

PATRICK TAILLON

**ÉTUDE DU RÔLE DU TGF- β 1 DANS LA
PATHOGENÈSE DE L'HYPERTENSION
ARTÉRIELLE ET DE L'INSUFFISANCE RÉNALE**

Mémoire présenté
à la Faculté des études supérieures de l'Université Laval
dans le cadre du programme de maîtrise en médecine expérimentale
pour l'obtention du grade de maître ès sciences (M.Sc)

DÉPARTEMENT DE MÉDECINE
FACULTÉ DE MÉDECINE
UNIVERSITÉ LAVAL
QUÉBEC

2007

Résumé

L'hypertension artérielle secondaire à la progression de l'insuffisance rénale chronique (IRC) est généralement associée à une dysfonction de l'endothélium vasculaire, caractérisée par une production exagérée de vasoconstricteurs tels l'endothéline-1 (ET-1) et l'angiotensine II (Ang II) et une réduction de la relâche de vasodilatateurs dont le monoxyde d'azote (NO). Cette dysfonction endothéliale peut entraîner la surproduction du *transforming growth factor-Beta 1* (TGF- β 1), une cytokine aux propriétés pro-fibrosantes et hypertrophiques. Nos travaux ont pour but d'élucider les interactions entre les facteurs dérivés de l'endothélium en IRC.

Dans un premier temps, nous avons étudié l'implication de l'ET-1 chez le rat urémique avec masse rénale réduite, en utilisant un antagoniste des récepteurs ET_A de l'ET-1, l'ABT-627. Une semaine après l'induction de l'insuffisance rénale par néphrectomie subtotalaire 5/6, des rats urémiques recevant l'ABT-627 sont comparés avec un groupe de rats urémiques ne recevant aucun traitement et des témoins, sur une période de 6 semaines. À la fin de l'étude, la pression artérielle systolique des animaux urémiques est augmentée comparativement à celle des animaux témoins. Les animaux urémiques présentent une augmentation de la créatinine sérique, de la protéinurie, de l'excrétion urinaire d'ET-1 et du TGF- β 1 ainsi que de l'expression de l'ARNm du TGF- β 1 dans le cortex rénal. De plus, ils montrent une augmentation de l'expression d'ET-1 et du TGF- β 1 dans l'endothélium vasculaire de l'aorte thoracique. Par ailleurs, l'expression de l'ARNm du récepteur ET_B de l'endothéline est réduite dans le cortex rénal des animaux urémiques. Les dommages histologiques rénaux comprennent de la glomérulosclérose, de la nécrose tubulaire et de la fibrose interstitielle associée à une production accrue d'alpha-actine de muscle lisse (α -SMA). Le traitement des animaux urémiques avec l'ABT-627 atténue l'élévation de la pression artérielle et les dommages histologiques rénaux, sans toutefois prévenir la détérioration progressive de la fonction rénale. Par ailleurs, l'ABT-627 ne contre pas la surproduction vasculaire et rénale d'ET-1 et du TGF- β 1 ainsi que la réduction de l'expression rénale du récepteur ET_B chez l'animal urémique. Ces résultats montrent que l'ET-1 est impliquée, du moins en partie, dans la pathogenèse de l'hypertension et des dommages rénaux chez le rat urémique. Cependant, le blocage des récepteurs ET_A ne

confère pas la protection cardiovasculaire et rénale escomptée, suggérant l'implication d'autres facteurs tels le TGF- β 1 et l'Ang II dans ce modèle animal d'insuffisance rénale.

Dans une seconde étude, nous avons évalué l'implication du TGF- β 1 dans la pathogenèse de l'hypertension artérielle associée à l'insuffisance rénale, en utilisant le même modèle animal que précédemment. Pour ce faire, nous avons comparé les effets de la neutralisation du TGF- β 1 avec l'anticorps 1D11 avec un antagoniste des récepteurs AT₁ de l'Ang II chez l'animal urémique. Après 6 semaines de traitement, la pression artérielle systolique des animaux urémiques est augmentée comparativement à celle des animaux témoins. Les animaux urémiques présentent une augmentation significative de la créatinine sérique, de la protéinurie, de l'expression endothéliale d'ET-1 dans l'aorte thoracique et du TGF- β 1 dans le cortex rénal, ainsi qu'une diminution de la créatinine urinaire et de la clairance de la créatinine. Ils montrent aussi des signes évidents d'hypertrophie cardiaque. Le traitement des animaux urémiques avec l'anticorps 1D11 diminue de façon significative la pression artérielle systolique, sans toutefois prévenir la détérioration de la fonction rénale et l'hypertrophie cardiaque, ni contrer la surexpression vasculaire d'ET-1 et rénale du TGF- β 1. Par contre, le traitement des animaux urémiques avec le losartan normalise la pression artérielle systolique et la protéinurie, prévient l'hypertrophie cardiaque et limite la surexpression vasculaire et rénale d'ET-1 et du TGF- β 1. Ainsi, la neutralisation du TGF- β 1 atténue l'élévation de la pression artérielle systolique chez l'animal urémique, sans toutefois prévenir la détérioration de la fonction rénale ni la surexpression vasculaire et rénale d'ET-1 et du TGF- β 1.

