to modulate the sensitivity to the vascular smooth muscle cell ET-1 receptor, since the vasoconstrictor response to ET-1 of perfused arteries incubated with rHuEPO was only exacerbated in the presence of L-NAME. All these findings confirm that the balance between these 2 vasoactive substances, NO and ET-1, which antagonize each other, are essential to determining the peripheral vascular resistance and thus vas-

cular tone. Moreover, it is not clear as to why the perfused arteries did not constrict in response to increased flow when incubated with L-NAME alone, while endothelial ET-1 release was increased by L-NAME. Although NO may be the main vasodilator implicated in the flow-induced vasodilatation, others have been shown to play a potential role (endothelial-derived hyperpolarized factor, prostacyclin), by counteracting and inhibiting vasoconstriction due to ET-1 (Koller et al. 1993; Takamura et al. 1999).

By producing and releasing NO, the endothelium seems able to protect against and counterbalance the noxious effects of r-HuEPO on vascular function. Imbalance in favor of ET-1 may play a major role in pathophysiological situations associated with an impaired formation and (or) bioavailability of NO, as has been previously demonstrated in an *in vivo* experimental study (Richard et al. 1995). Quaschnig et al. (2003) showed that transgenic mice overexpressing human EPO did not develop hypertension when NO is present. In the presence of L-NAME, however, these mice quickly developed hypertension with severe arteriolar vasoconstriction, and a stimulated ET-1 system seems to be implicated. Some other studies have suggested such a link between EPO and stimulated ET-1 production (Carlini et al. 1993; Katoh et al. 1994) as well as overexpression of both subtypes of ET-1 receptors (ET_A and ET_B) (Bode-Böger et al. 1996; Ruschitzka et al. 2000; Rodrigue et al. 2008). The clinical use of r-HuEPO represents significant progress in the treatment of anemia in kidney failure patients (Moreno et al. 2000). However, systemic hypertension has been reported to develop, or to worsen, in 20%–30% of patients treated with r-HuEPO. This rise in blood pressure is commonly observed in experimental models of renal failure (Lacasse et al. 1997; Ni et al. 1998). Several potential mechanisms by which rHuEPO therapy may increase blood pressure in hemodialysis patients have been listed. They include increased blood viscosity, enhanced tissue renin activity and increased angiotensin II receptor expression, increased catecholamine release, and especially a direct vascular effect of r-HuEPO by increasing intracellular calcium levels (Smith et al. 2003). However, all these effects of r-HuEPO do not seem to be sufficient to explain hypertension establishment, since healthy volunteers and normal rats receiving r-HuEPO remain normotensive (Berglund and Ekblom 1991; Lacasse et al. 1997). Evidence suggests that r-HuEPO accentuates a preexisting endothelial dysfunction. Recent studies have shown that acetylcholine-induced vasodilatation was markedly impaired in perfused mesenteric arteries from rats treated with a combination of r-HuEPO and L-NAME and sustained exercise training to mimic elevated shear stress. Under these conditions, rats quickly developed high blood pressure, and half of them died during the exercise and recovery periods (Meziri et al. 2011). Chronic renal failure is associated with an impaired endothelial function and defective endothelium-dependent vasodilatation. Several pathogenic factors have been proposed to cause this defect. Reduced bioavailability of NO appears to be one of the main factors involved in endothelial dysfunction associated with chronic renal failure because of increased oxidative stress in the vascular wall (Schiffrin et al. 2007). The ET-1 system has been widely implicated in chronic renal disease, since plasma ET-1 concentration was increased and renal ET-1 was upregulated with increased urinary ET-1 excretion

(Dhaun et al. 2006). An amplification of the renal vasoconstrictive effect of ET-1 has been proposed to explain the worsening of hypertension in chronic kidney disease (Dhaun et al. 2006). Among patients with chronic renal failure presenting endothelial dysfunction and arterial hypertension, r-HuEPO treatment increased the production of vascular ET-1 (Larivière and Lebel 2003). In rats with renal failure, r-HuEPO therapy increased vascular and renal cortex expression and production of ET-1 (Larivière and Lebel 2003). Furthermore, the present study and that of others (Boulanger and Luscher 1990) have clearly demonstrated that the absence of NO increases endothelial ET-1 production and release, suggesting that NO may play an important role in the control of synthesis and (or) release of ET-1, thus affecting the ET-1/NO ratio. In the presence of r-HuEPO, it is proposed that the unbalanced ET-1/NO ratio, in favor of ET-1, unmasks the vasoconstrictor response to ET-1, leading to an elevation of vascular tone, which increases blood pressure (Shimada et al. 2003). Our experimental findings are in accordance with this hypothesis.

In conclusion, r-HuEPO altered flow- and shear stress-dependent vasodilatation of resistance arteries, at least by increasing ET-1 release and interfering with a balanced ET-1/NO ratio. Although further examination will be needed to confirm this hypothesis (e.g., using NO donors such as L-arginine, and ET_A or ET_B receptor blockers), the presence of a balanced endothelial ET-1/NO ratio seems to be necessary for avoiding altered blood flow-dependent dilatation, increased vascular tone, and elevated blood pressure, as is the case in some clinical situations such as patients with chronic renal failure treated with r-HuEPO.

Acknowledgement

The authors are grateful to Emmanuel Gil for his excellent technical support. This work was supported by a grant from the Transplantation Foundation (Saint Apollinaire, France).

References

- Anagnostou, A., Liu, Z., Steiner, M., Chin, K., Lee, E.S., Kessimian, N., and Noguchi, C.T. 1994. Erythropoietin receptor mRNA expression in human endothelial cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 91(9): 3974–3978. doi:10.1073/pnas.91.9.3974. PMID: 8171022.
- Banerjee, D., Rodriguez, M., Nag, M., and Adamson, J.W. 2000. Exposure of endothelial cells to recombinant human erythropoietin induces nitric oxide synthase activity. *Kidney Int.* 57(5): 1895–1904. doi:10.1046/j.1523-1755.2000.00039.x. PMID:10792608.
- Barhoumi, T., Kasal, D.A., Li, M.W., Shbat, L., Laurant, P., Neves, M.F., et al. 2011. T regulatory lymphocytes prevent angiotensin II-induced hypertension and vascular injury. *Hypertension*, 57(3): 469–476. doi:10.1161/HYPERTENSIONAHA.110.162941. PMID:21263125.
- Bergaya, S., Matrougui, K., Meneton, P., Henrion, D., and Boulanger, C.M. 2004. Role of tissue kallikrein in response to flow in mouse resistance arteries. *J. Hypertens.* 22(4): 745–750. doi:10.1097/00004872-200404000-00017. PMID:15126916.
- Berglund, B., and Ekblom, B. 1991. Effect of recombinant human erythropoietin treatment on blood pressure and some haematological parameters in healthy men. *J. Intern. Med.* 229(2): 125–130. doi:10.1111/j.1365-2796.1991.tb00319.x. PMID:1997637.
- Bertinieri, G., Parati, G., Ulian, L., Santucci, C., Massaro, P.,

- Cosentini, R., et al. 1998. Hemodilution reduces clinic and ambulatory blood pressure in polycythemic patients. *Hypertension*, **31**(3): 848–853. PMID:9495271.
- Bode-Böger, S.M., Böger, R.H., Kuhn, M., Radermacher, J., and Frölich, J.C. 1996. Recombinant human erythropoietin enhances vasoconstrictor tone via endothelin-1 and constrictor prostanooids. *Kidney Int.* **50**(4): 1255–1261. doi:10.1038/ki.1996.435. PMID: 8887285.
- Boulanger, C., and Luscher, T.F. 1990. Release of endothelin from the porcine aorta. Inhibition by endothelium-derived nitric oxide. *J. Clin. Invest.* **85**(2): 587–590. doi:10.1172/JCI114477. PMID: 2153712.
- Bruneval, P., Sassy, C., Mayeux, P., Belair, M.F., Casadevall, N., Roux, F.X., et al. 1993. Erythropoietin synthesis by tumor cells in a case of meningioma associated with erythrocytosis. *Blood*, **81** (6): 1593–1597. PMID:8453106.
- Carlini, R.G., Dusso, A.S., Obialo, C.I., Alvarez, U.M., and Rothstein, M. 1993. Recombinant human erythropoietin (rHuEPO) increases endothelin-1 release by endothelial cells. *Kidney Int.* **43**(5): 1010–1014. doi:10.1038/ki.1993.142. PMID: 8510379.
- Dhaun, N., Goddard, J., and Webb, D.J. 2006. The endothelin system and its antagonism in chronic kidney disease. *J. Am. Soc. Nephrol.* **17**(4): 943–955. doi:10.1681/ASN.2005121256. PMID:16540557.
- Edgell, C.J., McDonald, C.C., and Graham, J.B. 1983. Permanent cell line expressing human factor VIII-related antigen established by hybridization. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **80**(12): 3734–3737. doi:10.1073/pnas.80.12.3734. PMID:6407019.
- Engert, A. 2005. Recombinant human erythropoietin in oncology: current status and further developments. *Ann. Oncol.* **16**(10): 1584–1595. doi:10.1093/annonc/mdi307. PMID:15958437.
- Groenendijk, B.C., Van der Heiden, K., Hierck, B.P., and Poelmann, R.E. 2007. The role of shear stress on ET-1, KLF2, and NOS-3 expression in the developing cardiovascular system of chicken embryos in a venous ligation model. *Physiology (Bethesda)*, **22** (22): 380–389. PMID:18073411.
- Hosoya, T., Maruyama, A., Kang, M.I., Kawatani, Y., Shibata, T., Uchida, K., et al. 2005. Differential responses of the Nrf2-Keap1 system to laminar and oscillatory shear stresses in endothelial cells. *J. Biol. Chem.* **280**(29): 27244–27250. doi:10.1074/jbc.M502551200. PMID:15917255.
- Juvonen, E., Ikkala, E., Fyhrquist, F., and Ruutu, T. 1991. Autosomal dominant erythrocytosis caused by increased sensitivity to erythropoietin. *Blood*, **78**(11): 3066–3069. PMID:1954391.
- Katoh, K., Mizuno, K., Hashimoto, S., Okazaki, K., Asahi, K., Kuriki, M., et al. 1994. Direct evidence for erythropoietin-induced release of endothelin from peripheral vascular tissue. *Life Sci.* **54** (16): PL253–PL259. PMID:8152333.
- Koller, A., Sun, D., and Kaley, G. 1993. Role of shear stress and endothelial prostaglandins in flow- and viscosity-induced dilation of arterioles in vitro. *Circ. Res.* **72**(6): 1276–1284. PMID: 8495555.
- Lacasse, M.S., Kingma, I., Larivière, R., Grose, J.H., and Lebel, M. 1997. Uremia enhances the blood pressure response to erythropoietin. *Clin. Exp. Hypertens.* **19**(4): 389–401. PMID:9140703.
- Larivière, R., and Lebel, M. 2003. Endothelin-1 in chronic renal failure and hypertension. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* **81**(6): 607–621. doi:10.1139/y03-012. PMID:12839272.
- Laughlin, M.H., Newcomer, S.C., and Bender, S.B. 2008. Importance of hemodynamic forces as signals for exercise-induced changes in endothelial cell phenotype. *J. Appl. Physiol.* **104**(3): 588–600. doi:10.1152/japplphysiol.01096.2007. PMID:18063803.
- Laurant, P., Touyz, R.M., and Schiffrin, E.L. 1997. Effect of pressurization on mechanical properties of mesenteric small arteries from spontaneously hypertensive rats. *J. Vasc. Res.* **34** (2): 117–125. PMID:9167644.
- Malek, A.M., Zhang, J., Jiang, J., Alper, S.L., and Izumo, S. 1999. Endothelin-1 gene suppression by shear stress: pharmacological evaluation of the role of tyrosine kinase, intracellular calcium, cytoskeleton, and mechanosensitive channels. *J. Mol. Cell. Cardiol.* **31**(2): 387–399. doi:10.1006/jmcc.1998.0873. PMID: 10093051.
- McFarlane, P.A., Pisoni, R.L., Eichleay, M.A., Wald, R., Port, F.K., and Mendelssohn, D. 2010. International trends in erythropoietin use and hemoglobin levels in hemodialysis patients. *Kidney Int.* **78** (2): 215–223. doi:10.1038/ki.2010.108. PMID:20428102.
- Meziri, F., Binda, D., Touati, S., Pellegrin, M., Berthelot, A., Touyz, R.M., and Laurant, P. 2011. Exercise aggravates cardiovascular risks and mortality in rats with disrupted nitric oxide pathway and treated with recombinant human erythropoietin. *Eur. J. Appl. Physiol.* [doi.] doi:10.1007/s00421-011-1829-z. PMID:21249387.
- Moreno, F., Sanz-Guajardo, D., Lopez-Gomez, J.M., Jofre, R., and Valderrabano, F. Spanish Cooperative Renal Patients Quality of Life Study Group of the Spanish Society of Nephrology. 2000. Increasing the hematocrit has a beneficial effect on quality of life and is safe in selected hemodialysis patients. Spanish Cooperative Renal Patients Quality of Life Study Group of the Spanish Society of Nephrology. *J. Am. Soc. Nephrol.* **11**(2): 335–342. PMID: 10665941.
- Nagai, T., Akizawa, T., Nakashima, Y., Kohjiro, S., Nabeshima, K., Kanamori, N., et al. 1995. Effects of rHuEpo on cellular proliferation and endothelin-1 production in cultured endothelial cells. *Nephrol. Dial. Transplant.* **10**(10): 1814–1819. PMID: 8592587.
- Ni, Z., Wang, X.Q., and Vaziri, N.D. 1998. Nitric oxide metabolism in erythropoietin-induced hypertension: effect of calcium channel blockade. *Hypertension*, **32**(4): 724–729. PMID:9774370.
- Ohura, N., Yamamoto, K., Ichio, S., Sokabe, T., Nakatsuka, H., Baba, A., et al. 2003. Global analysis of shear stress-responsive genes in vascular endothelial cells. *J. Atheroscler. Thromb.* **10**(5): 304–313. PMID:14718748.
- Pyke, K.E., and Tschakovsky, M.E. 2005. The relationship between shear stress and flow-mediated dilatation: implications for the assessment of endothelial function. *J. Physiol.* **568**(2): 357–369. doi:10.1113/jphysiol.2005.089755. PMID:16051630.
- Quaschnig, T., Ruschitzka, F., Stallmach, T., Shaw, S., Morawietz, H., Goettsch, W., et al. 2003. Erythropoietin-induced excessive erythrocytosis activates the tissue endothelin system in mice. *FASEB J.* **17**(2): 259–261. PMID:12490547.
- Raine, A.E. 1988. Hypertension, blood viscosity, and cardiovascular morbidity in renal failure: implications of erythropoietin therapy. *Lancet*, **1**(8577): 97–100. doi:10.1016/S0140-6736(88)90293-0. PMID:2891990.
- Ribatti, D., Presta, M., Vacca, A., Ria, R., Giuliani, R., Dell'Era, P., et al. 1999. Human erythropoietin induces a pro-angiogenic phenotype in cultured endothelial cells and stimulates neovascularization in vivo. *Blood*, **93**(8): 2627–2636. PMID:10194442.
- Richard, V., Hogue, M., Clozel, M., Löffler, B.M., and Thuillez, C. 1995. In vivo evidence of an endothelin-induced vasopressor tone after inhibition of nitric oxide synthesis in rats. *Circulation*, **91**(3): 771–775. PMID:7828305.
- Rodrigue, M.E., Brochu, I., D'orléans-Juste, P., Larivière, R., and Lebel, M. 2008. Effect of erythropoietin on blood pressure and on the vascular endothelial ET-1/ETB receptor system. *Am. J. Hypertens.* **21**(6): 639–643. doi:10.1038/ajh.2008.37. PMID: 18437122.
- Ruschitzka, F.T., Wenger, R.H., Stallmach, T., Quaschnig, T., de Wit, C., Wagner, K., et al. 2000. Nitric oxide prevents

- cardiovascular disease and determines survival in polyglobulic mice overexpressing erythropoietin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **97**(21): 11609–11613. doi:10.1073/pnas.97.21.11609. PMID: 11027359.
- Santolaya, R.B., Lahiri, S., Alfaro, R.T., and Schoene, R.B. 1989. Respiratory adaptation in the highest inhabitants and highest Sherpa mountaineers. *Respir. Physiol.* **77**(2): 253–262. doi:10.1016/0034-5687(89)90011-X. PMID:2506621.
- Schiffrin, E.L., Lipman, M.L., and Mann, J.F. 2007. Chronic kidney disease: effects on the cardiovascular system. *Circulation*, **116**(1): 85–97. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.106.678342. PMID: 17606856.
- Shimada, N., Saka, S., Sekizuka, K., Tanaka, A., Takahashi, Y., Nakamura, T., et al. 2003. Increased endothelin: nitric oxide ratio is associated with erythropoietin-induced hypertension in hemodialysis patients. *Ren. Fail.* **25**(4): 569–578. doi:10.1081/JDI-120022548. PMID:12911161.
- Smith, K.J., Bleyer, A.J., Little, W.C., and Sane, D.C. 2003. The cardiovascular effects of erythropoietin. *Cardiovasc. Res.* **59**(3): 538–548. doi:10.1016/S0008-6363(03)00468-1. PMID:14499855.
- Takamura, Y., Shimokawa, H., Zhao, H., Igarashi, H., Egashira, K., and Takeshita, A. 1999. Important role of endothelium-derived hyperpolarizing factor in shear stress-induced endothelium-dependent relaxations in the rat mesenteric artery. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* **34**(3): 381–387. doi:10.1097/00005344-199909000-00010. PMID:10470996.
- Topper, J.N., Cai, J., Falb, D., and Gimbrone, M.A., Jr. 1996. Identification of vascular endothelial genes differentially responsive to fluid mechanical stimuli: cyclooxygenase-2, manganese superoxide dismutase, and endothelial cell nitric oxide synthase are selectively up-regulated by steady laminar shear stress. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **93**(19): 10417–10422. doi:10.1073/pnas.93.19.10417. PMID:8816815.
- Vogel, J., Kiessling, I., Heinicke, K., Stallmach, T., Ossent, P., Vogel, O., et al. 2003. Transgenic mice overexpressing erythropoietin adapt to excessive erythrocytosis by regulating blood viscosity. *Blood*, **102**(6): 2278–2284. doi:10.1182/blood-2003-01-0283. PMID:12750170.
- Wang, X.Q., and Vaziri, N.D. 1999. Erythropoietin depresses nitric oxide synthase expression by human endothelial cells. *Hypertension*, **33**(3): 894–899. PMID:10082505.
- Ziegler, T., Silacci, P., Harrison, V.J., and Hayoz, D. 1998. Nitric oxide synthase expression in endothelial cells exposed to mechanical forces. *Hypertension*, **32**(2): 351–355. PMID: 9719066.

4. Discussion et conclusion

Notre étude a montré que l'r-HuEPO inhibe la vasodilatation induite par le flux ou les contraintes de cisaillement (*shear stress*) sur des artères mésentériques isolées. La vasodilatation flux-dépendante des artères mésentériques est totalement inhibée en présence de L-NAME parallèlement à un niveau de *shear stress* très élevé. En présence de L-NAME, l'r-HuEPO induit un effet inverse caractérisé par une vasoconstriction paradoxal associée à une élévation prononcée du *shear stress*. Dans cette étude, nous montrons aussi que l'effet inhibiteur de l'r-HuEPO sur la vasodilatation induite par l'écoulement s'accompagne d'une augmentation de la production d'ET-1 et que l'absence de NO exacerbe la vasoconstriction ET-1-dépendante en présence de l'r-HuEPO.

L'exposition à l'r-HuEPO provoque une augmentation de la production endothéliale d'ET-1, d'une manière flux-dépendante. De plus, bien que nous ne démontrons pas de causalité avec l'élévation du *shear stress*, la présente étude, en accord avec d'autres (Boulanger et Luscher 1990), montrent clairement que l'absence de NO (incubation avec de L-NAME) augmente la production endothéliale de l'ET-1. Ceci suggère que, en condition expérimentale où une sécrétion basale de NO est présente, l'artère est capable de maintenir une vasodilatation flux-dépendante en présence de l'r-HuEPO, bien que la production d'ET-1 soit stimulée par l'r-HuEPO. L'effet vasodilatateur NO-dépendant contrebalance ou s'oppose à un effet vasoconstricteur. En présence de l'r-HuEPO et de L-NAME, l'élévation du débit de perfusion (en stimulant les forces de cisaillement à la surface endothéliale) provoque en retour, un effet vasoconstricteur induit localement par l'ET-1. Le NO, dont la production est inhibée, ne peut s'opposer à l'effet vasoconstricteur de l'ET-1.

En fait, la présence de NO est nécessaire pour contrebalancer l'effet vasoconstricteur de l'ET-1, dont la libération est augmentée par l'r-HuEPO. Par ailleurs,

la présence de NO est aussi nécessaire pour moduler la sensibilité aux récepteurs de l'ET-1 au niveau des CMLV. Cela est suggéré par le fait que la réponse vasoconstrictrice à l'ET-1, des artères perfusées incubées avec l'r-HuEPO, a été exacerbée seulement en présence de L-NAME. L'équilibre fonctionnel vasomoteur entre ces deux substances vasoactives, NO et ET-1, est donc essentiel pour déterminer le niveau du tonus vasomoteur dont un des éléments de régulation essentiels sont les forces de cisaillement en réponse à l'élévation de la vitesse de l'écoulement sanguin.

Le NO joue un rôle important dans le contrôle de la synthèse et/ou la sécrétion d'ET-1 affectant ainsi le rapport ET-1/NO. En présence de l'r-HuEPO, il est suggéré que le rapport ET-1/NO peut être déséquilibré en faveur de l'ET-1. Ceci pourrait prendre un sens pathologique en présence d'une dysfonction endothéliale et un défaut de synthèse ou de biodisponibilité du NO, démasquant ainsi la réponse vasoconstrictrice à l'ET-1. Tout ceci conduit à une élévation du tonus vasculaire et conséquemment, de la pression artérielle (Shimada et al. 2003).

En conclusion, l'r-HuEPO altère la vasodilatation flux- et *shear stress*-dépendante des artères de résistance, en augmentant la sécrétion d'ET-1 et en agissant sur l'équilibre du rapport ET-1/NO. D'autres expériences supplémentaires seront nécessaires pour confirmer cette hypothèse (par exemple en utilisant des donneurs de NO comme la L-arginine ou les antagonistes des récepteurs ETB et ETA). Par ailleurs, la présence d'un ratio équilibré ET-1/NO endothéliale semble être nécessaire afin d'éviter toute altération de la vasodilatation flux-dépendante induite par l'écoulement du sang. Cette dernière pouvant conduire à une élévation de tonus vasomoteur et de la pression, comme dans le cas de certaines maladies telles que l'insuffisance rénale chronique traités par l'r-HuEPO.

- Étude 2 -
L'HYPERTENSION ARTERIELLE ET LE STRESS
OXYDATIF PROVOQUES PAR
L'ERYTHROPOIETINE RECOMBINANTE
HUMAINE SONT CORRIGES PAR
L'EXERCICE CHEZ UN MODELE DE SOURIS
TRANSGENIQUE SUREXPRIMANT
L'ENDOTHELIN-1 ENDOTHELIALE.

ERYTHROPOIETIN-INDUCED HYPERTENSION AND OXIDATIVE STRESS IN
MICE OVEREXPRESSING HUMAN ENDOTHELIN-1 WAS DECREASED BY
EXERCISE

Tlili Barhoumi, Marie Briet, Daniel A. Kasal, Layla Shbat, Pierre Paradis,

Pascal Laurant and Ernesto L. Schiffrin

Publication en voie de soumission à *kidney international* (IF 2010: 6,105)

1. But de l'étude

Nos résultats précédents démontrent que l'ET-1 pourrait être impliqué dans l'altération de la vasodilatation flux-dépendante de l'artère mésentérique en présence de l'r-HuEPO, et induirait même une vasoconstriction flux-dépendante en présence d'une dysfonction endothéliale. Par ailleurs, la littérature fait aussi état de ce que l'ET-1 semblerait jouer un rôle dans l'établissement de l'HTA de patients traités à l'r-HuEPO (Rodrigue et al. 2003). Le but, ici, était d'étudier les effets cardiovasculaires du traitement avec l'r-HuEPO sur des souris transgéniques sur-exprimant l'ET-1 endothéliale (eET-1), puis d'évaluer l'impact de l'exercice physique sur les risques cardiovasculaires induits par l'r-HuEPO.

Les paramètres de risques cardiovasculaires étudiés étaient :

1. la pression artérielle
2. le remodelage vasculaire
3. la dysfonction endothéliale.
4. le stress oxydatif
5. l'inflammation

Nous supposons que l'r-HuEPO provoque une augmentation de la pression artérielle associée à une dysfonction endothéliale, un processus inflammatoire et un stress oxydatif élevé chez les souris transgéniques eET-1, et que l'exercice, au vu des résultats de l'étude précédente, devrait accentuer ou corriger les altérations cardiovasculaires induites par le traitement à l'r-HuEPO.

2. Méthode

2.1 Animaux

Des souris transgéniques mâles (eET-1) (âgés de 8-10 semaines) sur-exprimant l'ET-1 sélectivement dans l'endothélium vasculaire, par le biais du promoteur Tie2, ont été utilisées. Les animaux étaient repartis de façon aléatoire en 4 groupes :

1. un groupe eET-1 contrôle
2. un groupe eET-1 traité avec l'r-HuEPO
3. un groupe eET-1 + exercice
4. un groupe eET-1 + exercice et traité avec l'r-HuEPO.

Des souris C57BL/6 (Wild Type) sont utilisées comme contrôles et divisées en 2: groupe contrôle et groupe traité à l'r-HuEPO.

Le traitement avec l'r-HuEPO est de 100 UI/kg en sous-cutané, 3 fois par semaine pendant 8 semaines.

2.2 Protocole d'exercice

Les animaux dans les groupes exercices ont suivi un programme de nage pendant 8 semaines (6 fois/semaine; 60 min/jour) selon le protocole modifié, défini par Pellegrin et al (2007; 2009a).

2.3 Étapes de l'investigation

1. Mesure de l'évolution de la pression artérielle par la méthode du *tail-cuff*
2. Mesure du taux d'hématocrite.
3. Mesure de la concentration plasmatique de l'ET-1.
4. Mesure de la concentration plasmatique des cytokines INF- γ , TNF- α , IL-6 et IL-10 avec un *Bioplex multiplex Kit*.
5. Évaluation de la fonction endothéliale: Étude *ex-vivo* de la vasodilatation dépendante et indépendante de l'endothélium des artères mésentériques isolées et pressurisées, en réponse à l'acétylcholine (réponse endothélium- et NO-dépendante) et au nitroprussiate de sodium (réponse endothélium-indépendante).
6. Quantification de l'infiltration des macrophages dans l'aorte et le cortex rénal.
7. Quantification de l'expression et de l'infiltration du facteur de transcription Foxp3+ (X-linked forkhead/winged helix), marqueur spécifique des Treg dans la rate et le cortex rénal par immunofluorescence.

3. Principaux Résultats

3.1 Effet du traitement avec l'r-HuEPO sur les souris eET-1

- Augmente la pression artérielle systolique
- Augmente la concentration plasmatique en ET-1
- Augmente l'activité de la NADPH oxydase et la production aortique des anions superoxydes
- Augmente l'infiltration des monocytes / macrophages aortiques (MOMA-2).
- Augmente le taux des cytokines pro-inflammatoires INF- γ , TNF- α et IL-6
- Entraîne une altération de la fonction endothéliale caractérisée par une réduction de la vasodilatation NO-dépendante en réponse à l'acétylcholine

3.2 Effet de l'exercice physique

- Prévient les effets délétères de l'r-HuEPO ;
- Prévient l'élévation de la pression artérielle systolique;
- Prévient le stress oxydatif;
- Prévient la dysfonction endothéliale;
- Prévient l'infiltration des macrophages;
- Diminue le taux de l'INF- γ .

Il est à noter aussi que l'exercice augmente le taux du Foxp3 dans la rate et le cortex rénal, ce qui traduit l'implication du système immunitaire et des cellules Treg dans l'effet bénéfique de l'exercice.

**ERYTHROPOIETIN-INDUCED HYPERTENSION AND OXIDATIVE STRESS
IN MICE OVEREXPRESSING HUMAN ENDOTHELIN-1 WAS DECREASED BY
EXERCISE**

Tlili Barhoumi^{1,4}, Marie Briet¹, Daniel A. Kasal^{1,3}, Layla Shbat¹, Pierre Paradis¹,

Pascal Laurant⁴ and Ernesto L. Schiffrin^{1,2}

¹Lady Davis Institute for Medical Research and ²Department of Medicine, Sir Mortimer B. Davis-Jewish General Hospital, McGill University, Montreal, PQ, Canada, ³State University of Rio de Janeiro, Brasil, ⁴Université d'Avignon et des Pays de Vaucluse-Avignon, France;

Key words: endothelin-1, erythropoietin, exercise, blood pressure, vascular remodeling, endothelial dysfunction

Word count:

Manuscript: 4945

Abstract: 262

Figures: 8

Correspondence to:

Ernesto L. Schiffrin CM, MD, PhD, FRSC, FRCPC
Department of Medicine,
Sir Mortimer B. Davis-Jewish General Hospital, #B-127,
3755 Cote Ste-Catherine Road,
Montreal, Quebec, Canada H3T 1E2
Ph.: (514) 340-7538; Fax: (514) 340-7539
Email: ernesto.schiffrin@mcgill.ca

Abstract

Erythropoietin has been shown to increase blood pressure in patients and animal models when used to treat anemia. This effect might partly contribute by oxidative stress and increased ET-1 production and release. Chronic exercise prevents or reduces development of cardiovascular disease such as hypertension. However, it is unknown whether exercise prevents erythropoietin-induced hypertension. Mice with an endothelial specific preproET-1 (eET-1) overexpression exhibit vascular damage in absence of blood pressure rise. We hypothesized that erythropoietin induces hypertension and exacerbates vascular damage in eET-1 mice, and that exercise training will prevent these effects. Eight to 10-week old male eET-1 and wild type (WT) mice were treated with human recombinant erythropoietin (r-HuEPO 100 U/kg, s.c., 3 times/week) or not (control), and subjected to a program of chronic swimming (1 h/d, 6 d/week) for 8 weeks or maintained in sedentary condition. The blood pressure was measured weekly. NADPH oxidase activity was evaluated by lucigenin chemiluminescence and superoxide production by dihydroethidium staining. In eET-1 mice treatment with r-HuEPO increased SBP (141.45 ± 5.4 vs. 111.15 ± 5.5 mmHg, $P < 0.01$), plasmatic ET-1 concentration ($P < 0.001$), NADPH oxidase activity in kidney (37%, $P < 0.05$) and in aorta (56%, $P < 0.01$), impaired acetylcholine vasodilatory responses by 70% compared to control ($P < 0.01$) and increased vascular remodeling ($P < 0.05$) in mesenteric artery. R-HuEPO increased mesenteric artery vascular cell adhesion molecule expression (2-fold, $P < 0.05$), and aortic macrophage infiltration ($P < 0.001$) in eET-1 mice. All the above were prevented by exercise. Exercise

caused a 2 folds increase in Foxp3⁺ expression (specific marker of natural T regulatory cells) in renal cortex. Thus, r-HuEPO treatment induced blood pressure elevation and vascular injury. These effects were prevented by swimming exercise in part through decrease of vascular oxidative stress, inflammation and endothelial dysfunction.

Introduction

Erythropoietin (EPO) is a hypoxia-induced hormone that is essential for normal erythropoiesis. Human recombinant erythropoietin (r-HuEPO) is widely accepted as a treatment of anemia associated with chronic kidney disease (CKD) (Fisher 2003; Krantz 1991). However, large clinical trials conducted within CKD patients showed an increase in cardiovascular events and hypertension in the group of patients randomly assigned to the higher hematocrit levels target (Cerasola et al. 2009; Singh et al. 2006; Unger et al. 2010). Whether these adverse effects are due to the molecule by itself or hematocrit levels is still controversial. Experimental data suggest that r-HuEPO could have a direct effect on the cardiovascular system. Beside its classical expression in erythroid progenitor cells, EPO receptor was found in endothelial cells and vascular smooth muscle cells (Bogoyevitch 2004; Chong et al. 2002b). In a rat model of uremia, r-HuEPO administration induced high blood pressure (BP) and oxidative stress (Rancourt et al. 2010b). Endotelin-1 (ET-1) has been involved in r-HuEPO-induced cardiovascular injury. Increased levels of ET-1 were shown in hemodialysis patients treated with r-HuEPO

(Carlini et al. 1993b). Cardiovascular injury induced by r-HuEPO in uremic rats were blunted by endothelin-1 subtype A receptor blockers (Rodrigue et al. 2003c).

Endothelin-1 (ET-1) was first characterized as a potent vasoconstrictor and is overexpressed in the vasculature in different models of hypertension, such as deoxycorticosterone acetate-salt rats, Dahl salt-sensitive rats, and stroke-prone spontaneously hypertensive rats

ET-1 is a powerful vasoconstrictor peptide that is implicated in BP elevation in different models of experimental hypertension such as deoxycorticosterone acetate-salt rat, stroke-prone spontaneously hypertensive rats, and Dahl salt-sensitive rats, (Iglarz and Schiffrin 2003; Schiffrin 2005a) and in high blood pressure in human (Cardillo et al. 1999). In a mice model overexpressing ET-1 in endothelial cells, we demonstrated that ET-1 overexpression induced endothelial dysfunction, vascular remodeling and reactive oxygen specie generation in mesenteric resistance arteries in the absence of significant blood pressure (BP) elevation (Amiri et al. 2004).

Aerobic exercise is associated with systemic changes in heart rate, cardiac output, systolic and pulse pressure leading to acute vascular functional adaptations by generating hemodynamic shear stress (Duncker and Bache 2008; Kemi and Wisloff 2010). Increased blood flow and shear stress induced by aerobic exercise were modulated mainly by NO and endothelium-dependent vasodilation in order to protect blood vessels, decrease peripheral resistance and favor O₂ delivery to muscles in activity (Duncker and Bache 2008; Maiorana et al. 2003). R-HuEPO administration further increases oxidative stress,

which might partly account for the accentuation of hypertension and renal injury (Rancourt et al. 2010b). Several studies, shown that r-HuEPO treatment increased proinflammatory cytokines in hemodialysis patients (Goicoechea et al. 1998b). Chronique exercise decreased proinflammatory cytokines (Balducci et al. 2010b) and oxidative stress (Ji 1999b). Exercise have a deleterious effect in rats treated with r-HuEPO with pre-existing cardiovascular risk (L-NAME treatment) (Meziri et al. 2011b). However there is no study about the effect of exercise and r-HuEPO in case of ET-1 overexpressing in the endothelium.

The aims of the current study were 1/ to investigate the effects of r-HuEPO treatment on blood pressure, vascular function and remodeling, oxidative stress, and inflammation in transgenic mice overexpressing human preproendothelin-1 specifically in the endothelium of blood vessels, 2/ to assess a putative beneficial effect of regular swimming on blood pressure, vascular damage, and the same cardiovascular risk factors in this model of mice. Swimming is considered equally effective as jogging, biking, or walking as a recommended aerobic exercise with beneficial effects on cardiovascular risk reduction (Delagardelle and Feiereisen 2011).

Methods

Animals

The study was approved by the Animal Ethics Committee of the Lady Davis Institute for Medical Research (LDI) and conducted according to recommendations of the McGill

University Animal Care Committee and performed according to the recommendations of the Canadian Council for Animal Care. Eight to 10-week-old male transgenic mice overexpressing human preproET-1 selectively in the endothelium using the Tie2 promoter (eET-1) previously described (Amiri et al. 2004) and wild-type littermate mice were studied. Mice were treated with r-HuEPO (100 U/kg, s.c., 3 times/week) or not (control), for 8 weeks (n=8-10). Systolic blood pressure (SBP) was measured weekly by the tail-cuff method using a MC4000 BP analysis system (Hatteras Instruments).

Endurance Swimming Protocol and Sacrifice

eET-1 mice were subjected to endurance exercise or maintained in sedentary condition. The exercise group underwent 8-week swimming program. Briefly, mice swam always in the morning between 10 and 12 AM (Pellegrin et al. 2009b). The duration of swimming period was 60 minutes per day, 6 days per week in water kept at 36°C to 37°C. During the first week, we increased progressively the time of swimming exercise from 10 to 60 minutes by adding 10min each day. Mice should be in moving during all the time of exercise. At the end of each exercise session, mice were carefully dried and placed under a lamp 5 to 10 minutes.

Endothelial Function and Vessel Mechanics

Second-order branches of mesenteric arteries were dissected and mounted on a pressurized myograph. Endothelial function and vessel mechanics were determined as described previously (Leibovitz et al. 2009). Briefly, vessels were equilibrated for 60 min at 45mmHg of intraluminal pressure in warmed oxygenated (95% air–5% CO₂) Krebs

solution (pH 7.4) containing (mmol/l): 120 NaCl, 25 NaHCO₃, 4.7 KCl, 1.18 KH₂PO₄, 1.18 MgSO₄, 2.5 CaCl₂, 0.026 EDTA and 5.5 glucose. Media and lumen diameters were measured by a computer-based video imaging system (Living Systems Instrumentation, Burlington, Virginia, USA). Endothelium-dependent and -independent relaxations were assessed by measuring the dilatory responses to cumulative doses of acetylcholine (Ach, 10⁻⁹ to 10⁻⁴ mol/L) and sodium nitroprusside (SNP, 10⁻⁸ to 10⁻³ mol/L), respectively, in vessels precontracted with norepinephrine (NE, 5 x 10⁻⁵ mol/L). To evaluate the contribution of nitric oxide (NO) to the vascular response, in a different set of experiments the dose-response curve to Ach was determined before and after a 30-minute preincubation with the NO synthase inhibitor *N*ω-nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME, 10⁻⁴ mol/L). Thereafter, vessels were perfused with Ca²⁺-free Krebs solution containing 10 mmol/l EGTA for 30 min to eliminate vascular tone. Media and lumen diameters were measured at 3, 10, 20, 30, 40, 45, 60, 80, 100, 120 and 140 mmHg intraluminal pressures. Media cross-sectional area and media/lumen ratio were calculated (Lacolley et al. 2002b).

Reduced nicotinamide adenine dinucleotide (NADPH) oxidase activity and generation of reactive oxygen species (ROS)

ROS generation was determined in the aorta, cardiac apex and the kidney cortex by measuring NADPH oxidase activity by chemiluminescence using lucigenin and NADPH, as described in our previous studies (Barhoumi et al. 2011). Vascular superoxide (•O₂⁻) production was assessed on 5 μm cryosections of aorta with the superoxide-sensitive

fluorescent dye dihydroethidium (DHE, 2 $\mu\text{mol/L}$) in dark conditions for 5 min at 37°C. Fluorescence was visualized and captured with a fluorescence microscope with a CY3 filter as previously described (Barhoumi et al. 2011).

Plasma cytokine measurement

Plasma levels of interleukin (IL)-1 β , IL-6, IL-10, interferon (IFN)- γ , and tumor necrosis factor (TNF)- α were measured using Bio-Rad Laboratories Bio-Plex Multiplex System (Hercules, CA, USA).

Immunofluorescent detection of macrophages and lymphocytes

Immunofluorescence microscopy was performed on 5- μm -thick cryostat aortic sections. Aortic sections were air-dried for 30 min, fixed for 5 min in a mixture of acetone:methanol (1:1) at -20°C and washed with PBS containing 0.1 % Tween-20 (PBST) twice for 10 min. Sections were blocked with PBST containing 10% normal goat serum for 1 h at room temperature and then incubated with a rat anti-macrophage-specific antigen MOMA-2 antibody (1:50, Abcam, Cambridge, MA, USA), a hamster anti-CD3 monoclonal antibody (1:100, 145-2C11) or rabbit anti-Foxp3 antibody (marker of natural T regulatory cells) (1:500, Abcam) in blocking solution overnight at 4°C. The sections were washed 3 times with PBST and incubated with Alexa Fluor® 488 goat anti-hamster, Alexa Fluor® 555 goat anti-rat or Alexa Fluor® 555 goat anti-rabbit (1:200, Invitrogen Corp., Carlsbad, CA, USA) in the blocking solution for 1h at room temperature and then washed 3 times with PBST and mounted with Vectashield containing 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI, Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA). Images were captured

using a fluorescent microscope Leica DM2000 (Leica Microsystems, Richmond Hill, ON, Canada). The percentage of MOMA-2 and CD3 staining/total surface area was quantified with Image J software (National Institute of Mental Health, Bethesda, Maryland, USA).

Data analysis

Results are presented as means $\pm$ SEM. Comparisons between multiple groups were done by one-way analysis of variance (ANOVA). For comparison of systolic blood pressure, a two-way analysis of variance for repeated measurements was used. For studies comparing the acetylcholine response curves, two-way ANOVA was performed on the sum-of-squares data from each curve. ANOVA was followed by a Student–Newman–Keuls post-hoc test. $P < 0.05$ was considered statistically significant.

Results

Physiological variables of eET-1 and control mice

Table 1 summarizes the physiological characteristics of eET-1 and wt mice treated or not with r-HuEPO and subjected or not to exercise. eET-1, eET-1 + exercise and eET-1 + r-HuEPO + exercise mice had lower body weight compared with WT, eET-1 and eET-1 + r-HuEPO mice respectively, Tibia length was not different between groups. Heart weight was increased in WT + rHu EPO compared to WT and in eET-1 + r-HuEPO + exercise compared to eET-1 + r-HuEPO. Spleen weight was increased in WT + r-HuEPO

compared to WT and in eET-1 + r-HuEPO compared to eET-1 Hematocrit was increased in all mice treated with r-HuEPO.

Effects of exercise on r-HuEPO-induced hypertension

Systolic blood pressure was comparable in WT and eET-1 mice. Blood pressure was similar in WT and WT + r-HuEPO but was increased in eET-1 + r-HuEPO compared to eET-1. (Figure 1).

Exercise prevented r-HuEPO-induced impairment of mesenteric artery endothelium-dependent relaxation and remodelling

Mesenteric arteries from eET-1 and WT showed no difference in relaxation responses to acetylcholine (Figure 2A). In contrast to WT and WT + r-HuEPO, eET-1 + r-HuEPO exhibited an impairment in relaxation responses to acetylcholine compared to eET-1 (Figure 2A), indicating endothelial dysfunction. Exercise prevented r-HuEPO induced endothelial dysfunction in eET-1 mice (Figure 2A). Endothelium-independent relaxation responses to sodium nitroprusside were similar in all the groups, indicating integrity of the vascular smooth muscle cell layer (Figure 2C). In mesenteric arteries, relaxation to acetylcholine was significantly blunted by eNOS inhibition with L-NAME in all groups except in eET-1 + r-HuEPO + exercise (Figure 2B).

M/L ratio was increased in eET-1 compared to WT. WT + r-HuEPO and eET-1 + r-HuEPO had significantly higher M/L ratio than WT and eET-1 respectively (Figure 3). Exercise prevented r-HuEPO induced M/L increased in eET-1 + r-HuEPO (Figure 3).

Exercise prevented r-HuEPO-induced oxidative stress

Heart, aorta and kidney NADPH oxidase activity levels were greater in eET-1 compared to WT. rHu-EPO treatment increased NADPH oxidase activity in both the aorta and the kidney cortex of eET-1 mice but not in WT mice (Fig. 4A). Exercise decreased NADPH oxidase activity in heart, kidney cortex and aorta in eET-1 and eET-1 + r-HuEPO. Superoxide-induced dihydroethidium fluorescence in the aorta was increased in eET-1 mice compared to wild type; this level was furthermore increased by rHu-EPO treatment. This effect was abrogated by swimming exercise. rHu-EPO treatment had no significant effect in wild type mice (Fig. 4B).

Effect of exercise on rHu-EPO-induced immune response

Monocyte/mm macrophage infiltration in aortic adventitia and periadventitial fat was higher in eET-1 compared to WT mice. Monocyte/macrophage infiltration was furthermore increased by rHu-EPO treatment in eET-1 mice and decreased significantly in exercise groups. No change was observed in wild type mice treated with rHu-EPO (Fig 5 A). In the renal cortex, monocyte/macrophage infiltration was increased in eET-1 compared to WT mice. In WT and eET-1 mice, rHu-EPO treatment had no effect in MOMA-2 staining. Exercise decreased monocyte/macrophage infiltration in eET-1 mice, but has no effect in eET-1 + rHu-EPO (Fig. 5B).

Expression of Foxp3, marker of T regulatory cells (Treg), was examined by immunofluorescence in renal cortex since kidneys play a key role in BP regulation (Fig. 5C). Foxp3 staining was not significantly different between WT and eET-1 mice and was

not modified by r-HuEPO treatment. However exercise increased Foxp3 expression by 2-fold in eET-1 mice and in eET-1 + rHu-EPO (Fig 5C).

CD4⁺CD25⁺FOXP3⁺ T Cells levels in the spleen were similar in WT and eET-1 mice. Treatment with r-HuEPO significantly decreased CD4⁺CD25⁺FOXP3⁺ T Cells levels in the spleen in WT and eET-1 mice. Exercise restored CD4⁺CD25⁺FOXP3⁺ T Cells levels in the spleen of eET-1 + r-HuEPO (Figure 6).

There is no change in cytokines levels in WT and eET-1 mice, however, rHu-EPO treatment in eET-1 mice increased pro-inflammatory cytokine IL-6 and tended to increase INF- γ . In this group exercise decreased INF- γ levels, but has no significant effect in the other pro-inflammatory cytokines. Plasma levels of the anti-inflammatory cytokine IL-10 tended to increase by rHu-EPO treatment in eET-1 mice, but was not affected by exercise. However exercise significantly increased IL-10 levels in eET-1 mice without rHu-EPO treatment (Fig. 7).

EPO-induced elevation in Plasma ET-1 concentrations levels

Plasma ET-1 concentration was increased in eET-1 mice compared to WT. Treatment with r-HuEPO significantly increased ET-1 levels in eET-1 mice. Exercise had no effect in plasma ET-1 concentration in eET-1 mice but tended to decrease ET-1 concentration in eET-1 mice treated with r-HuEPO (Fig. 8).

Discussion

Treatment with recombinant human erythropoietin (r-HuEPO) is usually associated with an increase in blood pressure (BP) resulting in *de novo* hypertension or exacerbation of

existing hypertension, this effect was markedly if models present an endothelial dysfunction (Abraham and Macres 1991; Lebel et al. 1998c) and has not been reported when r-HuEPO was administered to healthy patients (Berglund and Ekblom 1991) or control animals without any renal or cardiovascular disease (Lacasse et al. 1997). However, hypertension has been observed in normal rats with higher doses of r-HuEPO (Muntzel et al. 1993). In this study, we support and extend this concept by demonstrating that r-HuEPO treatment increased systolic blood pressure (SBP) in transgenic mice overexpressing human preproET-1 selectively in the endothelium, with an endothelial dysfunction (Amiri et al. 2004).

The present study provides the first in vivo demonstration that r-HuEPO treatment when associated with endothelin-1 overexpression, results in increased systolic blood pressure (SBP), enhanced endothelial dysfunction and vascular remodeling of resistance vessels, mediated in part by increased plasmatic ET-1 concentration, oxidative stress and inflammation. This effect was prevented by swimming exercise.

R-HuEPO treatment has no effect on blood pressure (BP), in models with normal endothelial function, since it's hematopoietic effect may be counterbalanced by endothelial vasodilatory agents such as increase in nitric oxide production (Ruschitzka et al. 2000b; Vogel et al. 2003a) or endothelial ET_B receptor expression (Rodrigue et al. 2008c). However, in our study, r-HuEPO attenuate endothelial vasodilation in response to acetylcholine, suggesting that chronic use of r-HuEPO is able to impair endothelial function. R-HuEPO did not increase systemic ET-1 release and did not disturb the level

of blood pressure that is remains normal in WT mice treated with EPO. In contrast, r-HuEPO treatment induced hypertension and vascular damage in eET-1 mice. These effects are mediated at least partly through increased oxidative stress, macrophages infiltration and plasmatic ET-1 concentration.

It was shown that r-HuEPO induced hypertension in presence of endothelial dysfunction (Rodrigue et al. 2008a; Ruschitzka et al. 2000). In our study, r-HuEPO treatment may exacerbate the unbalance in ET-1/NO ratio which leads to further more the endothelial dysfunction and pressure rise in eET-1 mice. Although transgenic mice without treatment with r-HuEPO did not exhibited alteration in endothelium-dependent vasorelaxation to acetylcholine in the absence of changes in (SBP), R-HuEPO treatment of transgenic mice (eET-1+ r-HuEPO) resulted in significant endothelium-dependent vasorelaxant dysfunction through deficiency of nitric oxide as demonstrated by reduced responses to acetylcholine.

Several studies have shown that r-HuEPO can stimulate the release of ET-1, a powerful endothelial vasoconstrictor (Smith et al. 2003). In our study plasmatic ET-1 concentration was increased by r-HuEPO treatment and may be leads to impair the ET-1/NO ratio. Many previous study shown that ET-1 induces endothelial dysfunction (Amiri et al. 2004; Li et al. 1998b) and inflammation has been associated with BP elevation, which is associated with excess ET-1 (Schiffrin 2005a; Virdis and Schiffrin 2003a), more interestingly Amiri et al, 2008 (Amiri et al. 2008) shown that ET-1 has an effect on vascular inflammation independent of BP elevation.

Our results shown that r-HuEPO treatment increased plasmatic endothelin-1 concentration in eET-1 mice, these data with that of others demonstrate the detrimental effects of excess production of ET-1 and its pathophysiological consequences specially in pressure rise (Schiffrin 2005a; Virdis and Schiffrin 2003b). These suggest that increase in systolic blood pressure (SBP) was caused by decreased of vascular ETBRs or increased in ETARs. Furthermore, these results seem to suggest that r-HuEPO seems to affect Tie-2 promoter.

To further investigate the mechanisms by which r-HuEPO treatment in these mice overexpressing endothelin-1 may contribute to (SBP) elevation and endothelial dysfunction, we studied the role of oxidative stress and nitric oxide bioavailability. Significantly increased vascular NADPH oxidase activity in eET-1 mice + r-HuEPO compared to wild-type + r-HuEPO mice reinforces the large body of evidence on the potent role of endothelin-1 in ROS generation. These findings are in agreement with previous results in these models of transgenic mice overexpressing endothelin-1 in the vasculature (Amiri et al. 2008).

Hypertension is associated with an increase in vascular inflammatory responses, which contributes to vascular dysfunction monocyte/macrophage infiltration in aortic adventitia and periadventitial fat was higher in eET-1 compared to WT mice. This level was furthermore increased by rHu-EPO treatment. Vascular inflammation is characterized by a greater expression of cell adhesion molecules (VCAM-1 and ICAM-1) by endothelial cells and by the accumulation of immune cells such as dendritic cells (DCs) and T cells in

the vascular wall (Viel et al. 2010b). In arterial hypertension experimental and clinical data suggest a possible interplay of inflammatory molecules with both oxidative stress and endothelial activation markers (Cerasola et al. 2009).

In our study exercise decrease macrophages infiltration and increased T regulatory cells (cd4+cd25+foxp3) infiltration in kidney of eET-1 mice treated with r-HuEPO accordingly with a higher level in the spleen of this group. These findings are in agreement with our previous results shown that T regulatory cells were implicated in hypertension and vascular damage Angiotensine II-induced (Barhoumi et al. 2011).

The beneficial effect of swimming was likely mediated by downregulating oxidative stress inflammatory cells infiltration and plasmatic ET-1 concentration. Decreased oxidative stress in vascular tissues of eET-1 mice treated with r-HuEPO with swimming exercise was associated with suppression of macrophages and T lymphocytes, both of which could have contributed to r-HuEPO-induced oxidative stress. Whether ROS produced by macrophages and T lymphocytes infiltrating the adventitia and periadventitial fat are able to reach and react with endothelium-derived NO contributing to endothelial dysfunction, remains to be demonstrated (Touyz 2005a).

Despite some controversial results, it has been clearly demonstrated that low- to moderate-intensity exercise decreases elevated blood pressure or delays the onset of hypertension in various experimental hypertension models in animals (Kuru et al. 2002a), spontaneously hypertensive rats (Yen et al. 1995), Dahl-salt hypertension (Tipton 1991), DOCA-induced hypertension (Fregly 1984b), and Goldblatt hypertension (Marcus and

Tipton 1985b), L-NAME-treated rats (Kuru et al. 2009b; Meziri et al. 2011b). Accordingly, we showed that regular swimming exercise training prevented the rise in blood pressure in eET-1 mice treated with r-HuEPO.

It has been clearly demonstrated that exercise decreases elevated blood pressure and prevents hypertension in the most experimental models of hypertension.

In summary, r-HuEPO associated with endothelial cell-restricted preproendothelin-1 overexpression induces increase in plasmatic endothelin-1 concentration, plasma inflammatory cytokines $\text{INF-}\gamma$, $\text{TNF-}\alpha$ and IL-6, endothelial dysfunction, vascular remodeling, and enhanced ROS production all contributing to elevation in (SBP). To our knowledge, the present study provides the first in-vivo demonstration that endothelin-1 overexpression associated r-HuEPO treatment results in enhanced endothelial dysfunction and vascular remodeling of resistance vessels, and contributes to elevated (SBP), and the role of exercise to abrogated these effect.

Acknowledgments

We are grateful to André Turgeon and Véronique Michaud for excellent technical assistance. This work was supported by Canadian Institutes of Health Research (CIHR) grants 82790 and 102606, a Canada Research Chair on Hypertension and Vascular Research from CIHR/Government of Canada, and the Canada Fund for Innovation (all to ELS). N'oubliez pas la subvention de la société d'hypertension

Disclosures

None.

Tables

Table 1. Physiological Variables of eET-1 and control mice

Parameters	WT	WT+EPO	eET-1	eET-1+EX	eET-1+EPO	eET-1+EPO+EX
Body weight, g	34.4 ±2.3	32.1 ±2.5	29.2 ±2.1**	25.1 ±1.1††	28.8 ±1.1	26.2 ±1.5‡
TL, mm	17.5 ±0.2	16.9 ±0.1	17.4 ±0.2	16.8 ±0.1	17.4 ±0.1	16.8 ±0.1
Heart weight/TL, mg/mm	6.9 ±0.8	7.8 ±0.6*	6.7 ±0.6	6.7 ±0.5	7.0 ±0.5	8.1 ±0.5‡‡
Kidney weight/TL, mg/mm	8.7 ±0.9	11.3 ±1.2	10.1 ±4.0	8.8 ±6.4	10.7 ±6.4	8.8 ±1.5
Spleen weight/TL, mg/mm	4.2 ±0.9	8.1 ±2.5*	4.1 ±0.7	3.3 ±0.3	9.2 ±6.5††	3.9 ±0.9‡‡
Hematocrit	47.6 ±1.8	65.3 ±2.1*	42.4 ±7.1	51.4 ±2.2	65.3 ±1.5††	63.6 ±4.2†

Values are mean ± SEM. n=7 to 8 mice per group. TL indicates tibia length. Data are means ± SEM. *P<0.05 and **P<0.01 vs. WT, †P<0.05 and ††P<0.01 vs. eET-1, ‡P<0.05 and ‡‡P<0.01 vs. eET-1 + EPO

Figures

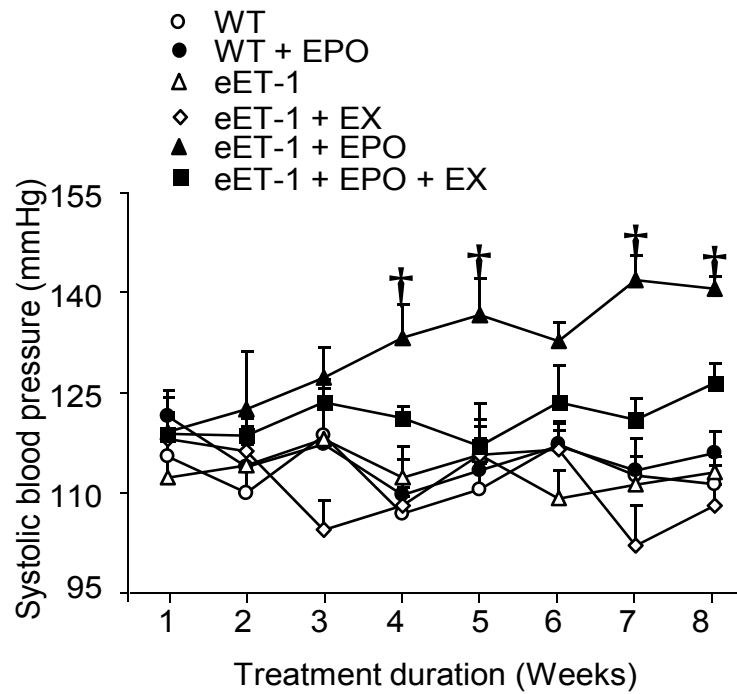


Figure 1. Exercise prevented EPO-induced hypertension. Systolic blood pressure was measured by tail-cuff technique in wild type mice (WT) and in mice overexpressing eET-1 in the endothelium (eET-1), in WT and eET-1 treated with EPO (WT + EPO and eET-1 + EPO respectively), and eET-1 assigned to an exercise regimen in addition or not to the EPO treatment (eET-1 + EX and eET-1 + EPO + EX respectively). Data are presented as means $\pm$ SEM. †P<0.05 vs. eET-1 with n = 6 - 8.

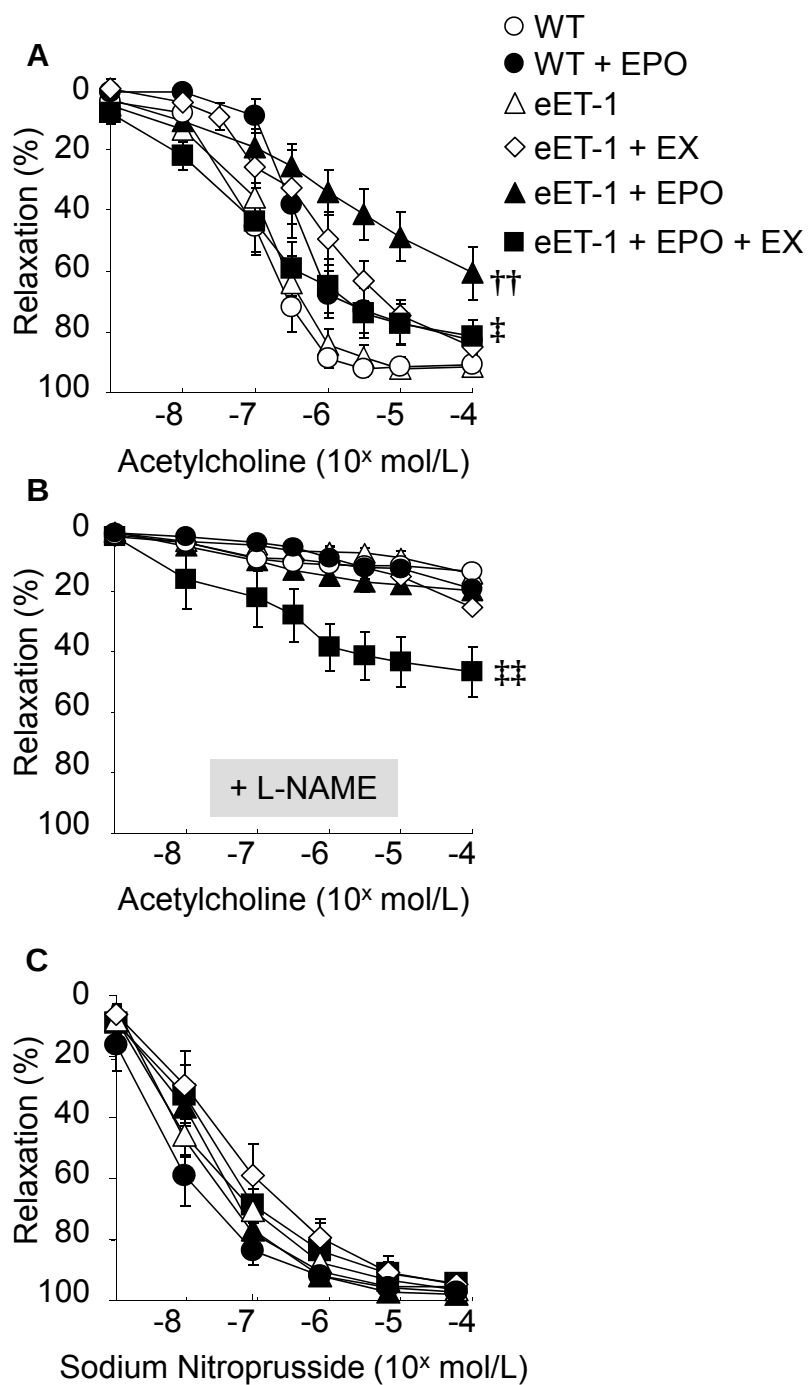


Figure 2. Exercise prevented EPO-induced impairment of vasodilatory responses to acetylcholine. Responses to acetylcholine without (A) or with L-NAME (B)

and nitroprusside (C) were determined in the same groups as in figure 1 (n=6-8).
Data are means $\pm$ SEM. $\dagger\dagger P < 0.01$ vs. eET-1; $\ddagger\dagger P < 0.01$ and $\ddagger P < 0.05$ vs. eET-1 + EPO.

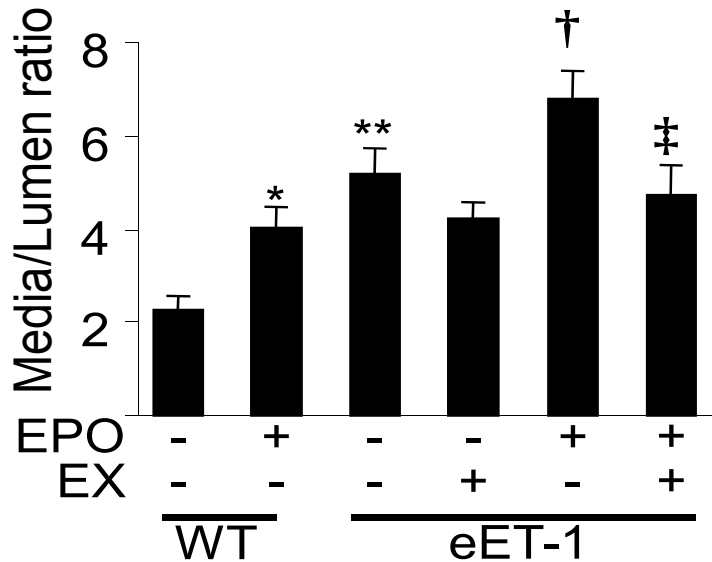


Figure 3. Exercise prevented EPO-induced small mesenteric arteries remodeling. Media to lumen ratio was determined in the same groups as in figure 1 (n=6-8).
Data are means $\pm$ SEM. * $P < 0.05$ and ** $P < 0.01$ vs. WT, $\dagger P < 0.05$ and $\dagger\dagger P < 0.01$ vs. eET-1 and $\ddagger P < 0.05$ vs. eET-1 + EPO.

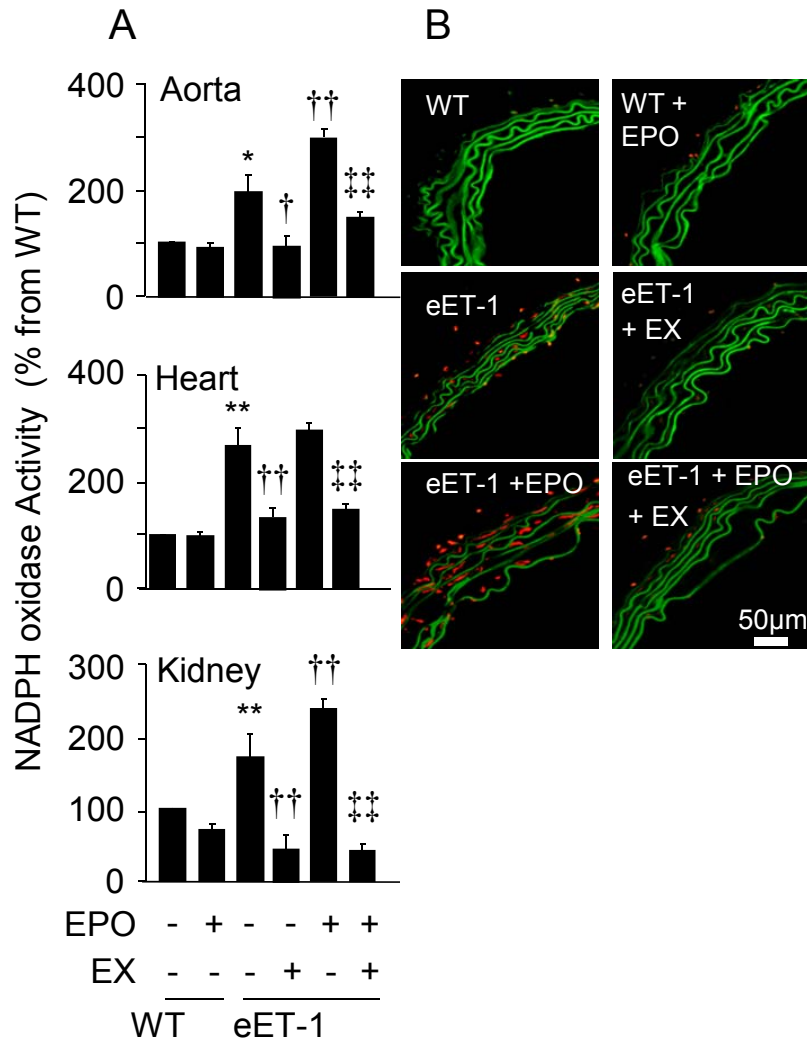
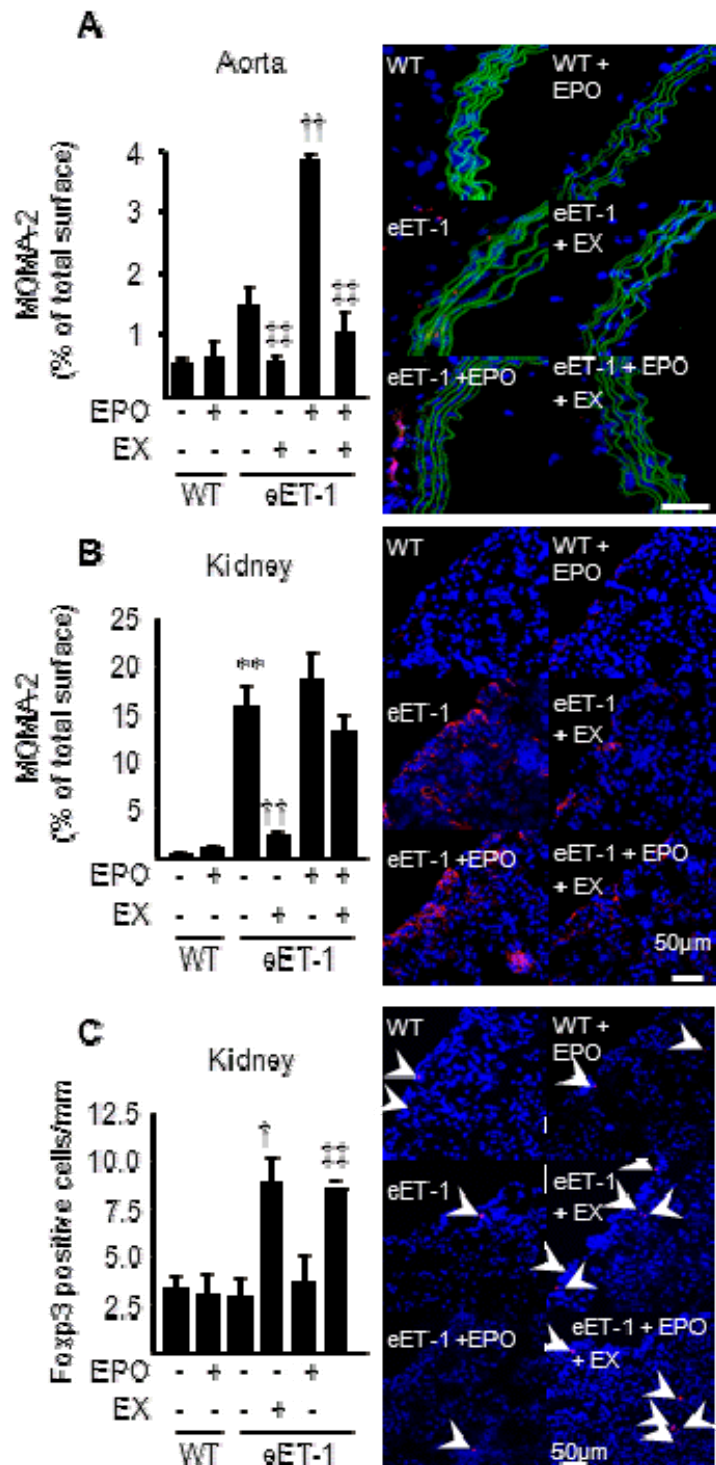


Figure 4. EPO-induced oxidative stress was prevented by exercise. NADPH oxidase activity in heart, aorta and kidney (A) and dihydroethidium staining revealing superoxide generation were determined in the same group as in figure 1. Data are means $\pm$ SEM. * $P < 0.05$ and ** $P < 0.01$ vs. WT, † $P < 0.05$ and †† $P < 0.01$ vs. eET-1 and ‡‡ $P < 0.01$ vs. eET-1 + EPO with $n = 6 - 8$.

Figure 5. EPO induced immune cell infiltration in the aorta and the kidney. Exercise increased the number of FoxP3 positive cells in the kidney. Monocyte/macrophage infiltration in the aorta (A) and the kidney (B) was determined by immunofluorescence (red fluorescence, n=3–5) in the same groups as figure 1. Regulatory T cells infiltration in the kidney (C) was determined by immunofluorescence (red fluorescence, n=6–8). Arrow heads point at Foxp3+ cells. Elastin autofluorescence and nuclear stain 4,6-diamidino-2-phenylindole were shown in green and blue, respectively. Data are means $\pm$ SEM. *P<0.05 and **P<0.01 vs. WT, †P<0.05 and ††P<0.01 vs. eET-1 and ‡‡P<0.01 vs. eET-1 + EPO with n = 6 – 8.



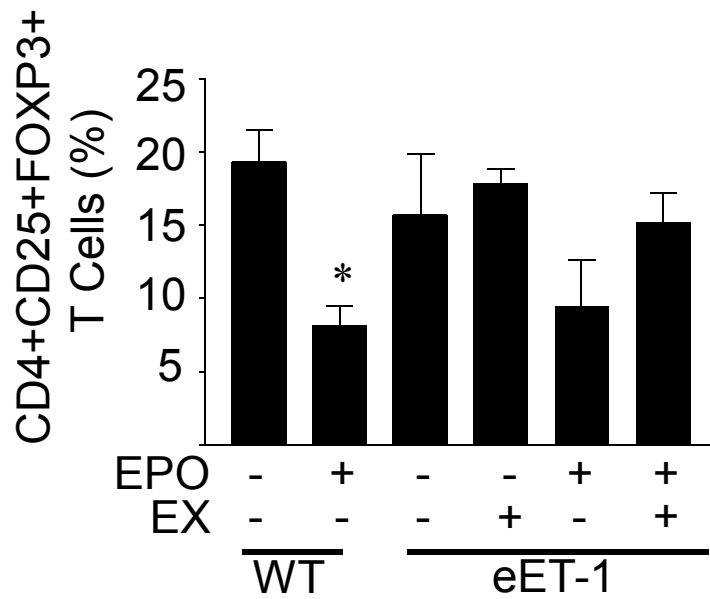


Figure 6. CD4+CD25+FOXP3+ T Cells levels in the spleen were determined by Flow Cytometry Analysis in the same groups as figure 1. Data are means $\pm$ SEM. *P<0.05 vs. WT, with n= 6-8.

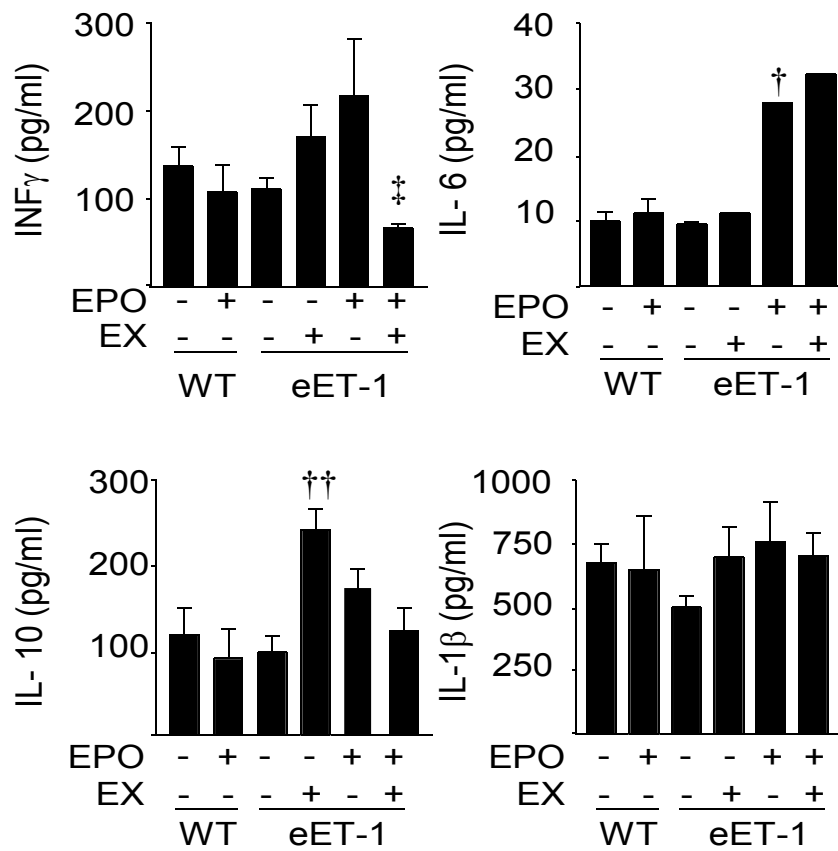


Figure 7. Plasma cytokine levels. The levels of IFN-, TNF-, IL-6, and IL-10 were determined in wildtype mice (WT), mice overexpressing eET-1 in the endothelium (eET-1), WT mice treated with EPO (WT+EPO), eET-1 mice treated with EPO (eET-1 +EPO), eET-1 mice with exercise (eET-1 +EX), eET-1 mice treated with EPO with exercise (eET-1 +EPO+EX). Data are means $\pm$ SEM. [†]P<0.05 and ^{††}P<0.01 vs. eET-1 and [‡]P<0.05 vs. eET-1 + EPO with n = 6 – 8.

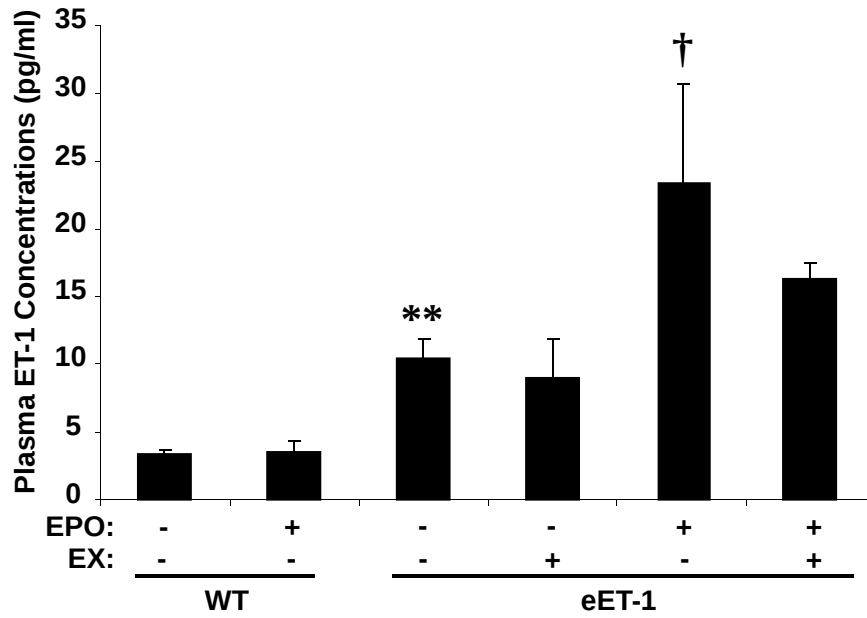


Figure 8. EPO-induced elevation in Plasma ET-1 concentrations levels. Levels were determined in wildtype mice (WT), mice overexpressing eET-1 in the endothelium (eET-1), WT mice treated with EPO (WT+EPO), eET-1 mice treated with EPO (eET-1+EPO), eET-1 mice with exercise (eET-1+EX), eET-1 mice treated with EPO with exercise (eET-1+EPO+EX). Data are means $\pm$ SEM. ** P <0.01 vs. WT, † P <0.05 vs. eET-1 with n = 6 – 8.

Reference List

- (1) Fisher JW. Erythropoietin: physiology and pharmacology update. *Exp Biol Med* (Maywood) 2003; 228(1):1-14.
- (2) Krantz SB. Erythropoietin. *Blood* 1991; 77(3):419-434.
- (3) Cerasola G, Guarneri M, Cottone S. [Inflammation, oxidative stress and kidney function in arterial hypertension]. *G Ital Nefrol* 2009; 26 Suppl 46:8-13.
- (4) Singh AK, Szczech L, Tang KL, Barnhart H, Sapp S, Wolfson M, Reddan D. Correction of anemia with epoetin alfa in chronic kidney disease. *N Engl J Med* 2006; 355(20):2085-2098.
- (5) Unger EF, Thompson AM, Blank MJ, Temple R. Erythropoiesis-stimulating agents--time for a reevaluation. *N Engl J Med* 2010; 362(3):189-192.
- (6) Bogoyevitch MA. An update on the cardiac effects of erythropoietin cardioprotection by erythropoietin and the lessons learnt from studies in neuroprotection. *Cardiovasc Res* 2004; 63(2):208-216.
- (7) Chong ZZ, Kang JQ, Maiese K. Erythropoietin is a novel vascular protectant through activation of Akt1 and mitochondrial modulation of cysteine proteases. *Circulation* 2002; 106(23):2973-2979.
- (8) Rancourt ME, Rodrigue ME, Agharazii M, Lariviere R, Lebel M. Role of oxidative stress in erythropoietin-induced hypertension in uremic rats. *Am J Hypertens* 2010; 23(3):314-320.
- (9) Carlini R, Obialo CI, Rothstein M. Intravenous erythropoietin (r-HuEPO) administration increases plasma endothelin and blood pressure in hemodialysis patients. *Am J Hypertens* 1993; 6(2):103-107.
- (10) Rodrigue ME, Moreau C, Lariviere R, Lebel M. Relationship between eicosanoids and endothelin-1 in the pathogenesis of erythropoietin-induced hypertension in uremic rats. *J Cardiovasc Pharmacol* 2003; 41(3):388-395.
- (11) Iglarz M, Schiffrin EL. Role of endothelin-1 in hypertension. *Curr Hypertens Rep* 2003; 5(2):144-148.
- (12) Schiffrin EL. Vascular endothelin in hypertension. *Vascul Pharmacol* 2005; 43(1):19-29.

- (13) Cardillo C, Kilcoyne CM, Wacławski M, Cannon RO, III, Panza JA. Role of endothelin in the increased vascular tone of patients with essential hypertension. *Hypertension* 1999; 33(2):753-758.
- (14) Amiri F, Viridis A, Neves MF, Iglarz M, Seidah NG, Touyz RM, Reudelhuber TL, Schiffrin EL. Endothelium-restricted overexpression of human endothelin-1 causes vascular remodeling and endothelial dysfunction. *Circulation* 2004; 110(15):2233-2240.
- (15) Duncker DJ, Bache RJ. Regulation of coronary blood flow during exercise. *Physiol Rev* 2008; 88(3):1009-1086.
- (16) Kemi OJ, Wisloff U. High-intensity aerobic exercise training improves the heart in health and disease. *J Cardiopulm Rehabil Prev* 2010; 30(1):2-11.
- (17) Maiorana A, O'Driscoll G, Taylor R, Green D. Exercise and the nitric oxide vasodilator system. *Sports Med* 2003; 33(14):1013-1035.
- (18) Goicoechea M, Martin J, de SP, Quiroga JA, Ortiz A, Carreno V, Caramelo C. Role of cytokines in the response to erythropoietin in hemodialysis patients. *Kidney Int* 1998; 54(4):1337-1343.
- (19) Balducci S, Zanuso S, Nicolucci A, Fernando F, Cavallo S, Cardelli P, Fallucca S, Alessi E, Letizia C, Jimenez A, Fallucca F, Pugliese G. Anti-inflammatory effect of exercise training in subjects with type 2 diabetes and the metabolic syndrome is dependent on exercise modalities and independent of weight loss. *Nutr Metab Cardiovasc Dis* 2010; 20(8):608-617.
- (20) Ji LL. Antioxidants and oxidative stress in exercise. *Proc Soc Exp Biol Med* 1999; 222(3):283-292.
- (21) Meziri F, Binda D, Touati S, Pellegrin M, Berthelot A, Touyz RM, Laurant P. Exercise aggravates cardiovascular risks and mortality in rats with disrupted nitric oxide pathway and treated with recombinant human erythropoietin. *Eur J Appl Physiol* 2011.
- (22) Delagardelle C, Feiereisen P. [25 years of organized ambulatory heart sport in Luxembourg. The development of a sustained rehabilitation model]. *Bull Soc Sci Med Grand Duche Luxemb* 2011; (1):7-17.
- (23) Pellegrin M, Alonso F, Aubert JF, Bouzourene K, Braunersreuther V, Mach F, Haefliger JA, Hayoz D, Berthelot A, Nussberger J, Laurant P, Mazzolai L. Swimming prevents vulnerable atherosclerotic plaque development in

- hypertensive 2-kidney, 1-clip mice by modulating angiotensin II type 1 receptor expression independently from hemodynamic changes. *Hypertension* 2009; 53(5):782-789.
- (24) Leibovitz E, Ebrahimian T, Paradis P, Schiffrin EL. Aldosterone induces arterial stiffness in absence of oxidative stress and endothelial dysfunction. *J Hypertens* 2009; 27(11):2192-2200.
 - (25) Lacolley P, Labat C, Pujol A, Delcayre C, Benetos A, Safar M. Increased carotid wall elastic modulus and fibronectin in aldosterone-salt-treated rats: effects of eplerenone. *Circulation* 2002; 106(22):2848-2853.
 - (26) Lebel M, Kingma I, Grose JH, Langlois S. Hemodynamic and hormonal changes during erythropoietin therapy in hemodialysis patients. *J Am Soc Nephrol* 1998; 9(1):97-104.
 - (27) Abraham PA, Macres MG. Blood pressure in hemodialysis patients during amelioration of anemia with erythropoietin. *J Am Soc Nephrol* 1991; 2(4):927-936.
 - (28) Berglund B, Ekblom B. Effect of recombinant human erythropoietin treatment on blood pressure and some haematological parameters in healthy men. *J Intern Med* 1991; 229(2):125-130.
 - (29) Lacasse M, Kingma I, Lariviere R, Grose JH, Lebel M. Uremia enhances the blood pressure response to erythropoietin. *Clin Exp Hypertens* 1997; 19(4):389-401.
 - (30) Muntzel M, Hannedouche T, Lacour B, Drueke TB. Erythropoietin increases blood pressure in normotensive and hypertensive rats. *Nephron* 1993; 65(4):601-604.
 - (31) Ruschitzka FT, Wenger RH, Stallmach T, Quaschnig T, de WC, Wagner K, Labugger R, Kelm M, Noll G, Rulicke T, Shaw S, Lindberg RL, Rodenwaldt B, Lutz H, Bauer C, Luscher TF, Gassmann M. Nitric oxide prevents cardiovascular disease and determines survival in polyglobulic mice overexpressing erythropoietin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000; 97(21):11609-11613.
 - (32) Vogel J, Kiessling I, Heinicke K, Stallmach T, Ossent P, Vogel O, Aulmann M, Frietsch T, Schmid-Schonbein H, Kuschinsky W, Gassmann M. Transgenic mice overexpressing erythropoietin adapt to excessive erythrocytosis by regulating blood viscosity. *Blood* 2003; 102(6):2278-2284.

- (33) Rodrigue ME, Brochu I, Orleans-Juste P, Lariviere R, Lebel M. Effect of erythropoietin on blood pressure and on the vascular endothelial ET-1/ETB receptor system. *Am J Hypertens* 2008; 21(6):639-643.
- (34) Smith KJ, Bleyer AJ, Little WC, Sane DC. The cardiovascular effects of erythropoietin. *Cardiovasc Res* 2003; 59(3):538-548.
- (35) Li JS, Turgeon A, Schiffrin EL. Effect of chronic treatment with two different ET(A) selective endothelin receptor antagonists on blood pressure and small artery structure of deoxycorticosterone acetate (DOCA)-salt hypertensive rats. *Am J Hypertens* 1998; 11(5):554-562.
- (36) Virdis A, Schiffrin EL. Vascular inflammation: a role in vascular disease in hypertension? *Curr Opin Nephrol Hypertens* 2003; 12(2):181-187.
- (37) Amiri F, Paradis P, Reudelhuber TL, Schiffrin EL. Vascular inflammation in absence of blood pressure elevation in transgenic murine model overexpressing endothelin-1 in endothelial cells. *J Hypertens* 2008; 26(6):1102-1109.
- (38) Virdis A, Schiffrin EL. Vascular inflammation: a role in vascular disease in hypertension? *Curr Opin Nephrol Hypertens* 2003; 12(2):181-187.
- (39) Viel EC, Lemarie CA, Benkirane K, Paradis P, Schiffrin EL. Immune regulation and vascular inflammation in genetic hypertension. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2010; 298(3):H938-H944.
- (40) Barhoumi T, Kasal DA, Li MW, Shbat L, Laurant P, Neves MF, Paradis P, Schiffrin EL. T regulatory lymphocytes prevent angiotensin II-induced hypertension and vascular injury. *Hypertension* 2011; 57(3):469-476.
- (41) Touyz RM. Molecular and cellular mechanisms in vascular injury in hypertension: role of angiotensin II. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 2005; 14(2):125-131.
- (42) Kuru O, Senturk UK, Demir N, Yesilkaya A, Erguler G, Erkilic M. Effect of exercise on blood pressure in rats with chronic NOS inhibition. *Eur J Appl Physiol* 2002; 87(2):134-140.
- (43) Yen MH, Yang JH, Sheu JR, Lee YM, Ding YA. Chronic exercise enhances endothelium-mediated dilation in spontaneously hypertensive rats. *Life Sci* 1995; 57(24):2205-2213.
- (44) Tipton CM. Exercise, training and hypertension: an update. *Exerc Sport Sci Rev*

- 1991; 19:447-505.
- (45) Fregly MJ. Effect of an exercise regimen on development of hypertension in rats. *J Appl Physiol* 1984; 56(2):381-387.
 - (46) Marcus KD, Tipton CM. Exercise training and its effects with renal hypertensive rats. *J Appl Physiol* 1985; 59(5):1410-1415.
 - (47) Kuru O, Senturk UK, Kocer G, Ozdem S, Baskurt OK, Cetin A, Yesilkaya A, Gunduz F. Effect of exercise training on resistance arteries in rats with chronic NOS inhibition. *J Appl Physiol* 2009; 107(3):896-902.

4. Discussion et conclusion

Notre étude a montré pour la première fois que le traitement à l'r-HuEPO, lorsqu'il est associé à une sur-expression de l'ET-1, augmente la pression artérielle systolique (PAS), exacerbe la dysfonction endothéliale et le remodelage vasculaire des artères de résistance, augmente la concentration plasmatique d'ET-1, augmente le stress oxydatif (l'activité de la NADPH oxydase et la production des anions superoxydes) et l'inflammation (augmentation de l'infiltration des monocytes et des macrophages aortiques) et augmentation les taux des cytokines pro-inflammatoire $\text{INF-}\gamma$, $\text{TNF-}\alpha$ et IL-6). L'exercice d'endurance prévient ces effets délétères. Ceci confirme notre hypothèse: l'r-HuEPO entraîne une augmentation de la pression artérielle chez les souris transgéniques sur-exprimant l'ET-1, suggérant ainsi que l'état hypertensif associé à un traitement à l' r-HuEPO est lié à une anomalie de la production d'ET-1 d'origine vasculaire. L'exercice est capable de prévenir les altérations cardiovasculaires induites par l'association r-HuEPO/ET-1.

Ces résultats confirment ceux d'autres travaux, qui ont montré que l'effet délétère de l'r-HuEPO apparaît dans les modèles qui présentent une dysfonction endothéliale altérée avec une inhibition de la biosynthèse de NO et une exagération du système des ET-1 (Meziri et al. 2011; Quaschnig et al. 2003; Ruschitzka et al. 2000; Vogel et al. 2003b). Par contre, en présence de NO ou d'une sur-expression des récepteurs ETB de l'ET-1 (Meziri et al. 2011; Rodrigue et al. 2008), l'effet délétère (HTAn, vasoconstriction périphérique) de l'r-HuEPO n'apparaît pas.

Dans notre étude, l'HTA et les dommages vasculaires, provoqués par l'r-HuEPO chez la souris sur-exprimant l'ET-1, sont associés à une stimulation du stress oxydatif, un processus inflammatoire vasculaire caractérisé par l'infiltration de macrophages et de lymphocytes. Ils sont également associés à une augmentation de l'activité de la NADPH oxydase, et une élévation de la concentration plasmatique en ET-1. Il est reconnu que l'ET-1 est pro-inflammatoire et pro-oxydant (Schiffrin 2005). De plus, en présence d'une

dysfonction endothéliale, l'r-HuEPO semble exercer un effet permissif sur l'activité de l'ET-1 (Lariviere and Lebel 2003). L'infiltration des macrophages et des lymphocytes T dans l'adventice et le tissu péri-vasculaire contribue probablement, avec l'augmentation de l'activité de la NADPH oxydase, à la production des ROS. Les ROS et les anions superoxydes réagissent avec le NO, pour en abaisser sa biodisponibilité et contribuer à la dysfonction endothéliale (Touyz 2005).

Dans notre étude, l'effet de l'exercice régulier de nage confirme les résultats d'autres études qui ont montré les effets bénéfiques de l'exercice, à intensité faible ou moyenne, sur la pression artérielle et les désordres vasculaires associés. Il s'agit du maintien de la fonction endothéliale, l'augmentation de la production et de la biodisponibilité du NO, l'augmentation de l'activité et de l'expression de eNOS, l'amélioration de la vasodilatation NO-dépendante en réponse à l'acétylcholine et au flux, la diminution de la rigidité artérielle et de la résistance vasculaire périphérique, la diminution de l'expression de la NADPH oxydase vasculaire et l'amélioration de la voie Akt/eNOS phosphorylée, pour ne citer que ces effets (Adams et al. 2005; Kuru et al. 2002; Kuru et al. 2009; Meziri et al. 2011; Sonnenschein et al. 2011; Tipton et al. 1991; Touati et al. 2011)

En plus de son effet bénéfique sur la fonction endothéliale et le stress oxydatif, l'exercice diminue l'infiltration rénale et aortique des macrophages et augmente celle des cellules T régulatrices (Foxp3) dans le rein des souris eET-1 traitées avec l'r-HuEPO, parallèlement à une élévation de leur pourcentage dans la rate. Ceci montre que les cellules Treg pourraient contribuer aux effets bénéfiques de l'exercice sur la pression artérielle et les désordres vasculaires induits par le traitement à l'r-HuEPO. Ces résultats confirment également ceux qui suggèrent, d'une part, que le système immunitaire joue un rôle essentiel dans la pathogenèse de l'HTA et des maladies cardiovasculaire (Ait-Oufella et al. 2006; Galkina et al. 2007; Taleb et al. 2008; Valaperti et al. 2008) et d'autre part que les lymphocytes T influencent la pression artérielle (Guzik et al. 2007). Il a été

démontré aussi que les Treg sont impliqués dans l'athérosclérose (Ait-Oufella et al. 2006).

Plusieurs études ont montré que l'exercice physique exerce des effets anti-inflammatoires et entraîne des modifications considérables sur le système immunitaire (MacNeil et Hoffman-Goetz 1993; Nieman et al. 1993; Pedersen et Hoffman-Goetz 2000; Pedersen et al. 1989). Nous suggérons que l'exercice, via l'inhibition de l'infiltration des macrophages et la stimulation de celle des Treg, contribue probablement à protéger le système artériel contre les désordres vasculaires à l'origine de l'HTA et de l'athérombogénèse induits par l'r-HuEPO.

En résumé, l'r-HuEPO, associée à la sur-expression de la preproendotheline-1 des cellules endothéliales, provoque une augmentation de la concentration plasmatique de l'ET-1, une élévation du taux des cytokines inflammatoires INF- γ et d'IL-6, une altération de la dysfonction endothéliale et du remodelage vasculaire, sans occulter une exagération de la production des ROS et qui contribuent tous, à l'élévation de la pression artérielle. À notre connaissance, la présente étude fournit la première étude *in vivo* qui fait la démonstration que la sur-expression de l'ET-1, associée au traitement à l'r-HuEPO, provoque une dysfonction endothéliale accrue, un remodelage vasculaire des artères de résistance et contribue à l'élévation de la pression artérielle. Par ailleurs, il est clairement démontré que l'exercice empêche ces effets grâce à des propriétés anti-inflammatoires, anti-oxydantes et probablement par un effet immunitaire, en l'occurrence par l'augmentation des cellules Treg, qui pourrait être l'un des principaux facteurs à l'origine des effets bénéfiques de l'exercice.

- Étude 3 -HTA ET SRAA:
IMPLICATION DE L'INFLAMMATION ET DU
SYSTÈME IMMUNITAIRE (RÔLE DES
CELLULES T RÉGULATRICES)

I. Les lymphocytes T régulatrices empêchent l'hypertension et les lésions vasculaires induites par l'angiotensine II

T regulatory lymphocytes prevent angiotensin II-induced hypertension and vascular injury

Tlili Barhoumi, Daniel A. Kasal, Melissa W. Li, Layla Shbat, Pascal Laurant, Mario F. Neves, Pierre Paradis and Ernesto L. Schiffrin

Publication acceptée dans *Hypertension* (IF 2010: 6.1)

1. But de l'étude

Dans l'étude précédente nous avons observé que l'effet bénéfique de l'exercice sur l'HTA et les désordres vasculaires associés (comme l'inflammation) étaient associés à une élévation de l'infiltration des Treg. Les Treg sont une lignée de cellules immunitaires dont on commence à comprendre le rôle dans l'étiologie des maladies cardiovasculaires et l'HTA (Schiffrin 2010). Notre but, dans la présente étude, était d'étudier les effets d'un transfert adoptif des Treg sur la pression artérielle et l'altération vasculaire, sur un modèle expérimental d'HTA secondaire : la souris traitée à l'Ang II.

Nous supposons que l'amélioration des Treg, cellules qui modulent les phénomènes de suppression immunitaire, prévient les effets délétères de l'Angi II. Le transfert adoptif des Treg (CD4+CD25+) prévient l'augmentation de la pression artérielle, la dysfonction endothéliale, le remodelage vasculaire, le stress oxydatif et l'inflammation chez des souris traitées par l'Ang II.

2. Méthode

2.1 Animaux

Des souris mâles C57BL/6 (âgés de 10 à 12 semaines) ont reçu, par voie intraveineuse, trois fois toutes les deux semaines, du PBS, 3×10^5 cellules Treg (CD4+CD25+) ou 3×10^5 cellules T effectrices (Teff) (CD4+CD25-). Puis, ont été infusées avec l'Ang II (1 ug/kg/min, sc) pendant 14 jours, en utilisant des mini-pompes osmotiques. Quant aux souris contrôle, il leur était également administré (injections) du PBS par voie intraveineuse.

La pression artérielle systolique a été mesurée pendant la période de perfusion avec l'Ang II, par radiotélémétrie et par la méthode de *tail-cuff* (3 fois par semaine) dans un groupe séparé. Après 2 semaines de traitement, les souris ont été sacrifiées sous anesthésie à l'isoflurane.

2.2 Isolation et transfert adoptif des cellules Treg et des Teff

Les lymphocytes T ont été isolés à partir de 3 rates de souris C57BL/6, suite à deux étapes de sélection:

- 1- sélection négative pour avoir des cellules T CD4 +
- 2- sélection positive pour avoir des cellules T CD25 +

L'isolation est réalisée en utilisant des billes magnétiques et la pureté des cellules a été vérifiée par cytométrie du flux (*Fluorescence-activated cell sorting* FACS).

2.3 Évaluation de la fonction endothéliale

La fonction endothéliale est déterminée sur des artères mésentériques de deuxième ordre (150-250 μm de diamètre), en utilisant la méthode du myographe pressurisé.

3 Résultats principaux

3.1 Le transfert adoptif des cellules T régulatrices prévient l'HTA induite par l'Ang II.

L'Ang II induit une augmentation de la pression artérielle systolique, cet effet est prévenu par le transfert adoptif des Treg, mais pas des Teff.

3.2 Le transfert adoptif des Treg prévient l'altération de la vasodilatation endothélium-dépendante induite par l'Ang II

Le traitement avec l'Ang II entraîne une altération de la vasodilatation en réponse à l'acétylcholine. Celle-ci a été inhibée par le transfert adoptif des Treg et légèrement réduite par les cellules Teff.