À la lumière des résultats obtenus, il semble que le développement de l'hypertension artérielle associée à l'insuffisance rénale dans notre modèle expérimental soit attribuable plus particulièrement à l'action de l'Ang II. Les effets de l'Ang II seraient médiés en partie par l'ET-1 et le TGF- β 1, qui agissent possiblement de façon indépendante.

Abstract

Hypertension in chronic renal failure (CRF) is associated with endothelial dysfunction, which is characterized by exaggerated production of vasoconstrictors such as endothelin-1 (ET-1) and angiotensin II (Ang II) and a reduction in vasodilators such as nitric oxide (NO). Endothelial dysfunction could lead to TGF- β 1 overproduction, a cytokine with pro-fibrotic and hypertrophic properties. Our studies aimed at elucidating the interactions between the endothelium-derived factors in CRF.

In a first study, we investigated the role of ET-1 in the rat remnant kidney model of CRF, using the ET_A receptor antagonist ABT-627. One week after renal mass reduction, uremic rats receiving ABT-627 were compared with untreated uremic rats and sham-operated rats, during 6 weeks. At the end of the study, systolic blood pressure was elevated in uremic rats as compared to sham-operated animals. Uremic animals showed increased serum creatinine, proteinuria, ET-1 and TGF- β 1 urinary excretion and renal TGF- β 1 mRNA expression. In addition, ET-1 and TGF- β 1 expression was increased in the vascular endothelium of thoracic aorta of uremic animals. However, ET_B mRNA expression was reduced in the renal cortex of uremic animals. The renal histological damages were comprised of glomerulosclerosis, tubular necrosis and interstitial fibrosis, which was associated with increased alpha-smooth muscle actin (α -SMA) expression. Treatment with ABT-627 attenuated the rise in systolic blood pressure and the renal damages, but did not prevent the progressive decline in renal function, the ET-1 and TGF- β 1 overproduction nor the reduction in ET_B receptor expression. Our results show that ET-1 is involved, at least in part, in the pathogenesis of hypertension and the renal injuries in uremic rats. However, ET_A receptor blockade does not confer the anticipated cardiovascular and renal protection, suggesting the implication of other factors such as TGF- β 1 and Ang II in this animal model of CRF.

In a second study, we evaluated the involvement of TGF- β 1 in the pathogenesis of hypertension associated with renal insufficiency, in the same animal model. We compared the effects of the TGF- β 1 neutralizing antibody 1D11 and the Ang II AT₁ receptor antagonist losartan. At the end of the study, systolic blood pressure was increased in uremic animals as compared to the controls. Uremic animals presented a significant increase in serum creatinin, proteinuria, expression of ET-1 in the vascular endothelium of thoracic

aorta and renal cortex production of TGF- β 1, as well as a reduction in creatinine clearance. They also showed obvious signs of cardiac hypertrophy. Treatment with the 1D11 antibody reduced the rise in systolic blood pressure without preventing the decline in renal function and cardiac hypertrophy nor the vascular ET-1 and renal TGF- β 1 overexpression. In contrast, treatment with losartan normalized systolic blood pressure and proteinuria, prevented the cardiac hypertrophy and attenuated the vascular and renal ET-1 and TGF- β 1 overexpression. Therefore, neutralization of TGF- β 1 attenuates the rise in systolic blood pressure in uremic animal, without preventing the deterioration of renal function or the vascular and renal overexpression of ET-1 and TGF- β 1.

Based on these studies, the development of hypertension associated with the renal insufficiency in this experimental model is likely attributed to Ang II. The effects of Ang II may be mediated by ET-1 and TGF- β 1, which appears to act in an independent manner.