3.3 Le transfert adoptif des Treg prévient la rigidité des artères mésentériques induite par l'Ang II

3.4 Le transfert adoptif des Treg diminue le stress oxydatif induit par l'Ang II

L'Ang II augmente l'activité de la NADPH oxydase dans l'aorte et le cœur. Le transfert adoptif des Treg, mais pas celui des Teff, prévient cet effet.

3.5 Le transfert adoptif des Treg diminue les réponses immunitaires induites par l'Ang II

L'Ang II augmente les taux plasmatiques des cytokines pro-inflammatoires (INF- γ , TNF- α et d'IL-6) ainsi que l'infiltration aortique et rénale des macrophages. Ce taux diminue par le transfert adoptif des Treg. Aucun changement n'a été observé par le transfert des Teff.

Hypertension

JOURNAL OF THE AMERICAN HEART ASSOCIATION

American Heart
Association® 
Learn and Live™

T Regulatory Lymphocytes Prevent Angiotensin II Induced Hypertension and Vascular Injury

Tlili Barhoumi, Daniel A. Kasal, Melissa W. Li, Layla Shbat, Pascal Laurant, Mario F. Neves, Pierre Paradis and Ernesto L. Schiffrin

Hypertension 2011;57:469-476; originally published online Jan 24, 2011;

DOI: 10.1161/HYPERTENSIONAHA.110.162941

Hypertension is published by the American Heart Association, 7272 Greenville Avenue, Dallas, TX 75214

Copyright © 2011 American Heart Association. All rights reserved. Print ISSN: 0194-911X. Online ISSN: 1524-4563

The online version of this article, along with updated information and services, is located on the World Wide Web at:

<http://hyper.ahajournals.org/cgi/content/full/57/3/469>

Data Supplement (unedited) at:

<http://hyper.ahajournals.org/cgi/content/full/HYPERTENSIONAHA.110.162941/DC1>

Subscriptions: Information about subscribing to Hypertension is online at
<http://hyper.ahajournals.org/subscriptions/>

Permissions: Permissions & Rights Desk, Lippincott Williams & Wilkins, a division of Wolters Kluwer Health, 351 West Camden Street, Baltimore, MD 21202-2436. Phone: 410-528-4050. Fax: 410-528-8550. E-mail:
journalpermissions@lww.com

Reprints: Information about reprints can be found online at
<http://www.lww.com/reprints>

T Regulatory Lymphocytes Prevent Angiotensin II–Induced Hypertension and Vascular Injury

Tlili Barhoumi, Daniel A. Kasal, Melissa W. Li, Layla Shbat, Pascal Laurant, Mario F. Neves, Pierre Paradis, Ernesto L. Schiffrin

Abstract—Angiotensin (Ang) II induces hypertension by mechanisms mediated in part by adaptive immunity and T effector lymphocytes. T regulatory lymphocytes (Tregs) suppress T effector lymphocytes. We questioned whether Treg adoptive transfer would blunt Ang II–induced hypertension and vascular injury. Ten- to 12-week-old male C57BL/6 mice were injected IV with 3×10^5 Treg ($CD4^+CD25^+$) or T effector ($CD4^+CD25^-$) cells, 3 times at 2-week intervals, and then infused or not with Ang II ($1 \mu\text{g/kg}$ per minute, SC) for 14 days. Ang II increased systolic blood pressure by 43 mm Hg ($P < 0.05$), NADPH oxidase activity 1.5-fold in aorta and 1.8-fold in the heart ($P < 0.05$), impaired acetylcholine vasodilatory responses by 70% compared with control ($P < 0.05$), and increased vascular stiffness ($P < 0.001$), mesenteric artery vascular cell adhesion molecule expression (2-fold; $P < 0.05$), and aortic macrophage and T-cell infiltration ($P < 0.001$). All of the above were prevented by Treg but not T effector adoptive transfer. Ang II caused a 43% decrease in Foxp3⁺ cells in the renal cortex, whereas Treg adoptive transfer increased Foxp3⁺ cells 2-fold compared with control. Thus, Tregs suppress Ang II–mediated vascular injury in part through anti-inflammatory actions. Immune mechanisms modulate Ang II–induced blood pressure elevation, vascular oxidative stress, inflammation, and endothelial dysfunction. (*Hypertension*. 2011;57:469–476.) • **Online Data Supplement**

Key Words: adaptive immunity ■ inflammation ■ cytokines ■ blood pressure ■ vascular remodeling ■ endothelial dysfunction

Angiotensin (Ang) II plays a role in the development of hypertension in part through vasoconstriction and increased peripheral vascular resistance, endothelial dysfunction, structural vascular remodeling, and low-grade inflammation.¹ Ang II plays a key role in inflammation, through oxidative stress and production of adhesion molecules and cytokines.^{2,3} Innate and adaptive immunity are involved in Ang II–induced hypertension and end-organ damage,^{2–6} as first suggested by Shao et al,⁷ who demonstrated that Ang II infusion in rats caused recruitment of T cells in the kidney, an effect prevented by Ang II type 1 receptor (AT₁R) blockers. Guzik et al⁸ showed that Ang II–induced increase in blood pressure (BP), endothelial dysfunction, vascular remodeling, and superoxide production were reduced in *rag-1*^{−/−} mice deficient in T and B cells and could be restored by adoptive transfer of T but not B cells.

Mouse T and B cells and macrophages isolated from the spleen express AT₁R and, in vitro, Ang II regulates the proliferation of wild-type but not AT₁R-deficient (*agtlar*^{−/−}) splenic lymphocytes.⁹ Angiotensinogen, Ang I, and Ang II induced proliferation of human T and natural killer cells,¹⁰ suggesting a functional renin-Ang system in these cells. These cells express renin, renin receptors, angiotensinogen, Ang-

converting enzyme, AT₁R, and Ang II type 2 receptor. Similarly, mouse T lymphocytes express a local renin-Ang system regulating T-cell activation, expression of tissue homing markers, and production of tumor necrosis factor (TNF) α .¹¹

A subset of T lymphocytes, regulatory T lymphocytes (Tregs), suppresses innate and adaptive immune responses,¹² including proinflammatory effects of other lymphocytes, macrophages, dendritic cells, and neutrophils. They express CD4, interleukin (IL) 2 receptor α -subunit (CD25), and the transcription factor X-linked forkhead/winged helix (Foxp3).¹³ Deficiency in Treg is associated with autoimmune diseases in humans and mice.¹⁴ Treg lymphocytes of patients with type 1 diabetes mellitus had reduced capacity to suppress T-cell proliferation in vitro.¹⁵ The number and suppressor function of Treg were decreased in apolipoprotein E knockout (*apoE*^{−/−}) mice,¹⁶ and Treg adoptive transfer attenuated development of atherosclerosis in these mice. Recently, we showed chromosome 2–dependent modulation of immune responses in genetic hypertension via Treg lymphocytes.¹⁷ In the Dahl salt-sensitive (SS) rats, vascular inflammation and BP elevation were associated with dysfunction of Treg suppressor effects. Consomic SSBN2 rats, which have the SS rat genome and chromosome 2 from

Received September 15, 2010; first decision October 3, 2010; revision accepted December 29, 2010.

From the Lady Davis Institute for Medical Research (T.B., D.A.K., M.W.L., L.S., P.P., E.L.S.), Sir Mortimer B. Davis-Jewish General Hospital, McGill University, Montreal, Quebec, Canada; Université d'Avignon et des Pays de Vaucluse (T.B., P.L.), Avignon, France; State University of Rio de Janeiro (D.A.K., M.F.N.), Rio de Janeiro, Brazil.

T.B. and D.A.K. contributed equally to this work.

Correspondence to Ernesto L. Schiffrin, Department of Medicine, Sir Mortimer B. Davis-Jewish General Hospital, #B-127, 3755 Cote-Ste-Catherine Rd, Montreal, Quebec, Canada H3T 1E2. E-mail: ernesto.schiffrin@mcgill.ca

© 2011 American Heart Association, Inc.

Hypertension is available at <http://hyper.ahajournals.org>

DOI: 10.1161/HYPERTENSIONAHA.110.162941

Downloaded from hyper.ahajournals.org at McGill University on February 20, 2011

normotensive Brown Norway rats, had improved Treg function and decreased hypertension and vascular and systemic inflammatory mediators compared with SS rats. Furthermore, adoptive transfer of Treg prevented Ang II-induced cardiac hypertrophy and fibrosis, TNF- α expression, immune cell infiltration, and electric remodeling of the heart independent of BP-lowering effects.¹⁸ To test the hypothesis that enhancing Treg-mediated immune suppression will blunt Ang II-induced hypertension and vascular injury, we determined whether Treg adoptive transfer prevents Ang II-induced hypertension, endothelial dysfunction, vascular remodeling, oxidative stress, and inflammation in mice.

Methods

Animals

The study was approved by the Animal Care Committee of the Lady Davis Institute and McGill University, and followed recommendations of the Canadian Council of Animal Care. Treg adoptive transfer was performed as described previously with minor modifications.¹⁸ Ten- to 12-week-old male C57BL/6 mice (Harlan Laboratories, Indianapolis, IN) were injected IV via the tail vein 3 times, at 2-week intervals, with PBS, 3×10^5 CD4⁺CD25⁺ (Treg) or CD4⁺CD25⁻ cells (comparator T effector [Teff]), and then infused with Ang II (1 μ g/kg per minute, SC) for 14 days using ALZET osmotic minipumps (Durect). Control mice were similarly injected IV with vehicle (PBS). Systolic BP (SBP) was measured during Ang II infusion 3 times per week by the tail-cuff method using a MC4000 BP analysis system (Hatteras Instruments). After 2 weeks of treatment, mice were killed under anesthesia with isoflurane. BP was also determined by telemetry in a separate group of mice. Ten-week-old male mice were anesthetized with isoflurane, surgically instrumented with PA-C10 radiotelemetry transmitters as recommended by the manufacturer (Data Sciences International), allowed to recover for 7 days, and treated as described above, and then BP was determined every 5 minutes for 10 seconds for 2 consecutive days. Thereafter, mice were infused or not with Ang II for 14 days, and BP was determined throughout this period.

Isolation and Adoptive Transfer of Treg and CD4⁺CD25⁻ Cells

T lymphocytes were isolated from 3 spleens of 10- to 12-week-old male C57BL/6 mice through CD4⁺ T-cell-negative selection followed by CD25⁺ T-cell-positive selection of splenocytes as per the manufacturer's instructions using the EasySep Mouse CD4⁺ T Cell Pre-Enrichment and CD25 Positive Selection Kits (Stem Cell Technologies). Purity of Treg cells was verified by flow cytometry by first blocking with Fc-Block (BD Biosciences) for 30 minutes at 4°C, followed by staining with anti-CD4 APC-conjugated (RM4-5) and anti-CD25 PE-conjugated (3C7) antibodies (BD Biosciences) for 1 hour at 4°C. Cells were washed, resuspended, and analyzed using FACSCalibur flow cytometer (BD Bioscience) and FCS Express V3 software (De Novo Software). To perform adoptive transfer, mice were placed under a heat lamp to increase blood flow to the tail vein and then transferred to a holding device (AIMS restrainer). The lateral tail veins were identified and 100 μ L of PBS or 3×10^5 cells injected using a 0.5-mL syringe with a 26-gauge needle.

Endothelial Function and Vessel Mechanics

Second-order branches of mesenteric arteries (ID 150 to 250 μ m) were dissected and mounted on a pressurized myograph, and endothelial function and vessel mechanics were determined as described previously.²⁰ Details of the protocol are presented in the online Data Supplement (please see <http://hyper.ahajournals.org>). NADPH oxidase activity and generation of reactive oxygen species, plasma cytokine measurement, Western blot analysis, and immunofluorescent detection of macrophages and lymphocytes are presented in the online Data Supplement as well.

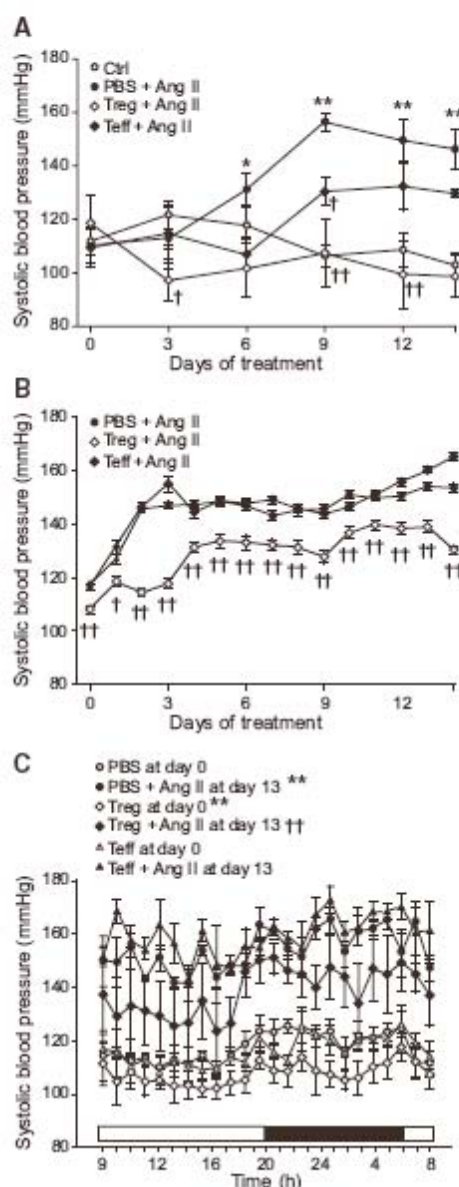


Figure 1. Treg adoptive transfer prevented Ang II-induced hypertension. SBP assessed by the tail-cuff technique (A) was determined in control mice (Ctrl) and in mice infused with Ang II and pretreated with PBS, Treg, or Teff (CD4⁺CD25⁻) cells. SBP was also determined by telemetry (B and C). B, Mean 24-hour SBP data are presented. C, Mean hourly SBP data of day 0 and 13 are shown. Daytime and nighttime are highlighted by open and close horizontal bars. Data are presented as mean $\pm$ SEM; * P < 0.05 and ** P < 0.001 vs Ctrl or PBS at day 0 and † P < 0.05 and †† P < 0.001 vs PBS + Ang II or PBS + Ang II at day 13 with n = 5 for A and n = 24 data points per day for each of 3 to 4 mice for B.

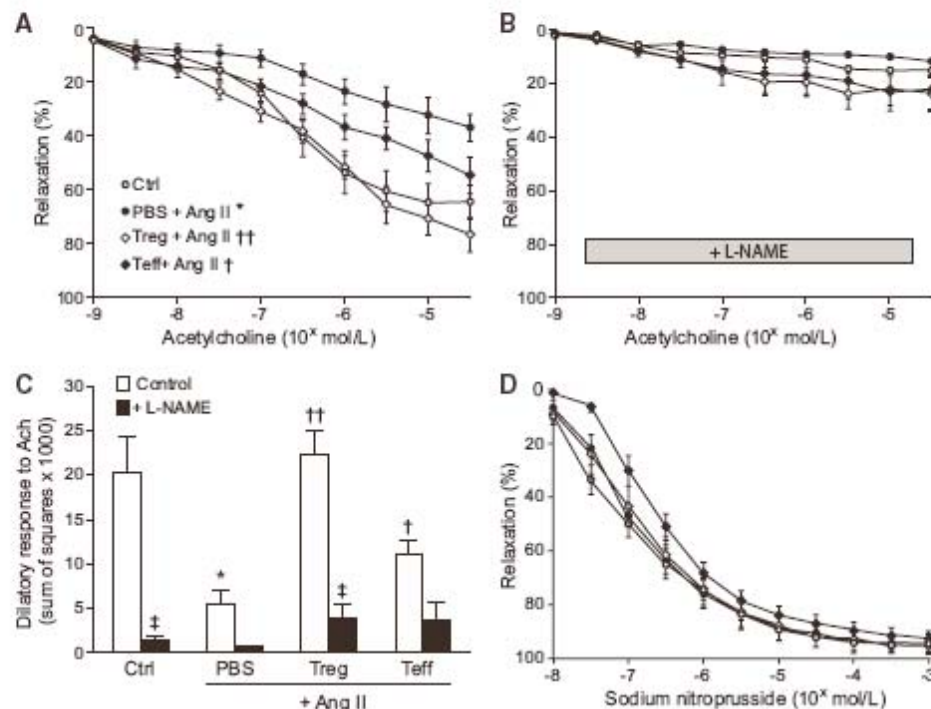


Figure 2. Treg adoptive transfer prevented Ang II-induced impairment of vasodilatory responses to acetylcholine. Responses to acetylcholine without (A) or with L-NAME (B) and sodium nitroprusside (D) were determined in the same groups as in Figure 1. The sum of squares of vasodilatory acetylcholine responses without (A) or with (B) L-NAME and statistical results are presented in C. * $P < 0.001$ vs Ctrl; † $P < 0.05$ and †† $P < 0.001$ vs PBS+Ang II; and ‡ $P < 0.001$ vs L-NAME with $n = 6$ to 10.

Data Analysis

Results are presented as mean $\pm$ SEM. Comparisons between multiple groups were done by 1-way ANOVA. Comparison of SBP was by 2-way ANOVA for repeated measurements. Acetylcholine response curves and stress/strain relationships were compared by 2-way ANOVA on the sum of squares from each curve. For plasma cytokines, control and Treg+Ang II groups were jointly considered as controls. Aortic and renal cortex Foxp3 and monocyte/macrophage specific antigen-2 (MOMA-2) immunofluorescence were compared using Kruskal-Wallis 1-way ANOVA. ANOVA was followed in all of the cases by Student-Newman-Keuls or Bonferroni post hoc tests. $P < 0.05$ was considered statistically significant.

Results

Adoptive Transfer of Treg Prevents Ang II-Induced Hypertension

Mice were treated with 3 adoptive transfers of Treg at 2-week intervals, starting 4 weeks before infusion of Ang II. Cell purity determined by flow cytometry indicated that Treg and Teff preparations contained $81.1 \pm 2.5\%$ and $5.5 \pm 1.2\%$ of CD4⁺CD25⁺ cells, respectively. To test the specificity of Treg effects, a group of mice received 3 adoptive transfers of Teff.

Ang II induced a progressive increase of SBP (Figure 1A), which was prevented by adoptive transfer of Treg but not Teff. Results with the tail-cuff technique were confirmed by telemetry (Figure 1B and 1C). Body weight and heart

weight:tibia length ratio were not affected by any treatment (data not shown).

Adoptive Transfer of Treg Prevents Ang II-Induced Impairment of Mesenteric Artery Endothelium-Dependent Relaxation

Ang II treatment impaired the vasodilatory response of mesenteric arteries to acetylcholine, and this was prevented by adoptive transfer of Treg and slightly reduced by Teff (Figure 2A and 2C). Vasodilatory responses to acetylcholine were abrogated by the NO synthase inhibitor *N*^G-nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME) in control and Treg+Ang II groups, but no significant change was noted in the PBS+Ang II and Teff+Ang II groups (Figure 2B and 2C), indicating that endothelial NO synthase-dependent vasodilatory responses were impaired by Ang II and that this was not corrected by Teff transfer. Vasodilation with sodium nitroprusside was similar in all of the groups (Figure 2D).

Adoptive Transfer of Treg Prevents Ang II-Induced Mesenteric Artery Stiffness

No significant changes in media:lumen ratio or media cross-sectional area of resistance mesenteric arteries were observed (Table S1, available in the online Data Supplement). However, Ang II infusion resulted in displacement to the left of stress/

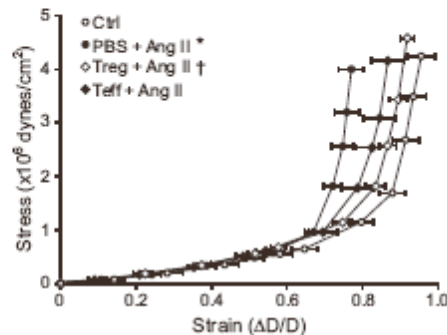


Figure 3. Treg adoptive transfer prevented Ang II-induced increase in small mesenteric artery stiffness. Stress/strain relationship was determined in the same groups as in Figure 1. $n=6$ to 8. * $P<0.01$ vs Ctrl; † $P<0.05$ vs PBS+Ang II for strain measured at 140 mm Hg.

strain curves of Ang II-infused mice, indicating increased stiffness compared with arteries from control mice (Figure 3 and Table S1), effect abolished by administration of Treg but not Teff.

Adoptive Transfer of Treg Prevents Ang II-Induced Oxidative Stress

Ang II infusion increased NADPH oxidase activity in both the aorta and the heart (Figure 4A and 4B). Adoptive transfer of Treg but not Teff prevented this effect. Ang II infusion increased superoxide-induced dihydroethidium fluorescence in the aorta, which was abrogated by adoptive transfer of Treg but not Teff (Figure 4C).

Adoptive Transfer of Treg Prevents Ang II-Induced Immune Response

Plasma levels of the proinflammatory cytokines interferon (IFN)- γ , TNF- α , and IL-6 were increased by Ang II, which was prevented by Treg adoptive transfer but unaffected by Teff transfer (Figure 5). Plasma levels of the anti-inflammatory cytokine IL-10 were significantly increased by Ang II treatment and prevented by Treg transfer but not affected by Teff (Figure 5). Ang II treatment increased the levels of vascular cell adhesion molecule 1 in mesenteric arteries, which was prevented by adoptive transfer of Treg but not Teff (Figure 6A). Monocyte/macrophage-specific antigen MOMA-2 immunostaining was increased in aortic adventitia and periaortic fat by Ang II in mice treated with vehicle or Teff, whereas no change was observed in mice that received Treg (Figure 6B). In addition, Ang II treatment increased T-cell infiltration in the aortic adventitia and periaortic fat, an effect prevented by Treg but not by Teff (Figure 6C).

Renal Cortex, Site of Treg Action?

Expression of Foxp3, a marker of Treg, was examined by immunofluorescence in aorta. A very low number of Foxp3⁺ cells was detected in aorta of control mice (Figure 7A). Neither Ang II nor Treg or Teff transfer altered the number of Foxp3⁺ cells in aorta. Expression of Foxp3 was examined in the renal cortex because kidneys play a key role in BP

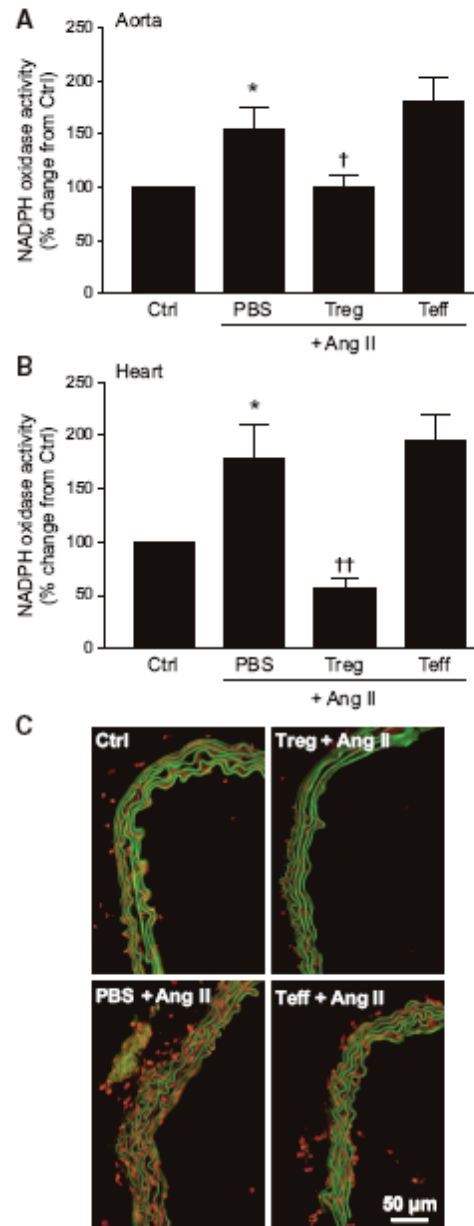


Figure 4. Ang II-induced oxidative stress was prevented by Treg adoptive transfer. NADPH oxidase activity in aorta (A) and heart (B) and dihydroethidium staining revealing superoxide generation (C) were determined in the same groups as in Figure 1. * $P<0.05$ vs Ctrl; † $P<0.05$ and †† $P<0.01$ vs PBS+Ang II. $n=6$ to 7.

regulation. A significant number of Foxp3⁺ cells was detected in the renal cortex of control mice (Figure 7B). Ang II caused a 43% decrease in Foxp3⁺ cells in the renal cortex compared with control mice. Adoptive transfer of Treg

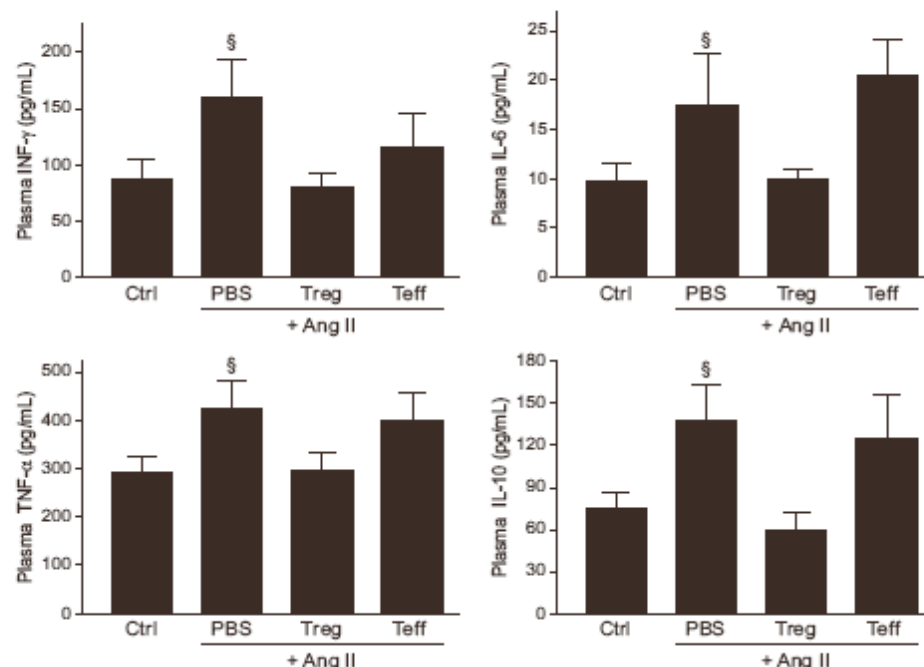


Figure 5. Ang II-induced elevation in plasma cytokine levels was prevented by Treg adoptive transfer. The levels of IFN- γ , TNF- α , IL-6, and IL-10 were determined in the same groups as in Figure 1. $^{\S}P < 0.05$ vs Ctrl and Treg+Ang II. $n = 5$ to 10.

increased Foxp3⁺ cells 2-fold in the renal cortex compared with control mice. Teff transfer induced a 42% decrease in Foxp3⁺ cells in the renal cortex compared with Ang II-treated mice. Ang II-induced decrease in Foxp3⁺ cells was associated with a 9-fold increase in monocyte/macrophages in the renal cortex as revealed by MOMA-2 staining (Figure 7C). Treg transfer did not reduce MOMA-2 staining. However, Teff adoptive transfer increased monocyte/macrophage infiltration in the renal cortex 1.6-fold further.

Discussion

Multiple lines of evidence link cardiovascular disease, including hypertension, with a chronic low-grade inflammatory state. More recently, innate and adaptive immunity have been identified as playing a role in cardiovascular disease and hypertension.^{4–6} The findings of the present study support and extend this concept by demonstrating that Tregs are involved in the pathophysiology of Ang II-induced BP elevation and vascular injury.

The observation that Treg adoptive transfer prevented Ang II-induced hypertension, vascular damage, and immune cell infiltration complements and extends the understanding of a role of T effector lymphocytes in hypertension provided by the study of Ang II effects in *rag-1*^{−/−} mice lacking T and B cells⁸ and that Treg adoptive transfer prevents cardiac hypertrophy, inflammation, and electric remodeling induced by Ang II.¹⁸ Tregs have been characterized as potent suppressors of T-helper lymphocytes, but molecular mechanisms through

which they exert their suppressive effects remain unknown.²¹ The suppressive action of Treg is also exerted on other cells, such as activated monocytes and macrophages.¹² Accordingly, the results of the present study suggest that not only adaptive but also innate immune responses were prevented by adoptive transfer of Tregs, because macrophage infiltration was decreased in adventitia and periaortic fat. It is noteworthy that we observed previously that Ang II-induced hypertension and vascular damage were blunted in *mcsf*^{OP/op} mice deficient in macrophages and innate immunity.²²

Ang II-induced hypertension and vascular damage are mediated at least partly through production of oxidative stress by macrophages and T lymphocytes. Both cell types express AT₁R and NADPH oxidase.^{9,11,23,24} Guzik et al⁸ demonstrated that adoptive transfer of T cells deficient in AT₁R (*at1ar*^{−/−}) or lacking a functional NADPH oxidase (T cells from *p47^{phox}*^{−/−} mice) into *rag-1*^{−/−} mice impaired the ability of Ang II to induce BP elevation and vascular damage. Decreased oxidative stress in vascular tissues of mice receiving Treg was associated with suppression of both macrophages and T lymphocytes, both of which could have contributed to Ang II-induced oxidative stress. Whether reactive oxygen species produced by macrophages and T lymphocytes infiltrating the adventitia and periaortic fat are able to reach and react with endothelium-derived NO, contributing to endothelial dysfunction,²⁵ remains to be determined.

Increased arterial stiffness is part of Ang II-induced vascular damage in both rodents²⁶ and humans²⁷ and is

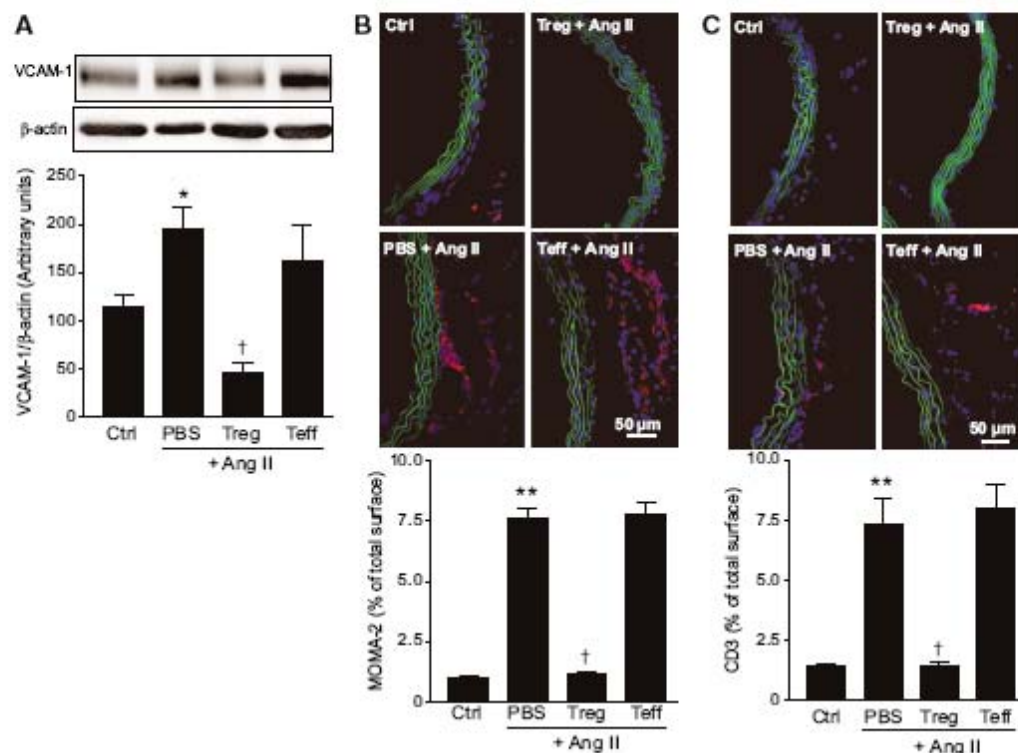


Figure 6. Ang II-induced inflammation and immune cell infiltration were prevented by Treg adoptive transfer. Mesenteric artery vascular cell adhesion molecule 1 protein level determined by Western blot (A, $n=5-10$), and monocyte/macrophage (B, Red fluorescence, $n=3-5$) and T-lymphocyte (C, Red fluorescence, $n=3-4$) infiltration in the aorta by immunofluorescence are from the same groups as in Figure 1. Elastin autofluorescence and nuclear stain 4',6-diamidino-2-phenylindole are shown in green and blue, respectively. * $P<0.05$ and ** $P<0.001$ vs Ctrl and † $P<0.001$ vs PBS+Ang II.

associated with low-grade inflammation.²⁸ Here we show that a strategy modulating immune homeostasis interferes with Ang II-induced vascular stiffness that contributes to the pathophysiology of hypertension.

Kvakan et al¹⁸ demonstrated that transfer of Treg interfered with Ang II-induced inflammatory and immune responses and ameliorated cardiac hypertrophy and fibrosis, TNF- α expression, immune cell infiltration, and electric remodeling. However, Treg had no effect on Ang II-induced BP elevation. This discrepancy with our study may be explained by differences in Treg adoptive transfer protocol and mouse strain. Here, mice were injected IV 3 times, at 2-week intervals, with 3×10^5 Treg cells, and then infused with Ang II for 14 days, whereas, in the study of Kvakan et al,¹⁸ mice were injected IV only once with 2×10^5 Treg, 1 day after the beginning of the Ang II infusion. Repeated injection with 50% more Treg as in our study may be more effective. The preventive strategy used in the present study versus the "treatment" strategy in the study of Kvakan et al¹⁸ may also explain different effects on BP. Finally, Kvakan et al¹⁸ used NMRI mice, whereas we studied C57BL/6 mice. NMRI mice are prone to develop glomerulonephritis with aging (www.criver.com) and have 2 renin genes, whereas C57BL/6 mice

have 1 renin gene.²⁹ Other factors, including differences in handling of mice, differential feeding, and intestinal microbiota, may contribute to modulate the immune responses and their effects on the vasculature and BP to explain the different behavior of mice in 2 experimental settings.

We demonstrated previously that genetic background provides a framework linking the genome, inflammation, immunity, and a role of Treg in salt-sensitive hypertension.¹⁷ In consomic SSBN2 rats bearing a chromosome 2 from normotensive Brown-Norway rats on a Dahl SS genetic background, both BP and vascular inflammation were reduced, associated with enhanced Treg activity in the aortic wall, as demonstrated by increased expression of Foxp3 and the anti-inflammatory cytokines transforming growth factor β and IL-10. The present study extends this concept, showing that manipulation of the Treg pool can prevent Ang II-induced hypertension, inflammation, and immune response.

Ang II-induced hypertension, vascular damage, and immune cell infiltration were associated with increased plasma inflammatory cytokines IFN- γ , TNF- α , and IL-6. Somewhat surprisingly, IL-10 levels increased with Ang II infusion and decreased with Treg adoptive transfer but not with Teff transfer. In basal conditions the production of IL-10 may be sufficient to moderate

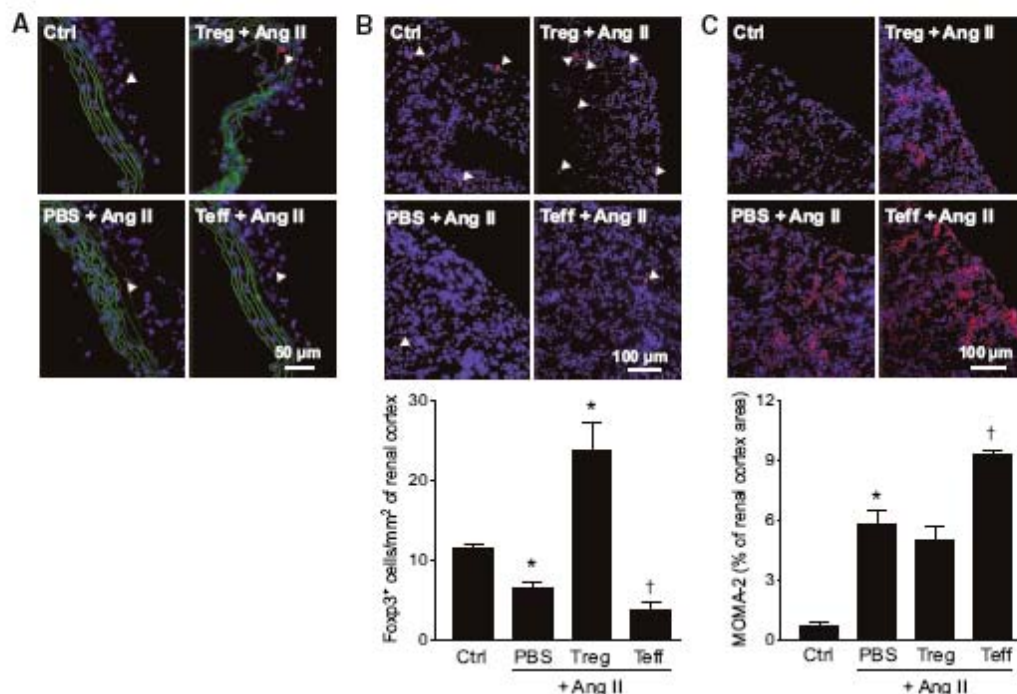


Figure 7. Treg infiltration in the aorta and renal cortex. Treg infiltration in the aorta (A, Red fluorescence) and renal cortex (B, Red fluorescence) and monocyte/macrophage infiltration in the renal cortex (C, Red fluorescence) were determined by immunofluorescence in the same groups as in Figure 1. Elastin autofluorescence (A) and nuclear staining with 4',6-diamidino-2-phenylindole (A through C) are shown in green and blue, respectively. Arrow heads point at Foxp3⁺ cells. * $P < 0.05$ vs Ctrl and † $P < 0.05$ vs PBS + Ang II with $n = 3$.

the expression of inflammatory cytokines. An increase in systemic IL-10 in association with enhanced levels of inflammatory cytokines has been observed in patients with heart failure after acute myocardial infarction²⁰ and in dilated cardiomyopathy.²¹ Interestingly, Treg adoptive transfer was associated with normalization of plasma levels of inflammatory cytokines and of IL-10, as well as the suppression of macrophage and T-lymphocyte infiltration. This may be interpreted as a result of feedback loops that modulate proinflammatory cytokines by increases in anti-inflammatory IL-10 acting in a counterregulatory fashion. This may apply to systemic levels of cytokines, because local levels may change in a different way, with enhanced IL-10 associated with increased Treg vascular infiltration as found in conomic SSB2 rats, compared with increased IFN- γ , TNF- α , and IL-6 with Teff infiltration in the vasculature in Dahl SS rats.¹⁷

The kidney plays a major role in long-term control of BP and in the development and maintenance of hypertension.²² Ang II-induced hypertension was associated with a decrease in Treg and an increase in monocyte/macrophages in the renal cortex. Treg adoptive transfer was accompanied by increased Treg in the renal cortex. Although this did not result in a significant decrease in monocyte/macrophage infiltration, this may have reduced inflammation, renal damage, and BP rise. The kidney may represent one of the sites of action of Treg that could play an important role in the regulation of inflammation-induced BP rise. It was not possible to detect changes in Treg in the aorta in

this study, which might be because of the technique used. Further experiments will be necessary to better understand the direct effects of Treg on the vasculature.

A limitation to the present study is the fact that mechanisms whereby Treg may improve vascular effects and BP in Ang II-infused mice were not completely elucidated. IL-10-mediated effects could play a role via anti-inflammatory actions, but this needs to be further investigated. Further studies, particularly in humans, will be necessary to establish that immune imbalance plays a role in hypertension in humans as in Ang II-dependent hypertension in mice. Finally, whether effects on endothelial function, oxidative stress, and plasma cytokines caused BP rise or are secondary to hypertension remains to be determined.

Perspectives

The present study demonstrates that anti-inflammatory Treg lymphocytes modulate Ang II-induced BP elevation, vascular oxidative stress, inflammation, and endothelial dysfunction, extending previous findings of other investigators on effects of Treg on Ang II effects on the heart. T-regulatory lymphocytes seem to be implicated in mechanisms that modulate the degree to which Ang II may induce hypertension, vascular injury, and an inflammatory response. Together with previous studies on T effector cells, particularly Th1 and Th17, and their role in BP elevation and vascular damage, this suggests that a ying/yang

relationship of Treg and Teff (Th1 and Th17) may modulate vascular responses in cardiovascular disease. These results underline the potential for immunomodulatory approaches to prevent Ang II-induced BP elevation, vascular oxidative stress, inflammation, and endothelial dysfunction.

Acknowledgments

We are grateful to André Turgeon and Véronique Michaud for excellent technical assistance.

Sources of Funding

This work was supported by Canadian Institutes of Health Research grants 82790 and 102606, a Canada Research Chair on Hypertension and Vascular Research from Canadian Institutes of Health Research/Government of Canada Program, and the Canada Fund for Innovation (all to E.L.S.).

Disclosures

None.

References

- Paradis P, Schiffrin EL. Renin-angiotensin-aldosterone system and pathobiology of hypertension. In: DeMello WC, Frohlich ED, eds. *Renin-Angiotensin System and Cardiovascular Disease*. 2009:35–57.
- Marchesi C, Paradis P, Schiffrin EL. Role of the renin-angiotensin system in vascular inflammation. *Trends Pharmacol Sci*. 2008;29:367–374.
- Schiffrin EL. The flame that lights the fire: oxidative stress, inflammation, and renal damage in angiotensin II-induced hypertension. *Hypertension*. 2008;52:205–206.
- Harrison DG, Vinh A, Lob H, Madhur MS. Role of the adaptive immune system in hypertension. *Curr Opin Pharmacol*. 2010;10:203–207.
- Verdoren S, Muller DN, Luft FC, Dechend R. Immunology in hypertension, preeclampsia, and target-organ damage. *Hypertension*. 2009;54:439–443.
- Schiffrin EL. T lymphocytes: a role in hypertension? *Curr Opin Nephrol Hypertens*. 2010;19:181–186.
- Shao J, Nangaku M, Miyata T, Inagi R, Yamada K, Kurakawa K, Fujita T. Imbalance of T-cell subsets in angiotensin II-infused hypertensive rats with kidney injury. *Hypertension*. 2003;42:31–38.
- Guzik TJ, Hoch NE, Brown KA, McCann LA, Rahman A, Dikalov S, Goronzy J, Weyand C, Harrison DG. Role of the T cell in the genesis of angiotensin II induced hypertension and vascular dysfunction. *J Exp Med*. 2007;204:2449–2460.
- Nataraj C, Oliverio MI, Mannon RB, Mannon PJ, Audoly LP, Amuchastegui CS, Ruiz P, Smithies O, Coffman TM. Angiotensin II regulates cellular immune responses through a calcineurin-dependent pathway. *J Clin Invest*. 1999;104:1693–1701.
- Jurewicz M, McDermott DH, Sechler JM, Tinkam K, Takakura A, Carpenter CB, Milford E, Abdi R. Human T and natural killer cells possess a functional renin-angiotensin system: further mechanisms of angiotensin II-induced inflammation. *J Am Soc Nephrol*. 2007;18:1090–1102.
- Hoch NE, Guzik TJ, Chen W, Deans T, Maulout SA, Gratz P, Weyand C, Harrison DG. Regulation of T-cell function by endogenously produced angiotensin II. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2009;296:R208–R216.
- Akdis CA, Akdis M. Mechanisms and treatment of allergic disease in the big picture of regulatory T cells. *J Allergy Clin Immunol*. 2009;123:735–746.
- Sakaguchi S. Naturally arising Foxp3-expressing CD25+CD4+ regulatory T cells in immunological tolerance to self and non-self. *Nat Immunol*. 2005;6:345–352.
- Valencia X, Lipsky PE. CD4+CD25+FoxP3+ regulatory T cells in autoimmune diseases. *Nat Clin Pract Rheumatol*. 2007;3:619–626.
- Lindley S, Dayan CM, Bishop A, Roep BO, Peakman M, Tree TI. Defective suppressor function in CD4(+)CD25(+) T-cells from patients with type 1 diabetes. *Diabetes*. 2005;54:92–99.
- Mor A, Planer D, Luboshits G, Afek A, Metzger S, Chajek-Shaul T, Keren G, George J. Role of naturally occurring CD4+ CD25+ regulatory T cells in experimental atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2007;27:893–900.
- Viel EC, Lemarié CA, Benkirane K, Paradis P, Schiffrin EL. Immune regulation and vascular inflammation in genetic hypertension. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2010;298:H938–H944.
- Kvakan H, Kleinewietfeld M, Qadri F, Park JK, Fischer R, Schwarz J, Rahn HP, Plehm R, Wellner M, Elitok S, Gratz P, Dechend R, Luft FC, Muller DN. Regulatory T cells ameliorate angiotensin II-induced cardiac damage. *Circulation*. 2009;119:2904–2912.
- Shi Y, Fukuoka M, Li G, Liu Y, Chen M, Konviser M, Chen X, Opavsky MA, Liu PP. Regulatory T cells protect mice against coxsackievirus-induced myocarditis through the transforming growth factor β -coxsackie-adenovirus receptor pathway. *Circulation*. 2010;121:2624–2634.
- Leibovitz E, Ebrahimiyan T, Paradis P, Schiffrin EL. Aldosterone induces arterial stiffness in absence of oxidative stress and endothelial dysfunction. *J Hypertens*. 2009;27:2192–2200.
- Andersson J, Libby P, Hansson GK. Adaptive immunity and atherosclerosis. *Clin Immunol*. 2010;134:33–46.
- De Ciuceis C, Amiri F, Brassard P, Endemann DH, Touyz RM, Schiffrin EL. Reduced vascular remodeling, endothelial dysfunction, and oxidative stress in resistance arteries of angiotensin II-infused macrophage colony-stimulating factor-deficient mice: evidence for a role in inflammation in angiotensin-induced vascular injury. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2005;25:2106–2113.
- Jackson SH, Devadas S, Kwon J, Pinto LA, Williams MS. T cells express a phagocyte-type NADPH oxidase that is activated after T cell receptor stimulation. *Nat Immunol*. 2004;5:818–827.
- Yanagita Y, Rakugi H, Okamura A, Moriguchi K, Takiuchi S, Ohishi M, Suzuki K, Higaki J, Ogihara T. Angiotensin II type 1 receptor-mediated peroxide production in human macrophages. *Hypertension*. 1999;33:335–339.
- Touyz RM. Molecular and cellular mechanisms in vascular injury in hypertension: role of angiotensin II. *Curr Opin Nephrol Hypertens*. 2005;14:125–131.
- Intengan HD, Thibault G, Li JS, Schiffrin EL. Resistance artery mechanics, structure, and extracellular components in spontaneously hypertensive rats: effects of angiotensin receptor antagonism and converting enzyme inhibition. *Circulation*. 1999;100:2267–2275.
- Rehman A, Ismail SB, Naing L, Roshan TM, Rahman AR. Reduction in arterial stiffness with angiotensin II antagonism and converting enzyme inhibition: a comparative study among malay hypertensive subjects with a known genetic profile. *Am J Hypertens*. 2007;20:184–189.
- Vlachopoulos C, Dima I, Aznaouridis K, Vasiliadou C, Ioakeimidis N, Aggeli C, Toutouza M, Stefanadis C. Acute systemic inflammation increases arterial stiffness and decreases wave reflections in healthy individuals. *Circulation*. 2005;112:2193–2200.
- Mahadik SR, Deo SS, Mehtalia SD. Association of adiposity, inflammation and atherosclerosis: the role of adipocytokines and CRP in Asian Indian subjects. *Metab Syndr Relat Disord*. 2008;6:121–128.
- Ueland T, Kjekshus J, Frøland SS, Orskov T, Squire IB, Gullestad L, Dickstein K, Aukrust P. Plasma levels of soluble tumor necrosis factor receptor type I during the acute phase following complicated myocardial infarction predicts survival in high-risk patients. *J Am Coll Cardiol*. 2005;46:2018–2021.
- Ohtsuka T, Hamada M, Hiasa G, Sasaki O, Suzuki M, Hara Y, Shigematsu Y, Hiwada K. Effect of β -blockers on circulating levels of inflammatory and anti-inflammatory cytokines in patients with dilated cardiomyopathy. *J Am Coll Cardiol*. 2001;37:412–417.
- Guyton AC. Renal function curve—a key to understanding the pathogenesis of hypertension. *Hypertension*. 1987;10:1–6.

Expanded Methods

Endothelial function and vessel mechanics

Second-order branches of the mesenteric arterial tree (internal diameter between 150–250 μm) were dissected and mounted on a pressurized myograph as previously described.¹ Briefly, vessels were equilibrated for 60 min at 45 mmHg intraluminal pressure in warmed oxygenated (95% air–5% CO_2) Krebs solution (pH 7.4) containing (mmol/l): 120 NaCl, 25 NaHCO_3 , 4.7 KCl, 1.18 KH_2PO_4 , 1.18 MgSO_4 , 2.5 CaCl_2 , 0.026 EDTA and 5.5 glucose. Media and lumen diameters were measured by a computer-based video imaging system (Living Systems Instrumentation, Burlington, Virginia, USA). Endothelium-dependent and -independent relaxation was assessed by measuring the dilatory responses to cumulative doses of acetylcholine (ACh, 10^{-9} to 10^{-4} mol/L) or sodium nitroprusside (SNP, 10^{-8} to 10^{-4} mol/L), respectively, in vessels precontracted with norepinephrine (NE, 5×10^{-5} mol/L). To evaluate the contribution of nitric oxide (NO) to the vascular response, the dose-response curve to ACh was determined before and after a 30-minute preincubation with the NO synthase inhibitor *N*^G-nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME, 10^{-4} mol/L). Thereafter, vessels were perfused with Ca^{2+} -free Krebs solution containing 10 mmol/l EGTA for 30 min to eliminate vascular tone. Media and lumen diameter were measured at 3, 10, 20, 30, 40, 45, 60, 80, 100, 120 and 140 mmHg intraluminal pressures. Media cross-sectional area, media/lumen ratio, and stress and strain were calculated as previously described.²

Reduced nicotinamide adenine dinucleotide (NADPH) oxidase activity and generation of reactive oxygen species (ROS)

ROS generation was determined in aorta and apex of the heart by measuring NADPH oxidase activity by chemiluminescence using lucigenin and NADPH, as described in our previous studies.³ Vascular superoxide ($\cdot\text{O}_2^-$) production was assessed on 5 μm cryosections of aorta with the superoxide-sensitive fluorescent dye dihydroethidium (DHE, 2 $\mu\text{mol/L}$) in dark conditions for 5 min at 37°C. Fluorescence was visualized and captured with a fluorescence microscope with a CY3 filter as previously described.³

Plasma cytokine measurement

Plasma levels of interleukin (IL)-6, IL-10, interferon (IFN)- γ , and tumor necrosis factor (TNF)- α were measured with a Bio-Rad Laboratories Bio-Plex Multiplex System (Hercules, CA, USA) by an operator unaware of the groups studied.

Western blot analysis

Protein expression was determined by Western blot⁴ using specific antibody anti-vascular cell adhesion molecule (VCAM)-1 (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA). Signal was revealed by chemiluminescence (SuperSignal West Pico, Thermo Scientific, Rockford, IL, USA) with the Molecular Imager Chemidoc XRS system (Bio-Rad, Mississauga, ON, Canada), and quantified by densitometry using Image lab software (Bio-Rad). Membranes were subsequently stripped and reprobed with anti- β -

actin antibody (Sigma Chemicals, St Louis, Missouri, USA) to verify equal loading. Results were expressed as percentage of control group optical density.

Immunofluorescent detection of macrophages and lymphocytes

Immunofluorescence microscopy was performed on 5- μ m-thick cryostat aortic sections. Aortic sections were air-dried for 30 min, fixed for 5 min in a mixture of acetone:methanol (1:1) at -20°C and washed with PBS containing 0.1 % Tween-20 (TBST) twice for 10 min. Sections were blocked with PBST containing 10% normal goat serum for 1 h at room temperature and then incubated with a rat anti-macrophage-specific antigen MOMA-2 antibody (1:50, Abcam, Cambridge, MA, USA), a hamster anti-CD3 monoclonal antibody (1:100, 145-2C11) or rabbit anti-Foxp3 antibody (1:500, Abcam) in blocking solution overnight at 4°C. The sections were washed 3 times with PBST and incubated with Alexa Fluor® 488 goat anti-hamster, Alexa Fluor® 555 goat anti-rat or Alexa Fluor® 555 goat anti-rabbit (1:200, Invitrogen Corp., Carlsbad, CA, USA) in the blocking solution for 1h at room temperature and then washed 3 times with PBST and mounted with Vectashield containing 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI, Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA). Images were captured using a fluorescent microscope Leica DM2000 (Leica Microsystems, Richmond Hill, ON, Canada). The percentage of MOMA and CD3 staining/total surface area was quantified with Image J software (National Institute of Mental Health, Bethesda, Maryland, USA).

Reference List

- 1 Leibovitz E, Ebrahimian T, Paradis P, Schiffrin EL. Aldosterone induces arterial stiffness in absence of oxidative stress and endothelial dysfunction. *J Hypertens.* 2009;27:2192-2200.
- 2 Neves MF, Endemann D, Amiri F, Virdis A, Pu Q, Rozen R, Schiffrin EL. Small artery mechanics in hyperhomocysteinemic mice: effects of angiotensin II. *J Hypertens.* 2004;22:959-966.
- 3 Leibovitz E, Ebrahimian T, Paradis P, Schiffrin EL. Aldosterone induces arterial stiffness in absence of oxidative stress and endothelial dysfunction. *J Hypertens.* 2009;27:2192-2200.
- 4 Neves MF, Endemann D, Amiri F, Virdis A, Pu Q, Rozen R, Schiffrin EL. Small artery mechanics in hyperhomocysteinemic mice: effects of angiotensin II. *J Hypertens.* 2004;22:959-966.

Table S1. Treg adoptive transfer effects on Ang II vascular actions

Parameter	Vehicle	Angiotensin II		
		PBS	Treg	CD4 ⁺ CD25 ⁻
Media/lumen ratio (%) [‡]	4.75 ± 0.27	5.69 ± 0.73	4.90 ± 0.59	5.63 ± 0.97
Media cross-sectional area (μm ³) [‡]	6666 ± 694	8788 ± 1282	6605 ± 633	6882 ± 1021
Stress (x10 ⁶ dynes/cm ²) [§]	4.25 ± 0.54	4.01 ± 0.83	4.59 ± 0.75	4.17 ± 0.64
Strain [§]	0.96 ± 0.04	0.77 ± 0.03*	0.92 ± 0.02†	0.87 ± 0.04

Media-to-lumen ratio, media cross section, stress and strain were determined in control mice (Ctrl) and in c. Data are means ± SEM. **P*<0.01 vs. Ctrl, †*P*<0.05 vs. PBS + Ang II. n = 6-8; [‡] measured at 45 mmHg and [§] measured at 140 mmHg.

4 Discussion et conclusion

Plusieurs hypothèses ont suggéré une relation entre les maladies cardiovasculaires (y compris l'HTA), et l'état d'inflammation. Plus récemment, les immunités innée et acquise ont été identifiées comme jouant un rôle dans les maladies cardio-vasculaires et l'HTA (Harrison et al. 2010; Schiffrin 2010). Les résultats de notre étude permettent d'étendre ce concept, montrant que le transfert adoptif des Treg prévient l'HTA et le dommage vasculaire induits par l'Ang II. Ce transfert empêche l'altération de la vasodilatation endothélium-dépendante, la rigidité des artères mésentériques, le stress oxydatif, diminue les réponses immunitaires (taux plasmatiques des cytokines pro-inflammatoires $\text{INF-}\gamma$, $\text{TNF-}\alpha$ et d'IL-6, et l'infiltration aortique et rénale des macrophages). Ceci confirme notre hypothèse selon laquelle le transfert adoptif des Treg (CD4+CD25+) empêche l'augmentation de la pression artérielle et les désordres vasculaires induits par l'Ang II.

L'observation que le transfert adoptif des Treg prévient les lésions vasculaires, l'infiltration des cellules immunitaires et l'HTA induite par l'Ang II, complète et élargit la compréhension du rôle des lymphocytes T effecteurs dans l'hypertension. (Guzik et al. 2007; Kvakan et al. 2009).

Dans notre étude, les Treg diminuent le taux d'infiltration des macrophages et monocytes dans l'aorte et le cortex rénal, suggérant d'une part que, les réponses immunitaires adaptatives et innées ont été prévenues par un transfert adoptif des Treg. D'autre part, la diminution du stress oxydatif dans les tissus vasculaires des souris recevant les Treg a été associée à la suppression des macrophages et des lymphocytes T, ce qui pourrait avoir contribué au stress oxydatif induit par l'Ang II (Griendling et al. 2000; Griendling et Ushio-Fukai 2000).

Dans notre étude, le transfert adoptif des Treg empêche la rigidité des artères mésentériques induite par l'Ang II. Ainsi, un mécanisme de modulation d'homéostasie immunitaire interfère avec ce processus et contribue à la physiopathologie de l'HTA.

L'HTA, les altérations vasculaires et l'infiltration des cellules immunitaires induites par l'Ang II ont été associées à une augmentation des cytokines plasmatiques pro-inflammatoires (INF- γ , TNF- α et IL-6). Ce taux diminue suite au transfert adoptif des Treg alors qu'aucun changement n'a été observé par le transfert des T effecteurs (Teff). Assez curieusement, l'IL-10 augmente avec la perfusion d'Ang II et diminue avec le transfert adoptif des Treg, mais pas les cellules Teff. Dans notre étude, l'augmentation d'IL-10 peut être interprétée comme effet des boucles de rétroaction qui modulent les cytokines pro-inflammatoires par des pics de l'IL-10 et qui agit comme anti-inflammatoire. Cela peut s'appliquer à des niveaux systémiques de cytokines. Par contre, au niveau local, les productions peuvent changer d'une manière différente, avec un taux plus élevé d'IL-10 associé à une augmentation de l'infiltration vasculaire des Treg (Viel et al. 2010).

L'HTA induite par l'Ang II est associée à une diminution des Treg et une augmentation des monocytes/macrophages, dans le cortex rénal. Dans notre étude, le transfert adoptif des Treg était accompagné par une augmentation de ces cellules dans le cortex rénal. Malgré que ce transfert n'a pas entraîné une diminution significative de l'infiltration des macrophages, il peut être l'origine de la diminution du taux de l'inflammation, des lésions rénales et de la pression artérielle. Le rein peut représenter l'un des sites d'action des Treg pouvant jouer un rôle important dans la régulation de l'inflammation. Cette dernière induirait l'augmentation de la pression artérielle. Dans cette étude, il n'était pas possible de détecter des changements dans le taux des Treg au niveau de l'aorte, conformément à la technique utilisée. D'autres expériences seront nécessaires pour mieux comprendre les effets directs des Treg sur le système vasculaire.

- Étude 4 -
HTA ET SRAA:
IMPLICATION DE L'INFLAMMATION ET DU
SYSTÈME IMMUNITAIRE (RÔLE DES
CELLULES T RÉGULATRICES)

I. Les lymphocytes T régulatrices empêchent les lésions vasculaires induits par l'aldostérone

T regulatory lymphocytes prevent aldosterone-induced vascular injury

Daniel A. Kasal*, Tlili Barhoumi*, Melissa W. Li, Pascal Laurant, Mario F. Neves, Pierre Paradis and Ernesto L. Schiffrin

***Both authors contributed equally to this work.**

Publication acceptée (révision mineur) dans *Hypertension* (Impact factor 6.614)

1. But de l'étude

Après avoir étudié l'effet des Treg sur l'HTA induite par l'Ang II, il nous a semblé intéressant d'étudier les effets des Treg sur une HTA induite par l'aldostérone, hormone impliquée aussi dans les désordres rénaux et cardiovasculaires ainsi que les pathologies hypertensives. Notre but était d'étudier les effets d'un transfert adoptif des Treg sur la pression artérielle et l'altération vasculaire chez des souris traitées par l'Aldostérone (Aldo).

Nous supposons que l'amélioration des Treg qui modulent les phénomènes de suppression immunitaire, prévient les effets délétères de l'Aldostérone. Le transfert adoptif des Treg (CD4+CD25+) empêcherait l'augmentation de la pression artérielle, la dysfonction endothéliale, le remodelage vasculaire, le stress oxydatif et l'inflammation chez des souris traitées à l'Aldostérone.

2. Méthode

2.1 Animaux

Souris mâles C57BL/6 (âgés de 13 à 15 semaines) ont subi une injection de PBS par voie intraveineuse, deux fois à intervalle d'une semaine, 3×10^5 de Treg (CD4+CD25+) ou T

effectrices (Teff) (CD4+CD25-). Ces souris ont été infusées pendant 14 jours avec l'Aldo (600 ng/kg/d), en utilisant des mini-pompes osmotiques. Du PBS était également administré (injection) aux souris contrôle, par voie intraveineuse.

La pression artérielle systolique a été mesurée pendant la période de perfusion avec l'Aldo, par télémétrie et par la méthode de tail-cuff (3 fois par semaine), dans un groupe séparé. Après 2 semaines de traitement, les souris ont été sacrifiées sous anesthésie à l'isoflurane.

2.2 Isolation et transfert adoptif des cellules Treg et des Teff

Les lymphocytes T ont été isolés à partir de 3 rates de souris C57BL/6, suite à deux étapes de sélections :

- 1- sélection négative pour avoir des cellules T CD4 +
- 2- sélection positive pour avoir des cellules CD25 +

L'isolation est réalisée en utilisant des billes magnétiques et la pureté des cellules a été vérifiée par FACS.

2.3 Évaluation de la fonction endothéliale

La fonction endothéliale est déterminée sur des artères mésentériques de deuxième ordre (150-250 µm de diamètre), en utilisant la méthode du myographe pressurisé.

3. Résultats principaux

3.1 Le transfert adoptif des Treg prévient l'augmentation de la pression artérielle systolique induite par l'Aldo.

L'Aldo entraîne une augmentation de la pression artérielle systolique. Cet effet disparaît par le transfert adoptif des Treg. Aucun effet n'a été observé suite au transfert adoptif des cellules Teff.

3.2 Le transfert adoptif des Treg prévient l'altération de la vasodilatation endothélium-dépendante induite par l'Aldo

Le traitement avec l'Aldo entraîne une altération de la vasodilatation en réponse à l'acétylcholine, ce qui a été empêché par le transfert adoptif des Treg mais pas avec les cellules Teff.

3.3 Le transfert adoptif des Treg prévient le remodelage hypertrophique induit par l'Aldo sur les artères mésentériques

3.4 Le transfert adoptif des Treg diminue le stress oxydatif induit par l'Aldo

L'Aldo augmente l'activité de la NADPH oxydase dans l'aorte, le cœur et le cortex rénal. Le transfert adoptif des Treg, mais pas les Teff, a empêché tous ces effets.

3.5 Le transfert adoptif des Treg diminue l'infiltration des cellules immunitaires inflammatoires induite par l'Aldo

L'Aldo augmente le taux du VCAM-1 dans l'aorte. Aucune variation n'a été observée suite au transfert adoptif des Treg, alors que les Teff exacerbent cet effet. L'Aldo augmente l'infiltration aortique et rénale des macrophages. Ce taux diminue par le transfert adoptif des Treg tandis que les Teff l'exacerbent.

Hypertension

JOURNAL OF THE AMERICAN HEART ASSOCIATION



*Learn and Live*SM

T Regulatory Lymphocytes Prevent Aldosterone-Induced Vascular Injury

Daniel A. Kasal, Tili Barhoumi, Melissa W. Li, Naoki Yamamoto, Evguenia Zdanovich, Asia Rehman, Mario F. Neves, Pascal Laurant, Pierre Paradis and Ernesto L. Schiffrin

Hypertension published online December 5, 2011

Hypertension is published by the American Heart Association, 7272 Greenville Avenue, Dallas, TX 75214

Copyright © 2011 American Heart Association. All rights reserved. Print ISSN: 0194-911X. Online ISSN: 1524-4563

The online version of this article, along with updated information and services, is located on the World Wide Web at:
<http://hyper.ahajournals.org/content/early/2011/12/04/HYPERTENSIONAHA.111.181123>

Data Supplement (unedited) at:
<http://hyper.ahajournals.org/content/suppl/2011/12/02/HYPERTENSIONAHA.111.181123.DC1.html>

Subscriptions: Information about subscribing to Hypertension is online at
<http://hyper.ahajournals.org//subscriptions/>

Permissions: Permissions & Rights Desk, Lippincott Williams & Wilkins, a division of Wolters Kluwer Health, 351 West Camden Street, Baltimore, MD 21202-2436. Phone: 410-528-4050. Fax: 410-528-8550. E-mail:
journalpermissions@lww.com

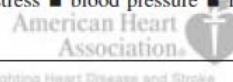
Reprints: Information about reprints can be found online at
<http://www.lww.com/reprints>

T Regulatory Lymphocytes Prevent Aldosterone-Induced Vascular Injury

Daniel A. Kasal, Tlili Barhoumi, Melissa W. Li, Naoki Yamamoto, Evguenia Zdanovich, Asia Rehman, Mario F. Neves, Pascal Laurant, Pierre Paradis, Ernesto L. Schiffrin

Abstract—Aldosterone mediates actions of the renin-angiotensin-aldosterone system inducing hypertension, oxidative stress, and vascular inflammation. Recently, we showed that angiotensin II-induced hypertension and vascular damage are mediated at least in part by macrophages and T-helper effector lymphocytes. Adoptive transfer of suppressor T-regulatory lymphocytes (Tregs) prevented angiotensin II action. We hypothesized that Treg adoptive transfer would blunt aldosterone-induced hypertension and vascular damage. Thirteen to 15-week-old male C57BL/6 mice were injected intravenously at 1-week intervals with 3×10^5 CD4⁺CD25⁺ cells (representing Treg) or control CD4⁺CD25[−] cells and then infused or not for 14 days with aldosterone (600 μ g/kg per day, SC) while receiving 1% saline to drink. Aldosterone induced a small but sustained increase in blood pressure ($P < 0.001$), decreased vasodilatory responses to acetylcholine by 66% ($P < 0.001$), increased both media:lumen ratio ($P < 0.001$) and media cross-sectional area of resistance arteries by 60% ($P < 0.05$), and increased NADPH oxidase activity 2-fold in aorta ($P < 0.001$), kidney and heart ($P < 0.05$), and aortic superoxide production. As well, aldosterone enhanced aortic and renal cortex macrophage infiltration and aortic T-cell infiltration (all $P < 0.05$), and tended to decrease Treg in the renal cortex. Treg adoptive transfer prevented all of the vascular and renal effects induced by aldosterone. Adoptive transfer of CD4⁺CD25[−] cells exacerbated aldosterone effects except endothelial dysfunction and increases in media:lumen ratio of resistance arteries. Thus, Tregs suppress aldosterone-mediated vascular injury, in part through effects on innate and adaptive immunity, suggesting that aldosterone-induced vascular damage could be prevented by an immunomodulatory approach. (*Hypertension*. 2012;59:00-00.) • Online Data Supplement

Key Words: adaptive ■ innate immunity ■ inflammation ■ oxidative stress ■ blood pressure ■ remodeling ■ endothelial dysfunction



The renin-angiotensin (Ang)-aldosterone system (RAAS) plays an important role in the homeostasis of blood pressure (BP).¹ Ang II acts in part by causing vasoconstriction or, indirectly, by increasing blood volume through enhanced renal sodium and water reabsorption, the latter directly but also via the release of aldosterone from the adrenal glands, which, through binding to mineralocorticoid receptors (MRs), increases renal sodium and water reabsorption, contributing to BP rise. MR is expressed in several nonrenal tissues such as blood vessels,² and, thus, aldosterone could also regulate BP by direct vascular actions.^{3–6}

Ang II participates in the development of hypertension by increasing peripheral vascular resistance, at least in part by causing endothelial dysfunction and vasoconstriction, remodeling, oxidative stress, and inflammation. Aldosterone mediates some of the Ang II-induced vascular effects. Ang

II-induced hypertension and vascular injury in rats were reduced by MR antagonist treatment in rats.^{7–9} Aldosterone infusion indeed caused endothelial dysfunction and vascular remodeling, oxidative stress, and inflammation in rats^{9–12} and mice.¹³

Innate and adaptive immunity appear to be involved in Ang II-induced hypertension and vascular damage.^{14–17} A role for regulatory T lymphocytes (Tregs), which are suppressors of the innate and adaptive immune responses,^{18–20} has been suggested in Ang II-induced BP elevation and vascular damage. Ang II induced a decrease in Treg, and adoptive transfer of Treg prevented Ang II-induced BP rise and vascular damage.^{21,22} Innate and adaptive immunity may also be involved in aldosterone-induced vascular damage. Aldosterone induced perivascular monocyte/macrophage infiltration in the heart¹² and in mesenteric arteries.¹³ Aldosterone-

Received August 11, 2011; first decision September 11, 2011; revision accepted November 11, 2011.

From the Lady Davis Institute for Medical Research (D.A.K., T.B., M.W.L., N.Y., E.Z., A.R., P.P., E.L.S.) and Department of Medicine (E.L.S.), Sir Mortimer B. Davis-Jewish General Hospital, McGill University, Montreal, Quebec, Canada; State University of Rio de Janeiro (D.A.K., M.F.N.), Rio de Janeiro, Brazil; Université d'Avignon et des Pays de Vaucluse-Avignon (T.B., P.L.), Avignon, France.

D.A.K. and T.B. both contributed equally to this work.

This paper was sent to Nancy J. Brown, associate editor, for review by expert referees, editorial decision, and final disposition.

Correspondence to Ernesto L. Schiffrin, Sir Mortimer B. Davis-Jewish General Hospital, #B-127, 3755 Cote Ste-Catherine Rd, Montreal, Quebec, Canada H3T 1E2. E-mail ernesto.schiffrin@mcgill.ca

© 2011 American Heart Association, Inc.

Hypertension is available at <http://hyper.ahajournals.org>

DOI: 10.1161/HYPERTENSIONAHA.111.181123

Downloaded from <http://hyper.ahajournals.org/> by ERNESTO SCHIFFRIN on December 6, 2011

induced endothelial dysfunction and vascular oxidative stress were decreased in *mcsf^{Dp/+}*, which have a low monocyte/macrophage number in the vessel wall.¹³ Guzik et al²³ showed that deoxycorticosterone acetate (DOCA)/salt-induced hypertension and superoxide production in the aorta were blunted in *rag^{-/-}* mice deficient in T and B lymphocytes, and adoptive transfer of T but not B cells restored the mineralocorticoid effects. Furthermore, aldosterone activates T cells in vitro.²⁴ However, it is unknown whether Tregs play a role in aldosterone-induced hypertension and vascular damage.

To test the hypothesis that Tregs play a role in aldosterone-induced vascular damage, we determined whether Treg adoptive transfer could prevent aldosterone-induced endothelial dysfunction and vascular remodeling, oxidative stress, and inflammation in mice. In addition, we determined whether aldosterone would decrease Treg.

Methods

Additional materials and methods are mentioned in the online Data Supplement (please see <http://hyper.ahajournals.org>).

Animals

Thirteen to 15-week-old male C57BL/6 mice (Harlan Laboratories, Chicago, IL) mice were injected intravenously via the tail vein twice, at 1-week intervals, with PBS or 3×10^5 CD4⁺CD25⁺ (Treg) or CD4⁺CD25⁻ cells, and then infused with aldosterone (600 μ g/kg per day) for 14 days using ALZET osmotic minipumps (Durect, Cupertino, CA), while receiving 1% saline in drinking water. Control mice were similarly injected intravenously with vehicle and received tap drinking water. Systolic and diastolic BP were measured during aldosterone infusion by telemetry, as described previously.²¹ The study was approved by the animal care committee of the Lady Davis Institute for Medical Research and McGill University and followed recommendations of the Canadian Council of Animal Care.

Isolation and Adoptive Transfer of Treg and CD4⁺CD25⁻ Cells

Treg and CD4⁺CD25⁻ cells were isolated from spleens of 10- to 12-week-old male C57BL/6 mice through CD4⁺ T cell negative selection followed by a CD25⁺ T cell-positive selection of splenocytes using EasySep Mouse CD4⁺ T Cell Pre-Enrichment and CD25 Positive Selection kits (Stem Cell Technologies, Vancouver, British Columbia, Canada). Details of the protocol are presented as material in the online Data Supplement.

Endothelial Function and Vessel Mechanics

Second-order branches of mesenteric arteries (ID 150–250 μ m) were dissected and mounted on a pressurized myograph and endothelial function and vessel mechanics determined as described previously.¹³ Details of the protocol are presented in the online Data Supplement.

NADPH Oxidase Activity and Generation of Superoxide

NADPH oxidase activity was determined by lucigenin chemiluminescence,¹³ and superoxide production was examined by dihydroethidium staining,²¹ as described previously. Details of the protocol are presented in the online Data Supplement.

Immunofluorescence Microscopy

Nox1, Nox2, Nox4, and vascular cell adhesion molecule (VCAM)-1 expression in the aorta and monocyte/macrophage (MOMA-2) and T lymphocyte (CD3) infiltration in the aorta and kidney, and Treg (Foxp3) infiltration in the kidney were determined by immunofluorescence microscopy on 5- μ m-thick cryostat sections. Details of the protocol are presented in the online Data Supplement.

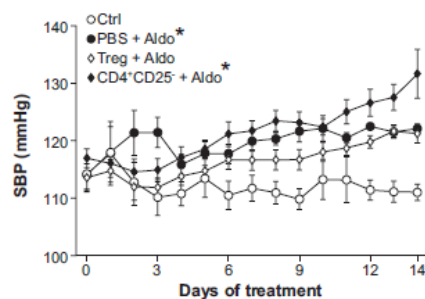
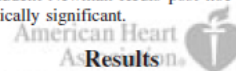


Figure 1. Aldosterone-induced small systolic blood pressure (SBP) rise was not prevented by T-regulatory lymphocyte (Treg) adoptive transfer. SBP was determined by telemetry in control mice (Ctrl) and in mice infused with aldosterone (Aldo) and pre-treated with PBS, Treg, or CD4⁺CD25⁺ cells. Mean 24-hour SBP data are presented. Data are presented as means $\pm$ SEM. * $P < 0.05$ vs Ctrl, $n = 5$ to 6 mice.

rescence microscopy on 5- μ m-thick cryostat sections. Details of the protocol are presented in the online Data Supplement.

Data Analysis

Results are presented as mean $\pm$ SEM. Comparisons between multiple groups were done by 1- or 2-way ANOVA. BP data were compared with 2-way ANOVA for repeated measures. For comparison of acetylcholine response curves, 2-way ANOVA was performed on the sum-of-squares data from each curve. ANOVA was followed by a Student-Newman-Keuls post hoc test. $P < 0.05$ was considered statistically significant.



Characterization of CD4⁺CD25⁺ and CD4⁺CD25⁻ T Cells

The content of CD4⁺, CD25⁺, and Foxp3⁺ cells was determined in the preparations of CD4⁺CD25⁺ and CD4⁺CD25⁻ T cells by flow cytometry. The preparation of CD4⁺CD25⁺ T cells used was enriched in Tregs, because 82% of cells were CD4⁺, 87% were CD25⁺, 58% were Foxp3⁺, and 57% were triple-positive CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ cells (Figure S1, available in the online Data Supplement at <http://hyper.ahajournals.org>). The preparation of CD4⁺CD25⁻ T cells was enriched in CD4⁺ cells (87%) and poor in Tregs, containing only 7% CD25⁺, 9% Foxp3⁺, and 5% triple-positive CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ cells. Accordingly, the preparation of CD4⁺CD25⁺ cells is identified in the remainder of this article as "Treg."

Adoptive Transfer of Treg Reduced Aldosterone-Induced Systolic BP Rise

Aldosterone infusion and 1% saline in drinking water caused a small but significant increase in systolic BP, which rose 8 and 11 mm Hg at days 2 and 3 and continued to rise slowly over the following days to 12 mm Hg, achieving a plateau by day 9 up to the end of the experiment in mice injected with PBS compared with control mice (Figure 1). A similar finding was observed in mice injected with CD4⁺CD25⁻ cells. However, systolic BP in mice in which Treg adoptive transfer was carried out was not significantly different from control mice or those injected with PBS. No significant change in diastolic BP was observed in mice injected with

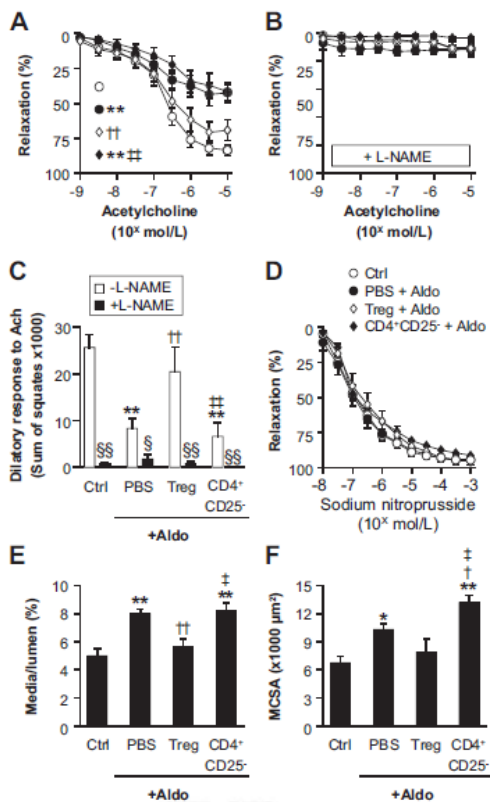


Figure 2. T regulatory lymphocyte (Treg) adoptive transfer prevented aldosterone-induced endothelial dysfunction and vascular remodeling. Vasodilatory responses to acetylcholine without (A) or with *N*^ω-nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME; B), vasodilatory response to sodium nitroprusside (D), and media:lumen ratio (media:lumen; E) and media cross-sectional area (media cross-sectional area [MCSA]; F) were determined in mesenteric arteries of the same groups as in Figure 1. The sum of squares of vasodilatory acetylcholine responses without (–L-NAME) or with (+L-NAME) L-NAME are presented in C. Data are means ± SEM. **P* < 0.05 and ***P* < 0.001 vs control (Ctrl), †*P* < 0.05 and ††*P* < 0.01 vs PBS + aldosterone (Aldo), ‡*P* < 0.05 and ‡‡*P* < 0.001 vs Treg + Aldo, and §§*P* < 0.001 vs –L-NAME; *n* = 6 to 8.

PBS, Treg, or CD4⁺CD25[–] cells compared with control mice (Figure S2).

Adoptive Transfer of Treg Prevented Aldosterone-Induced Mesenteric Artery Endothelial Dysfunction

Aldosterone decreased the vasodilatory response of resistance mesenteric arteries to acetylcholine by 66% compared with control, effect prevented by adoptive transfer of Treg but not CD4⁺CD25[–] cells (Figure 2A and 2C). Vasodilatory responses to acetylcholine were almost completely abrogated by the NO synthase inhibitor *N*^ω-nitro-L-arginine methyl ester in all of the groups (Figure 2B and 2C), indicating that

NO was the major mediator of the vasodilator response in all of the groups in this size vessel in this experimental paradigm. Vasodilatory responses to sodium nitroprusside were similar in all of the groups (Figure 2D).

Adoptive Transfers of Treg Prevented Aldosterone-Induced Mesenteric Artery Hypertrophic Remodeling

Aldosterone-treated mice exhibited a 60% greater media:lumen ratio and a 57% larger media cross-sectional area of mesenteric arteries compared with control (Figure 2E and 2F). This effect was prevented by adoptive transfer of Treg but not CD4⁺CD25[–] cells. In addition, adoptive transfer of CD4⁺CD25[–] cells exacerbated aldosterone-induced increase in media cross-sectional area, causing an additional 28% increase compared with aldosterone-treated rats receiving sham lymphocyte transfer.

Adoptive Transfer of Treg Prevented Aldosterone-Induced Oxidative Stress

Aldosterone infusion increased NADPH oxidase activity 2-fold in aorta, heart, and renal cortex (Figure 3A through 3C). Adoptive transfer of Treg but not CD4⁺CD25[–] cells prevented these effects. Adoptive transfer of CD4⁺CD25[–] cells exaggerated aldosterone-induced increase in NADPH oxidase activity in aorta, resulting in 24% higher activity level than in aldosterone-infused mice not receiving lymphocyte transfer (Figure 3A). Aldosterone increased superoxide as measured by dihydroethidium fluorescence in vascular smooth muscle cells and perivascular cells of aorta, which was abrogated by adoptive transfer of Tregs but not CD4⁺CD25[–] cells (Figure 3D). To better understand the mechanism involved in changes in NADPH oxidase activity described above, the expressions of Nox1, Nox2, and Nox4 were determined by immunofluorescence in the aorta. No significant change in the expression of the different Nox family homologues was found because variability was large (Figure S3). However, aldosterone qualitatively increased the level of expression of Nox2 and Nox4. Because NADPH activity was higher, this may represent increased activity of either of these 2 latter Nox family members.

Adoptive Transfer of Treg Prevented Aldosterone-Induced Inflammatory and Immune Cell Tissue Infiltration

Aldosterone increased 2.2-fold the level of VCAM-1 expression in aorta, which was not prevented by adoptive transfers of Treg and was enhanced 1.5-fold by CD4⁺CD25[–] cells (Figure 4A). Aldosterone increased 4.6-fold monocyte/macrophage-specific antigen MOMA-2 immunostaining in adventitia and periaortic fat of aorta, which was prevented by adoptive transfer of Treg and exaggerated by CD4⁺CD25[–] cells by 30% (Figure 4B). Aldosterone treatment increased aortic vascular and perivascular T cell infiltration 4.5-fold. This effect was prevented by adoptive transfer of Treg and enhanced 2.7-fold by adoptive transfer of CD4⁺CD25[–] cells (Figure 4C).

To determine whether Treg infiltration is modulated by aldosterone infusion, the number of Foxp3⁺ cells was quantified by immunofluorescence in the renal cortex and me-

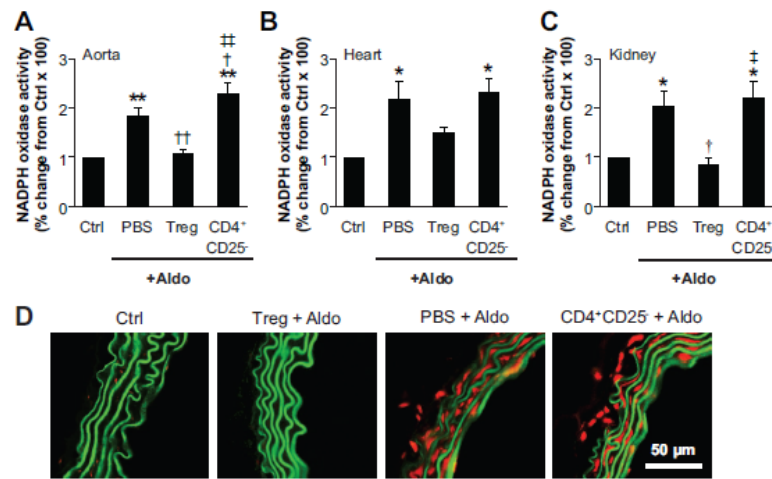


Figure 3. Aldosterone-induced oxidative stress was prevented by T-regulatory lymphocyte (Treg) adoptive transfer. NADPH oxidase activity in aorta (A), heart (B), and renal cortex (C) and dihydroethidium staining revealing superoxide generation in aorta (D) were determined in the same groups as in Figure 1. A through C, Data are means $\pm$ SEM; * P < 0.05 and ** P < 0.001 vs Ctrl, † P < 0.05 and †† P < 0.001 vs PBS + aldosterone (Aldo), and ‡ P < 0.01 and ‡‡ P < 0.001 vs Treg + Aldo, with n = 6 to 9. D, Representative dihydroethidium-stained sections of aorta from 4 to 5 mice per group are presented.

dulla. Small clusters of Foxp3⁺ cells were observed in the kidney. Aldosterone tended to decrease the number of Foxp3⁺ cells in the renal cortex (Figure 4D and Figure S4). Adoptive transfer of Treg counteracted the effects of aldosterone and resulted in a 3.3-fold increase in Foxp3⁺ cells compared with the PBS⁺ aldosterone group, whereas CD4⁺CD25⁺ cell adoptive transfer had no effect. Similar observations were made in the renal medulla (Figure S5). Detection of monocyte/macrophages using the MOMA-2 antibody revealed a homogenous distribution over the cortex and medulla, although with a lower expression level in the medulla. Aldosterone induced >10-fold increase in monocyte/macrophage infiltration in the renal cortex, which was reduced by adoptive transfer of Treg and which tended to increase after CD4⁺CD25⁺ cell transfer (Figure 4E and Figure S6). Monocyte/macrophage infiltration in the renal medulla and T cell infiltration in both renal cortex and medulla were unaltered by aldosterone or adoptive transfer of Treg or CD4⁺CD25⁺ cells (Figures S7 and S8).

Discussion

An association among the RAAS, hypertension, vascular damage, and chronic low-grade inflammation has been suggested by numerous experimental and clinical studies. Innate and adaptive immunities have been shown to play a role in hypertension and associated cardiovascular disease.^{15–17} The present study extends this notion by demonstrating that Treg adoptive transfer prevents aldosterone-induced vascular damage in a BP-independent fashion.

The observation that adoptive transfer of Treg prevented the vascular damage and monocyte/macrophage and T lymphocyte infiltration associated with aldosterone infusion underlines the importance of the role of innate and adaptive immunity in RAAS-induced hypertension and vascular dam-

age. We showed previously the participation of the innate immune response in Ang II- and DOCA/salt-induced hypertension and vascular damage and aldosterone-induced vascular injury when these were blunted in mice deficient in macrophages.^{13,25,26} The importance of adaptive immune responses was demonstrated by Guzik et al,²³ who showed that Ang II- and DOCA/salt-induced hypertension and vascular damage were blunted in *rag*^{−/−} mice deficient in T and B lymphocytes and effects restored by adoptive transfer of T but not B cells. More recently, we and others showed that adoptive transfer of Treg prevents Ang II-induced infiltration of monocyte/macrophages and T cells and, thus, innate and adaptive immune responses.^{21,27} Interestingly, Ang II might activate, at least in part, adaptive immunity by decreasing the number of Tregs, thus reducing their suppressive effects. Indeed, we showed that Ang II decreased the number of Tregs in the renal cortex,²¹ and Matrougui et al²² reported that Ang II-induced apoptosis of Tregs. The results of the present study suggest that both the innate and adaptive immune responses are involved in aldosterone-induced vascular injury, because aldosterone induced monocyte/macrophage and T lymphocyte infiltration, which was prevented by adoptive transfer of Tregs. As in the case of Ang II, aldosterone tended to reduce the number of Tregs in the renal cortex, which could contribute to activate the adaptive immune response. Importantly, adoptive transfer of CD4⁺CD25⁺ cells (T lymphocytes not including Treg) exacerbated most of the aldosterone effects, including the increases in mesenteric artery media cross-section, oxidative stress, VCAM-1, and monocyte/macrophage, as well as T-cell infiltration, which supports the hypothesis that aldosterone activates immune responses.

Aldosterone-induced endothelial dysfunction and vascular remodeling and inflammation are mediated through genera-

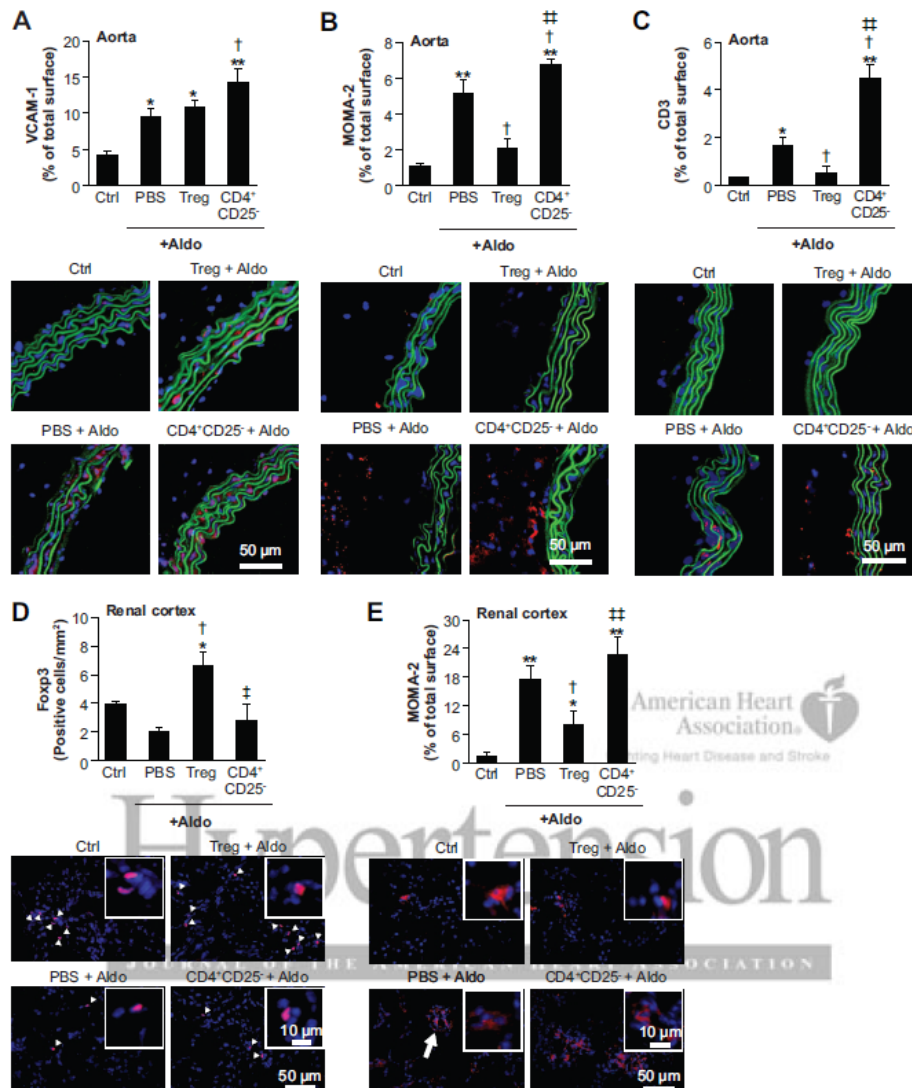


Figure 4. Aldosterone-induced inflammatory and immune cell infiltration was prevented by T regulatory lymphocyte (Treg) adoptive transfer. Immunofluorescence (in red) was used to determine the expression levels of vascular cell adhesion molecule (VCAM)-1 in aorta (A; n=4), monocyte/macrophage infiltration in aorta (B; n=3-4) and renal cortex (E; n=4), T lymphocyte infiltration in aorta (C; n=4), and Treg number in renal cortex (D; n=4) in the same groups as in Figure 1. Elastin autofluorescence and nuclear stain 4',6'-diamidino-2-phenylindole (DAPI) are shown in green and blue, respectively. Arrowheads point at Foxp3⁺ cells, and the arrow indicates a glomerulus. Data are means±SEM; *P<0.05 and **P<0.001 vs control (Ctrl), [†]P<0.05 and ^{††}P<0.001 vs PBS+aldosterone (Aldo), and [‡]P<0.05 and ^{‡‡}P<0.001 vs Treg+Aldo.

tion of oxidative stress that could be related to infiltrating macrophages and T cells, because both oxidative stress and immune cell infiltration were prevented by Treg adoptive transfer. Macrophages express both MR and Ang II type 1 receptor, whereas T cells abundantly express Ang II type 1 receptor, but MR at low levels, and both cell types express NADPH oxidase.^{24,28-30} Aldosterone induces oxidative stress

in macrophages in vitro and in vivo in *apoE*^{-/-} mice.³⁰ Macrophages express a local renin-Ang system that may contribute to target organ damage.^{30,31} Local production of Ang II may participate in aldosterone-induced oxidative stress in macrophages and vascular cells. Keidar et al³⁰ showed that aldosterone-induced oxidative stress in macrophages was completely inhibited only when both MR and

Ang-converting enzyme or Ang II type 1 receptor were inhibited. Guzik et al²³ showed that DOCA/salt-induced superoxide production was blunted in *rag*^{-/-} mice and restored by adoptive transfer of T but not B cells, suggesting that T cells could be involved in aldosterone-induced oxidative stress, because DOCA acts through MR.²³ T lymphocytes also express a local renin-Ang system that could contribute to aldosterone-induced oxidative stress.²⁸ Aldosterone induced superoxide production in the vascular wall, which could be attributed at least partly to infiltrating macrophages and T cells, because aldosterone-induced superoxide production in vascular smooth muscle cell was prevented by adoptive transfer of Treg and blunted in mice deficient in macrophages.^{13,21} Whether superoxide produced by infiltrating macrophages and T cells or by vascular smooth muscle cells is able to interact with endothelium-derived NO and to contribute to endothelial dysfunction³² remains to be determined. The quantification of expression of Nox1, Nox2, and Nox4 in the aorta by immunofluorescence showed qualitative increases of Nox2 and Nox4 in response to aldosterone. Because NADPH oxidase activity was enhanced by aldosterone, the increase may occur in part as a result of upregulation of Nox2 and Nox4. However, the mechanisms of regulation of NADPH oxidase activity by aldosterone with or without adoptive transfer of Treg or CD4⁺CD25⁻ cells remain to be clarified.

Although we found previously that Ang II-induced VCAM-1 expression in the aorta was prevented by Treg adoptive transfer,²¹ Treg adoptive transfer did not prevent aldosterone-induced VCAM-1 expression in the aorta. Aldosterone-induced VCAM-1 expression in mesenteric arteries was blunted in *mcsf*^{OP/+} mice with reduced macrophages when compared with control wild-type mice.¹³ Treg may fail to affect the action of aldosterone on VCAM-1 expression.

The kidney could represent one of the sites of action of Treg that could participate in the regulation of inflammation and immunity-induced BP rise.²¹ As in the case of Ang II, aldosterone tended to decrease Treg and increased monocyte/macrophage infiltration in the renal cortex, which were reversed by Treg adoptive transfer. However, aldosterone induced only modest increases in BP. Accordingly, the kidney may represent one of the sites of action of Treg that could play an important role in the regulation of vascular inflammation beyond BP regulation.

Perspectives

The present study demonstrates that enhanced suppressor Tregs prevent aldosterone-induced endothelial dysfunction, vascular remodeling, and oxidative stress, extending previous findings on the effects of Treg on Ang II effects. Treg may be implicated in mechanisms that modulate the degree to which the RAAS induces hypertension, vascular injury, and innate and adaptive immune responses. Several studies in animal models and humans have shown that inhibition of the RAAS used to control hypertension and vascular damage is associated with a decrease in the inflammatory state. Platten et al³³ showed that blocking Ang-converting enzyme or Ang II type 1 receptor suppressed autoreactive T-helper 1 and T-helper 17 cells and promoted Treg in a model of autoimmunity.

Taken together, these observations suggest that it could be possible to develop immunomodulatory approaches to treat hypertension and associated vascular injury. Loss-of-function studies are required to confirm the role of Treg in the pathogenesis of Ang II- and aldosterone-induced hypertension and vascular damage.

Acknowledgments

We are grateful to Véronique Michaud for excellent technical assistance.

Sources of Funding

The work of the authors was supported by Canadian Institutes of Health Research grants 82790 and 102606, a Canada Research Chair on Hypertension and Vascular Research from Canadian Institutes of Health Research/Government of Canada, and the Canada Fund for Innovation (all to E.L.S.).

Disclosures

None.

References

- Paradis P, Schiffrin EL. Renin-angiotensin-aldosterone system and pathobiology of hypertension. In: DeMello WC, Frohlich ED, eds. *Renin Angiotensin System and Cardiovascular Disease*. Humana Press: New York, NY; 2009:35–57.
- Williams JS, Williams GH. 50th anniversary of aldosterone. *J Clin Endocrinol Metab*. 2003;88:2364–2372.
- Michea L, Delpiano AM, Hirschfeld C, Lobos L, Lavandro S, Marusic ET. Eplerenone blocks nongenomic effects of aldosterone on the Na⁺/H⁺ exchanger, intracellular Ca²⁺ levels, and vasoconstriction in mesenteric resistance vessels. *Endocrinology*. 2005;146:973–980.
- Romagni P, Rossi F, Guerin L, Quirini C, Santemma V. Aldosterone induces contraction of the resistance arteries in man. *Atherosclerosis*. 2003;166:345–349.
- Schmidt BM, Oehmer S, Delles C, Bratke R, Schneider MP, Klingbeil A, Fleischmann EH, Schmieder RE. Rapid nongenomic effects of aldosterone on human forearm vasculature. *Hypertension*. 2003;42:156–160.
- Wehling M, Spes CH, Win N, Janson CP, Schmidt BM, Theisen K, Christ M. Rapid cardiovascular action of aldosterone in man. *J Clin Endocrinol Metab*. 1998;83:3517–3522.
- Neves MF, Endemann D, Amiri F, Virdis A, Pu Q, Rozen R, Schiffrin EL. Small artery mechanics in hyperhomocysteinemic mice: effects of angiotensin II. *J Hypertens*. 2004;22:959–966.
- Rocha R, Martin-Berger CL, Yang P, Scherrer R, Delyani J, McMahon E. Selective aldosterone blockade prevents angiotensin II/salt-induced vascular inflammation in the rat heart. *Endocrinology*. 2002;143:4828–4836.
- Virdis A, Neves MF, Amiri F, Viel E, Touyz RM, Schiffrin EL. Spironolactone improves angiotensin-induced vascular changes and oxidative stress. *Hypertension*. 2002;40:504–510.
- Iglarz M, Touyz RM, Viel EC, Amiri F, Schiffrin EL. Involvement of oxidative stress in the profibrotic action of aldosterone: interaction with the renin-angiotensin system. *Am J Hypertens*. 2004;17:597–603.
- Lacolley P, Labat C, Pujol A, Delcayre C, Benetos A, Safar M. Increased carotid wall elastic modulus and fibronectin in aldosterone-salt-treated rats: effects of eplerenone. *Circulation*. 2002;106:2848–2853.
- Rocha R, Rudolph AE, Friedrich GE, Nachowiak DA, Kekceci BK, Blomme EA, McMahon E, Delyani JA. Aldosterone induces a vascular inflammatory phenotype in the rat heart. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2002;283:H1802–H1810.
- Leibovitz E, Ebrahimi T, Paradis P, Schiffrin EL. Aldosterone induces arterial stiffness in absence of oxidative stress and endothelial dysfunction. *J Hypertens*. 2009;27:2192–2200.
- Bu DX, Lichtman AH. T cells and blood vessels: costimulation turns up the pressure. *Circulation*. 2010;122:2495–2498.
- Harrison DG, Vinh A, Lob H, Madhur MS. Role of the adaptive immune system in hypertension. *Curr Opin Pharmacol*. 2010;10:203–207.
- Schiffrin EL. T lymphocytes: a role in hypertension? *Curr Opin Nephrol Hypertens*. 2010;19:181–186.