Remerciements

Dans un premier temps, j'aimerais sincèrement remercier mon directeur de recherche, le Docteur Richard Larivière, un homme de science passionné, dévoué à sa profession et qui a à cœur la formation et la réussite de ses étudiants. J'ai énormément apprécié ton soutien, tes enseignements, tes judicieux conseils et surtout, la confiance que tu as su me témoigner tout au long de ma formation. Merci pour tout!

Aux membres de l'équipe : Frédérick Therrien, Marie-Ève Rodrigue, Mélanie Nadeau, Nadia Chbinou, Marie-Ève Rancourt, Philippe Lavoie, Danielle Lizotte, Claude Villeneuve et Sonia Lacasse-Marcoux ainsi qu'à mes complices de tous les jours : Marc-André Déry, Marie-Claude Lauzier, Élisabeth Pagé, Maude Michaud-Dumont, Geneviève Robitaille, Guylaine Soucy, Marc Bergeron, Nikolas Daigle et Charles Simard. Merci pour les agréables moments passés ensemble, et surtout, pour votre amitié!

Je tiens également à remercier ma merveilleuse famille; mon père Marc-André, ma mère Sylvie Racette ainsi que ma sœur Christine. Merci pour votre support, vos encouragements et votre amour.

Table des matières

RÉSUMÉ	II
ABSTRACT	IV
REMERCIEMENTS	VI
TABLE DES MATIÈRES.....	VII
LISTE DES FIGURES	IX
LISTE DES TABLEAUX.....	X
LISTE DES ABRÉVIATIONS.....	XI
CHAPITRE 1 – INTRODUCTION	14
1.1 - HYPERTENSION ARTÉRIELLE	14
1.1.1 - <i>Hémodynamie de la pression artérielle</i>	14
A - Débit cardiaque.....	15
B - Résistance périphérique	15
1.1.2 - <i>Régulation de la pression artérielle</i>	15
1.1.3 - <i>Hypertension artérielle</i>	16
1.1.4 - <i>Facteurs de risque</i>	17
1.1.5 - <i>Prévalence et liens avec les maladies cardiovasculaires (MCV)</i>	17
1.2 - LE REIN	18
1.2.1 - <i>Physiologie générale</i>	18
A - Corpuscule rénal	19
B - Tubules rénaux.....	20
C - Appareil juxtaglomérulaire	20
1.2.2 - <i>Insuffisance rénale</i>	21
A - Mécanismes de progression de l'IRC	21
B - Facteurs de risque.....	22
C - Conséquences physiologiques et cliniques de l'IRC	23
D - Prévalence et liens avec les MCV.....	23
1.2.3 - <i>Hypertension artérielle associée à l'IRC</i>	23
A - Implication du système nerveux autonome.....	25
B - Contrôle hormonal	26
C - Facteurs métaboliques.....	27
1.3 - DYSFONCTION ENDOTHÉLIALE.....	29
1.3.1 - <i>Le monoxyde d'azote (NO)</i>	29
A - Biosynthèse.....	29
B - Mécanismes d'action.....	30
C - Implications en IRC	31
1.3.2 - <i>L'endothéline-1 (ET-1)</i>	32
A - Biosynthèse.....	32
B - Mécanismes d'action.....	33
C - Implications en IRC	34
1.3.3 - <i>L'Angiotensine II (Ang II)</i>	35
A - Système rénine-angiotensine.....	35
B - Mécanismes d'action.....	36
C - Implications en IRC	38
1.3.4 - <i>Le transforming growth factor Beta-1 (TGF-β1)</i>	39
A - Biosynthèse et activation	39
B - Signalisation par les SMAD.....	40
C - Implications en IRC	42
1.4 - INTERACTIONS ENTRE LES FACTEURS ENDOTHÉLIAUX	46
1.4.1 - <i>ET-1 et NO</i>	46
1.4.2 - <i>Angiotensine II et NO</i>	47