17. Verloren S, Muller DN, Luft FC, Dechend R. Immunology in hypertension, preeclampsia, and target-organ damage. *Hypertension*. 2009;54:439–443.
18. Akdis CA, Akdis M. Mechanisms and treatment of allergic disease in the big picture of regulatory T cells. *J Allergy Clin Immunol*. 2009;123:735–746.
19. Vignali DA, Collison LW, Workman CJ. How regulatory T cells work. *Nat Rev Immunol*. 2008;8:523–532.
20. Zhen Y, Zheng J, Zhao Y. Regulatory CD4+CD25+ T cells and macrophages: communication between two regulators of effector T cells. *Inflamm Res*. 2008;57:564–570.
21. Barhoumi T, Kasal DA, Li MW, Shbat L, Laurant P, Neves MF, Paradis P, Schiffrin EL. T regulatory lymphocytes prevent angiotensin II-induced hypertension and vascular injury. *Hypertension*. 2011;57:469–476.
22. Matrougui K, Zakaria AE, Kassan M, Choi S, Nair D, Gonzalez-Villalobos RA, Chentoufi AA, Kadowitz P, Belmadani S, Partyka M. Natural regulatory T cells control coronary arteriolar endothelial dysfunction in hypertensive mice. *Am J Pathol*. 2011;178:434–441.
23. Guzik TJ, Hoch NE, Brown KA, McCann LA, Rahman A, Dikalov S, Goronzy J, Weyand C, Harrison DG. Role of the T cell in the genesis of angiotensin II induced hypertension and vascular dysfunction. *J Exp Med*. 2007;204:2449–2460.
24. Herrada AA, Contreras FJ, Marini NP, Amador CA, Gonzalez PA, Cortes CM, Riedel CA, Carvajal CA, Figueroa F, Michea LF, Fardella CE, Kaleris AM. Aldosterone promotes autoimmune damage by enhancing Th17-mediated immunity. *J Immunol*. 2010;184:191–202.
25. De Ceuces C, Amiri F, Brassard P, Endemann DH, Touyz RM, Schiffrin EL. Reduced vascular remodeling, endothelial dysfunction, and oxidative stress in resistance arteries of angiotensin II-infused macrophage colony-stimulating factor-deficient mice: evidence for a role in inflammation in angiotensin-induced vascular injury. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2005;25:2106–2113.
26. Ko EA, Amiri F, Pandey NR, Javeshghani D, Leibovitz E, Touyz RM, Schiffrin EL. Resistance artery remodeling in deoxycorticosterone acetate-salt hypertension is dependent on vascular inflammation: evidence from m-CSF-deficient mice. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2007;292:H1789–H1795.
27. Kvakani H, Kleinewietfeld M, Qadri F, Park JK, Fischer R, Schwarz I, Rahn HP, Plehm R, Wellner M, Elitok S, Gratz P, Dechend R, Luft FC, Muller DN. Regulatory T cells ameliorate angiotensin II-induced cardiac damage. *Circulation*. 2009;119:2904–2912.
28. Hoch NE, Guzik TJ, Chen W, Deans T, Maalouf SA, Gratz P, Weyand C, Harrison DG. Regulation of T-cell function by endogenously produced angiotensin II. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2009;296:R208–R216.
29. Keidar S, Heinrich R, Kaplan M, Aviram M. Oxidative stress increases the expression of the angiotensin-II receptor type 1 in mouse peritoneal macrophages. *J Renin Angiotensin Aldosterone Syst*. 2002;3:24–30.
30. Keidar S, Kaplan M, Pavlotzky E, Coleman R, Hayek T, Hamoud S, Aviram M. Aldosterone administration to mice stimulates macrophage NADPH oxidase and increases atherosclerosis development: a possible role for angiotensin-converting enzyme and the receptors for angiotensin II and aldosterone. *Circulation*. 2004;109:2213–2220.
31. Paul M, Poyan MA, Kreutz R. Physiology of local renin-angiotensin systems. *Physiol Rev*. 2006;86:747–803.
32. Touyz RM. Molecular and cellular mechanisms in vascular injury in hypertension: role of angiotensin II. *Curr Opin Nephrol Hypertens*. 2005;14:125–131.
33. Platten M, Youssef S, Hur EM, Ho PP, Han MH, Lanz TV, Phillips LK, Goldstein MJ, Bhat R, Raine CS, Sobel RA, Steinman L. Blocking angiotensin-converting enzyme induces potent regulatory T cells and modulates TH1- and TH17-mediated autoimmunity. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009;106:14948–14953.



Hypertension

JOURNAL OF THE AMERICAN HEART ASSOCIATION

ONLINE SUPPLEMENT

T regulatory lymphocytes prevent aldosterone-induced vascular injury

Daniel A. Kasal^{1,3,*}, Tlili Barhoumi^{1,4,*}, Melissa W. Li¹, Naoki Yamamoto¹, Evguenia Zdanovich¹, Asia Rehman¹, Mario F. Neves³, Pascal Laurant⁴, Pierre Paradis¹, and Ernesto L. Schiffrin^{1,2}

¹Lady Davis Institute for Medical Research, and ²Department of Medicine, Sir Mortimer B. Davis-Jewish General Hospital, McGill University, Montreal, Canada; ³State University of Rio de Janeiro, Brazil; ⁴Université d'Avignon et des Pays de Vaucluse-Avignon, France

*Both authors contributed equally to this work.

Running title: Treg blunt aldosterone vascular effects

Correspondence to:

Ernesto L. Schiffrin MD, PhD
Sir Mortimer B. Davis-Jewish General Hospital, #B-127,
3755 Cote Ste-Catherine Road,
Montreal, Quebec, Canada H3T 1E2
Ph.: (514) 340-7538; Fax: (514) 340-7539
Email: ernesto.schiffrin@mcgill.ca
Http://www.ladydavis.ca/en/ernestoschiffrin

Expanded Methods

Isolation of Treg and CD4⁺CD25⁻ cells

CD4⁺CD25⁺ cells (Treg) were isolated from 2 spleens of 10 to 12-week old male C57BL/6 mice through CD4⁺ T cell negative selection followed by a CD25⁺ T cell positive selection of splenocytes as per manufacturer's instructions using the EasySep® Mouse CD4⁺ T Cell Pre-Enrichment and CD25 Positive Selection Kits (Stem Cell Technologies, Vancouver, BC, Canada). CD4⁺CD25⁻ cells not retained by the CD25⁺ positive selection were collected and used as control cells for the adoptive transfer. This produced enough cells for one injection of Treg and CD4⁺CD25⁻ cells. Purity of Treg and CD4⁺CD25⁻ cells was determined by flow cytometry as follows. Isolated cells (10⁴) were resuspended in PBS containing 2% fetal bovine serum (Fluorescence Activated Cell Sorting (FACS) Buffer). Cells were blocked with mouse BD Fc-Block™ (1:200, clone 2.4G2, BD Biosciences, Mississauga, ON, Canada) for 30 minutes at 4°C to avoid non-specific binding to mouse Fc-gamma receptors, stained for 1 hour at 4°C with APC-conjugated rat anti-mouse CD4 antibody (1:2000, clone RM4-5, BD Biosciences), and with PE-conjugated anti-mouse CD25 antibody using Mouse CD25 Positive Selection Kits (Stem Cell Technologies), washed with FACS Buffer, fixed and permeabilized using the Foxp3 Staining Buffer Set as per manufacturer's instructions (eBioscience, San Diego, CA), and stained with FITC-conjugated rat anti-mouse Foxp3 antibody (1:1000, clone FJK-16s, eBioscience) for 1 hour at 4°C. Cells were washed, resuspended with FACS Buffer, and analyzed using FACSCalibur™ flow cytometer (BD Biosciences) and FCS Express V3 software (De Novo Software, Los Angeles, CA).

Endothelial function and vessel mechanics

Second-order branches of the mesenteric arterial tree (internal diameter between 150–250µm) were dissected and mounted on a pressurized myograph as previously described.¹ Briefly, vessels were equilibrated for 60 min at 45mmHg intraluminal pressure in warmed Krebs solution (pH 7.4) containing (mmol/l): 120 NaCl, 25 NaHCO₃, 4.7 KCl, 1.18 KH₂PO₄, 1.18 MgSO₄, 2.5 CaCl₂, 0.026 EDTA and 5.5 glucose, bubbled with a mixture of 95% air–5% CO₂. Media and lumen diameters were measured by a computer-based video imaging system (Living Systems Instrumentation, Burlington, Virginia, USA). Endothelium-dependent and -independent relaxation was assessed by measuring the dilatory responses to cumulative doses of acetylcholine (ACh, 10⁻⁹ to 10⁻⁴ mol/L) or sodium nitroprusside (SNP, 10⁻⁸ to 10⁻⁴ mol/L), respectively, in vessels precontracted with norepinephrine (NE, 5 x 10⁻⁵ mol/L). To evaluate the contribution of nitric oxide (NO) to the vascular response, the dose-response curve to ACh was determined before and after a 30-minute preincubation with the NO synthase inhibitor N^o-nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME, 10⁻⁴ mol/L). Thereafter, vessels were perfused with Ca²⁺-free Krebs solution containing 10 mmol/l EGTA for 30 min to eliminate vascular tone. Media and lumen diameter were measured at 3, 10, 20, 30, 40, 45, 60, 80, 100, 120 and 140 mmHg intraluminal pressures. Media cross-sectional area, media/lumen ratio, and stress and strain were calculated as previously described.²

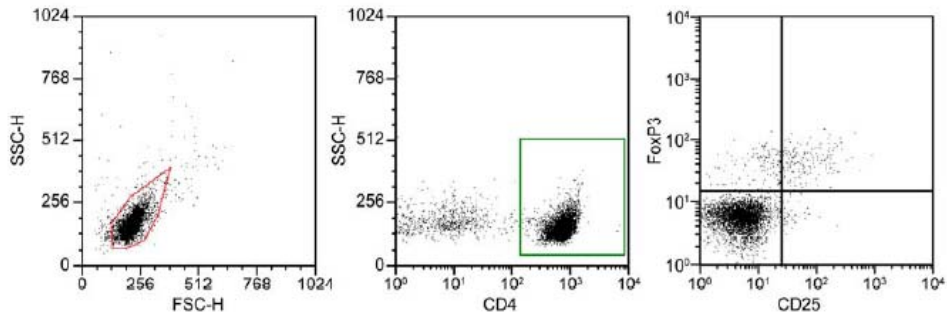
Immunofluorescence microscopy

Nox1, Nox2, Nox4 and VCAM-1 expression in the aorta and monocyte/macrophage (MOMA-2) and lymphocyte T (CD3) infiltration in the aorta and kidney and Treg (Foxp3) infiltration in the kidney were determined by immunofluorescence microscopy on 5- μ m-thick cryostat sections. Sections were air-dried for 30 min, and then fixed for 5 min in a mixture of acetone:methanol (1:1) at -20°C (for VCAM-1), in 4 % paraformaldehyde for 20 min at RT (for CD3, Foxp3, MOMA-2, Nox2, and Nox4) or in ice cold acetone for 10 min at RT (for Nox1). Thereafter, sections were washed with PBS containing 0.1 % Tween-20 (PBST) twice for 10 min followed by a wash with PBS. Sections were blocked with PBST containing 10% normal goat serum (for Nox1 and VCAM-1) or PBS containing 20% fetal bovine serum, 1% bovine serum albumin and 0.4% triton (for CD3, Foxp3, MOMA-2, Nox2 and Nox4), for 1 h at RT and then incubated with a rat anti-VCAM-1 (1:100, Abcam, Cambridge, MA), a rat anti-macrophage-specific antigen MOMA-2 (1:50, Abcam), a rabbit anti-CD3 polyclonal (1:200, Dako Canada, Burlington, ON, Canada), a rabbit anti-Foxp3 (1:500, Abcam), a goat anti-Nox1 (1:50, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA), a rabbit anti-Nox2 (1:50, kindly provided by Dr. Mark Quinn, University of Montana, MT), a rabbit anti-Nox4 (1:200, Abcam) antibodies in blocking solution overnight at 4°C. The sections were washed 3 times with PBST and incubated with Alexa Fluor® 555 goat anti-rat, Alexa Fluor® 488, 555 or 568 goat anti-rabbit or Alexa Fluor® 555 donkey anti-goat antibodies (1:400 for Nox4 and 1:200 for all the other antibodies, Invitrogen Corp., Carlsbad, CA, USA) and then washed 3 times with PBST and mounted with Vectashield® Hardset™ with DAPI (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA). Images were captured using a fluorescent microscope Leica DM2000 (Leica Microsystems, Richmond Hill, ON, Canada) and analyzed with Image J software (National Institute of Mental Health, Bethesda, Maryland).

References

1. Leibovitz E, Ebrahimian T, Paradis P, Schiffrin EL. Aldosterone induces arterial stiffness in absence of oxidative stress and endothelial dysfunction. *J Hypertens*. 2009;27:2192-2200.
2. Neves MF, Endemann D, Amiri F, Virdis A, Pu Q, Rozen R, Schiffrin EL. Small artery mechanics in hyperhomocysteinemic mice: effects of angiotensin II. *J Hypertens*. 2004;22:959-966.

CD4⁺CD25⁺ cells



T regulatory cells

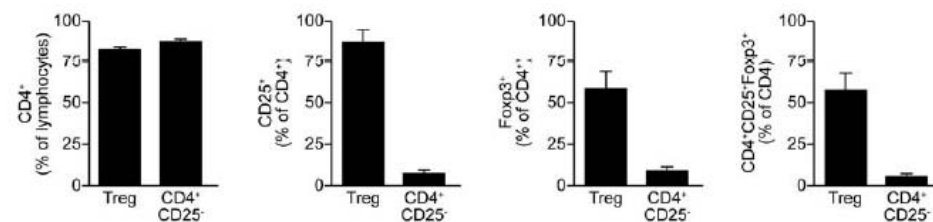
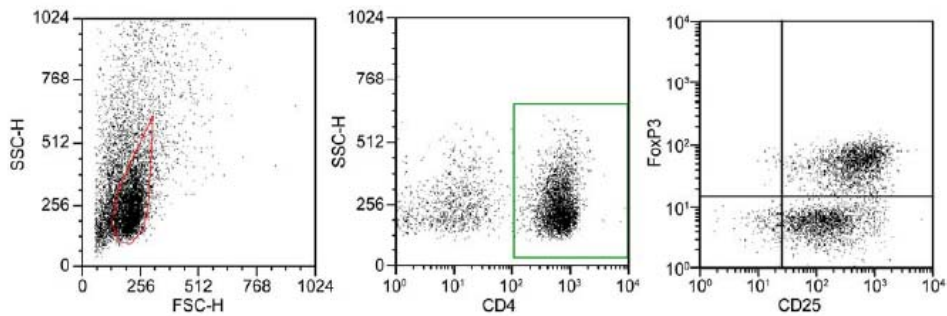


Figure S1. Flow cytometry profile of T regulatory lymphocytes (Treg) and CD4⁺CD25⁺ cells. Cells were separated using CD4⁺ T cell negative selection followed by CD25⁺ T cell positive selection of splenocytes, stained with APC-conjugated anti-mouse CD4, PE-conjugated anti-mouse CD25 and FITC-conjugated anti-mouse Foxp3 antibodies, and analyzed by flow cytometry. Cells were gated as lymphocytes in the Side Scatter (SSC)/Forward Scatter (FSC) plot, and lymphocytes were gated as CD4⁺ cells in the SSC/CD4 plot. Gated CD4⁺ cells were characterized for CD4⁺CD25⁺ (right panels), CD4⁺Foxp3⁺ (upper panels) and CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ (upper right panel) in the Foxp3/CD25 plot. Representative flow cytometry results are presented. The % of CD4⁺ cells in lymphocytes, % of CD25⁺ cells in CD4⁺ cells, % of Foxp3⁺ cells in CD4⁺ cells and % of CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ cells in CD4⁺ cells are presented. Data are means $\pm$ SD from three independent experiments.

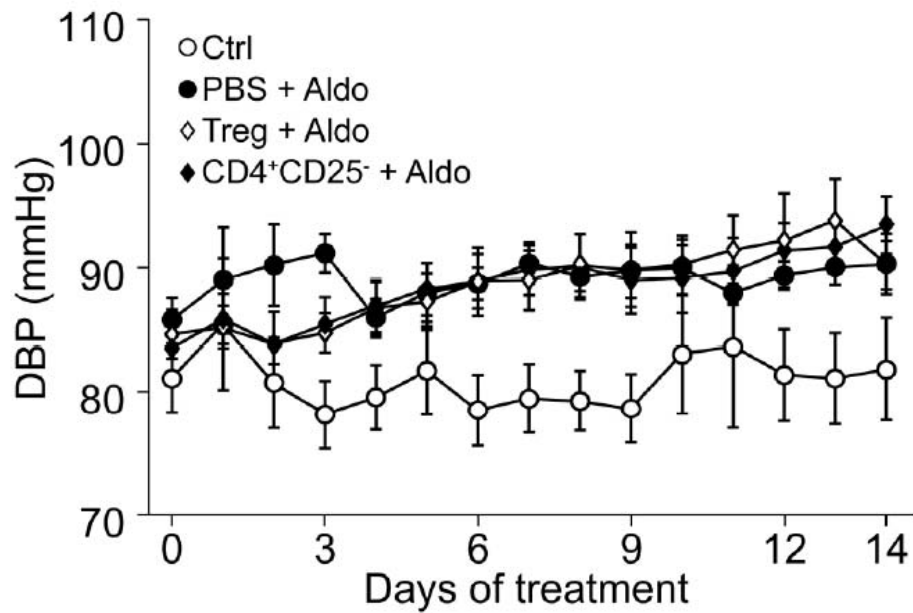


Figure S2. Diastolic blood pressure was not significantly changed by any of the treatments. Diastolic blood pressure (DBP) was determined by telemetry in control mice (Ctrl) and in mice infused with aldosterone (Aldo) and pretreated with PBS, Treg or CD4⁺CD25⁺ cells. Mean 24-h SBP data are presented. Data are presented as means $\pm$ SEM. n = 5-6 mice.

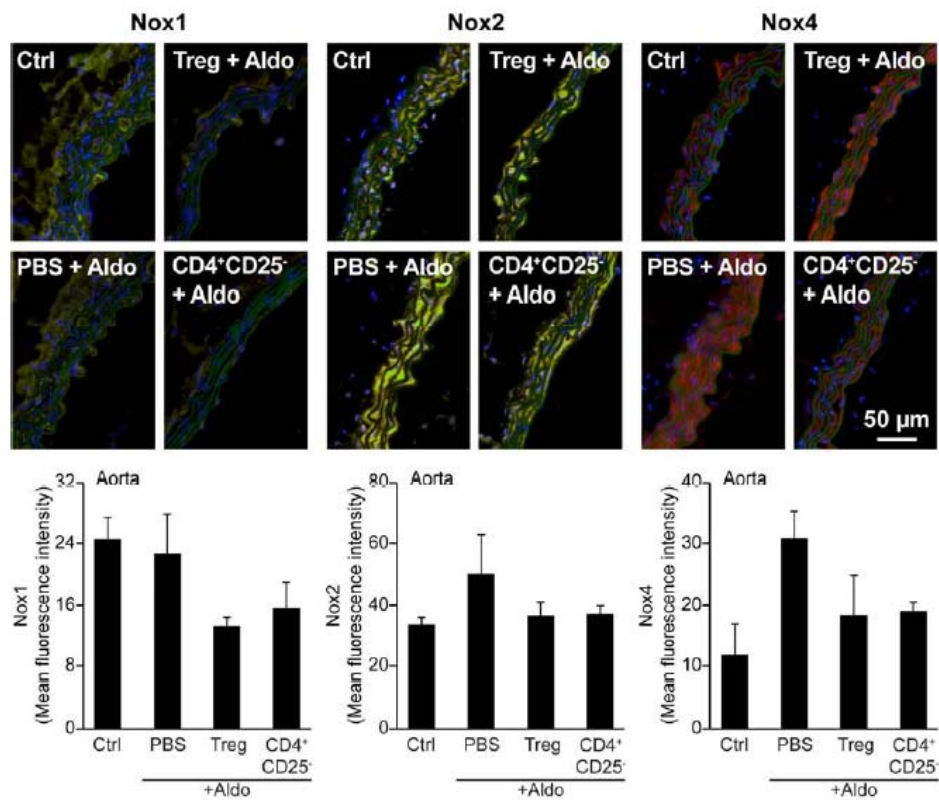


Figure S3. Nox1, Nox2 and Nox4 expression in aorta. Immunofluorescence was used to determine the expression level of Nox1 (in yellow), Nox2 (in yellow) and Nox4 (in red) in the aorta of control mice (Ctrl) and in mice infused with aldosterone (Aldo) and pretreated with PBS, Treg (CD4⁺CD25⁺) or CD4⁺CD25⁺ cells. Elastin autofluorescence and the nuclear stain DAPI are shown in green and blue, respectively. Representative elastin autofluorescence, DAPI nuclear staining and Nox immunofluorescence merged images are shown. Data are means $\pm$ SEM, n = 3.

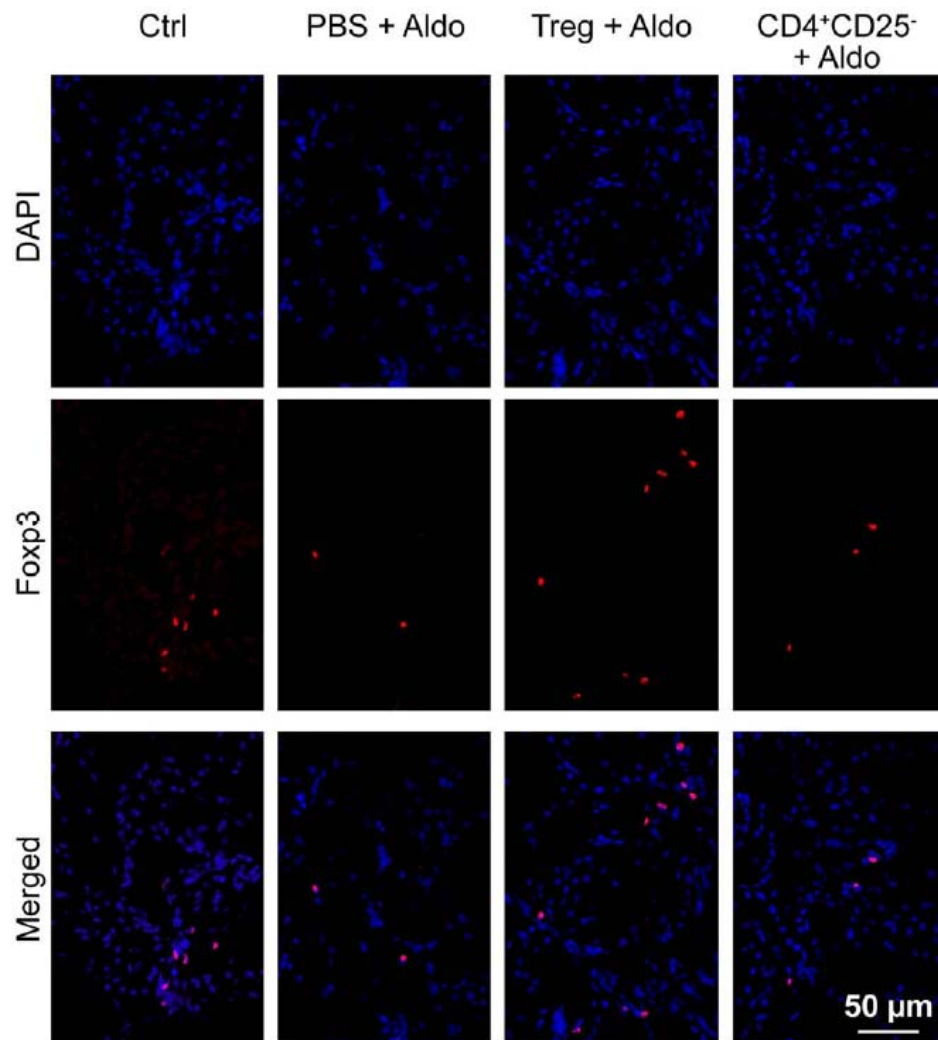


Figure S4. Adoptive transfer of Treg counteracts aldosterone-induced decrease in Treg infiltration in the renal cortex. Immunofluorescence (in red) was used to determine the number of Treg in renal cortex ($n = 4$) in control mice (Ctrl) and in mice infused with aldosterone (Aldo) and pretreated with PBS, Treg (CD4⁺CD25⁺) or CD4⁺CD25⁻ cells. DAPI nuclear staining is shown in blue. Representative DAPI nuclear staining, Foxp3 immunofluorescence and merged images are shown.

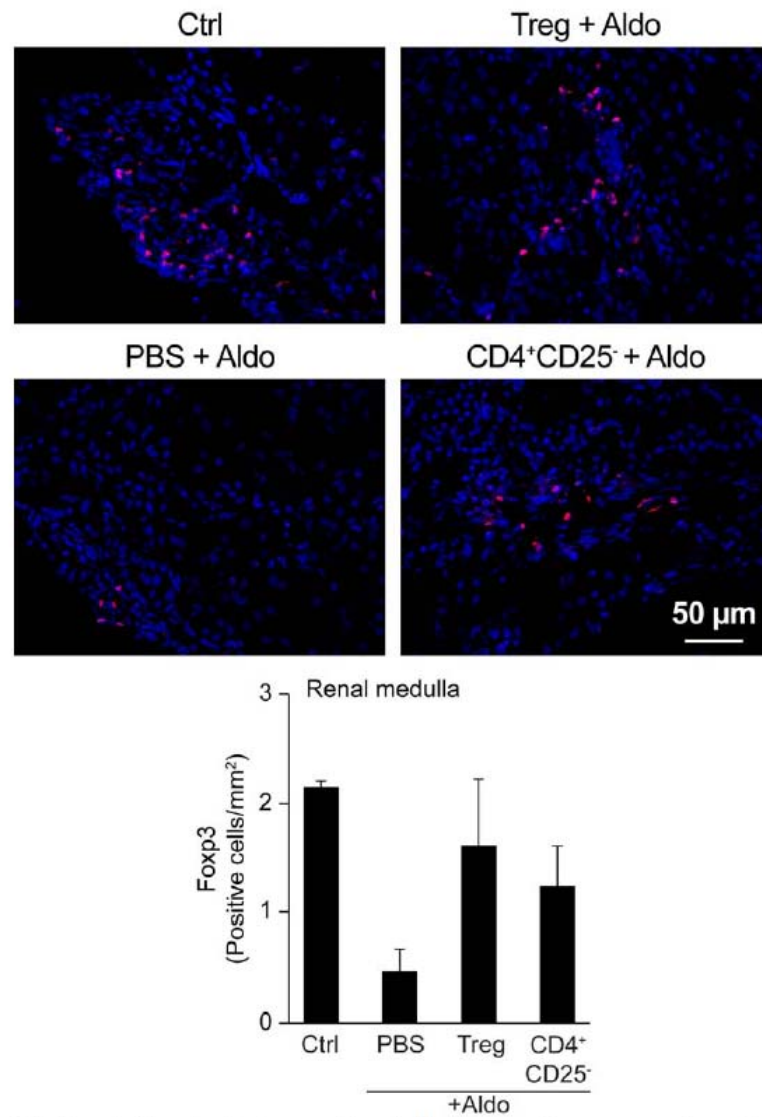


Figure S5. Treg infiltration in the renal medulla. Immunofluorescence (in red) was used to determine the number of Treg infiltration in the renal medulla in control mice (Ctrl) and in mice infused with aldosterone (Aldo) and pretreated with PBS, Treg (CD4⁺CD25⁺) or CD4⁺CD25⁺ cells. DAPI nuclear staining is shown in blue. Representative Foxp3 immunofluorescence and DAPI nuclear staining (in blue) merged images are shown. Data are means $\pm$ SEM, $n = 3-4$.

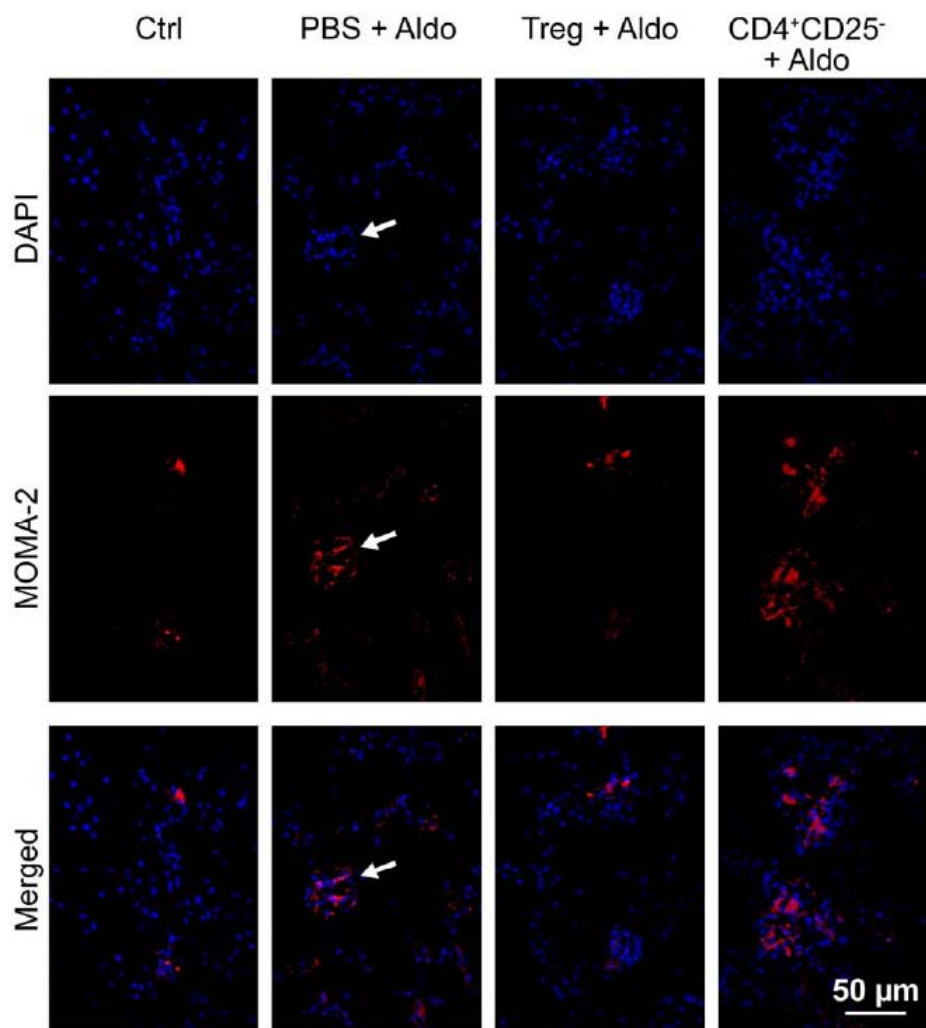


Figure S6. Aldosterone-induced monocyte/macrophage infiltration in the renal cortex was prevented by Treg adoptive transfer. Immunofluorescence (in red) was used to determine monocyte/macrophage infiltration in renal cortex ($n = 4$) in control mice (Ctrl) and in mice infused with aldosterone (Aldo) and pretreated with PBS, Treg ($CD4^+CD25^+$) or $CD4^+CD25^-$ cells. DAPI nuclear staining is shown in blue. Representative DAPI nuclear staining, MOMA-2 immunofluorescence and merged images are shown. The arrows pointed at the same glomerulus in the DAPI, MOMA-2 and Merged panels.

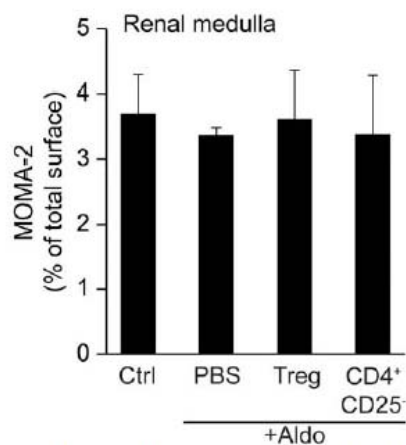
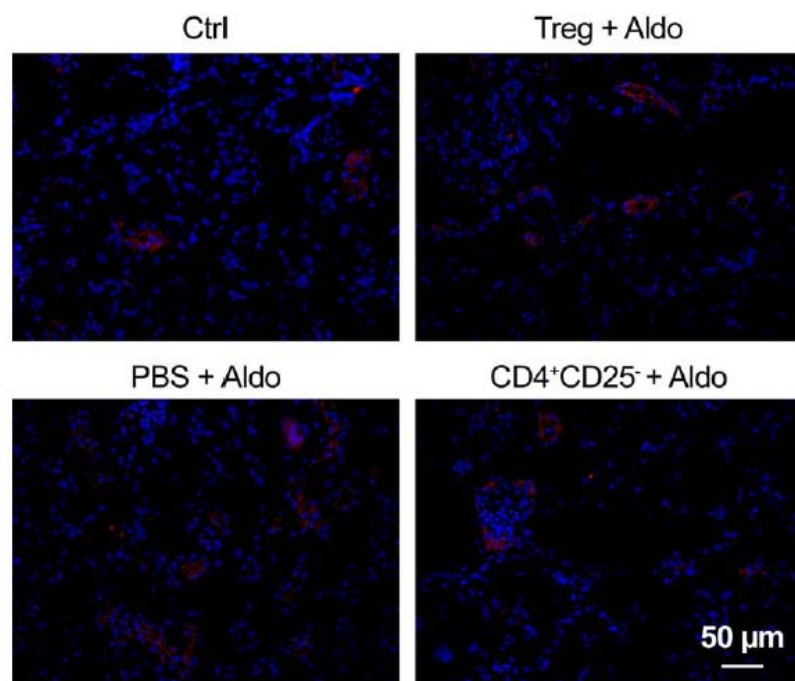


Figure S7. Monocyte/macrophage infiltration in the renal medulla. Immunofluorescence (in red) was used to determine the number of the monocyte/macrophage infiltration in the renal medulla in control mice (Ctrl) and in mice infused with aldosterone (Aldo) and pretreated with PBS, Treg (CD4⁺CD25⁺) or CD4⁺CD25⁻ cells. DAPI nuclear staining is shown in blue. Representative MOMA-2 immunofluorescence and DAPI nuclear staining (in blue) merged images are shown. Data are means $\pm$ SEM, n = 3-4.

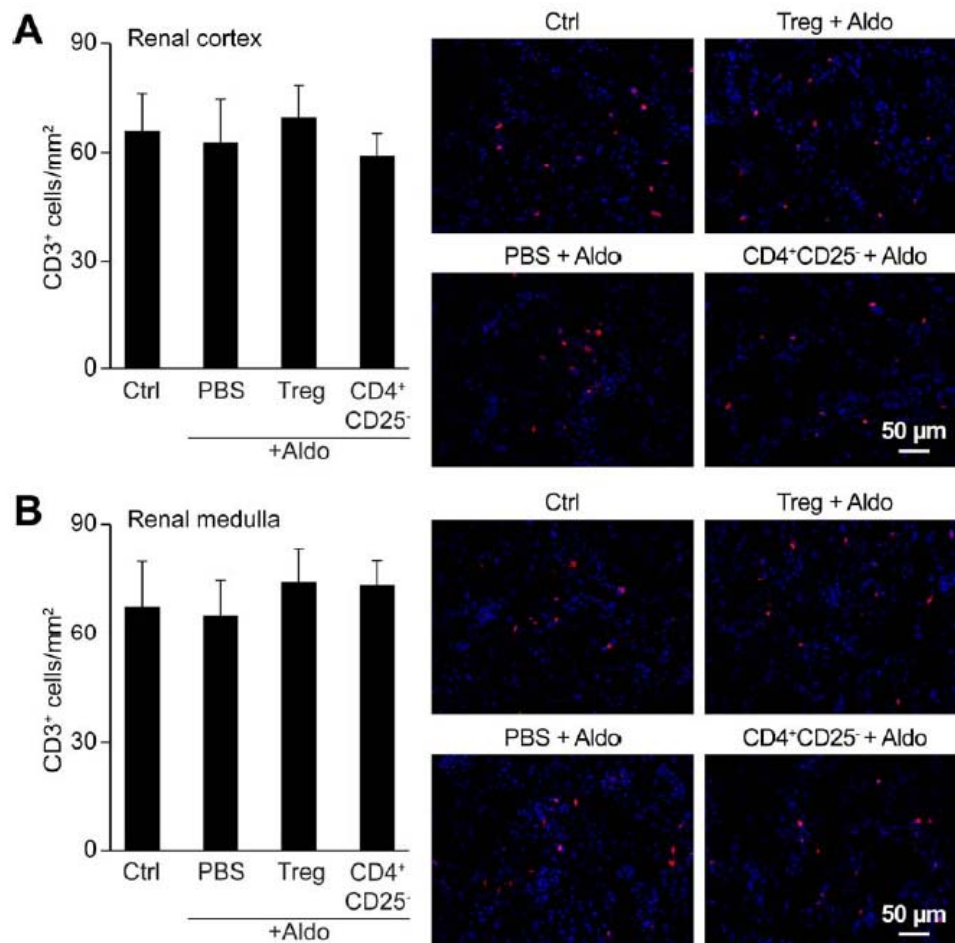


Figure S8. T lymphocyte infiltration in the kidney. Immunofluorescence (in red) was used to determine the number of T lymphocyte infiltrating the renal cortex (**A**) and medulla (**B**) in control mice (Ctrl) and in mice infused with aldosterone (Aldo) and pretreated with PBS, Treg (CD4⁺CD25⁺) or CD4⁺CD25⁻ cells. DAPI nuclear staining is shown in blue. Representative DAPI nuclear staining and Fop3 immunofluorescence merged images are shown. Data are means $\pm$ SEM, n = 3-4.

4. Discussion et conclusion

Notre étude montre que le transfert adoptif des Treg réduit partiellement l'élévation modeste de la pression artérielle et prévient le dommage vasculaire ainsi que l'infiltration des macrophages et lymphocytes T induites par l'Aldo. Ceci confirme notre hypothèse selon laquelle le transfert adoptif des Treg (CD4+CD25+) empêche l'augmentation de la pression artérielle, la dysfonction endothéliale, le remodelage vasculaire, le stress oxydatif et l'inflammation chez des souris traitées par l'Aldo. Ces résultats permettent d'étendre l'importance du rôle de l'immunité innée et acquise dans l'HTA et les altérations vasculaires induites par le SRAA.

Comme nous l'avons précédemment démontré dans notre étude sur l'Ang II, le transfert adoptif des Treg empêche l'infiltration aortique et rénale des monocytes/macrophages et de cellules T induites par l'Aldo. Ceci suggère que l'activation du SRAA pourrait activer le système immunitaire acquis, au moins en partie, en diminuant le nombre des Treg et donc la réduction de leurs effets suppresseurs.

La dysfonction endothéliale, le remodelage vasculaire et l'inflammation induite par l'Aldo sont médiés, au moins en partie, par la production du stress oxydatif qui pourrait être associé du moins en partie, à l'infiltration des macrophages et des cellules T. Le transfert adoptif des Treg prévient l'augmentation du stress oxydatif et l'infiltration des cellules immunitaires.

Nous avons également observé que l'Aldo augmente la production d'anions superoxyde dans les CMVL. La production des anions suproxyde, par l'infiltration des macrophages et des cellules T au (CMVL), est en mesure d'atteindre et de réagir avec le NO dérivé de l'endothélium et de contribuer à la dysfonction endothéliale.

Dans notre étude précédente, nous avons émis comme hypothèse que le rein pourrait représenter l'un des sites d'action des Treg impliqués dans la régulation de la pression artérielle induite par l'inflammation. Nous avons fait le constat que l'Aldo diminue le nombre des Treg et augmente l'infiltration des monocytes/macrophages dans

le cortex rénal. Ces effets sont inversés par les Treg. Du fait que l'Aldo induise seulement une augmentation modeste de la pression artérielle, on pourrait conclure que le rein soit l'un des sites d'action des Treg jouant un rôle important dans la régulation de l'inflammation, au-delà de la régulation de la pression artérielle.

L'Aldo entraîne une augmentation de la pression artérielle systolique, une altération de la fonction endothéliale (réduction de la vasodilatation en réponse à l'acétylcholine), un remodelage vasculaire hypertrophique, un stress oxydatif et une infiltration aortique et rénale des macrophages. Cet effet disparaît par le transfert adoptif des Treg. L'information supplémentaire que cette étude apporte, comparativement aux autres études réalisées sur l'Ang II, est que le transfert adoptif des Teff exacerbe la plupart des effets de l'Aldo.

DISCUSSION GÉNÉRALE ET CONCLUSION

L'HTA est une pathologie responsable de complications cardiovasculaires et cérébrales. Elle est souvent associée aux désordres vasculaires notamment la dysfonction endothéliale, le remodelage vasculaire, l'inflammation et le stress oxydatif. La sédentarité et l'alimentation excessive sont associées fréquemment à l'HTA. En effet, cette pathologie est présente souvent chez les obèses et les diabétiques. D'ailleurs, l'exercice physique a toujours été recommandé comme moyen de prévention.

Les mécanismes impliqués dans le développement de l'HTA induite par le traitement à la r-HuEPO, dans l'IRC, sont toujours non identifiés. Cependant, la dysfonction endothéliale, le déséquilibre ET-1/NO, le stress oxydatif et l'inflammation restent toujours des éléments clés dans ce processus. En plus de la rigidité artérielle, la cascade stress oxydatif/inflammation est une étape cruciale dans les désordres vasculaires et l'HTA induite soit par un traitement comme la r-HuEPO ou soit par la stimulation du SRAA. Plusieurs progrès ont été réalisés dans le traitement de l'HTA par des médicaments antihypertenseurs à base d'inhibiteurs des différentes composantes du SRAA ou par des moyens thérapeutiques ou préventifs comme l'exercice physique. L'implication du système immunitaire dans la physiopathologie de l'HTA, est de plus en plus importante. Ainsi, le développement de thérapies pour l'HTA, par des moyens immunitaires, peut constituer l'originalité majeure dans ce domaine. Dans notre travail nous avons étudié la physiopathologie des désordres vasculaires induits par la r-HuEPO et le SRAA, et l'effet de l'exercice ou du transfert adoptif des Treg comme éléments de prévention ou thérapeutiques

Dans notre première étude, nous avons montré que la r-HuEPO inhibe la vasodilatation induite par le flux ou les contraintes de cisaillement (*shear stress*). La vasodilatation flux-dépendante des artères mésentériques est totalement inhibée en présence de L-NAME parallèlement à un niveau de *shear stress* très élevé. En présence de L-NAME, la r-HuEPO induit un effet inverse caractérisé par une vasoconstriction paradoxale, associée à une élévation prononcée du *shear stress*. Dans cette étude, nous

avons aussi démontré que l'effet inhibiteur de la r-HuEPO sur la vasodilatation induite par l'écoulement, était médié par une augmentation de la production d'ET-1. De plus, l'absence de NO exacerbe la vasoconstriction ET-1-dépendante, en présence de la r-HuEPO.

Indépendamment du *shear stress*, ce travail, en accord avec d'autres (Boulanger et Luscher 1990) montrent clairement que l'absence de NO augmente la production endothéliale de l'ET-1. L'exposition à la r-HuEPO provoque une augmentation de la production endothéliale d'ET-1 d'une manière flux-dépendante. Ceci suggère que, en condition expérimentale, où la sécrétion basale de NO est présente, l'artère est capable de maintenir une vasodilatation flux-dépendante en présence de r-HuEPO, bien que la production d'ET-1 soit stimulée par la r-HuEPO. L'effet vasodilatateur NO-dépendant contrebalance ou s'oppose à un effet vasoconstricteur. En présence de la r-HuEPO et de L-NAME, l'élévation du débit de perfusion, en stimulant les forces de cisaillement à la surface endothéliale, provoque en retour un effet vasoconstricteur induit localement par l'ET-1.

En fait, la présence de NO est nécessaire pour contrebalancer l'effet vasoconstricteur de l'ET-1. Par ailleurs, la présence de NO est aussi nécessaire pour moduler la sensibilité aux récepteurs de l'ET-1 au niveau des CMLV, puisque la réponse vasoconstrictrice à l'ET-1 des artères perfusées et incubées avec la r-HuEPO a été exacerbée seulement en présence de L-NAME. L'équilibre fonctionnel vasomoteur, entre ces deux substances vasoactives, NO et ET-1 est donc essentiel pour déterminer le niveau du tonus vasomoteur dont un des éléments de régulation essentiels sont les forces de cisaillement en réponse à l'élévation de la vitesse de l'écoulement sanguin.

Le NO joue un rôle important dans le contrôle de la synthèse et/ou la sécrétion d'ET-1 (Bode-Boger et al. 1996; Quaschnig et al. 2003). En présence de la r-HuEPO, il est suggéré que le rapport ET-1/NO peut être déséquilibré en faveur de l'ET-1, ceci pourrait prendre un sens pathologique en présence d'une dysfonction endothéliale et un défaut de synthèse ou de biodisponibilité du NO, démasquant ainsi la réponse

vasoconstrictrice à l'ET-1, conduisant à une élévation du tonus vasculaire et conséquemment, de la pression artérielle (Shimada et al. 2003).

Notre étude in vivo a confirmé encore que le déséquilibre du rapport ET-1/NO en faveur de l'ET-1 est à l'origine de l'HTA et des désordres vasculaires induits. On a montré pour la première fois que le traitement avec la r-HuEPO, lorsqu'il est associé à une sur-expression de l'ET-1 (souris transgéniques sur-exprimant l'ET-1 endothéliale), augmente la PAS. Il exacerbe la dysfonction endothéliale et le remodelage vasculaire des artères de résistance, augmente la concentration plasmatique d'ET-1, le stress oxydatif et l'inflammation. L'exercice d'endurance prévient ces effets délétères. Ceci montre que l'état hypertensif associé à un traitement r-HuEPO est lié à une anomalie de la production d'ET-1 d'origine vasculaire. L'exercice est capable de prévenir les altérations cardiovasculaires induites par l'association r-HuEPO/ET-1.

Ces résultats confirment ceux d'autres travaux, qui ont montrés que l'effet délétère de la r-HuEPO apparaît dans les modèles qui présentent une dysfonction endothéliale altérée avec une inhibition de la biosynthèse de NO et une exagération du système des ET-1 (Meziri et al. 2011; Quaschnig et al. 2003; Ruschitzka et al. 2000; Vogel et al. 2003). Par contre, en présence de NO ou d'une sur-expression des récepteurs ETB de l'ET-1 (Rodrigue et al. 2008), l'effet délétère (HTA, vasoconstriction périphérique) de la r-HuEPO n'apparaît pas.

On sait que l'ET-1 est pro-inflammatoire et pro-oxydant (Schiffrin 2010). De plus, en présence d'une dysfonction endothéliale, la r-HuEPO semble exercer un effet permissif sur l'activité de l'ET-1 (Larivière et Lebel 2003). L'infiltration des macrophages et des lymphocytes T dans l'adventice et le tissu péri-vasculaire contribuent probablement, avec l'augmentation de l'activité de la NADPH oxydase, à la production des ROS et d'anions superoxydes qui réagissent avec le NO dérivé de l'endothélium, pour en abaisser sa biodisponibilité et contribuer à la dysfonction endothéliale (Touyz 2005).

Dans notre étude, l'effet de l'exercice régulier de nage confirme les résultats d'autres études qui ont montré les effets bénéfiques de l'exercice à intensité faible ou

moyenne. Ce type d'exercice permet de maintenir la fonction endothéliale (augmentation de la production et de la biodisponibilité du NO, augmentation de l'activité et de l'expression de l'eNOS, amélioration de la vasodilatation NO-dépendante en réponse à l'acétylcholine et au flux, diminution de la rigidité artérielle et de la résistance vasculaire périphérique). Il diminue aussi l'expression de la NADPH oxydase vasculaire et améliore la voie Akt/eNOS phosphorylée (Adams et al. 2005; Kuru et al. 2009; Marcus and Tipton 1985; Meziri et al. 2011; Sonnenschein et al. 2011; Tipton et al. 1991; Touati et al. 2011).

L'effet bénéfique de l'exercice sur le système immunitaire est caractérisé par la diminution de l'infiltration rénale et aortique des macrophages et l'augmentation de celle des cellules T régulatrices (CD4+CD25+Foxp3) dans le rein et la rate des souris eET-1 traitées avec l'r-HuEPO. Ceci montre que les Treg pourraient contribuer aux effets bénéfiques de l'exercice sur la pression artérielle et les désordres vasculaires induits par le traitement à l'r-HuEPO. Ces résultats confirment également ceux qui suggèrent, d'une part, que le système immunitaire joue un rôle essentiel dans la pathogenèse de l'HTA et des maladies cardiovasculaire (Ait-Oufella et al. 2006; Galkina et al. 2007; Taleb et al. 2008b; Valaperti et al. 2008b), et d'autre part, que les lymphocytes T influencent la pression artérielle (Guzik et al. 2007). Ceci suggère aussi que les Treg pourraient être un élément crucial dans la régulation des maladies de la paroi artérielle. D'ailleurs, il a été démontré que ces cellules sont des inhibiteurs puissants de l'athérosclérose chez plusieurs modèles de souris (Ait-Oufella et al. 2006).

Plusieurs études ont montré que l'exercice physique entraîne des modifications considérables sur le système immunitaire (MacNeil et Hoffman-Goetz 1993; Nieman et al. 1993; Pedersen et Hoffman-Goetz 2000; Pedersen et al. 1989). Nos résultats suggèrent que l'exercice, via l'inhibition de l'infiltration des macrophages et la stimulation de celle des Treg, contribue probablement à protéger le système artériel contre les désordres vasculaires à l'origine de l'HTA et de l'athéro-thrombogénèse induits par l'r-HuEPO.

Par ailleurs, il est clairement démontré que l'exercice empêche ces effets grâce à des propriétés anti-inflammatoires, antioxydantes et probablement par un effet

immunitaire, notamment par l'augmentation du nombre des cellules Treg qui pourrait être l'un des facteurs responsables des effets bénéfiques de l'exercice. Récemment, l'immunité innée et acquise ont été identifiées comme jouant un rôle dans les maladies cardio-vasculaires et l'HTA (Harrison et al. 2010; Schiffrin 2010). Les résultats de notre deuxième partie d'étude montrent que le transfert adoptif des Treg prévient l'HTA induite par l'Ang II ainsi que la dysfonction endothéliale (l'altération de la vasodilatation endothélium-dépendante et la rigidité des artères mésentériques). Il prévient aussi l'infiltration des macrophages et monocytes dans l'aorte et le cortex rénal et diminue le taux des cytokines plasmatiques pro-inflammatoires (INF- γ , TNF- α et IL-6). Ce processus pourrait contribuer à la diminution du stress oxydatif induit par l'Ang II chez les souris recevant les Treg.

L'HTA induite par l'Ang II est associée à une diminution des Treg et une augmentation des monocytes/macrophages dans le cortex rénal. Dans notre étude, le transfert adoptif des Treg était accompagné par une augmentation de ces cellules dans le cortex rénal. Bien que cela n'ait pas entraîné une diminution significative de l'infiltration rénale des macrophages, ce transfert pourrait être à l'origine de la diminution du taux de l'inflammation, des lésions rénales et de la pression artérielle.

L'Aldostérone (dernière composante du SRAA) entraîne une augmentation de la PAS, une altération de la fonction endothéliale (réduction de la vasodilatation en réponse à l'acétylcholine), un remodelage vasculaire hypertrophique, un stress oxydatif et une infiltration aortique et rénale des macrophages. Tous ces effets disparaissent avec le transfert adoptif des Treg. L'information supplémentaire que cette étude apporte, comparativement à l'étude réalisée sur l'Ang II, est que le transfert adoptif des T effecteurs exacerbe la plupart des effets de l'Aldo. Ces résultats et autres (Platten et al. 2009) montrent que l'activation du SRAA pourrait déclencher, au moins en partie, le système immunitaire adaptatif, en diminuant le nombre des Treg et donc la réduction de leurs effets suppresseurs. Le transfert adoptif des Treg restaure cette déficience.

L'ensemble de notre travail montre que l'exercice physique et le transfert adoptif des Treg pourrait être des éléments essentiels, au moins en partie, dans la prévention et/ou le traitement de l'HTA et les désordres cardiovasculaires induits. Ces deux types de thérapies se focalisent sur une nouvelle cible pathologique: l'inflammation vasculaire (Chiasson et al. 2011; Hopps et al. 2011; Ploeger et al. 2009; Randolph et Fathman 2006). D'autres expériences seront nécessaires pour mieux comprendre les effets directs des Treg sur le système vasculaire et les mécanismes exacts par lesquels ils agissent pour prévenir ou traiter les déséquilibres immunitaires et inflammatoires impliqués dans l'HTA. Il est tout aussi important d'évaluer l'effet du transfert adoptif des Treg au cours de l'HTA, en analysant les paramètres inflammatoires sur plusieurs points de traitement. Ceci permettrait un meilleur ciblage de l'effet thérapeutique direct et des mécanismes impliqués. D'autre part, il faudrait se poser la question suivante: pourquoi l'exercice augmente l'infiltration et la mobilisation des Treg au niveau tissulaire? Est-ce là l'un des effets bénéfiques de l'exercice sur le système immunitaire (Wilson et al. 2009)? Ou est-ce un élément essentiel impliqué dans la prévention de l'HTA, médié par l'exercice.

Enfin, il reste à dire que garder une homéostasie fonctionnelle équilibrée est très importante pour éviter la pathogénèse cardiovasculaire. Les désordres vasculaires sont en étroite relation avec les processus inflammatoire et immunitaire. Il serait important et original de développer deux approches thérapeutiques anti-inflammatoires: l'une à partir de l'exercice et l'autre à partir du transfert adoptif des Treg.

BIBLIOGRAPHIE

Reference List

- Abbruzzese, T.A., Guzman, R.J., Martin, R.L., Yee, C., Zarins, C.K., Dalman, R.L. 1998. Matrix metalloproteinase inhibition limits arterial enlargements in a rodent arteriovenous fistula model. *Surgery* **124**(124): 328-334. doi:S0039606098002633 [pii]
- Abiose, A.K., Mansoor, G.A., Barry, M., Soucier, R., Nair, C.K., Hager, D. 2004. Effect of spironolactone on endothelial function in patients with congestive heart failure on conventional medical therapy. *Am. J. Cardiol.* **93**(93): 1564-1566. doi:10.1016/j.amjcard.2004.03.015 [doi];S0002914904003765 [pii]
- Abraham, P.A., Macres, M.G. 1991. Blood pressure in hemodialysis patients during amelioration of anemia with erythropoietin. *J. Am. Soc. Nephrol.* **2**(2): 927-936
- Adams, V., Linke, A., Krankel, N., Erbs, S., Gielen, S., Mobius-Winkler, S., Gummert, J.F., Mohr, F.W., Schuler, G., Hambrecht, R. 2005b. Impact of regular physical activity on the NAD(P)H oxidase and angiotensin receptor system in patients with coronary artery disease. *Circulation* **111**(111): 555-562. doi:111/5/555 [pii];10.1161/01.CIR.0000154560.88933.7E [doi]
- Ait-Oufella, H., Salomon, B.L., Potteaux, S., Robertson, A.K., Gourdy, P., Zoll, J., Merval, R., Esposito, B., Cohen, J.L., Fisson, S., Flavell, R.A., Hansson, G.K., Klatzmann, D., Tedgui, A., Mallat, Z. 2006. Natural regulatory T cells control the development of atherosclerosis in mice. *Nat. Med.* **12**(12): 178-180. doi:nm1343 [pii];10.1038/nm1343 [doi]
- Akimoto, T., Kusano, E., Ito, C., Yanagiba, S., Inoue, M., Amemiya, M., Ando, Y., Asano, Y. 2001. Involvement of erythropoietin-induced cytosolic free calcium mobilization in activation of mitogen-activated protein kinase and DNA synthesis in vascular smooth muscle cells. *J. Hypertens.* **19**(19): 193-202
- Alreja, G., Joseph, J. 2011. Renin and cardiovascular disease: Worn-out path, or new direction. *World J. Cardiol.* **3**(3): 72-83. doi:10.4330/wjc.v3.i3.72 [doi]
- Amiri, F., Paradis, P., Reudelhuber, T.L., Schiffrin, E.L. 2008. Vascular inflammation in absence of blood pressure elevation in transgenic murine model overexpressing endothelin-1 in endothelial cells. *J. Hypertens.* **26**(26): 1102-1109. doi:10.1097/HJH.0b013e3282fc2184 [doi];00004872-200806000-00009 [pii]
- Amiri, F., Virdis, A., Neves, M.F., Iglarz, M., Seidah, N.G., Touyz, R.M., Reudelhuber, T.L., Schiffrin, E.L. 2004. Endothelium-restricted overexpression of human endothelin-1 causes vascular remodeling and endothelial dysfunction. *Circulation*

- 110**(110): 2233-2240. doi:01.CIR.0000144462.08345.B9 [pii];10.1161/01.CIR.0000144462.08345.B9 [doi]
- Ammarguella, F., Gogusev, J., Drueke, T.B. 1996. Direct effect of erythropoietin on rat vascular smooth-muscle cell via a putative erythropoietin receptor. *Nephrol. Dial. Transplant.* **11**(11): 687-692
- Anagnostou, A., Liu, Z., Steiner, M., Chin, K., Lee, E.S., Kessimian, N., Noguchi, C.T. 1994b. Erythropoietin receptor mRNA expression in human endothelial cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **91**(91): 3974-3978. PMID:PMC43705.
- Applegate, W.B., Miller, S.T., Elam, J.T., Cushman, W.C., el, D.D., Brewer, A., Graney, M.J. 1992. Nonpharmacologic intervention to reduce blood pressure in older patients with mild hypertension. *Arch. Intern. Med.* **152**(152): 1162-1166
- Atlas, S.A. 2007. The renin-angiotensin aldosterone system: pathophysiological role and pharmacologic inhibition. *J. Manag. Care Pharm.* **13**(13): 9-20. doi:2007(13)8: 9-20 [pii]
- Aubin, M.C., Carrier, M., Shi, Y.F., Tardif, J.C., Perrault, L.P. 2006. Role of probucol on endothelial dysfunction of epicardial coronary arteries associated with left ventricular hypertrophy. *J Cardiovasc Pharmacol.* **47**(5):702-10.
- Awano, S., Dawson, L.A., Hunter, A.R., Turner, A.J., Usmani, B.A. 2006. Endothelin system in oral squamous carcinoma cells: specific siRNA targeting of ECE-1 blocks cell proliferation. *Int. J. Cancer* **118**(118): 1645-1652. doi:10.1002/ijc.21525 [doi]
- Balducci, S., Zanuso, S., Nicolucci, A., Fernando, F., Cavallo, S., Cardelli, P., Fallucca, S., Alessi, E., Letizia, C., Jimenez, A., Fallucca, F., Pugliese, G. 2010b. Anti-inflammatory effect of exercise training in subjects with type 2 diabetes and the metabolic syndrome is dependent on exercise modalities and independent of weight loss. *Nutr. Metab Cardiovasc. Dis.* **20**(20): 608-617. doi:S0939-4753(09)00107-0 [pii];10.1016/j.numecd.2009.04.015 [doi]
- Barhoumi, T., Kasal, D.A., Li, M.W., Shbat, L., Laurant, P., Neves, M.F., Paradis, P., Schiffrin, E.L. 2011. T regulatory lymphocytes prevent angiotensin II-induced hypertension and vascular injury. *Hypertension* **57**(57): 469-476. doi:HYPERTENSIONAHA.110.162941 [pii];10.1161/HYPERTENSIONAHA.110.162941 [doi]
- Barrett, J.D., Zhang, Z., Zhu, J.H., Lee, D.B., Ward, H.J., Jamgotchian, N., Hu, M.S., Fredal, A., Giordani, M., Eggena, P. 1998. Erythropoietin upregulates angiotensin

- receptors in cultured rat vascular smooth muscle cells. *J. Hypertens.* **16**(16): 1749-1757
- Barton, C.H., Ni, Z., Vaziri, N.D. 2001. Enhanced nitric oxide inactivation in aortic coarctation-induced hypertension. *Kidney Int.* **60**(60): 1083-1087. doi:kid904 [pii];10.1046/j.1523-1755.2001.0600031083.x [doi]
- Barton, M., Vos, I., Shaw, S., Boer, P., D'Uscio, L.V., Grone, H.J., Rabelink, T.J., Lattmann, T., Moreau, P., Luscher, T.F. 2000. Dysfunctional renal nitric oxide synthase as a determinant of salt-sensitive hypertension: mechanisms of renal artery endothelial dysfunction and role of endothelin for vascular hypertrophy and Glomerulosclerosis. *J. Am. Soc. Nephrol.* **11**(11): 835-845
- Basile, J. 2009. New therapeutic options in patients prone to hypertension: a focus on direct Renin inhibition and aldosterone blockade. *Am. J. Med. Sci.* **337**(337): 438-444. doi:10.1097/MAJ.0b013e31819b3a80 [doi]
- Beck, E.B., Erbs, S., Mobius-Winkle, S., Adams, V., Woitek, F.J., Walther, T., Hambrecht, R., Mohr, F.W., Stumvoll, M., Bluher, M., Schuler, G., Linke, A. 2011. Exercise training restores the endothelial response to vascular growth factors in patients with stable coronary artery disease. *Eur. J. Cardiovasc. Prev. Rehabil.* doi:1741826711403068 [pii];10.1177/1741826711403068 [doi]
- Belaidi, E., Godin-Ribuot, D. 2010. [The endothelin system: its involvement in the cardiovascular system]. *Rev. Med. Interne* **31**(31): 792-794. doi:S0248-8663(10)00527-8 [pii];10.1016/j.revmed.2009.11.011 [doi]
- Beleslin-Cokic, B.B., Cokic, V.P., Yu, X., Weksler, B.B., Schechter, A.N., Noguchi, C.T. 2004. Erythropoietin and hypoxia stimulate erythropoietin receptor and nitric oxide production by endothelial cells. *Blood* **104**(104): 2073-2080. doi:10.1182/blood-2004-02-0744 [doi];2004-02-0744 [pii]
- Benetos, A., Lacolley, P., Safar, M.E. 1997. Prevention of aortic fibrosis by spirinolactone in spontaneously hypertensive rats. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **17**(17): 1152-1156
- Berglund, B., Ekblom, B. 1991. Effect of recombinant human erythropoietin treatment on blood pressure and some haematological parameters in healthy men. *J. Intern. Med.* **229**(229): 125-130
- Berthon, N., Laurant, P., Fellmann, D., Berthelot, A. 2003. Effect of magnesium on mRNA expression and production of endothelin-1 in DOCA-salt hypertensive rats. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* **42**(42): 24-31

- Besarab, A., Bolton, W.K., Browne, J.K., Egrie, J.C., Nissenson, A.R., Okamoto, D.M., Schwab, S.J., Goodkin, D.A. 1998. The effects of normal as compared with low hematocrit values in patients with cardiac disease who are receiving hemodialysis and epoetin. *N. Engl. J. Med.* **339**(339): 584-590. doi:10.1056/NEJM199808273390903 [doi]
- Bevilacqua, M.P., Stengelin, S., Gimbrone, M.A., Jr., Seed, B. 1989. Endothelial leukocyte adhesion molecule 1: an inducible receptor for neutrophils related to complement regulatory proteins and lectins. *Science* **243**(243): 1160-1165
- Blacher, J., Amah, G., Girerd, X., Kheder, A., Ben, M.H., London, G.M., Safar, M.E. 1997. Association between increased plasma levels of aldosterone and decreased systemic arterial compliance in subjects with essential hypertension. *Am. J. Hypertens.* **10**(10): 1326-1334. doi:S0895706197003014 [pii]
- Blanco-Rivero, J., Cachofeiro, V., Lahera, V., Aras-Lopez, R., Marquez-Rodas, I., Salaices, M., Xavier, F.E., Ferrer, M., Balfagon, G. 2005. Participation of prostacyclin in endothelial dysfunction induced by aldosterone in normotensive and hypertensive rats. *Hypertension* **46**(46): 107-112. doi:01.HYP.0000171479.36880.17 [pii];10.1161/01.HYP.0000171479.36880.17 [doi]
- Bode-Boger, S.M., Boger, R.H., Kuhn, M., Radermacher, J., Frolich, J.C. 1992. Endothelin release and shift in prostaglandin balance are involved in the modulation of vascular tone by recombinant erythropoietin. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* **20 Suppl 12**(20 Suppl 12): S25-S28
- Bode-Boger, S.M., Boger, R.H., Kuhn, M., Radermacher, J., Frolich, J.C. 1996b. Recombinant human erythropoietin enhances vasoconstrictor tone via endothelin-1 and constrictor prostanoids. *Kidney Int.* **50**(50): 1255-1261
- Bogoyevitch, M.A. 2004. An update on the cardiac effects of erythropoietin cardioprotection by erythropoietin and the lessons learnt from studies in neuroprotection. *Cardiovasc. Res.* **63**(63): 208-216. doi:10.1016/j.cardiores.2004.03.017 [doi];S0008636304001336 [pii]
- Boulanger, C., Luscher, T.F. 1990. Release of endothelin from the porcine aorta. Inhibition by endothelium-derived nitric oxide. *J. Clin. Invest* **85**(85): 587-590. doi:10.1172/JCI114477 [doi]. PMID:PMC296463.
- Boulanger, C.M. 1999. Secondary endothelial dysfunction: hypertension and heart failure. *J. Mol. Cell Cardiol.* **31**(31): 39-49. doi:S0022-2828(98)90842-2 [pii];10.1006/jmcc.1998.0842 [doi]

- Brasier, A.R., Recinos, A., III, Eledrisi, M.S. 2002. Vascular inflammation and the renin-angiotensin system. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **22**(22): 1257-1266
- Brassard, P., Amiri, F., Schiffrin, E.L. 2005. Combined angiotensin II type 1 and type 2 receptor blockade on vascular remodeling and matrix metalloproteinases in resistance arteries. *Hypertension* **46**(46): 598-606.
doi:01.HYP.0000176744.15592.7d [pii];10.1161/01.HYP.0000176744.15592.7d [doi]
- Bravo, Y., Quiroz, Y., Ferrebuz, A., Vaziri, N.D., Rodriguez-Iturbe, B. 2007. Mycophenolate mofetil administration reduces renal inflammation, oxidative stress, and arterial pressure in rats with lead-induced hypertension. *Am. J. Physiol Renal Physiol* **293**(293): F616-F623. doi:00507.2006 [pii];10.1152/ajprenal.00507.2006 [doi]
- Briet, M., Schiffrin, E.L. 2010. Aldosterone: effects on the kidney and cardiovascular system. *Nat. Rev. Nephrol.* **6**(6): 261-273. doi:nrneph.2010.30 [pii];10.1038/nrneph.2010.30 [doi]
- Briet, M., Schiffrin, E.L. 2011. The role of aldosterone in the metabolic syndrome. *Curr. Hypertens. Rep.* **13**(13): 163-172. doi:10.1007/s11906-011-0182-2 [doi]
- Brilla, C.G., Maisch, B., Weber, K.T. 1992. Myocardial collagen matrix remodelling in arterial hypertension. *Eur. Heart J.* **13 Suppl D**(13 Suppl D): 24-32
- Brilla, C.G., Weber, K.T. 1992. Mineralocorticoid excess, dietary sodium, and myocardial fibrosis. *J. Lab Clin. Med.* **120**(120): 893-901. doi:0022-2143(92)90267-O [pii]
- Brochu, E., Lacasse, S., Moreau, C., Lebel, M., Kingma, I., Grose, J.H., Lariviere, R. 1999. Endothelin ET(A) receptor blockade prevents the progression of renal failure and hypertension in uraemic rats. *Nephrol. Dial. Transplant.* **14**(14): 1881-1888
- Brown, A.L., Tucker, B., Baker, L.R., Raine, A.E. 1989. Seizures related to blood transfusion and erythropoietin treatment in patients undergoing dialysis. *BMJ* **299**(299): 1258-1259. PMID:PMC1838158.
- Brown, N.J. 2005. Aldosterone and end-organ damage. *Curr. Opin. Nephrol. Hypertens.* **14**(14): 235-241. doi:00041552-200505000-00008 [pii]

- Brum, P.C., Da Silva, G.J., Moreira, E.D., Ida, F., Negrao, C.E., Krieger, E.M. 2000. Exercise training increases baroreceptor gain sensitivity in normal and hypertensive rats. *Hypertension* **36**(36): 1018-1022
- Brunet, P., Lorec, A.M., Leonetti, F., Roubicek, C., Jaber, K., Roux, F., Berland, Y. 1994. Plasma endothelin in haemodialysis patients treated with recombinant human erythropoietin. *Nephrol. Dial. Transplant.* **9**(9): 650-654
- Bruunsgaard, H. 2005. Physical activity and modulation of systemic low-level inflammation. *J. Leukoc. Biol.* **78**(78): 819-835. doi:jlbb.0505247 [pii];10.1189/jlb.0505247 [doi]
- Calabro, P., Chang, D.W., Willerson, J.T., Yeh, E.T. 2005. Release of C-reactive protein in response to inflammatory cytokines by human adipocytes: linking obesity to vascular inflammation. *J. Am. Coll. Cardiol.* **46**(46): 1112-1113. doi:S0735-1097(05)01405-1 [pii];10.1016/j.jacc.2005.06.017 [doi]
- Calo, L.A., Zaghetto, F., Pagnin, E., Davis, P.A., De, M.P., Sartorato, P., Martire, G., Fiore, C., Armanini, D. 2004. Effect of aldosterone and glycyrrhetic acid on the protein expression of PAI-1 and p22(phox) in human mononuclear leukocytes. *J. Clin. Endocrinol. Metab* **89**(89): 1973-1976
- Calvillo, L., Latini, R., Kajstura, J., Leri, A., Anversa, P., Ghezzi, P., Salio, M., Cerami, A., Brines, M. 2003. Recombinant human erythropoietin protects the myocardium from ischemia-reperfusion injury and promotes beneficial remodeling. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **100**(100): 4802-4806. doi:10.1073/pnas.0630444100 [doi];0630444100 [pii]. PMID:PMC153636.
- Cardillo, C., Kilcoyne, C.M., Wacławiw, M., Cannon, R.O., III, Panza, J.A. 1999. Role of endothelin in the increased vascular tone of patients with essential hypertension. *Hypertension* **33**(33): 753-758
- Carlini, R., Obialo, C.I., Rothstein, M. 1993b. Intravenous erythropoietin (r-HuEPO) administration increases plasma endothelin and blood pressure in hemodialysis patients. *Am. J. Hypertens.* **6**(6): 103-107. doi:0895-7061(93)90255-K [pii]
- Carlini, R.G., Dusso, A.S., Obialo, C.I., Alvarez, U.M., Rothstein, M. 1993c. Recombinant human erythropoietin (r-HuEPO) increases endothelin-1 release by endothelial cells. *Kidney Int.* **43**(43): 1010-1014
- Carlini, R.G., Gupta, A., Liapis, H., Rothstein, M. 1995. Endothelin-1 release by erythropoietin involves calcium signaling in endothelial cells. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* **26**(26): 889-892

- Carrier, Y., Yuan, J., Kuchroo, V.K., Weiner, H.L. 2007. Th3 cells in peripheral tolerance. I. Induction of Foxp3-positive regulatory T cells by Th3 cells derived from TGF- β T cell-transgenic mice. *J. Immunol.* **178**(178): 179-185. doi:178/1/179 [pii]
- Casillas, J.M., Gremeaux, V., Damak, S., Feki, A., Perennou, D. 2007. Exercise training for patients with cardiovascular disease. *Ann. Readapt. Med. Phys.* **50**(50): 403-402. doi:S0168-6054(07)00056-6 [pii];10.1016/j.annrmp.2007.03.007 [doi]
- Cerasola, G., Guarneri, M., Cottone, S. 2009. [Inflammation, oxidative stress and kidney function in arterial hypertension]. *G. Ital. Nefrol.* **26 Suppl 46**(26 Suppl 46): 8-13
- Chabrashvili, T., Tojo, A., Onozato, M.L., Kitiyakara, C., Quinn, M.T., Fujita, T., Welch, W.J., Wilcox, C.S. 2002. Expression and cellular localization of classic NADPH oxidase subunits in the spontaneously hypertensive rat kidney. *Hypertension* **39**(39): 269-274
- Chandramohan, G., Bai, Y., Norris, K., Rodriguez-Iturbe, B., Vaziri, N.D. 2008. Effects of dietary salt on intrarenal angiotensin system, NAD(P)H oxidase, COX-2, MCP-1 and PAI-1 expressions and NF-kappaB activity in salt-sensitive and -resistant rat kidneys. *Am. J. Nephrol.* **28**(28): 158-167. doi:000110021 [pii];10.1159/000110021 [doi]
- Chatzizisis, Y.S., Coskun, A.U., Jonas, M., Edelman, E.R., Feldman, C.L., Stone, P.H. 2007. Role of endothelial shear stress in the natural history of coronary atherosclerosis and vascular remodeling: molecular, cellular, and vascular behavior. *J. Am. Coll. Cardiol.* **49**(49): 2379-2393. doi:S0735-1097(07)01220-X [pii];10.1016/j.jacc.2007.02.059 [doi]
- Chiasson, V.L., Talreja, D., Young, K.J., Chatterjee, P., Banes-Berceli, A.K., Mitchell, B.M. 2011. FK506 binding protein 12 deficiency in endothelial and hematopoietic cells decreases regulatory T cells and causes hypertension. *Hypertension* **57**(57): 1167-1175. doi:HYPERTENSIONAHA.110.162917 [pii];10.1161/HYPERTENSIONAHA.110.162917 [doi]
- Chicco, A.J., McCune, S.A., Emter, C.A., Sparagna, G.C., Rees, M.L., Bolden, D.A., Marshall, K.D., Murphy, R.C., Moore, R.L. 2008. Low-intensity exercise training delays heart failure and improves survival in female hypertensive heart failure rats. *Hypertension* **51**(51): 1096-1102. doi:HYPERTENSIONAHA.107.107078 [pii];10.1161/HYPERTENSIONAHA.107.107078 [doi]

- Chong, Z.Z., Kang, J.Q., Maiese, K. 2002a. Angiogenesis and plasticity: role of erythropoietin in vascular systems. *J. Hematother. Stem Cell Res.* **11**(11): 863-871. doi:10.1089/152581602321080529 [doi]
- Chong, Z.Z., Kang, J.Q., Maiese, K. 2002b. Erythropoietin is a novel vascular protectant through activation of Akt1 and mitochondrial modulation of cysteine proteases. *Circulation* **106**(106): 2973-2979
- Cirillo, M., Laurenzi, M., Trevisan, M., Stamler, J. 1992. Hematocrit, blood pressure, and hypertension. The Gubbio Population Study. *Hypertension* **20**(20): 319-326
- Collison, L.W., Workman, C.J., Kuo, T.T., Boyd, K., Wang, Y., Vignali, K.M., Cross, R., Sehy, D., Blumberg, R.S., Vignali, D.A. 2007. The inhibitory cytokine IL-35 contributes to regulatory T-cell function. *Nature* **450**(450): 566-569. doi:nature06306 [pii];10.1038/nature06306 [doi]
- Conlon, P.J., Kovalik, E., Schumm, D., Minda, S., Schwab, S.J. 2000. Normalization of hematocrit in hemodialysis patients with cardiac disease does not increase blood pressure. *Ren Fail.* **22**(22): 435-444
- Cooke, J.P., Dzau, V.J. 1997. Derangements of the nitric oxide synthase pathway, L-arginine, and cardiovascular diseases. *Circulation* **96**(96): 379-382
- Cornelissen, V.A., Fagard, R.H. 2005. Effects of endurance training on blood pressure, blood pressure-regulating mechanisms, and cardiovascular risk factors. *Hypertension* **46**(46): 667-675. doi:01.HYP.0000184225.05629.51 [pii];10.1161/01.HYP.0000184225.05629.51 [doi]
- Crowley, S.D., Frey, C.W., Gould, S.K., Griffiths, R., Ruiz, P., Burchette, J.L., Howell, D.N., Makhanova, N., Yan, M., Kim, H.S., Tharaux, P.L., Coffman, T.M. 2008. Stimulation of lymphocyte responses by angiotensin II promotes kidney injury in hypertension. *Am. J. Physiol Renal Physiol* **295**(295): F515-F524. doi:00527.2007 [pii];10.1152/ajprenal.00527.2007 [doi]. PMID:PMC2519187.
- Cybulsky, M.I., Gimbrone, M.A., Jr. 1991. Endothelial expression of a mononuclear leukocyte adhesion molecule during atherogenesis. *Science* **251**(251): 788-791
- D'Uscio, L.V., Smith, L.A., Santhanam, A.V., Richardson, D., Nath, K.A., Katusic, Z.S. 2007. Essential role of endothelial nitric oxide synthase in vascular effects of erythropoietin. *Hypertension* **49**(49): 1142-1148. doi:HYPERTENSIONAHA.106.085704 [pii];10.1161/HYPERTENSIONAHA.106.085704 [doi]

- Davignon, J., Ganz, P. 2004. Role of endothelial dysfunction in atherosclerosis. *Circulation* **109**(109): III27-III32. doi:10.1161/01.CIR.0000131515.03336.f8 [doi];109/23_suppl_1/III-27 [pii]
- Davis, C., Fischer, J., Ley, K., Sarembock, I.J. 2003. The role of inflammation in vascular injury and repair. *J. Thromb. Haemost.* **1**(1): 1699-1709. doi:292 [pii]
- de la Rosa, M., Rutz, S., Dorninger, H., Scheffold, A. 2004. Interleukin-2 is essential for CD4+CD25+ regulatory T cell function. *Eur. J. Immunol.* **34**(34): 2480-2488. doi:10.1002/eji.200425274 [doi]
- De, C.C., Amiri, F., Brassard, P., Endemann, D.H., Touyz, R.M., Schiffrin, E.L. 2005. Reduced vascular remodeling, endothelial dysfunction, and oxidative stress in resistance arteries of angiotensin II-infused macrophage colony-stimulating factor-deficient mice: evidence for a role in inflammation in angiotensin-induced vascular injury. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **25**(25): 2106-2113. doi:01.ATV.0000181743.28028.57 [pii];10.1161/01.ATV.0000181743.28028.57 [doi]
- de, M.C., Davel, A.P., Rossoni, L.V., Antunes, E., Zanesco, A. 2008. Exercise training improves relaxation response and SOD-1 expression in aortic and mesenteric rings from high caloric diet-fed rats. *BMC. Physiol* **8**(8): 12. doi:1472-6793-8-12 [pii];10.1186/1472-6793-8-12 [doi]. PMID:PMC2443377.
- del, C.D., Raij, L., Shultz, P.J., Tolins, J.P. 1995. The pressor effect of recombinant human erythropoietin is not due to decreased activity of the endogenous nitric oxide system. *Nephrol. Dial. Transplant.* **10**(10): 505-508
- Delagardelle, C., Feiereisen, P. 2011. [25 years of organized ambulatory heart sport in Luxembourg. The development of a sustained rehabilitation model]. *Bull. Soc. Sci. Med. Grand Duche Luxemb.*: 7-17
- Diep, Q.N., El, M.M., Cohn, J.S., Endemann, D., Amiri, F., Viridis, A., Neves, M.F., Schiffrin, E.L. 2002. Structure, endothelial function, cell growth, and inflammation in blood vessels of angiotensin II-infused rats: role of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma. *Circulation* **105**(105): 2296-2302
- Donato, A.J., Lesniewski, L.A., Delp, M.D. 2007. Ageing and exercise training alter adrenergic vasomotor responses of rat skeletal muscle arterioles. *J. Physiol* **579**(579): 115-125. doi:jphysiol.2006.120055 [pii];10.1113/jphysiol.2006.120055 [doi]. PMID:PMC2075385.

- Dumont, O., Loufrani, L., Henrion, D. 2007. Key role of the NO-pathway and matrix metalloprotease-9 in high blood flow-induced remodeling of rat resistance arteries. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **27**(27): 317-324. doi:01.ATV.0000254684.80662.44 [pii];10.1161/01.ATV.0000254684.80662.44 [doi]. PMID:PMC2234579.
- Duncker, D.J., Bache, R.J. 2008. Regulation of coronary blood flow during exercise. *Physiol Rev.* **88**(88): 1009-1086. doi:88/3/1009 [pii];10.1152/physrev.00045.2006 [doi]
- Edwards, K.M., Ziegler, M.G., Mills, P.J. 2007. The potential anti-inflammatory benefits of improving physical fitness in hypertension. *J. Hypertens.* **25**(25): 1533-1542. doi:10.1097/HJH.0b013e328165ca67 [doi];00004872-200708000-00002 [pii]
- Eggena, P., Willsey, P., Jamgotchian, N., Truckenbrod, L., Hu, M.S., Barrett, J.D., Eggena, M.P., Clegg, K., Nakhoul, F., Lee, D.B. 1991. Influence of recombinant human erythropoietin on blood pressure and tissue renin-angiotensin systems. *Am. J. Physiol* **261**(261): E642-E646
- Elliott, S. 2008. Erythropoiesis-stimulating agents and other methods to enhance oxygen transport. *Br. J. Pharmacol.* **154**(154): 529-541. doi:bjp200889 [pii];10.1038/bjp.2008.89 [doi]. PMID:PMC2439521.
- Emter, C.A., McCune, S.A., Sparagna, G.C., Radin, M.J., Moore, R.L. 2005. Low-intensity exercise training delays onset of decompensated heart failure in spontaneously hypertensive heart failure rats. *Am. J. Physiol Heart Circ. Physiol* **289**(289): H2030-H2038. doi:00526.2005 [pii];10.1152/ajpheart.00526.2005 [doi]
- Erbs, S., Holtriegel, R., Linke, A., Beck, E.B., Adams, V., Gielen, S., Mobius-Winkler, S., Sandri, M., Krankel, N., Hambrecht, R., Schuler, G. 2010. Exercise training in patients with advanced chronic heart failure (NYHA IIIb) promotes restoration of peripheral vasomotor function, induction of endogenous regeneration, and improvement of left ventricular function. *Circ. Heart Fail.* **3**(3): 486-494. doi:CIRCHEARTFAILURE.109.868992 [pii];10.1161/CIRCHEARTFAILURE.109.868992 [doi]
- Eriksson, E.E., Xie, X., Werr, J., Thoren, P., Lindbom, L. 2001. Importance of primary capture and L-selectin-dependent secondary capture in leukocyte accumulation in inflammation and atherosclerosis in vivo. *J. Exp. Med.* **194**(194): 205-218. PMID:PMC2193449.

- Fain, J.N., Bahouth, S.W. 1998. Effect of tri-iodothyronine on leptin release and leptin mRNA accumulation in rat adipose tissue. *Biochem. J.* **332** (Pt 2)(332 (Pt 2)): 361-366. PMID:PMC1219490.
- Fagard, R.H. 2000. Physical activity, fitness and blood pressure. In: Birkenhäger WH, Reid JL, Bulpitt CJ, eds. *Handbook of Hypertension: Epidemiology of Hypertension*. 191–211.
- Fallarino, F., Grohmann, U., Hwang, K.W., Orabona, C., Vacca, C., Bianchi, R., Belladonna, M.L., Fioretti, M.C., Alegre, M.L., Puccetti, P. 2003. Modulation of tryptophan catabolism by regulatory T cells. *Nat. Immunol.* **4**(4): 1206-1212. doi:10.1038/ni1003 [doi];ni1003 [pii]
- Farag, S.S., Caligiuri, M.A. 2006. Human natural killer cell development and biology. *Blood Rev.* **20**(20): 123-137. doi:S0268-960X(05)00055-X [pii];10.1016/j.blre.2005.10.001 [doi]
- Farquharson, C.A., Struthers, A.D. 2002. Aldosterone induces acute endothelial dysfunction in vivo in humans: evidence for an aldosterone-induced vasculopathy. *Clin. Sci. (Lond)* **103**(103): 425-431. doi:10.1042/ [doi]
- Febbraio, M.A., Pedersen, B.K. 2002. Muscle-derived interleukin-6: mechanisms for activation and possible biological roles. *FASEB J.* **16**(16): 1335-1347. doi:10.1096/fj.01-0876rev [doi];16/11/1335 [pii]
- Feletou, M., Vanhoutte, P.M. 2006. Endothelial dysfunction: a multifaceted disorder (The Wiggers Award Lecture). *Am. J. Physiol Heart Circ. Physiol* **291**(291): H985-1002. doi:00292.2006 [pii];10.1152/ajpheart.00292.2006 [doi]
- Félétou, M., Vanhoutte PM. 2004. EDHF: new therapeutic targets? *Pharmacol Res.* **49**(6):565-80.
- Fischer, C.P., Berntsen, A., Perstrup, L.B., Eskildsen, P., Pedersen, B.K. 2007. Plasma levels of interleukin-6 and C-reactive protein are associated with physical inactivity independent of obesity. *Scand. J. Med. Sci. Sports* **17**(17): 580-587. doi:SMS602 [pii];10.1111/j.1600-0838.2006.00602.x [doi]
- Fisher, J.W. 2003. Erythropoietin: physiology and pharmacology update. *Exp. Biol. Med.* (Maywood.) **228**(228): 1-14
- Fliser, D., Bahlmann, F.H. 2008. Erythropoietin and the endothelium - a promising link? *Eur. J. Clin. Invest* **38**(38): 457-461. doi:ECI1968 [pii];10.1111/j.1365-2362.2008.01968.x [doi]

- Fontenot, J.D., Gavin, M.A., Rudensky, A.Y. 2003. Foxp3 programs the development and function of CD4+CD25+ regulatory T cells. *Nat. Immunol.* **4**(4): 330-336. doi:10.1038/ni904 [doi];ni904 [pii]
- Frangos, J.A., Eskin, S.G., McIntire, L.V., Ives, C.L. 1985. Flow effects on prostacyclin production by cultured human endothelial cells. *Science* **227**(227): 1477-1479
- Fraser, J.K., Tan, A.S., Lin, F.K., Berridge, M.V. 1989. Expression of specific high-affinity binding sites for erythropoietin on rat and mouse megakaryocytes. *Exp. Hematol.* **17**(17): 10-16
- Fregly, M.J. 1984a. Effect of an exercise regimen on development of hypertension in rats. *J. Appl. Physiol* **56**(56): 381-387
- Freidja, M.L., Vessieres, E., Clere, N., Desquret, V., Guihot, A.L., Toutain, B., Loufrani, L., Jardel, A., Procaccio, V., Faure, S., Henrion, D. 2011. Heme oxygenase-1 induction restores high-blood-flow-dependent remodeling and endothelial function in mesenteric arteries of old rats. *J. Hypertens.* **29**(29): 102-112. doi:10.1097/HJH.0b013e32833db36e [doi]
- Frustaci, A., Chimenti, C., Bellocchi, F., Morgante, E., Russo, M.A., Maseri, A. 1997. Histological substrate of atrial biopsies in patients with lone atrial fibrillation. *Circulation* **96**(96): 1180-1184
- Fujita, T. 2008. Aldosterone in salt-sensitive hypertension and metabolic syndrome. *J. Mol. Med.* **86**(86): 729-734. doi:10.1007/s00109-008-0343-1 [doi]
- Galbraith, C.G., Skalak, R., Chien, S. 1998. Shear stress induces spatial reorganization of the endothelial cell cytoskeleton. *Cell Motil. Cytoskeleton* **40**(40): 317-330. doi:10.1002/(SICI)1097-0169(1998)40:4<317::AID-CM1>3.0.CO;2-8 [pii];10.1002/(SICI)1097-0169(1998)40:4<317::AID-CM1>3.0.CO;2-8 [doi]
- Galkina, E., Harry, B.L., Ludwig, A., Liehn, E.A., Sanders, J.M., Bruce, A., Weber, C., Ley, K. 2007. CXCR6 promotes atherosclerosis by supporting T-cell homing, interferon-gamma production, and macrophage accumulation in the aortic wall. *Circulation* **116**(116): 1801-1811. doi:CIRCULATIONAHA.106.678474 [pii];10.1161/CIRCULATIONAHA.106.678474 [doi]
- Galkina, E., Kadl, A., Sanders, J., Varughese, D., Sarembock, I.J., Ley, K. 2006. Lymphocyte recruitment into the aortic wall before and during development of atherosclerosis is partially L-selectin dependent. *J. Exp. Med.* **203**(203): 1273-1282. doi:jem.20052205 [pii];10.1084/jem.20052205 [doi]. PMID:PMC2121208.

- Gao YJ, Lee, R.M. 2001. Hydrogen peroxide induces a greater contraction in mesenteric arteries of spontaneously hypertensive rats through thromboxane A(2) production. *Br J Pharmacol.* **134**(8):1639-46
- Gareau, R., Audran, M., Baynes, R.D., Flowers, C.H., Duvallet, A., Senecal, L., Brisson, G.R. 1996. Erythropoietin abuse in athletes. *Nature* **380**(380): 113.
doi:10.1038/380113a0 [doi]
- Garg, P.K., Liu, K., Tian, L., Guralnik, J.M., Ferrucci, L., Criqui, M.H., Tan, J., McDermott, M.M. 2009. Physical activity during daily life and functional decline in peripheral arterial disease. *Circulation* **119**(119): 251-260.
doi:CIRCULATIONAHA.108.791491
[pii];10.1161/CIRCULATIONAHA.108.791491 [doi]. PMID:PMC2888033.
- Garg, P.K., Tian, L., Criqui, M.H., Liu, K., Ferrucci, L., Guralnik, J.M., Tan, J., McDermott, M.M. 2006. Physical activity during daily life and mortality in patients with peripheral arterial disease. *Circulation* **114**(114): 242-248.
doi:CIRCULATIONAHA.105.605246
[pii];10.1161/CIRCULATIONAHA.105.605246 [doi]. PMID:PMC2645622.
- Gauthier, J. 2001. [Cardiovascular effects of doping]. *Ann. Cardiol. Angeiol. (Paris)* **50**(50): 293-298
- Geffken, D.F., Cushman, M., Burke, G.L., Polak, J.F., Sakkinen, P.A., Tracy, R.P. 2001. Association between physical activity and markers of inflammation in a healthy elderly population. *Am. J. Epidemiol.* **153**(153): 242-250
- Gibbons, G.H., Dzau, V.J. 1994. The emerging concept of vascular remodeling. *N. Engl. J. Med.* **330**(330): 1431-1438. doi:10.1056/NEJM199405193302008 [doi]
- Gibbons, G.H., Dzau, V.J. 1996. Molecular therapies for vascular diseases. *Science* **272**(272): 689-693
- Gielen, S., Erbs, S., Linke, A., Mobius-Winkler, S., Schuler, G., Hambrecht, R. 2003. Home-based versus hospital-based exercise programs in patients with coronary artery disease: effects on coronary vasomotion. *Am. Heart J.* **145**(145): E3.
doi:10.1067/mhj.2003.58a [doi];S0002870302947393 [pii]
- Glimcher, L.H., Murphy, K.M. 2000. Lineage commitment in the immune system: the T helper lymphocyte grows up. *Genes Dev.* **14**(14): 1693-1711
- Gogusev, J., Zhu, D.L., Herembert, T., Ammarguella, F., Marche, P., Drueke, T. 1994. Effect of erythropoietin on DNA synthesis, proto-oncogene expression and

- phospholipase C activity in rat vascular smooth muscle cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **199**(199): 977-983. doi:S0006-291X(84)71325-8 [pii];10.1006/bbrc.1994.1325 [doi]
- Goicoechea, M., Martin, J., de, S.P., Quiroga, J.A., Ortiz, A., Carreno, V., Caramelo, C. 1998b. Role of cytokines in the response to erythropoietin in hemodialysis patients. *Kidney Int.* **54**(54): 1337-1343. doi:10.1046/j.1523-1755.1998.00084.x [doi]
- Goldberg, N., Lundin, A.P., Delano, B., Friedman, E.A., Stein, R.A. 1992. Changes in left ventricular size, wall thickness, and function in anemic patients treated with recombinant human erythropoietin. *Am. Heart J.* **124**(124): 424-427
- Graham, D.A., Rush, J.W. 2004. Exercise training improves aortic endothelium-dependent vasorelaxation and determinants of nitric oxide bioavailability in spontaneously hypertensive rats. *J. Appl. Physiol* **96**(96): 2088-2096. doi:10.1152/japplphysiol.01252.2003 [doi];01252.2003 [pii]
- Gratze, P., Dechend, R., Stocker, C., Park, J.K., Feldt, S., Shagdarsuren, E., Wellner, M., Gueler, F., Rong, S., Gross, V., Obst, M., Plehm, R., Alenina, N., Zenclussen, A., Titze, J., Small, K., Yokota, Y., Zenke, M., Luft, F.C., Muller, D.N. 2008. Novel role for inhibitor of differentiation 2 in the genesis of angiotensin II-induced hypertension. *Circulation* **117**(117): 2645-2656. doi:CIRCULATIONAHA.107.760116 [pii];10.1161/CIRCULATIONAHA.107.760116 [doi]
- Greene, E.L., Kren, S., Hostetter, T.H. 1996. Role of aldosterone in the remnant kidney model in the rat. *J. Clin. Invest* **98**(98): 1063-1068. doi:10.1172/JCI118867 [doi]. PMID:PMC507523.
- Griendling, K.K., Sorescu, D., Ushio-Fukai, M. 2000b. NAD(P)H oxidase: role in cardiovascular biology and disease. *Circ. Res.* **86**(86): 494-501
- Griendling, K.K., Ushio-Fukai, M. 2000. Reactive oxygen species as mediators of angiotensin II signaling. *Regul. Pept.* **91**(91): 21-27. doi:S0167011500001361 [pii]
- Grimm, C., Wenzel, A., Groszer, M., Mayser, H., Seeliger, M., Samardzija, M., Bauer, C., Gassmann, M., Reme, C.E. 2002. HIF-1-induced erythropoietin in the hypoxic retina protects against light-induced retinal degeneration. *Nat. Med.* **8**(8): 718-724. doi:10.1038/nm723 [doi];nm723 [pii]

- Guyot, D., Margueritte, G. 2005. [Use of human recombinant erythropoietin in children with cancer]. *Arch. Pediatr.* **12**(12): 1376-1382. doi:S0929-693X(05)00372-6 [pii];10.1016/j.arcped.2005.05.006 [doi]
- Guzik, T.J., Hoch, N.E., Brown, K.A., McCann, L.A., Rahman, A., Dikalov, S., Goronzy, J., Weyand, C., Harrison, D.G. 2007b. Role of the T cell in the genesis of angiotensin II induced hypertension and vascular dysfunction. *J. Exp. Med.* **204**(204): 2449-2460. doi:jem.20070657 [pii];10.1084/jem.20070657 [doi]. PMID:PMC2118469.
- Hackam, D.G., Khan, N.A., Hemmelgarn, B.R., Rabkin, S.W., Touyz, R.M., Campbell, N.R., Padwal, R., Campbell, T.S., Lindsay, M.P., Hill, M.D., Quinn, R.R., Mahon, J.L., Herman, R.J., Schiffrin, E.L., Ruzicka, M., Laroche, P., Feldman, R.D., Lebel, M., Poirier, L., Arnold, J.M., Moe, G.W., Howlett, J.G., Trudeau, L., Bacon, S.L., Petrella, R.J., Milot, A., Stone, J.A., Drouin, D., Boulanger, J.M., Sharma, M., Hamet, P., Fodor, G., Dresser, G.K., Carruthers, S.G., Pylypchuk, G., Burgess, E.D., Burns, K.D., Vallee, M., Prasad, G.V., Gilbert, R.E., Leiter, L.A., Jones, C., Ogilvie, R.I., Woo, V., McFarlane, P.A., Hegele, R.A., Tobe, S.W. 2010. The 2010 Canadian Hypertension Education Program recommendations for the management of hypertension: part 2 - therapy. *Can. J. Cardiol.* **26**(26): 249-258. PMID:PMC2886555.
- Haddy, F.J., Overbeck, H.W., Daugherty, R.M., Jr. 1968. Peripheral vascular resistance. *Annu. Rev. Med.* **19**(19): 167-194. doi:10.1146/annurev.me.19.020168.001123 [doi]
- Hambrecht, R., Adams, V., Erbs, S., Linke, A., Krankel, N., Shu, Y., Baither, Y., Gielen, S., Thiele, H., Gummert, J.F., Mohr, F.W., Schuler, G. 2003. Regular physical activity improves endothelial function in patients with coronary artery disease by increasing phosphorylation of endothelial nitric oxide synthase. *Circulation* **107**(107): 3152-3158. doi:10.1161/01.CIR.0000074229.93804.5C [doi];01.CIR.0000074229.93804.5C [pii]
- Hambrecht, R., Fiehn, E., Weigl, C., Gielen, S., Hamann, C., Kaiser, R., Yu, J., Adams, V., Niebauer, J., Schuler, G. 1998. Regular physical exercise corrects endothelial dysfunction and improves exercise capacity in patients with chronic heart failure. *Circulation* **98**(98): 2709-2715
- Harrison, D.G., Vinh, A., Lob, H., Madhur, M.S. 2010. Role of the adaptive immune system in hypertension. *Curr. Opin. Pharmacol.* **10**(10): 203-207. doi:S1471-4892(10)00007-X [pii];10.1016/j.coph.2010.01.006 [doi]. PMID:PMC2843787.

- Heath, D., Yacoub, M. 1991. Lung mast cells in plexogenic pulmonary arteriopathy. *J. Clin. Pathol.* **44**(44): 1003-1006. PMID:PMC494968.
- Hehner, S.P., Breitzkreutz, R., Shubinsky, G., Unsoeld, H., Schulze-Osthoff, K., Schmitz, M.L., Droge, W. 2000. Enhancement of T cell receptor signaling by a mild oxidative shift in the intracellular thiol pool. *J. Immunol.* **165**(165): 4319-4328
- Heidarianpour, A., Hajizadeh, S., Khoshbaten, A., Niaki, A.G., Bigdili, M.R., Pourkhalili, K. 2007. Effects of chronic exercise on endothelial dysfunction and insulin signaling of cutaneous microvascular in streptozotocin-induced diabetic rats. *Eur. J. Cardiovasc. Prev. Rehabil.* **14**(14): 746-752.
doi:10.1097/HJR.0b013e32817ed02f [doi];00149831-200712000-00005 [pii]
- Heidenreich, S., Rahn, K.H., Zidek, W. 1991. Direct vasopressor effect of recombinant human erythropoietin on renal resistance vessels. *Kidney Int.* **39**(39): 259-265
- Hershon, K.S. 2011. Mechanistic and Clinical Aspects of Renin-Angiotensin-Aldosterone System (RAAS) Blockade in the Prevention of Diabetes and Cardiovascular Disease. *Endocr. Pract.*: 10-35. doi:U901142052056G04
[pii];10.4158/EP10106.RA [doi]
- Higashi, Y., Sasaki, S., Sasaki, N., Nakagawa, K., Ueda, T., Yoshimizu, A., Kurisu, S., Matsuura, H., Kajiyama, G., Oshima, T. 1999. Daily aerobic exercise improves reactive hyperemia in patients with essential hypertension. *Hypertension* **33**(33): 591-597
- Hirono, Y., Yoshimoto, T., Suzuki, N., Sugiyama, T., Sakurada, M., Takai, S., Kobayashi, N., Shichiri, M., Hirata, Y. 2007. Angiotensin II receptor type 1-mediated vascular oxidative stress and proinflammatory gene expression in aldosterone-induced hypertension: the possible role of local renin-angiotensin system. *Endocrinology* **148**(148): 1688-1696. doi:en.2006-1157
[pii];10.1210/en.2006-1157 [doi]
- Hiscock, N., Chan, M.H., Bisucci, T., Darby, I.A., Febbraio, M.A. 2004. Skeletal myocytes are a source of interleukin-6 mRNA expression and protein release during contraction: evidence of fiber type specificity. *FASEB J.* **18**(18): 992-994. doi:10.1096/fj.03-1259fje [doi];03-1259fje [pii]
- Hopps, E., Canino, B., Caimi, G. 2011. Effects of exercise on inflammation markers in type 2 diabetic subjects. *Acta Diabetol.* doi:10.1007/s00592-011-0278-9 [doi]
- Horta, P.P., de Carvalho, J.J., Mandarim-de-Lacerda, C.A. 2005. Exercise training attenuates blood pressure elevation and adverse remodeling in the aorta of

- spontaneously hypertensive rats. *Life Sci.* **77**(77): 3336-3343. doi:S0024-3205(05)00569-2 [pii];10.1016/j.lfs.2005.05.044 [doi]
- Hsueh, W.A., Wyne, K. 2011. Renin-Angiotensin-aldosterone system in diabetes and hypertension. *J. Clin. Hypertens. (Greenwich.)* **13**(13): 224-237. doi:10.1111/j.1751-7176.2011.00449.x [doi]
- Iglarz, M., Schiffrin, E.L. 2003. Role of endothelin-1 in hypertension. *Curr. Hypertens. Rep.* **5**(5): 144-148
- Imhof, B.A., Aurrand-Lions, M. 2004. Adhesion mechanisms regulating the migration of monocytes. *Nat. Rev. Immunol.* **4**(4): 432-444. doi:10.1038/nri1375 [doi];nri1375 [pii]
- Irani, K. 2000. Oxidant signaling in vascular cell growth, death, and survival : a review of the roles of reactive oxygen species in smooth muscle and endothelial cell mitogenic and apoptotic signaling. *Circ. Res.* **87**(87): 179-183
- Itoh, T., Nagaya, N., Ishibashi-Ueda, H., Kyotani, S., Oya, H., Sakamaki, F., Kimura, H., Nakanishi, N. 2006. Increased plasma monocyte chemoattractant protein-1 level in idiopathic pulmonary arterial hypertension. *Respirology.* **11**(11): 158-163. doi:RES [pii];10.1111/j.1440-1843.2006.00821.x [doi]
- Ji, L.L. 1999b. Antioxidants and oxidative stress in exercise. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **222**(222): 283-292. doi:pse22222 [pii]
- Joannides, R., Bakkali, E.H., Le, R.F., Rivault, O., Godin, M., Moore, N., Fillastre, J.P., Thuillez, C. 1997. Altered flow-dependent vasodilatation of conduit arteries in maintenance haemodialysis. *Nephrol. Dial. Transplant.* **12**(12): 2623-2628
- Jolliffe, J.A., Rees, K., Taylor, R.S., Thompson, D., Oldridge, N., Ebrahim, S. 2001. Exercise-based rehabilitation for coronary heart disease. *Cochrane. Database. Syst. Rev.*: CD001800. doi:CD001800 [pii];10.1002/14651858.CD001800 [doi]
- Jurewicz, M., McDermott, D.H., Sechler, J.M., Tinckam, K., Takakura, A., Carpenter, C.B., Milford, E., Abdi, R. 2007. Human T and natural killer cells possess a functional renin-angiotensin system: further mechanisms of angiotensin II-induced inflammation. *J. Am. Soc. Nephrol.* **18**(18): 1093-1102. doi:ASN.2006070707 [pii];10.1681/ASN.2006070707 [doi]
- Juul, S.E., Zhao, Y., Dame, J.B., Du, Y., Hutson, A.D., Christensen, R.D. 2000. Origin and fate of erythropoietin in human milk. *Pediatr. Res.* **48**(48): 660-667

- Karadag, R., Yagci, R., Aydin, B., Kanbay, M., Erdurmus, M., Keskin, U.C., Akcay, A., Durmus, M. 2009. Effects of erythropoietin treatment and hemodialysis on the serum endothelin level and intraocular pressure of hemodialysis patients. *Int. Ophthalmol.* **29**(29): 385-388. doi:10.1007/s10792-008-9253-z [doi]
- Karmisholt, K., Gotzsche, P.C. 2005. Physical activity for secondary prevention of disease. Systematic reviews of randomised clinical trials. *Dan. Med. Bull.* **52**(52): 90-94. doi:DMB3728 [pii]
- Karmisholt, K., Gyntelberg, F., Gotzsche, P.C. 2005. Physical activity for primary prevention of disease. Systematic reviews of randomised clinical trials. *Dan. Med. Bull.* **52**(52): 86-89. doi:DMB3727 [pii]
- Katoh, K., Mizuno, K., Hashimoto, S., Okazaki, K., Asahi, K., Kuriki, M., Yamada, D., Fukuchi, S. 1994. Direct evidence for erythropoietin-induced release of endothelin from peripheral vascular tissue. *Life Sci.* **54**(54): L253-L259
- Kemi, O.J., Wisloff, U. 2010. High-intensity aerobic exercise training improves the heart in health and disease. *J. Cardiopulm. Rehabil. Prev.* **30**(30): 2-11. doi:10.1097/HCR.0b013e3181c56b89 [doi]
- Kendall, R.T., Strungs, E.G., Rachidi, S.M., Lee, M.H., El-Shewy, H.M., Luttrell, D.K., Janech, M.G., Luttrell, L.M. 2011. The {beta}-arrestin pathway-selective angiotensin AT1A receptor agonist Sar1Ile4Ile8 regulates a robust G protein-independent signaling network. *J. Biol. Chem.* doi:M111.233080 [pii];10.1074/jbc.M111.233080 [doi]
- Kershaw, E.E., Flier, J.S. 2004. Adipose tissue as an endocrine organ. *J. Clin. Endocrinol. Metab* **89**(89): 2548-2556. doi:10.1210/jc.2004-0395 [doi];89/6/2548 [pii]
- Kim, S., Iwao, H. 2000. Molecular and cellular mechanisms of angiotensin II-mediated cardiovascular and renal diseases. *Pharmacol. Rev.* **52**(52): 11-34
- King, D.E., Carek, P., Mainous, A.G., III, Pearson, W.S. 2003. Inflammatory markers and exercise: differences related to exercise type. *Med. Sci. Sports Exerc.* **35**(35): 575-581. doi:10.1249/01.MSS.0000058440.28108.CC [doi]
- Kinsey, G.R., Sharma, R., Huang, L., Li, L., Vergis, A.L., Ye, H., Ju, S.T., Okusa, M.D. 2009. Regulatory T cells suppress innate immunity in kidney ischemia-reperfusion injury. *J. Am. Soc. Nephrol.* **20**(20): 1744-1753. doi:ASN.2008111160 [pii];10.1681/ASN.2008111160 [doi]. PMID:PMC2723989.

- Ko, E.A., Amiri, F., Pandey, N.R., Javeshghani, D., Leibovitz, E., Touyz, R.M., Schiffrin, E.L. 2007. Resistance artery remodeling in deoxycorticosterone acetate-salt hypertension is dependent on vascular inflammation: evidence from m-CSF-deficient mice. *Am. J. Physiol Heart Circ. Physiol* **292**(292): H1789-H1795. doi:01118.2006 [pii];10.1152/ajpheart.01118.2006 [doi]
- Kohn, K., Matsuoka, H., Takenaka, K., Miyake, Y., Nomura, G., Imaizumi, T. 1997. Renal depressor mechanisms of physical training in patients with essential hypertension. *Am J Hypertens.* **10**(8): 859-68.
- Kojda, G., Harrison, D. 1999. Interactions between NO and reactive oxygen species: pathophysiological importance in atherosclerosis, hypertension, diabetes and heart failure. *Cardiovasc Res.* **43**(3):562-71.
- Kokkinos, P.F., Narayan, P., Collieran, J.A., Pittaras, A., Notargiacomo, A., Reda, D., Papademetriou, V. 1995. Effects of regular exercise on blood pressure and left ventricular hypertrophy in African-American men with severe hypertension. *N. Engl. J. Med.* **333**(333): 1462-1467. doi:10.1056/NEJM199511303332204 [doi]
- Kokkinos, P.F., Narayan, P., Papademetriou, V. 2001. Exercise as hypertension therapy. *Cardiol. Clin.* **19**(19): 507-516
- Krantz, S.B. 1991. Erythropoietin. *Blood* **77**(77): 419-434
- Kranzhofer, R., Schmidt, J., Pfeiffer, C.A., Hagl, S., Libby, P., Kubler, W. 1999. Angiotensin induces inflammatory activation of human vascular smooth muscle cells. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **19**(19): 1623-1629
- Krapf, R., Hulter, H.N. 2009. Arterial hypertension induced by erythropoietin and erythropoiesis-stimulating agents (ESA). *Clin. J. Am. Soc. Nephrol.* **4**(4): 470-480. doi:4/2/470 [pii];10.2215/CJN.05040908 [doi]
- Kuchan, M.J., Frangos, J.A. 1993. Shear stress regulates endothelin-1 release via protein kinase C and cGMP in cultured endothelial cells. *Am. J. Physiol* **264**(264): H150-H156
- Kuru, O., Senturk, U.K., Demir, N., Yesilkaya, A., Erguler, G., Erkilic, M. 2002. Effect of exercise on blood pressure in rats with chronic NOS inhibition. *Eur. J. Appl. Physiol* **87**(87): 134-140. doi:10.1007/s00421-002-0602-8 [doi]
- Kuru, O., Senturk, U.K., Kocer, G., Ozdem, S., Baskurt, O.K., Cetin, A., Yesilkaya, A., Gunduz, F. 2009. Effect of exercise training on resistance arteries in rats with

- chronic NOS inhibition. *J. Appl. Physiol* **107**(107): 896-902. doi:91180.2008 [pii];10.1152/japplphysiol.91180.2008 [doi]
- Kvakan, H., Kleinewietfeld, M., Qadri, F., Park, J.K., Fischer, R., Schwarz, I., Rahn, H.P., Plehm, R., Wellner, M., Elitok, S., Gratz, P., Dechend, R., Luft, F.C., Muller, D.N. 2009. Regulatory T cells ameliorate angiotensin II-induced cardiac damage. *Circulation* **119**(119): 2904-2912. doi:CIRCULATIONAHA.108.832782 [pii];10.1161/CIRCULATIONAHA.108.832782 [doi]
- Lacasse, M., Kingma, I., Lariviere, R., Grose, J.H., Lebel, M. 1997. Uremia enhances the blood pressure response to erythropoietin. *Clin. Exp. Hypertens.* **19**(19): 389-401
- Lacolley, P., Labat, C., Pujol, A., Delcayre, C., Benetos, A., Safar, M. 2002b. Increased carotid wall elastic modulus and fibronectin in aldosterone-salt-treated rats: effects of eplerenone. *Circulation* **106**(106): 2848-2853
- Lakka, T.A., Salonen, J.T. 1993. Moderate to high intensity conditioning leisure time physical activity and high cardiorespiratory fitness are associated with reduced plasma fibrinogen in eastern Finnish men. *J. Clin. Epidemiol.* **46**(46): 1119-1127. doi:0895-4356(93)90111-D [pii]
- Lariviere, R., Lebel, M. 2003b. Endothelin-1 in chronic renal failure and hypertension. *Can. J. Physiol Pharmacol.* **81**(81): 607-621. doi:10.1139/y03-012 [doi];y03-012 [pii]
- Lasky, L.A., Singer, M.S., Yednock, T.A., Dowbenko, D., Fennie, C., Rodriguez, H., Nguyen, T., Stachel, S., Rosen, S.D. 1989. Cloning of a lymphocyte homing receptor reveals a lectin domain. *Cell* **56**(56): 1045-1055. doi:0092-8674(89)90637-5 [pii]
- Laurant, P., Touyz, R.M., Schiffrin, E.L. 1997. Effect of pressurization on mechanical properties of mesenteric small arteries from spontaneously hypertensive rats. *J. Vasc. Res.* **34**(34): 117-125
- Lebel, M., Kingma, I., Grose, J.H., Langlois, S. 1998c. Hemodynamic and hormonal changes during erythropoietin therapy in hemodialysis patients. *J. Am. Soc. Nephrol.* **9**(9): 97-104
- Lebel, M., Lacasse, M., Lariviere, R., Kingma, I., Grose, J.H. 1998d. Plasma and blood vessel endothelin-1 concentrations in hypertensive uremic rats treated with erythropoietin. *Clin. Exp. Hypertens.* **20**(20): 939-951

- Lebel, M., Rodrigue, M.E., Agharazii, M., Lariviere, R. 2006. Antihypertensive and renal protective effects of renin-angiotensin system blockade in uremic rats treated with erythropoietin. *Am. J. Hypertens.* **19**(19): 1286-1292. doi:S0895-7061(06)00575-9 [pii];10.1016/j.amjhyper.2006.06.019 [doi]
- Leibovitz, E., Ebrahimian, T., Paradis, P., Schiffrin, E.L. 2009. Aldosterone induces arterial stiffness in absence of oxidative stress and endothelial dysfunction. *J. Hypertens.* **27**(27): 2192-2200. doi:10.1097/HJH.0b013e328330a963 [doi]
- Leibowitz, A., Schiffrin, E.L. 2011. Immune Mechanisms in Hypertension. *Curr Hypertens Rep.*
- Leopold, J.A., Dam, A., Maron, B.A., Scribner, A.W., Liao, R., Handy, D.E., Stanton, R.C., Pitt, B., Loscalzo, J. 2007c. Aldosterone impairs vascular reactivity by decreasing glucose-6-phosphate dehydrogenase activity. *Nat. Med.* **13**(13): 189-197. doi:nm1545 [pii];10.1038/nm1545 [doi]
- Levings, M.K., Gregori, S., Tresoldi, E., Cazzaniga, S., Bonini, C., Roncarolo, M.G. 2005. Differentiation of Tr1 cells by immature dendritic cells requires IL-10 but not CD25+CD4+ Tr cells. *Blood* **105**(105): 1162-1169. doi:2004-03-1211 [pii];10.1182/blood-2004-03-1211 [doi]
- Li, J.S., Turgeon, A., Schiffrin, E.L. 1998b. Effect of chronic treatment with two different ET(A) selective endothelin receptor antagonists on blood pressure and small artery structure of deoxycorticosterone acetate (DOCA)-salt hypertensive rats. *Am. J. Hypertens.* **11**(11): 554-562. doi:S0895-7061(97)00405-6 [pii]
- Libby, P. 2006. Inflammation and cardiovascular disease mechanisms. *Am. J. Clin. Nutr.* **83**(83): 456S-460S. doi:83/2/456S [pii]
- Libby, P. 2007. Inflammatory mechanisms: the molecular basis of inflammation and disease. *Nutr. Rev.* **65**(65): S140-S146
- Libby, P., Ordovas, J.M., Auger, K.R., Robbins, A.H., Birinyi, L.K., Dinarello, C.A. 1986. Endotoxin and tumor necrosis factor induce interleukin-1 gene expression in adult human vascular endothelial cells. *Am. J. Pathol.* **124**(124): 179-185. PMID:PMC1888305.
- Lindenblatt, N., Menger, M.D., Klar, E., Vollmar, B. 2007. Darbepoetin-alpha does not promote microvascular thrombus formation in mice: role of eNOS-dependent protection through platelet and endothelial cell deactivation. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **27**(27): 1191-1198. doi:ATVBAHA.107.141580 [pii];10.1161/ATVBAHA.107.141580 [doi]

- Lloyd-Williams, F., Mair, F.S., Leitner, M. 2002. Exercise training and heart failure: a systematic review of current evidence. *Br. J. Gen. Pract.* **52**(52): 47-55. PMID:PMC1314201.
- Lob, H.E., Marvar, P.J., Guzik, T.J., Sharma, S., McCann, L.A., Weyand, C., Gordon, F.J., Harrison, D.G. 2010. Induction of hypertension and peripheral inflammation by reduction of extracellular superoxide dismutase in the central nervous system. *Hypertension* **55**(55): 277-83, 6p. doi:HYPERENSIONAHA.109.142646 [pii];10.1161/HYPERENSIONAHA.109.142646 [doi]. PMID:PMC2813894.
- Lombardero, M., Kovacs, K., Scheithauer, B.W. 2011. Erythropoietin: a hormone with multiple functions. *Pathobiology* **78**(78): 41-53. doi:000322975 [pii];10.1159/000322975 [doi]
- Lyngso, D., Simonsen, L., Bulow, J. 2002. Interleukin-6 production in human subcutaneous abdominal adipose tissue: the effect of exercise. *J. Physiol* **543**(543): 373-378. doi:PHY_019380 [pii]. PMID:PMC2290472.
- MacNeil, B., Hoffman-Goetz, L. 1993. Chronic exercise enhances in vivo and in vitro cytotoxic mechanisms of natural immunity in mice. *J. Appl. Physiol* **74**(74): 388-395
- Madhur, M.S., Lob, H.E., McCann, L.A., Iwakura, Y., Blinder, Y., Guzik, T.J., Harrison, D.G. 2010. Interleukin 17 promotes angiotensin II-induced hypertension and vascular dysfunction. *Hypertension* **55**(55): 500-507. doi:HYPERENSIONAHA.109.145094 [pii];10.1161/HYPERENSIONAHA.109.145094 [doi]. PMID:PMC2819301.
- Maiorana, A., O'Driscoll, G., Taylor, R., Green, D. 2003. Exercise and the nitric oxide vasodilator system. *Sports Med.* **33**(33): 1013-1035. doi:33141 [pii]
- Malek, A.M., Greene, A.L., Izumo, S. 1993. Regulation of endothelin 1 gene by fluid shear stress is transcriptionally mediated and independent of protein kinase C and cAMP. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **90**(90): 5999-6003. PMID:PMC46854.
- Mancia, G., De, B.G., Dominiczak, A., Cifkova, R., Fagard, R., Germano, G., Grassi, G., Heagerty, A.M., Kjeldsen, S.E., Laurent, S., Narkiewicz, K., Ruilope, L., Rynkiewicz, A., Schmieder, R.E., Struijker Boudier, H.A., Zanchetti, A., Vahanian, A., Camm, J., De, C.R., Dean, V., Dickstein, K., Filippatos, G., Funck-Brentano, C., Hellemans, I., Kristensen, S.D., McGregor, K., Sechtem, U., Silber, S., Tendera, M., Widimsky, P., Zamorano, J.L., Kjeldsen, S.E., Erdine, S., Narkiewicz, K., Kiowski, W., Agabiti-Rosei, E., Ambrosioni, E., Cifkova, R., Dominiczak, A., Fagard, R., Heagerty, A.M., Laurent, S., Lindholm, L.H.,

- Mancia, G., Manolis, A., Nilsson, P.M., Redon, J., Schmieder, R.E., Struijker-Boudier, H.A., Viigimaa, M., Filippatos, G., Adamopoulos, S., Agabiti-Rosei, E., Ambrosioni, E., Bertomeu, V., Clement, D., Erdine, S., Farsang, C., Gaita, D., Kiowski, W., Lip, G., Mallion, J.M., Manolis, A.J., Nilsson, P.M., O'Brien, E., Ponikowski, P., Redon, J., Ruschitzka, F., Tamargo, J., van, Z.P., Viigimaa, M., Waeber, B., Williams, B., Zamorano, J.L., The task force for the management of arterial hypertension of the European, Society of Hypertension, The task force for the management of arterial hypertension of the European, Society of Cardiology 2007. 2007 Guidelines for the management of arterial hypertension: The Task Force for the Management of Arterial Hypertension of the European Society of Hypertension (ESH) and of the European Society of Cardiology (ESC). *Eur. Heart J.* **28**(28): 1462-1536. doi:ehm236 [pii];10.1093/eurheartj/ehm236 [doi]
- Marchesi, C., Paradis, P., Schiffrin, E.L. 2008. Role of the renin-angiotensin system in vascular inflammation. *Trends Pharmacol. Sci.* **29**(29): 367-374. doi:S0165-6147(08)00110-7 [pii];10.1016/j.tips.2008.05.003 [doi]
- Marcus, K.D., Tipton, C.M. 1985b. Exercise training and its effects with renal hypertensive rats. *J. Appl. Physiol* **59**(59): 1410-1415
- Marney, A.M., Brown, N.J. 2007. Aldosterone and end-organ damage. *Clin. Sci. (Lond)* **113**(113): 267-278. doi:CS20070123 [pii];10.1042/CS20070123 [doi]
- Martinez-Estrada, O.M., Rodriguez-Millan, E., Gonzalez-De, V.E., Reina, M., Vilaro, S., Fabre, M. 2003. Erythropoietin protects the in vitro blood-brain barrier against VEGF-induced permeability. *Eur. J. Neurosci.* **18**(18): 2538-2544. doi:2987 [pii]
- Marvar, P.J., Thabet, S.R., Guzik, T.J., Lob, H.E., McCann, L.A., Weyand, C., Gordon, F.J., Harrison, D.G. 2010. Central and peripheral mechanisms of T-lymphocyte activation and vascular inflammation produced by angiotensin II-induced hypertension. *Circ. Res.* **107**(107): 263-270. doi:CIRCRESAHA.110.217299 [pii];10.1161/CIRCRESAHA.110.217299 [doi]. PMID:PMC2921936.
- Masuda, S., Nagao, M., Takahata, K., Konishi, Y., Gallyas, F., Jr., Tabira, T., Sasaki, R. 1993. Functional erythropoietin receptor of the cells with neural characteristics. Comparison with receptor properties of erythroid cells. *J. Biol. Chem.* **268**(268): 11208-11216
- Matrougui, K., Abd, E.Z., Kassan, M., Choi, S., Nair, D., Gonzalez-Villalobos, R.A., Chentoufi, A.A., Kadowitz, P., Belmadani, S., Partyka, M. 2011. Natural regulatory T cells control coronary arteriolar endothelial dysfunction in

- hypertensive mice. *Am. J. Pathol.* **178**(178): 434-441. doi:S0002-9440(10)00081-7 [pii];10.1016/j.ajpath.2010.11.034 [doi]. PMID:PMC3069876.
- Medzhitov, R. 2008. Origin and physiological roles of inflammation. *Nature* **454**(454): 428-435. doi:nature07201 [pii];10.1038/nature07201 [doi]
- Meilhac, O., Ramachandran, S., Chiang, K., Santanam, N., Parthasarathy, S. 2001. Role of arterial wall antioxidant defense in beneficial effects of exercise on atherosclerosis in mice. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **21**(21): 1681-1688
- Meng, S., Cason, G.W., Gannon, A.W., Racusen, L.C., Manning, R.D., Jr. 2003. Oxidative stress in Dahl salt-sensitive hypertension. *Hypertension* **41**(41): 1346-1352. doi:10.1161/01.HYP.0000070028.99408.E8 [doi];01.HYP.0000070028.99408.E8 [pii]
- Meng, S., Roberts, L.J., Cason, G.W., Curry, T.S., Manning, R.D., Jr. 2002. Superoxide dismutase and oxidative stress in Dahl salt-sensitive and -resistant rats. *Am. J. Physiol Regul. Integr. Comp Physiol* **283**(283): R732-R738. doi:10.1152/ajpregu.00346.2001 [doi]
- Meziri, F., Binda, D., Touati, S., Pellegrin, M., Berthelot, A., Touyz, R.M., Laurant, P. 2011b. Exercise aggravates cardiovascular risks and mortality in rats with disrupted nitric oxide pathway and treated with recombinant human erythropoietin. *Eur. J. Appl. Physiol.* doi:10.1007/s00421-011-1829-z [doi]
- Miyaki, A., Maeda, S., Yoshizawa, M., Misono, M., Saito, Y., Sasai, H., Kim, M.K., Nakata, Y., Tanaka, K., Ajisaka, R. 2009. Effect of habitual aerobic exercise on body weight and arterial function in overweight and obese men. *Am. J. Cardiol.* **104**(104): 823-828. doi:S0002-9149(09)01055-8 [pii];10.1016/j.amjcard.2009.04.057 [doi]
- Miyata, M., Sakuma, F., Ito, M., Ohira, H., Sato, Y., Kasukawa, R. 2000. Athymic nude rats develop severe pulmonary hypertension following monocrotaline administration. *Int. Arch. Allergy Immunol.* **121**(121): 246-252. doi:24324 [pii]
- Mohamed-Ali, V., Pinkney, J.H., Coppack, S.W. 1998. Adipose tissue as an endocrine and paracrine organ. *Int. J. Obes. Relat Metab Disord.* **22**(22): 1145-1158
- Moon, C., Krawczyk, M., Ahn, D., Ahmet, I., Paik, D., Lakatta, E.G., Talan, M.I. 2003. Erythropoietin reduces myocardial infarction and left ventricular functional decline after coronary artery ligation in rats. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **100**(100): 11612-11617. doi:10.1073/pnas.1930406100 [doi];1930406100 [pii]. PMID:PMC208806.

- Moraes-Teixeira, J.A., Felix, A., Fernandes-Santos, C., Moura, A.S., Mandarim-de-Lacerda, C.A., de Carvalho, J.J. 2010. Exercise training enhances elastin, fibrillin and nitric oxide in the aorta wall of spontaneously hypertensive rats. *Exp. Mol. Pathol.* **89**(89): 351-357. doi:S0014-4800(10)00117-6 [pii];10.1016/j.yexmp.2010.08.004 [doi]
- Moreau, C., Lariviere, R., Kingma, I., Grose, J.H., Lebel, M. 2000. Chronic nitric oxide inhibition aggravates hypertension in erythropoietin-treated renal failure rats. *Clin. Exp. Hypertens.* **22**(22): 663-674
- Morishita, E., Masuda, S., Nagao, M., Yasuda, Y., Sasaki, R. 1997. Erythropoietin receptor is expressed in rat hippocampal and cerebral cortical neurons, and erythropoietin prevents in vitro glutamate-induced neuronal death. *Neuroscience* **76**(76): 105-116. doi:S0306452296003065 [pii]
- Morita, T., Kurihara, H., Maemura, K., Yoshizumi, M., Yazaki, Y. 1993. Disruption of cytoskeletal structures mediates shear stress-induced endothelin-1 gene expression in cultured porcine aortic endothelial cells. *J. Clin. Invest* **92**(92): 1706-1712. doi:10.1172/JCI116757 [doi]. PMID:PMC288330.
- Moser, M. 1999. World Health Organization-International Society of Hypertension Guidelines for the Management of Hypertension-Do These Differ From the U.S. Recommendations? Which Guidelines Should the Practicing Physician Follow? *J. Clin. Hypertens. (Greenwich.)* **1**(1): 48-54
- Mueller, C.F., Laude, K., McNally, J.S., Harrison, D.G. 2005. ATVB in focus: redox mechanisms in blood vessels. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **25**(25): 274-278. doi:01.ATV.0000149143.04821.eb [pii];10.1161/01.ATV.0000149143.04821.eb [doi]
- Muirhead, N., Laupacis, A., Wong, C. 1992. Erythropoietin for anaemia in haemodialysis patients: results of a maintenance study (the Canadian Erythropoietin Study Group). *Nephrol. Dial. Transplant.* **7**(7): 811-816
- Muller, D.N., Shagdarsuren, E., Park, J.K., Dechend, R., Mervaala, E., Hampich, F., Fiebeler, A., Ju, X., Finckenberg, P., Theuer, J., Viedt, C., Kreuzer, J., Heidecke, H., Haller, H., Zenke, M., Luft, F.C. 2002. Immunosuppressive treatment protects against angiotensin II-induced renal damage. *Am. J. Pathol.* **161**(161): 1679-1693. doi:S0002-9440(10)64445-8 [pii];10.1016/S0002-9440(10)64445-8 [doi]. PMID:PMC1850776.
- Muntzel, M., Hannedouche, T., Lacour, B., Drueke, T.B. 1993. Erythropoietin increases blood pressure in normotensive and hypertensive rats. *Nephron* **65**(65): 601-604

- Munzel, T., Sinning, C., Post, F., Warnholtz, A., Schulz, E. 2008. Pathophysiology, diagnosis and prognostic implications of endothelial dysfunction. *Ann. Med.* **40**(40): 180-196. doi:790575153 [pii];10.1080/07853890701854702 [doi]
- Napoli, C., Williams-Ignarro, S., de, N.F., Lerman, L.O., D'Armiento, F.P., Crimi, E., Byrns, R.E., Casamassimi, A., Lanza, A., Gombos, F., Sica, V., Ignarro, L.J. 2006. Physical training and metabolic supplementation reduce spontaneous atherosclerotic plaque rupture and prolong survival in hypercholesterolemic mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **103**(103): 10479-10484. doi:0602774103 [pii];10.1073/pnas.0602774103 [doi]. PMID:PMC1502483.
- Nathan, C. 2002. Points of control in inflammation. *Nature* **420**(420): 846-852. doi:10.1038/nature01320 [doi];nature01320 [pii]
- Nava, M., Quiroz, Y., Vaziri, N., Rodriguez-Iturbe, B. 2003. Melatonin reduces renal interstitial inflammation and improves hypertension in spontaneously hypertensive rats. *Am. J. Physiol Renal Physiol* **284**(284): F447-F454. doi:10.1152/ajprenal.00264.2002 [doi];00264.2002 [pii]
- Neusser, M., Tepel, M., Zidek, W. 1993. Erythropoietin increases cytosolic free calcium concentration in vascular smooth muscle cells. *Cardiovasc. Res.* **27**(27): 1233-1236
- Neves, M.F., Amiri, F., Viridis, A., Diep, Q.N., Schiffrin, E.L. 2005. Role of aldosterone in angiotensin II-induced cardiac and aortic inflammation, fibrosis, and hypertrophy. *Can. J. Physiol Pharmacol.* **83**(83): 999-1006. doi:y05-068 [pii];10.1139/y05-068 [doi]
- Nguyen, G. 2007a. The (pro)renin receptor: a new kid in town. *Semin. Nephrol.* **27**(27): 519-523. doi:S0270-9295(07)00091-5 [pii];10.1016/j.semnephrol.2007.07.004 [doi]
- Nguyen, G. 2007b. The (pro)renin receptor: pathophysiological roles in cardiovascular and renal pathology. *Curr. Opin. Nephrol. Hypertens.* **16**(16): 129-133. doi:10.1097/MNH.0b013e328040bfab [doi];00041552-200703000-00012 [pii]
- Ni, Z., Hou, S., Barton, C.H., Vaziri, N.D. 2004b. Lead exposure raises superoxide and hydrogen peroxide in human endothelial and vascular smooth muscle cells. *Kidney Int.* **66**(66): 2329-2336. doi:KID66032 [pii];10.1111/j.1523-1755.2004.66032.x [doi]

- Nicolls, M.R., Taraseviciene-Stewart, L., Rai, P.R., Badesch, D.B., Voelkel, N.F. 2005. Autoimmunity and pulmonary hypertension: a perspective. *Eur. Respir. J.* **26**(26): 1110-1118. doi:26/6/1110 [pii];10.1183/09031936.05.00045705 [doi]
- Nieman, D.C., Henson, D.A., Gusewitch, G., Warren, B.J., Dotson, R.C., Butterworth, D.E., Nehlsen-Cannarella, S.L. 1993. Physical activity and immune function in elderly women. *Med. Sci. Sports Exerc.* **25**(25): 823-831
- Nishiyama, A., Yao, L., Nagai, Y., Miyata, K., Yoshizumi, M., Kagami, S., Kondo, S., Kiyomoto, H., Shokoji, T., Kimura, S., Kohno, M., Abe, Y. 2004. Possible contributions of reactive oxygen species and mitogen-activated protein kinase to renal injury in aldosterone/salt-induced hypertensive rats. *Hypertension* **43**(43): 841-848. doi:10.1161/01.HYP.0000118519.66430.22 [doi];01.HYP.0000118519.66430.22 [pii]
- Nishizaka, M.K., Zaman, M.A., Green, S.A., Renfro, K.Y., Calhoun, D.A. 2004. Impaired endothelium-dependent flow-mediated vasodilation in hypertensive subjects with hyperaldosteronism. *Circulation* **109**(109): 2857-2861. doi:10.1161/01.CIR.0000129307.26791.8E [doi];01.CIR.0000129307.26791.8E [pii]
- Novak, B.L., Force, R.W., Mumford, B.T., Solbrig, R.M. 2003. Erythropoietin-induced hypertensive urgency in a patient with chronic renal insufficiency: case report and review of the literature. *Pharmacotherapy* **23**(23): 265-269
- Nybo, L., Nielsen, B., Pedersen, B.K., Moller, K., Secher, N.H. 2002. Interleukin-6 release from the human brain during prolonged exercise. *J. Physiol* **542**(542): 991-995. doi:PHY_22285 [pii]. PMID:PMC2290444.
- Oliverio, M. I., Kim, H. S., Ito, M., Le, T., Audoly, L., Best, C. F., Hiller, S., Kluckman, K., Maeda, N., Smithies, O., and Coffman, T. M. 1998. Reduced growth, abnormal kidney structure, and type 2 (AT2) angiotensin receptor-mediated blood pressure regulation in mice lacking both AT1A and AT1B receptors for angiotensin II. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **95**:15496-15501.
- Ouchi, N., Kihara, S., Funahashi, T., Nakamura, T., Nishida, M., Kumada, M., Okamoto, Y., Ohashi, K., Nagaretani, H., Kishida, K., Nishizawa, H., Maeda, N., Kobayashi, H., Hiraoka, H., Matsuzawa, Y. 2003. Reciprocal association of C-reactive protein with adiponectin in blood stream and adipose tissue. *Circulation* **107**(107): 671-674

- Ouyang, W., Kolls, J.K., Zheng, Y. 2008. The biological functions of T helper 17 cell effector cytokines in inflammation. *Immunity*. **28**(28): 454-467. doi:S1074-7613(08)00119-2 [pii];10.1016/j.immuni.2008.03.004 [doi]
- Paffenbarger, R.S., Jr., Lee, I.M. 1997. Intensity of physical activity related to incidence of hypertension and all-cause mortality: an epidemiological view. *Blood Press Monit.* **2**(2): 115-123
- Panza, J.A. 1997. Endothelial dysfunction in essential hypertension. *Clin. Cardiol.* **20**(20): II-33
- Paravicini, T.M., Touyz, R.M. 2006. Redox signaling in hypertension. *Cardiovasc. Res.* **71**(71): 247-258. doi:S0008-6363(06)00185-4 [pii];10.1016/j.cardiores.2006.05.001 [doi]
- Park, Y.W., Baba, K., Furuta, Y., Iida, I., Sameshima, K., Arai, M., Hayashi, T. 2004. Enhancement of growth and cellulose accumulation by overexpression of xyloglucanase in poplar. *FEBS Lett.* **564**(564): 183-187. doi:10.1016/S0014-5793(04)00346-1 [doi];S0014579304003461 [pii]
- Parsa, C.J., Matsumoto, A., Kim, J., Riel, R.U., Pascal, L.S., Walton, G.B., Thompson, R.B., Petrofski, J.A., Annex, B.H., Stamler, J.S., Koch, W.J. 2003. A novel protective effect of erythropoietin in the infarcted heart. *J. Clin. Invest* **112**(112): 999-1007. doi:10.1172/JCI18200 [doi];112/7/999 [pii]. PMID:PMC198525.
- Paust, S., Lu, L., McCarty, N., Cantor, H. 2004. Engagement of B7 on effector T cells by regulatory T cells prevents autoimmune disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **101**(101): 10398-10403. doi:10.1073/pnas.0403342101 [doi];0403342101 [pii]. PMID:PMC478583.
- Pedersen, B.K. 2006. The anti-inflammatory effect of exercise: its role in diabetes and cardiovascular disease control. *Essays Biochem.* **42**(42): 105-117. doi:bse0420105 [pii];10.1042/bse0420105 [doi]
- Pedersen, B.K., Hoffman-Goetz, L. 2000. Exercise and the immune system: regulation, integration, and adaptation. *Physiol Rev.* **80**(80): 1055-1081
- Pedersen, B.K., Steensberg, A., Fischer, C., Keller, C., Keller, P., Plomgaard, P., Febbraio, M., Saltin, B. 2003. Searching for the exercise factor: is IL-6 a candidate? *J. Muscle Res. Cell Motil.* **24**(24): 113-119

- Pedersen, B.K., Steensberg, A., Schjerling, P. 2001. Muscle-derived interleukin-6: possible biological effects. *J. Physiol* **536**(536): 329-337. doi:PHY_12855 [pii]. PMID:PMC2278876.
- Pedersen, B.K., Tvede, N., Christensen, L.D., Klarlund, K., Kragbak, S., Halkj-Kristensen, J. 1989. Natural killer cell activity in peripheral blood of highly trained and untrained persons. *Int. J. Sports Med.* **10**(10): 129-131. doi:10.1055/s-2007-1024888 [doi]
- Pellegrin, M., Alonso, F., Aubert, J.F., Bouzourene, K., Braunersreuther, V., Mach, F., Haefliger, J.A., Hayoz, D., Berthelot, A., Nussberger, J., Laurant, P., Mazzolai, L. 2009. Swimming prevents vulnerable atherosclerotic plaque development in hypertensive 2-kidney, 1-clip mice by modulating angiotensin II type 1 receptor expression independently from hemodynamic changes. *Hypertension* **53**(53): 782-789. doi:HYPERTENSIONAHA.108.128165 [pii];10.1161/HYPERTENSIONAHA.108.128165 [doi]
- Pellegrin, M., Berthelot, A., Houdayer, C., Gaume, V., Deckert, V., Laurant, P. 2007. New insights into the vascular mechanisms underlying the beneficial effect of swimming training on the endothelial vasodilator function in apolipoprotein E-deficient mice. *Atherosclerosis* **190**(190): 35-42. doi:S0021-9150(06)00052-9 [pii];10.1016/j.atherosclerosis.2006.02.001 [doi]
- Penkowa, M., Keller, C., Keller, P., Jauffred, S., Pedersen, B.K. 2003. Immunohistochemical detection of interleukin-6 in human skeletal muscle fibers following exercise. *FASEB J.* **17**(17): 2166-2168. doi:10.1096/fj.03-0311fje [doi];03-0311fje [pii]
- Perros, F., Dorfmueller, P., Souza, R., Durand-Gasselin, I., Mussot, S., Mazmanian, M., Herve, P., Emilie, D., Simonneau, G., Humbert, M. 2007. Dendritic cell recruitment in lesions of human and experimental pulmonary hypertension. *Eur. Respir. J.* **29**(29): 462-468. doi:09031936.00094706 [pii];10.1183/09031936.00094706 [doi]
- Pescatello, L.S., Kulikowich, J.M. 2001. The aftereffects of dynamic exercise on ambulatory blood pressure. *Med. Sci. Sports Exerc.* **33**(33): 1855-1861
- Petersen, A.M., Pedersen, B.K. 2005. The anti-inflammatory effect of exercise. *J. Appl. Physiol* **98**(98): 1154-1162. doi:98/4/1154 [pii];10.1152/japplphysiol.00164.2004 [doi]
- Phillips, S.A., Das, E., Wang, J., Pritchard, K., Gutterman, D.D. 2011. Resistance and aerobic exercise protects against acute endothelial impairment induced by a single

- exposure to hypertension during exertion. *J. Appl. Physiol* **110**(110): 1013-1020. doi:jappphysiol.00438.2010 [pii];10.1152/jappphysiol.00438.2010 [doi]. PMID:PMC3075126.
- Piepoli, M.F., Davos, C., Francis, D.P., Coats, A.J. 2004. Exercise training meta-analysis of trials in patients with chronic heart failure (ExTraMATCH). *BMJ* **328**(328): 189. doi:10.1136/bmj.37938.645220.EE [doi];bmj.37938.645220.EE [pii]. PMID:PMC318480.
- Piloto, N., Teixeira, H.M., Teixeira-Lemos, E., Parada, B., Garrido, P., Sereno, J., Pinto, R., Carvalho, L., Costa, E., Belo, L., Santos-Silva, A., Teixeira, F., Reis, F. 2009. Erythropoietin promotes deleterious cardiovascular effects and mortality risk in a rat model of chronic sports doping. *Cardiovasc. Toxicol.* **9**(9): 201-210. doi:10.1007/s12012-009-9054-2 [doi]
- Pinheiro, A.R., Cunha, A.R., Aguila, M.B., Mandarim-de-Lacerda, C.A. 2007. Beneficial effects of physical exercise on hypertension and cardiovascular adverse remodeling of diet-induced obese rats. *Nutr. Metab Cardiovasc. Dis.* **17**(17): 365-375. doi:S0939-4753(06)00058-5 [pii];10.1016/j.numecd.2006.01.009 [doi]
- Platten, M., Youssef, S., Hur, E.M., Ho, P.P., Han, M.H., Lanz, T.V., Phillips, L.K., Goldstein, M.J., Bhat, R., Raine, C.S., Sobel, R.A., Steinman, L. 2009. Blocking angiotensin-converting enzyme induces potent regulatory T cells and modulates TH1- and TH17-mediated autoimmunity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **106**(106): 14948-14953. doi:0903958106 [pii];10.1073/pnas.0903958106 [doi]. PMID:PMC2736463.
- Ploeger, H.E., Takken, T., de Greef, M.H., Timmons, B.W. 2009. The effects of acute and chronic exercise on inflammatory markers in children and adults with a chronic inflammatory disease: a systematic review. *Exerc. Immunol. Rev.* **15**(15): 6-41
- Pohl, U., Holtz, J., Busse, R., Bassenge, E. 1986. Crucial role of endothelium in the vasodilator response to increased flow in vivo. *Hypertension* **8**(8): 37-44
- Prins, B.A., Hu, R.M., Nazario, B., Pedram, A., Frank, H.J., Weber, M.A., Levin, E.R. 1994. Prostaglandin E2 and prostacyclin inhibit the production and secretion of endothelin from cultured endothelial cells. *J. Biol. Chem.* **269**(269): 11938-11944
- Pu, Q., Neves, M.F., Viridis, A., Touyz, R.M., Schiffrin, E.L. 2003. Endothelin antagonism on aldosterone-induced oxidative stress and vascular remodeling. *Hypertension* **42**(42): 49-55. doi:10.1161/01.HYP.0000078357.92682.EC [doi];01.HYP.0000078357.92682.EC [pii]

- Pueyo, M.E., Gonzalez, W., Nicoletti, A., Savoie, F., Arnal, J.F., Michel, J.B. 2000. Angiotensin II stimulates endothelial vascular cell adhesion molecule-1 via nuclear factor-kappaB activation induced by intracellular oxidative stress. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **20**(20): 645-651
- Pullamsetti, S.S., Savai, R., Janssen, W., Dahal, B.K., Seeger, W., Grimminger, F., Ghofrani, H.A., Weissmann, N., Schermuly, R.T. 2011. Inflammation, immunological reaction and role of infection in pulmonary hypertension. *Clin. Microbiol. Infect.* **17**(17): 7-14. doi:CLM3285 [pii];10.1111/j.1469-0691.2010.03285.x [doi]
- Pu Q, Brassard P, Javeshghani DM, Iglarz M, Webb RL, Amiri F, Schiffrin EL. 2008. Effects of combined AT1 receptor antagonist/NEP inhibitor on vascular remodeling and cardiac fibrosis in SHRSP. *J Hypertens.* **26**(2):322-33.
- Quaschnig, T., Ruschitzka, F., Stallmach, T., Shaw, S., Morawietz, H., Goettsch, W., Hermann, M., Slowinski, T., Theuring, F., Hoher, B., Luscher, T.F., Gassmann, M. 2003. Erythropoietin-induced excessive erythrocytosis activates the tissue endothelin system in mice. *FASEB J.* **17**(17): 259-261. doi:10.1096/fj.02-0296fje [doi];02-0296fje [pii]
- Raij, L. 2006. Nitric oxide in the pathogenesis of cardiac disease. *J. Clin. Hypertens. (Greenwich.)* **8**(8): 30-39
- Rajagopalan, S., Kurz, S., Münzel, T., Tarpey, M., Freeman, B.A., Griending, 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**(8):1916-23.
- Rancourt, M.E., Rodrigue, M.E., Agharazii, M., Lariviere, R., Lebel, M. 2010b. Role of oxidative stress in erythropoietin-induced hypertension in uremic rats. *Am. J. Hypertens.* **23**(23): 314-320. doi:ajh2009242 [pii];10.1038/ajh.2009.242 [doi]
- Randall, O.S. 1991. Physiology and pathophysiology of hypertension. *J. Assoc. Acad. Minor. Phys.* **2**(2): 151-155
- Randolph, D.A., Fathman, C.G. 2006. Cd4+Cd25+ regulatory T cells and their therapeutic potential. *Annu. Rev. Med.* **57**(57): 381-402. doi:10.1146/annurev.med.57.121304.131337 [doi]

- Rautureau, Y., Paradis, P., Schiffrin, E.L. 2011. Cross-talk between aldosterone and angiotensin signaling in vascular smooth muscle cells. *Steroids*. doi:S0039-128X(11)00055-9 [pii];10.1016/j.steroids.2011.02.015 [doi]
- Richardson, C.R., Kriska, A.M., Lantz, P.M., Hayward, R.A. 2004. Physical activity and mortality across cardiovascular disease risk groups. *Med. Sci. Sports Exerc.* **36**(36): 1923-1929. doi:00005768-200411000-00015 [pii]
- Ridao, N., Luno, J., Garcia, d., V, Gomez, F., Tejedor, A., Valderrabano, F. 2001. Prevalence of hypertension in renal disease. *Nephrol. Dial. Transplant.* **16 Suppl 1**(16 Suppl 1): 70-73
- Rizzoni, D., Agabiti-Rosei, E. 2011. Structural abnormalities of small resistance arteries in essential hypertension. *Intern. Emerg. Med.* doi:10.1007/s11739-011-0548-0 [doi]
- Robinson, N., Saugy, M., Mangin, P. 2003. Effects of exercise on the secondary blood markers commonly used to suspect erythropoietin doping. *Clin. Lab* **49**(49): 57-62
- Rocha, R., Chander, P.N., Khanna, K., Zuckerman, A., Stier, C.T., Jr. 1998. Mineralocorticoid blockade reduces vascular injury in stroke-prone hypertensive rats. *Hypertension* **31**(31): 451-458
- Rocha, R., Stier, C.T., Jr., Kifor, I., Ochoa-Maya, M.R., Rennke, H.G., Williams, G.H., Adler, G.K. 2000. Aldosterone: a mediator of myocardial necrosis and renal arteriopathy. *Endocrinology* **141**(141): 3871-3878
- Rodrigue, M.E., Brochu, I., orleans-Juste, P., Lariviere, R., Lebel, M. 2008. Effect of erythropoietin on blood pressure and on the vascular endothelial ET-1/ETB receptor system. *Am. J. Hypertens.* **21**(21): 639-643. doi:ajh200837 [pii];10.1038/ajh.2008.37 [doi]
- Rodrigue, M.E., Moreau, C., Lariviere, R., Lebel, M. 2003. Relationship between eicosanoids and endothelin-1 in the pathogenesis of erythropoietin-induced hypertension in uremic rats. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* **41**(41): 388-395
- Rodriguez-Iturbe, B. 2010. Renal infiltration of immunocompetent cells: cause and effect of sodium-sensitive hypertension. *Clin. Exp. Nephrol.* **14**(14): 105-111. doi:10.1007/s10157-010-0268-1 [doi]

- Rodriguez-Iturbe, B., Zhan, C.D., Quiroz, Y., Sindhu, R.K., Vaziri, N.D. 2003. Antioxidant-rich diet relieves hypertension and reduces renal immune infiltration in spontaneously hypertensive rats. *Hypertension* **41**(41): 341-346
- Roger, S.D., Fluck, R.J., McMahon, A.C., Raine, A.E. 1996. Recombinant erythropoietin increases blood pressure in experimental hypertension and uraemia without change in vascular cytosolic calcium. *Nephron* **73**(73): 212-218
- Romagni, P., Rossi, F., Guerrini, L., Quirini, C., Santiemma, V. 2003. Aldosterone induces contraction of the resistance arteries in man. *Atherosclerosis* **166**(166): 345-349. doi:S0021915002003635 [pii]
- Ross, R. 1999. Atherosclerosis: an inflammatory disease. *N Engl J Med*; **340**:115-126.
- Ruan, X., Purdy, K.E., Oliverio, M.I., Coffman, T.M., Arendshorst, W.J. 1999. Effects of candesartan on angiotensin II-induced renal vasoconstriction in rats and mice. *J. Am. Soc. Nephrol.* **10 Suppl 11**(10 Suppl 11): S202-S207
- Ruschitzka, F.T., Wenger, R.H., Stallmach, T., Quaschnig, T., de, W.C., Wagner, K., Labugger, R., Kelm, M., Noll, G., Rulicke, T., Shaw, S., Lindberg, R.L., Rodenwaldt, B., Lutz, H., Bauer, C., Luscher, T.F., Gassmann, M. 2000b. Nitric oxide prevents cardiovascular disease and determines survival in polyglobulic mice overexpressing erythropoietin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **97**(97): 11609-11613. doi:10.1073/pnas.97.21.11609 [doi];97/21/11609 [pii]. PMID:PMC17248.
- Russo, P., Lauria, F., Loguercio, M., Barba, G., Arnout, J., Cappuccio, F.P., de, L.M., Donati, M.B., Iacoviello, L., Krogh, V., van, D.M., Siani, A. 2007. -344C/T Variant in the promoter of the aldosterone synthase gene (CYP11B2) is associated with metabolic syndrome in men. *Am. J. Hypertens.* **20**(20): 218-222. doi:S0895-7061(06)00486-9 [pii];10.1016/j.amjhyper.2006.07.012 [doi]
- Sasaki, T., Kuzuya, M., Nakamura, K., Cheng, X.W., Hayashi, T., Song, H., Hu, L., Okumura, K., Murohara, T., Iguchi, A., Sato, K. 2010. AT1 blockade attenuates atherosclerotic plaque destabilization accompanied by the suppression of cathepsin S activity in apoE-deficient mice. *Atherosclerosis* **210**(210): 430-437. doi:S0021-9150(09)01082-X [pii];10.1016/j.atherosclerosis.2009.12.031 [doi]
- Savoia, C., Burger, D., Nishigaki, N., Montezano, A., Touyz, R.M. 2011. Angiotensin II and the vascular phenotype in hypertension. *Expert. Rev. Mol. Med.* **13**(13): e11. doi:S1462399411001815 [pii];10.1017/S1462399411001815 [doi]
- Savoia, C., Touyz, R.M., Amiri, F., Schiffrin, E.L. 2008. Selective mineralocorticoid receptor blocker eplerenone reduces resistance artery stiffness in hypertensive

- patients. *Hypertension* **51**(51): 432-439. doi:HYPERENSIONAHA.107.103267 [pii];10.1161/HYPERENSIONAHA.107.103267 [doi]
- Sawyer, S.T., Krantz, S.B., Sawada, K. 1989. Receptors for erythropoietin in mouse and human erythroid cells and placenta. *Blood* **74**(74): 103-109
- Scandalios, J.G. 2002. Oxidative stress responses--what have genome-scale studies taught us? *Genome Biol.* **3**(3): REVIEWS1019. PMID:PMC139384.
- Schiffrin, E.L. 1992. Reactivity of small blood vessels in hypertension: relation with structural changes. State of the art lecture. *Hypertension* **19**(19): II1-II9
- Schiffrin, E.L. 2000. Endothelin: role in experimental hypertension. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* **35**(35): S33-S35
- Schiffrin, E.L. 2002. Beyond blood pressure: the endothelium and atherosclerosis progression. *Am. J. Hypertens.* **15**(15): 115S-122S. doi:S0895706102030066 [pii]
- Schiffrin, E.L. 2004. Remodeling of resistance arteries in essential hypertension and effects of antihypertensive treatment. *Am. J. Hypertens.* **17**(17): 1192-1200. doi:S0895-7061(04)00859-3 [pii];10.1016/j.amjhyper.2004.05.023 [doi]
- Schiffrin, E.L. 2005. Vascular endothelin in hypertension. *Vascul. Pharmacol.* **43**(43): 19-29. doi:S1537-1891(05)00096-0 [pii];10.1016/j.vph.2005.03.004 [doi]
- Schiffrin, E.L. 2006. Effects of aldosterone on the vasculature. *Hypertension* **47**(47): 312-318. doi:01.HYP.0000201443.63240.a7 [pii];10.1161/01.HYP.0000201443.63240.a7 [doi]
- Schiffrin, E.L. 2010a. How are stressed prehypertensive rats pressured? Endothelin pleads guilty. *Hypertension* **56**(56): 191-192. doi:HYPERENSIONAHA.110.154013 [pii];10.1161/HYPERENSIONAHA.110.154013 [doi]
- Schiffrin, E.L. 2010c. T lymphocytes: a role in hypertension? *Curr. Opin. Nephrol. Hypertens.* **19**(19): 181-186. doi:10.1097/MNH.0b013e3283360a2e [doi]
- Schildroth, J., Rettig-Zimmermann, J., Kalk, P., Steege, A., Fahling, M., Sendeski, M., Paliege, A., Lai, E.Y., Bachmann, S., Persson, P.B., Hoher, B., Patzak, A. 2011. Endothelin type A and B receptors in the control of afferent and efferent arterioles in mice. *Nephrol. Dial. Transplant.* **26**(26): 779-789. doi:gfq534 [pii];10.1093/ndt/gfq534 [doi]

- Schnackenberg, C.G., Wilcox, C.S. 1999. Two-week administration of tempol attenuates both hypertension and renal excretion of 8-Iso prostaglandin f2alpha. *Hypertension* **33**(33): 424-428
- Schrader, L.I., Kinzenbaw, D.A., Johnson, A.W., Faraci, F.M., Didion, S.P. 2007. IL-6 deficiency protects against angiotensin II induced endothelial dysfunction and hypertrophy. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **27**(27): 2576-2581.
doi:ATVBAHA.107.153080 [pii];10.1161/ATVBAHA.107.153080 [doi]
- Schulz, E., Gori, T., Munzel, T. 2011. Oxidative stress and endothelial dysfunction in hypertension. *Hypertens. Res.* doi:hr201139 [pii];10.1038/hr.2011.39 [doi]
- Shao, J., Nangaku, M., Miyata, T., Inagi, R., Yamada, K., Kurokawa, K., Fujita, T. 2003. Imbalance of T-cell subsets in angiotensin II-infused hypertensive rats with kidney injury. *Hypertension* **42**(42): 31-38.
doi:10.1161/01.HYP.0000075082.06183.4E [doi];01.HYP.0000075082.06183.4E [pii]
- Sharefkin, J.B., Diamond, S.L., Eskin, S.G., McIntire, L.V., Dieffenbach, C.W. 1991. Fluid flow decreases preproendothelin mRNA levels and suppresses endothelin-1 peptide release in cultured human endothelial cells. *J. Vasc. Surg.* **14**(14): 1-9.
doi:0741-5214(91)90148-N [pii]
- Sharifi, A.M., Schiffrin, E.L. 1997. Apoptosis in aorta of deoxycorticosterone acetate-salt hypertensive rats: effect of endothelin receptor antagonism. *J. Hypertens.* **15**(15): 1441-1448
- Shepherd, R.E., Kuehne, M.L., Kenno, K.A., Durstine, J.L., Balon, T.W., Rapp, J.P. 1982. Attenuation of blood pressure increases in Dahl salt-sensitive rats by exercise. *J. Appl. Physiol* **52**(52): 1608-1613
- Shi, Z.D., Tarbell, J.M. 2011. Fluid Flow Mechanotransduction in Vascular Smooth Muscle Cells and Fibroblasts. *Ann. Biomed. Eng.* doi:10.1007/s10439-011-0309-2 [doi]
- Shimada, N., Saka, S., Sekizuka, K., Tanaka, A., Takahashi, Y., Nakamura, T., Ebihara, I., Koide, H. 2003b. Increased endothelin: nitric oxide ratio is associated with erythropoietin-induced hypertension in hemodialysis patients. *Ren Fail.* **25**(25): 569-578
- Silva, G.J., Brum, P.C., Negrao, C.E., Krieger, E.M. 1997. Acute and chronic effects of exercise on baroreflexes in spontaneously hypertensive rats. *Hypertension* **30**(30): 714-719

- Singh, A.K., Szczech, L., Tang, K.L., Barnhart, H., Sapp, S., Wolfson, M., Reddan, D. 2006. Correction of anemia with epoetin alfa in chronic kidney disease. *N. Engl. J. Med.* **355**(355): 2085-2098. doi:355/20/2085 [pii];10.1056/NEJMoa065485 [doi]
- Sloan, R.P., Shapiro, P.A., Demeersman, R.E., McKinley, P.S., Tracey, K.J., Slavov, I., Fang, Y., Flood, P.D. 2007. Aerobic exercise attenuates inducible TNF production in humans. *J. Appl. Physiol* **103**(103): 1007-1011. doi:00147.2007 [pii];10.1152/japplphysiol.00147.2007 [doi]
- Smith, J.K., Dykes, R., Douglas, J.E., Krishnaswamy, G., Berk, S. 1999. Long-term exercise and atherogenic activity of blood mononuclear cells in persons at risk of developing ischemic heart disease. *JAMA* **281**(281): 1722-1727. doi:jci90017 [pii]
- Smith, K.J., Bleyer, A.J., Little, W.C., Sane, D.C. 2003. The cardiovascular effects of erythropoietin. *Cardiovasc. Res.* **59**(59): 538-548. doi:S0008636303004681 [pii]
- Sonnenschein, K., Horvath, T., Mueller, M., Markowski, A., Siegmund, T., Jacob, C., Drexler, H., Landmesser, U. 2011. Exercise training improves in vivo endothelial repair capacity of early endothelial progenitor cells in subjects with metabolic syndrome. *Eur. J. Cardiovasc. Prev. Rehabil.* doi:1741826710389373 [pii];10.1177/1741826710389373 [doi]
- Spieker, L.E., Noll, G., Ruschitzka, F.T., Maier, W., Luscher, T.F. 2000. Working under pressure: the vascular endothelium in arterial hypertension. *J. Hum. Hypertens.* **14**(14): 617-630
- Steensberg, A., Fischer, C.P., Keller, C., Moller, K., Pedersen, B.K. 2003. IL-6 enhances plasma IL-1ra, IL-10, and cortisol in humans. *Am. J. Physiol Endocrinol. Metab* **285**(285): E433-E437. doi:10.1152/ajpendo.00074.2003 [doi];285/2/E433 [pii]
- Steensberg, A., Keller, C., Starkie, R.L., Osada, T., Febbraio, M.A., Pedersen, B.K. 2002. IL-6 and TNF-alpha expression in, and release from, contracting human skeletal muscle. *Am. J. Physiol Endocrinol. Metab* **283**(283): E1272-E1278. doi:10.1152/ajpendo.00255.2002 [doi];00255.2002 [pii]
- Stephens, G.L., Shevach, E.M. 2007. Foxp3+ regulatory T cells: selfishness under scrutiny. *Immunity.* **27**(27): 417-419. doi:S1074-7613(07)00412-8 [pii];10.1016/j.immuni.2007.08.008 [doi]

- Struthers, A.D., MacDonald, T.M. 2004. Review of aldosterone- and angiotensin II-induced target organ damage and prevention. *Cardiovasc. Res.* **61**(61): 663-670. doi:10.1016/j.cardiores.2003.11.037 [doi];S0008636303007594 [pii]
- Suematsu, M., Suzuki, H., Delano, F.A., Schmid-Schonbein, G.W. 2002. The inflammatory aspect of the microcirculation in hypertension: oxidative stress, leukocytes/endothelial interaction, apoptosis. *Microcirculation.* **9**(9): 259-276. doi:10.1038/sj.mn.7800141 [doi]
- Sun, Y., Zhang, J., Lu, L., Bedigian, M.P., Robinson, A.D., Weber, K.T. 2004. Tissue angiotensin II in the regulation of inflammatory and fibrogenic components of repair in the rat heart. *J. Lab Clin. Med.* **143**(143): 41-51. doi:10.1016/S0022214303001914 [doi];S0022214303001914 [pii]
- Szostak, J., Laurant P. 2011. The forgotten face of regular physical exercise: a 'natural' anti-atherogenic activity. *Clin Sci (Lond).* **121**(3):91-106. PMID: 21729002.
- Taddei, S., Ghiadoni, L., Virdis, A., Versari, D., Salvetti, A. 2003. Mechanisms of endothelial dysfunction: clinical significance and preventive non-pharmacological therapeutic strategies. *Curr. Pharm. Des* **9**(9): 2385-2402
- Taddei, S., Virdis, A., Mattei, P., Salvetti, A. 1993. Vasodilation to acetylcholine in primary and secondary forms of human hypertension. *Hypertension* **21**(21): 929-933
- Taleb, S., Tedgui, A., Mallat, Z. 2008b. Regulatory T-cell immunity and its relevance to atherosclerosis. *J. Intern. Med.* **263**(263): 489-499. doi:JIM1944 [pii];10.1111/j.1365-2796.2008.01944.x [doi]
- Tamby, M.C., Chanseaud, Y., Humbert, M., Fermanian, J., Guilpain, P., Garcia-de-la-Pena-Lefebvre, Brunet, S., Servettaz, A., Weill, B., Simonneau, G., Guillevin, L., Boissier, M.C., Mouthon, L. 2005. Anti-endothelial cell antibodies in idiopathic and systemic sclerosis associated pulmonary arterial hypertension. *Thorax* **60**(60): 765-772. doi:60/9/765 [pii];10.1136/thx.2004.029082 [doi]. PMID:PMC1747530.
- Taniyama, Y., Griendling, K.K. 2003. Reactive oxygen species in the vasculature: molecular and cellular mechanisms. *Hypertension* **42**(42): 1075-1081. doi:10.1161/01.HYP.0000100443.09293.4F [doi];01.HYP.0000100443.09293.4F [pii]
- Taylor, R.S., Brown, A., Ebrahim, S., Jolliffe, J., Noorani, H., Rees, K., Skidmore, B., Stone, J.A., Thompson, D.R., Oldridge, N. 2004. Exercise-based rehabilitation for patients with coronary heart disease: systematic review and meta-analysis of

- randomized controlled trials. *Am. J. Med.* **116**(116): 682-692.
doi:10.1016/j.amjmed.2004.01.009 [doi];S0002934304001238 [pii]
- Teng, R., Calvert, J.W., Sibmooh, N., Piknova, B., Suzuki, N., Sun, J., Martinez, K., Yamamoto, M., Schechter, A.N., Lefer, D.J., Noguchi, C.T. 2011. Acute erythropoietin cardioprotection is mediated by endothelial response. *Basic Res. Cardiol.* **106**(106): 343-354. doi:10.1007/s00395-011-0158-z [doi]
- Thein, L.A., Thein, J.M., Landry, G.L. 1995. Ergogenic aids. *Phys. Ther.* **75**(75): 426-439
- Thornton, A.M., Shevach, E.M. 1998. CD4+CD25+ immunoregulatory T cells suppress polyclonal T cell activation in vitro by inhibiting interleukin 2 production. *J. Exp. Med.* **188**(188): 287-296. PMID:PMC2212461.
- Tian, N., Moore, R.S., Braddy, S., Rose, R.A., Gu, J.W., Hughson, M.D., Manning, R.D., Jr. 2007. Interactions between oxidative stress and inflammation in salt-sensitive hypertension. *Am. J. Physiol Heart Circ. Physiol* **293**(293): H3388-H3395.
doi:00981.2007 [pii];10.1152/ajpheart.00981.2007 [doi]
- Tian, N., Thrasher, K.D., Gundy, P.D., Hughson, M.D., Manning, R.D., Jr. 2005. Antioxidant treatment prevents renal damage and dysfunction and reduces arterial pressure in salt-sensitive hypertension. *Hypertension* **45**(45): 934-939.
doi:01.HYP.0000160404.08866.5a [pii];10.1161/01.HYP.0000160404.08866.5a [doi]
- Timmermans, P.B., Wong, P.C., Chiu, A.T., Herblin, W.F., Benfield, P., Carini, D.J., Lee, R.J., Wexler, R.R., Saye, J.A., Smith, R.D. 1993a. Angiotensin II receptors and angiotensin II receptor antagonists. *Pharmacol. Rev.* **45**(45): 205-251
- Timmermans, P.B., Wong, P.C., Chiu, A.T., Herblin, W.F., Smith, R.D. 1993b. New perspectives in angiotensin system control. *J. Hum. Hypertens.* **7 Suppl 2**(7 Suppl 2): S19-S31
- Timmons, B.W. 2005. Paediatric exercise immunology: health and clinical applications. *Exerc. Immunol. Rev.* **11**(11): 108-144
- Tipton, C.M. 1991. Exercise, training and hypertension: an update. *Exerc. Sport Sci. Rev.* **19**(19): 447-505
- Tipton, C.M., Sebastian, L.A., Overton, J.M., Woodman, C.R., Williams, S.B. 1991. Chronic exercise and its hemodynamic influences on resting blood pressure of hypertensive rats. *J. Appl. Physiol* **71**(71): 2206-2210

- Touati, S., Meziri, F., Devaux, S., Berthelot, A., Touyz, R.M., Laurant, P. 2011. Exercise reverses metabolic syndrome in high-fat diet-induced obese rats. *Med. Sci. Sports Exerc.* **43**(43): 398-407. doi:10.1249/MSS.0b013e3181eeb12d [doi]
- Touyz, R.M. 2005a. Molecular and cellular mechanisms in vascular injury in hypertension: role of angiotensin II. *Curr. Opin. Nephrol. Hypertens.* **14**(14): 125-131. doi:00041552-200503000-00007 [pii]
- Touyz, R.M. 2005b. Reactive oxygen species as mediators of calcium signaling by angiotensin II: implications in vascular physiology and pathophysiology. *Antioxid. Redox. Signal.* **7**(7): 1302-1314. doi:10.1089/ars.2005.7.1302 [doi]
- Touyz, R.M., He, G., El, M.M., Schiffrin, E.L. 2001. p38 Map kinase regulates vascular smooth muscle cell collagen synthesis by angiotensin II in SHR but not in WKY. *Hypertension* **37**(37): 574-580
- Touyz, R.M., Schiffrin, E.L. 2003. Role of endothelin in human hypertension. *Can. J. Physiol Pharmacol.* **81**(81): 533-541. doi:10.1139/y03-009 [doi];y03-009 [pii]
- Tran, H.A., Schwartzbard, A., Weintraub, H.S. 2011. Role of RAAS Inhibition in the Prevention of Cardiovascular Disease. *Curr. Treat. Options. Cardiovasc. Med.* doi:10.1007/s11936-011-0126-9 [doi]
- Tran, L.T., MacLeod, K.M., McNeill, J.H. 2009. Chronic etanercept treatment prevents the development of hypertension in fructose-fed rats. *Mol. Cell Biochem.* **330**(330): 219-228. doi:10.1007/s11010-009-0136-z [doi]
- Trinchieri, G. 1989. Biology of natural killer cells. *Adv. Immunol.* **47**(47): 187-376
- Tsai, J.C., Yang, H.Y., Wang, W.H., Hsieh, M.H., Chen, P.T., Kao, C.C., Kao, P.F., Wang, C.H., Chan, P. 2004. The beneficial effect of regular endurance exercise training on blood pressure and quality of life in patients with hypertension. *Clin. Exp. Hypertens.* **26**(26): 255-265
- Turner, M.J., Spina, R.J., Kohrt, W.M., Ehsani, A.A. 2000. Effect of endurance exercise training on left ventricular size and remodeling in older adults with hypertension. *J. Gerontol. A Biol. Sci. Med. Sci.* **55**(55): M245-M251
- Uematsu, M., Ohara, Y., Navas, J.P., Nishida, K., Murphy, T.J., Alexander, R.W., Nerem, R.M., Harrison, D.G. 1995. Regulation of endothelial cell nitric oxide synthase mRNA expression by shear stress. *Am. J. Physiol* **269**(269): C1371-C1378

- Unger, E.F., Thompson, A.M., Blank, M.J., Temple, R. 2010. Erythropoiesis-stimulating agents--time for a reevaluation. *N. Engl. J. Med.* **362**(362): 189-192. doi:NEJMp0912328 [pii];10.1056/NEJMp0912328 [doi]
- Valaperti, A., Marty, R.R., Kania, G., Germano, D., Mauermann, N., Dirnhofer, S., Leimenstoll, B., Blyszczuk, P., Dong, C., Mueller, C., Hunziker, L., Eriksson, U. 2008b. CD11b+ monocytes abrogate Th17 CD4+ T cell-mediated experimental autoimmune myocarditis. *J. Immunol.* **180**(180): 2686-2695. doi:180/4/2686 [pii]
- Van, G.C., Van Damme-Lombaerts, R., Vanrusselt, M., de, M.A., Proesmans, W., Vermeylen, J. 1990. Recombinant human erythropoietin increases blood pressure, platelet aggregability and platelet free calcium mobilisation in uraemic children: a possible link? *Thromb. Haemost.* **64**(64): 7-10
- Vaziri, N.D. 2008. Causal link between oxidative stress, inflammation, and hypertension. *Iran J. Kidney Dis.* **2**(2): 1-10. doi:61/57 [pii]
- Vaziri, N.D., Dicus, M., Ho, N.D., Boroujerdi-Rad, L., Sindhu, R.K. 2003. Oxidative stress and dysregulation of superoxide dismutase and NADPH oxidase in renal insufficiency. *Kidney Int.* **63**(63): 179-185. doi:kid702 [pii];10.1046/j.1523-1755.2003.00702.x [doi]
- Vaziri, N.D., Oveisi, F., Ding, Y. 1998. Role of increased oxygen free radical activity in the pathogenesis of uremic hypertension. *Kidney Int.* **53**(53): 1748-1754. doi:10.1046/j.1523-1755.1998.00947.x [doi]
- Vaziri, N.D., Rodriguez-Iturbe, B. 2006. Mechanisms of disease: oxidative stress and inflammation in the pathogenesis of hypertension. *Nat. Clin. Pract. Nephrol.* **2**(2): 582-593. doi:ncpneph0283 [pii];10.1038/ncpneph0283 [doi]
- Vaziri, N.D., Xu, Z.G., Shahkarami, A., Huang, K.T., Rodriguez-Iturbe, B., Natarajan, R. 2005. Role of AT1 receptor in regulation of vascular MCP-1, IL-6, PAI-1, MAP kinase, and matrix expressions in obesity. *Kidney Int.* **68**(68): 2787-2793. doi:KID750 [pii];10.1111/j.1523-1755.2005.00750.x [doi]
- Vaziri, N.D., Zhou, X.J., Naqvi, F., Smith, J., Oveisi, F., Wang, Z.Q., Purdy, R.E. 1996. Role of nitric oxide resistance in erythropoietin-induced hypertension in rats with chronic renal failure. *Am. J. Physiol* **271**(271): E113-E122
- Vaziri, N.D., Zhou, X.J., Smith, J., Oveisi, F., Baldwin, K., Purdy, R.E. 1995. In vivo and in vitro pressor effects of erythropoietin in rats. *Am. J. Physiol* **269**(269): F838-F845

- Venegas-Pont, M., Manigrasso, M.B., Grifoni, S.C., LaMarca, B.B., Maric, C., Racusen, L.C., Glover, P.H., Jones, A.V., Drummond, H.A., Ryan, M.J. 2010. Tumor necrosis factor-alpha antagonist etanercept decreases blood pressure and protects the kidney in a mouse model of systemic lupus erythematosus. *Hypertension* **56**(56): 643-649. doi:HYPERTENSIONAHA.110.157685 [pii];10.1161/HYPERTENSIONAHA.110.157685 [doi]. PMID:PMC2989495.
- Verlohren, S., Muller, D.N., Luft, F.C., Dechend, R. 2009. Immunology in hypertension, preeclampsia, and target-organ damage. *Hypertension* **54**(54): 439-443. doi:HYPERTENSIONAHA.108.120253 [pii];10.1161/HYPERTENSIONAHA.108.120253 [doi]
- Viel, E.C., Lemarie, C.A., Benkirane, K., Paradis, P., Schiffrin, E.L. 2010b. Immune regulation and vascular inflammation in genetic hypertension. *Am. J. Physiol Heart Circ. Physiol* **298**(298): H938-H944. doi:00707.2009 [pii];10.1152/ajpheart.00707.2009 [doi]
- Vinet, A., Karpoff, L., Walther, G., Startun, A., Obert, P., Goret, L., Dauzat, M., Perez-Martin, A. 2010. Vascular reactivity at rest and during exercise in middle-aged obese men: effects of short-term, low-intensity, exercise training. *Int. J. Obes. (Lond)*. doi:ijo2010206 [pii];10.1038/ijo.2010.206 [doi]
- Vinh, A., Chen, W., Blinder, Y., Weiss, D., Taylor, W.R., Goronzy, J.J., Weyand, C.M., Harrison, D.G., Guzik, T.J. 2010. Inhibition and genetic ablation of the B7/CD28 T-cell costimulation axis prevents experimental hypertension. *Circulation* **122**(122): 2529-2537. doi:CIRCULATIONAHA.109.930446 [pii];10.1161/CIRCULATIONAHA.109.930446 [doi]. PMID:PMC3064430.
- Virdis, A., Ghiadoni, L., Taddei, S. 2011. Effects of Antihypertensive Treatment on Endothelial Function. *Curr. Hypertens. Rep.* doi:10.1007/s11906-011-0207-x [doi]
- Virdis, A., Iglarz, M., Neves, M.F., Amiri, F., Touyz, R.M., Rozen, R., Schiffrin, E.L. 2003. Effect of hyperhomocystinemia and hypertension on endothelial function in methylenetetrahydrofolate reductase-deficient mice. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **23**(23): 1352-1357. doi:10.1161/01.ATV.0000083297.47245.DA [doi];01.ATV.0000083297.47245.DA [pii]
- Virdis, A., Neves, M.F., Amiri, F., Viel, E., Touyz, R.M., Schiffrin, E.L. 2002. Spironolactone improves angiotensin-induced vascular changes and oxidative stress. *Hypertension* **40**(40): 504-510

- Viridis, A., Schiffrin, E.L. 2003. Vascular inflammation: a role in vascular disease in hypertension? *Curr. Opin. Nephrol. Hypertens.* **12**(12): 181-187. doi:10.1097/01.mnh.0000058797.51455.ad [doi]
- Vogel, J., Kiessling, I., Heinicke, K., Stallmach, T., Ossent, P., Vogel, O., Aulmann, M., Frietsch, T., Schmid-Schonbein, H., Kuschinsky, W., Gassmann, M. 2003b. Transgenic mice overexpressing erythropoietin adapt to excessive erythrocytosis by regulating blood viscosity. *Blood* **102**(102): 2278-2284. doi:10.1182/blood-2003-01-0283 [doi];2003-01-0283 [pii]
- Vogt, C., Pentz, S., Rich, I.N. 1989b. A role for the macrophage in normal hemopoiesis: III. In vitro and in vivo erythropoietin gene expression in macrophages detected by in situ hybridization. *Exp. Hematol.* **17**(17): 391-397
- Vollaard, N.B., Shearman, J.P., Cooper, C.E. 2005. Exercise-induced oxidative stress: myths, realities and physiological relevance. *Sports Med.* **35**(35): 1045-1062. doi:35124 [pii]
- Walpol, P.L., Gotlieb, A.I., Cybulsky, M.I., Langille, B.L. 1995. Expression of ICAM-1 and VCAM-1 and monocyte adherence in arteries exposed to altered shear stress. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **15**(15): 2-10
- Wang, H., Nawata, J., Kakudo, N., Sugimura, K., Suzuki, J., Sakuma, M., Ikeda, J., Shirato, K. 2004. The upregulation of ICAM-1 and P-selectin requires high blood pressure but not circulating renin-angiotensin system in vivo. *J. Hypertens.* **22**(22): 1323-1332. doi:00004872-200407000-00014 [pii]
- Wang, X.Q., Vaziri, N.D. 1999. Erythropoietin depresses nitric oxide synthase expression by human endothelial cells. *Hypertension* **33**(33): 894-899
- Warren, M.K., Ralph, P. 1986. Macrophage growth factor CSF-1 stimulates human monocyte production of interferon, tumor necrosis factor, and colony stimulating activity. *J. Immunol.* **137**(137): 2281-2285
- Westenfelder, C., Biddle, D.L., Baranowski, R.L. 1999. Human, rat, and mouse kidney cells express functional erythropoietin receptors. *Kidney Int.* **55**(55): 808-820. doi:10.1046/j.1523-1755.1999.055003808.x [doi]
- Wilson, L.D., Zaldivar, F.P., Schwindt, C.D., Wang-Rodriguez, J., Cooper, D.M. 2009. Circulating T-regulatory cells, exercise and the elite adolescent swimmer. *Pediatr. Exerc. Sci.* **21**(21): 305-317

- Wilund, K.R. 2007. Is the anti-inflammatory effect of regular exercise responsible for reduced cardiovascular disease? *Clin. Sci. (Lond)* **112**(112): 543-555. doi:CS20060368 [pii];10.1042/CS20060368 [doi]
- Wong, S., Brennan, F.E., Young, M.J., Fuller, P.J., Cole, T.J. 2007. A direct effect of aldosterone on endothelin-1 gene expression in vivo. *Endocrinology* **148**(148): 1511-1517. doi:en.2006-0965 [pii];10.1210/en.2006-0965 [doi]
- Woodman, C.R., Turk, J.R., Williams, D.P., Laughlin, M.H. 2003. Exercise training preserves endothelium-dependent relaxation in brachial arteries from hyperlipidemic pigs. *J. Appl. Physiol* **94**(94): 2017-2026. doi:10.1152/jappphysiol.01025.2002 [doi];94/5/2017 [pii]
- Wu, H., Lee, S.H., Gao, J., Liu, X., Iruela-Arispe, M.L. 1999. Inactivation of erythropoietin leads to defects in cardiac morphogenesis. *Development* **126**(126): 3597-3605
- Yang, M.Z., Mun, C.H., Choi, Y.J., Baik, J.H., Park, K.A., Lee, W.T., Lee, J.E. 2007. Agmatine inhibits matrix metalloproteinase-9 via endothelial nitric oxide synthase in cerebral endothelial cells. *Neurol. Res.* **29**(29): 749-754. doi:10.1179/016164107X208103 [doi]
- Yen, M.H., Yang, J.H., Sheu, J.R., Lee, Y.M., Ding, Y.A. 1995. Chronic exercise enhances endothelium-mediated dilation in spontaneously hypertensive rats. *Life Sci.* **57**(57): 2205-2213. doi:0024320595021275 [pii]
- Yoon, J.W., Pahl, M.V., Vaziri, N.D. 2007. Spontaneous leukocyte activation and oxygen-free radical generation in end-stage renal disease. *Kidney Int.* **71**(71): 167-172. doi:5002019 [pii];10.1038/sj.ki.5002019 [doi]
- Yoshizumi, M., Kurihara, H., Sugiyama, T., Takaku, F., Yanagisawa, M., Masaki, T., Yazaki, Y. 1989. Hemodynamic shear stress stimulates endothelin production by cultured endothelial cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **161**(161): 859-864. doi:0006-291X(89)92679-X [pii]
- Yu, X., Dluz, S., Graves, D.T., Zhang, L., Antoniades, H.N., Hollander, W., Prusty, S., Valente, A.J., Schwartz, C.J., Sonenshein, G.E. 1992. Elevated expression of monocyte chemoattractant protein 1 by vascular smooth muscle cells in hypercholesterolemic primates. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **89**(89): 6953-6957. PMID:PMC49623.

- Yung, L.M., Laher, I., Yao, X., Chen, Z.Y., Huang, Y., Leung, F.P. 2009. Exercise, vascular wall and cardiovascular diseases: an update (part 2). *Sports Med.* **39**(39): 45-63. doi:4 [pii]
- Zhan, C.D., Sindhu, R.K., Vaziri, N.D. 2004. Up-regulation of kidney NAD(P)H oxidase and calcineurin in SHR: reversal by lifelong antioxidant supplementation. *Kidney Int.* **65**(65): 219-227. doi:10.1111/j.1523-1755.2004.00372.x [doi]
- Zhang, J., Ren, C.X., Qi, Y.F., Lou, L.X., Chen, L., Zhang, L.K., Wang, X., Tang, C. 2006. Exercise training promotes expression of apelin and APJ of cardiovascular tissues in spontaneously hypertensive rats. *Life Sci.* **79**(79): 1153-1159. doi:S0024-3205(06)00260-8 [pii];10.1016/j.lfs.2006.03.040 [doi]
- Zhu, Y.C., Zhu, Y.Z., Gohlke, P., Stauss, H.M., Unger, T. 1997. Effects of angiotensin-converting enzyme inhibition and angiotensin II AT1 receptor antagonism on cardiac parameters in left ventricular hypertrophy. *Am. J. Cardiol.* **80**(80): 110A-117A

ANNEXES

Communications

Orales

2011/2012 : Tlili Barhoumi, Marie Briet, Pierre Paradis, Pascal Laurant and Ernesto L. Schiffrin. An endothelin receptor type A antagonist prevents the deleterious vascular effects of erythropoietin in mice overexpressing human preproendothelin-1. Orlando-FL.20-24 Septembre HBPR. USA.

2011/2012 : Briet M, Barhoumi T, Cristina Sierra, Tom M. Coffman, Pierre Paradis, Schiffrin EL. Aldosterone-induced small artery remodeling requires functional angiotensin type 1a and 1b receptors ESH 2011, Orlando-FL. 20-24 Septembre HBPR. USA.

2011/2012 : Briet M, Barhoumi T, Davidman D, Bercovitch D, Frisch G, Nessim SJ, Lipman ML, Schiffrin EL. Recombinant human erythropoietin alters subcutaneous resistance artery endothelial function through a mechanism involving oxidative stress in patients with chronic kidney disease stage 4 ESH 2011, Milan,17-21 june 2011. Italy

2010/2011 : Tlili Barhoumi, Daniel Kasal , Pierre Paradis , Pascal Laurant and Ernesto L. Schiffrin. Adoptive transfer of T-regulatory lymphocytes attenuates angiotensin II vascular effects. Washington 12-16 Octobre AHA. USA.

2010/2011 : Tlili Barhoumi, Shbat layla, Marie briet , Pierre Paradis , Pascal Laurant and Ernesto L. Schiffrin. Effect of Exercise and EPO treatment in mice overexpressing human endothelin-1 in endothelium. Washington 12-16 Octobre AHA. USA.

2010/2011 : Daniel Kasal , Tlili Barhoumi, Pierre Paradis , Pascal Laurant and Ernesto L. Schiffrin. Adoptive transfer of T-regulatory lymphocytes attenuates angiotensin II vascular effects. Vancouver 26-30 septembre. Canada

2009/2010 : Daniel Kasal , Tlili Barhoumi, Pierre Paradis , Pascal Laurant and Ernesto L. Schiffrin. Adoptive transfer of T-regulatory lymphocytes attenuates angiotensin II vascular effects. McGill cardiovascular day, Montreal, Canada.

2009/2010 : S.TOUATI, F. MEZIRI, Y. HE, A. MONTEZANO, T. BARHOUMI, A. BERTHELOT, R. TOUYZ, P. LAURANT.« L'exercice physique corrige la dysfonction endothéliale, le stress oxydatif et l'inflammation chez le rat obèse ». Congrès de Physiologie, pharmacologie et thérapeutique, Bordeaux, France .

Afichées

2011/2012 : Briet M, Barhoumi T, Davidman D, Bercovitch D, Frisch G, Nessim SJ, Lipman ML, Schiffrin EL Recombinant human erythropoietin alters subcutaneous resistance artery endothelial function through a mechanism involving oxidative stress in patients with chronic kidney disease stage 4 YIF, Montreal, January 2011.

2011/2012 : Briet M, **Barhoumi T**, Davidman D, Bercovitch D, Frisch G, Nessim SJ, Lipman ML, Schiffrin EL. Recombinant human erythropoietin alters subcutaneous resistance artery endothelial function through a mechanism involving oxidative stress and endothelin-1 in patients with stage 4 chronic kidney disease. Artery, 11 Oct. Paris, France

2011/2012 : Briet M, **Barhoumi T**, Sierra C, Coffman TM, Paradis P, Schiffrin EL. Aldosterone-induced Small Artery Remodeling And Endothelial Dysfunction Requires Functional Angiotensin Type 1a Receptor. HBPR, Orlando, 20-24 sept, USA

2011/2012 : Briet M, **Barhoumi T**, Davidman M, Bercovitch D, Frisch G, Nessim SJ, Lipman ML, Schiffrin EL. Recombinant human erythropoietin alters subcutaneous resistance artery endothelial function through a mechanism involving endothelin-1 in patients with stage 4 chronic kidney disease. HBPR, Orlando, 20-24 sept, USA

2011/2012 : Briet M, **Barhoumi T**, Sierra C, Coffman TM, Paradis P, Schiffrin EL. Aldosterone-induced Small Artery Remodeling Requires Functional Angiotensin Type 1a And 1b Receptors. HBPR, Orlando, 20-24 sept, USA

2011/2012 : Briet M, **Barhoumi T**, Davidman D, Bercovitch D, Frisch G, Nessim SJ, Lipman ML, Schiffrin EL Recombinant human erythropoietin alters subcutaneous resistance artery endothelial function through a mechanism involving oxidative stress in patients with chronic kidney disease stage 4 YIF, Montreal, January. Canada.

2011/2012 : **Tlili Barhoumi**, Marie Briet , Pierre Paradis , Pascal Laurant and Ernesto L. Schiffrin. An endothelin receptor type A antagonist prevented the deleterious vascular effects of erythropoietin in mice overexpressing human preproendothelin-1, LDI scientific retreat, Montreal, Canada.

2011/2012 : **Tlili Barhoumi**, Daniel Kasal , Pierre Paradis , Pascal Laurant and Ernesto L. Schiffrin. Aldosterone-Induced Hypertension and Vascular Injury was attenuated by Adoptive Transfer of T-Regulatory Lymphocytes. McGill cardiovascular day, Montreal, Canada.

2011/2012 : **Tlili Barhoumi**, Daniel Kasal , Pierre Paradis , Pascal Laurant and Ernesto L. Schiffrin. Erythropoietin-Induced Hypertension and Oxidative Stress in Mice overexpressing Human Endothelin-1 was decreased by Exercise. McGill cardiovascular day, Montreal, Canada.

2011/2012 : **Tlili Barhoumi**, Daniel Kasal , Pierre Paradis , Pascal Laurant and Ernesto L. Schiffrin. ETA and ETB blockers prevent the deleterious cardiovascular effects of erythropoietin in mice overexpressing ET-1 in the endothelium.. McGill cardiovascular day, Montreal, Canada.

2011/2012 : **Tlili Barhoumi**, Daniel Kasal , Pierre Paradis, Pascal Laurant and Ernesto l. les antagonistes des récepteurs de l'endotheline de type a préviennent les effets délétères de l'érythropoïétine sur le système cardiovasculaire dans un modèle de souris surexprimant l'endotheline-1. Société québécoise d'hypertension artérielle. Montréal , Canada.

2011/2012 : **Tlili Barhoumi**, Daniel Kasal , Pierre Paradis, Pascal Laurant and Ernesto l. le transfert adoptif des cellules t régulatrices module les effets vasculaires et l'élévation

de la pression artérielle induite par L'ALDOSTÉRONE. Société québécoise d'hypertension artérielle. Montréal , Canada.

2011/2012 : Tlili Barhoumi, Daniel Kasal , Pierre Paradis, Pascal Laurant and Ernesto L. le transfert adoptif des cellules t régulatrices module les effets vasculaires et l'élévation de la pression artérielle induite par l'angiotensine ii. Société québécoise d'hypertension artérielle. Montréal , Canada.

2010/2011 : Tlili Barhoumi, Daniel Kasal , Pierre Paradis , Pascal Laurant and Ernesto L. Schiffrin. Adoptive transfer of T-regulatory lymphocytes attenuates Aldosterone vascular effects. Washington 12-16 Octobre AHA. USA.

2010/2011 : Tlili Barhoumi, Daniel Kasal , Pierre Paradis , Pascal Laurant and Ernesto L. Schiffrin. Exercise decreases blood pressure and oxidative stress in mice overexpressing human endothelin-1 in endothelium and treated with erythropoietin. Vancouver 26-30 septembre. Canada

2010/2011 S.TOUATI, F. MEZIRI, Y. HE, A. MONTEZANO, T. BARHOUMI A. BERTHELOT, R. TOUYZ, P. LAURANT. «Effect of exercise with and without diet modification on endothelial function and oxidative stress in obese rats». Printemps de la cardiologie, Nantes, France.

2010/2011 : Tlili Barhoumi, Daniel Kasal , Pierre Paradis , Pascal Laurant and Ernesto L. Schiffrin. Adoptive transfer of T-regulatory lymphocytes attenuates angiotensin II vascular effects. Vancouver 26-30 septembre. Canada

2009/2010 : Tlili Barhoumi, Daniel Kasal , Pierre Paradis , Pascal Laurant and Ernesto L. Schiffrin. T-regulatory lymphocyte Adoptive transfer Prevents angiotensin II-induced hypertension and vascular injury,LDI scientific retreat, Montreal, Canada.

2009/2010: Tlili Barhoumi, Daniel Kasal , Pierre Paradis, Pascal Laurant and Ernesto L. chronic swimming decreases erythropoietin-induced hypertension and oxidative stress in mice overexpressing human endothelin-1. LDI scientific retreat, Montreal, Canada.

2009/2010: Tlili Barhoumi, Daniel Kasal , Pierre Paradis, Pascal Laurant and Ernesto L. Exercise decreases blood pressure and oxidative stress in mice overexpressing human endothelin-1 in endothelium and treated with erythropoietin. McGill cardiovascular day, Montreal, Canada.

2009/2010 : Tlili Barhoumi, Daniel Kasal , Pierre Paradis, Pascal Laurant and Ernesto L. L'exercice d'endurance diminue le stress oxydatif chez des souris transgéniques surexprimant l'endotheline-1 endothéliale. Société québécoise d'hypertension artérielle.Quebec city , Canada.

2009/2010 : Kasal DAB, Barhoumi T, Neves MF, Shbat L, Lemarie CA, Paradis P, Laurant P, Schiffrin EL.le transfert adoptif de cellules T régulatrices module les effets vasculaires de l'aldostérone. Société québécoise d'hypertension artérielle.Quebec city , Canada.

2009/2010 F. MEZIRI, S.TOUATI, T. BARHOUMI, M. SIMOES, A. BERTHELOT, R. TOUYZ, P.

LAURANT. « Prevention of the cardiovascular risk by exercise training in rats with chronic kidney disease treated with recombinant human erythropoietin». Printemps de la cardiologie, Nantes, France.

2009/2010 F. MEZIRI, S.TOUATI, **T. BARHOUMI**, M. SIMOES, A. BERTHELOT, R. TOUYZ, P. LAURANT. «Exercise training effects on vascular and renal functions in rats with chronic kidney disease treated with recombinant human erythropoietin». Congrès de Physiologie, pharmacologie et thérapeutique, Bordeaux, France.

2008/2009 : **Tlili Barhoumi**, Pierre Paradis, Pascal Laurant and Ernesto L. Schiffrin.

Swimming decrease oxidative stress in mice overexpressing human endothelin-1 in endothelium. ET-11: APS International Conference on Endothelin. Montreal, Canada

2008/2009 : **Tlili Barhoumi**, Daniel Kasal , Pierre Paradis , Pascal Laurant and Ernesto L. Schiffrin. Adoptive transfer of T-regulatory lymphocytes attenuates angiotensin II vascular effects. Endotheline-11. ET-11: APS International Conference on Endothelin. Montreal, Canada

2008/2009 S.TOUATI, F. MEZIRI, S. DEVAUX, **T. BARHOUMI**, J. REGNARD, A. BERTHELOT, R. TOUYZ, P. LAURANT. «Exercise prevents development of metabolic syndrome in a rat model of diet-induced obesity». 20th Ontario Hypertension Society Annual Spring Meeting –Peterborough, Canada 2009.

2008/2009 F. MEZIRI, M. SIMOES, S.TOUATI, **BARHOUMI**, A. BERTHELOT, T.Rhian, P. LAURANT. « Exercise training and recombinant human erythropoietin effects on bloodpressure, vascular function and kidney status in rats with chronic kidney disease» 20th Ontario Hypertension Society Annual Spring Meeting – Peterborough, Canada 2009.

2008/2009 F. MEZIRI, M. SIMOES, S.TOUATI, **T. BARHOUMI**, A. BERTHELOT, T.Rhian, P. LAURANT. «Exercise training prevents development of hypertension and improves vascular function in rats with chronic kidney disease treated with recombinant human erythropoietin». Canadian Cardiovascular Congress -Toronto Canada 2008.

2007/2008 : **Barhoumi T**, A.Berthelot, P.Laurant. Recombinant human erythropoietin alters flow-induced dilatation in small mesenteric artery of rat:involvement of endothelin-1- 13th Annual Congress of The European College of Sport Science – Estoril, Portugal.

2007/2008 : Meziri F, Simões M, Touati S, **Barhoumi T**, Berthelot A, Touyz RM and Laurant P. “Exercise training prevents the cardiovascular risk induced by chronic kidney disease in rats treated with recombinant human erythropoietin” - 13th Annual Congress of The European College of Sport Science – Estoril, Portugal.

2007/2008 : Touati S, Meziri F,Deveaux S, Szostak J, **Barhoumi T**, Regnard J, Berthelot A, Laurant P .Effect of Exercise and diet modification on endothelial dysfunction and insulin resistance in a rat model of diet-induced obesity. - 13th Annual Congress of The European College of Sport Science – Estoril, Portugal.

2007/2008 : **Barhoumi T**, A.Berthelot, P.Laurant. Recombinant human erythropoietin alters flow-induced dilatation in small mesenteric artery of rat: involvement of endothelin-1- printemps de cardiologie, Montpellier, France.

2007/2008 : Barhoumi T, A.Berthelot, P.Laurant. Recombinant human erythropoietin alters flow-induced dilatation in small mesenteric artery of rat: involvement of endothelin-1. 14ème forum des jeunes chercheurs Besançon, France .