1.4.3 - Angiotensine II et ET-1	48
1.4.4 - Angiotensine II et TGF- β 1	48
1.4.5 - TGF- β 1 et ET-1	49
1.4.6 - TGF- β 1 et NO	49
1.5 - HYPOTHÈSES ET OBJECTIFS GÉNÉRAUX DE RECHERCHE	50
CHAPITRE 2 - LE BLOCAGE DES RÉCEPTEURS ET_A DE L'ENDOTHÉLINE ATTÉNUÉ L'HYPERTENSION ARTÉRIELLE CHEZ LE RAT URÉMIQUE	
HYPERTENDU	51
2.1 - HYPOTHÈSE ET OBJECTIFS DE L'ÉTUDE	51
2.2 - MATÉRIEL ET MÉTHODES	52
2.3 - RÉSULTATS	56
2.3.1 - Pression artérielle systolique	56
2.3.2 - Créatinine sérique	57
2.3.3 - Paramètres urinaires	58
A - Volume urinaire	58
B - Protéinurie	59
C - Clairance de la créatinine	60
D - Concentrations urinaires d'ET-1	61
2.3.4 - Concentrations tissulaires d'ET-1	62
2.3.5 - Expression du TGF- β 1 et du récepteur ET _B par analyse de type Northern dans le cortex rénal	63
2.3.6 - Immunofluorescence en microscopie confocale dans l'aorte thoracique	64
2.3.7 - Analyse histologique des dommages rénaux et expression de l' α -SMA	66
CHAPITRE 3 - EFFETS DE LA NEUTRALISATION DU TGF-B1 CHEZ LE RAT EN INSUFFISANCE RÉNALE CHRONIQUE.....	68
3.1 - HYPOTHÈSE ET OBJECTIFS DE L'ÉTUDE	68
3.2 - MATÉRIEL ET MÉTHODES	69
3.3 - RÉSULTATS	72
3.3.1 - Pression artérielle systolique	72
3.3.2 - Créatinine sérique	73
3.3.3 - Paramètres urinaires	74
A - Volume urinaire	74
B - Protéinurie	75
C - Clairance de la créatinine	76
D - Nitrites/Nitrates (NO ₂ /NO ₃) urinaires	77
3.3.4 - Paramètres tissulaires	78
A - Poids des animaux	78
B - Poids du rein/poids corporel	79
C - Poids du cœur/poids corporel	80
3.3.5 - Immunofluorescence en microscopie confocale dans l'aorte thoracique	81
A - Expression vasculaire de l'ET-1	81
B - Expression vasculaire du récepteur ET _B	81
C - Expression vasculaire de la eNOS	81
3.3.6 - Analyse de l'expression de gènes par PCR quantitatif en temps réel dans l'aorte thoracique	82
A - Expression de l'ET-1	82
B - Expression du TGF- β 1	83
C - Expression du récepteur II du TGF- β	84
D - Expression de PAI-1	85
3.3.7 - Expression du TGF- β 1 et de la TSP-1 par analyse de type Northern dans le cortex rénal	86
A - Expression rénale du TGF- β 1	86
B - Expression rénale de la TSP-1	87
DISCUSSION	88
CONCLUSION	95
BIBLIOGRAPHIE.....	96

Liste des figures

Figure 1 : Mécanismes impliqués dans la régulation de la PA à court et à long terme	16
Figure 2 : Anatomie du rein.....	21
Figure 3 : Relation entre l'HTA et l'insuffisance rénale	24
Figure 4 : Mécanismes par lesquels l'insuffisance rénale mène à l'HTA	25
Figure 5 : Angiotensine II et élévation de la pression artérielle	27
Figure 6 : Synthèse du NO et ses principaux effets.....	31
Figure 7 : Synthèse et actions vasculaires de l'ET-1.....	33
Figure 8 : SRA classique et tissulaire	36
Figure 9 : Voies de signalisation de l'angiotensine II	37
Figure 10 : Structure du TGF- β 1 et son interaction avec la TSP-1	40
Figure 11 : Voie de signalisation du TGF- β 1	41
Figure 12 : Structure des SMAD	42
Figure 13 : Rôle du TGF- β 1 dans la transdifférenciation cellulaire (EMT).....	44
Figure 14 : Interactions entre l'angiotensine II et le NO.....	47
Figure 15 : Profil de la PAS chez les animaux témoins, Nx et Nx + ABT-627	56
Figure 16 : Créatinine sérique chez les animaux témoins, Nx et Nx + ABT-627	57
Figure 17 : Volume urinaire chez les animaux témoins, Nx et Nx + ABT-627	58
Figure 18 : Protéinurie chez les animaux témoins, Nx et Nx + ABT-627.....	59
Figure 19 : Clairance de la créatinine chez les animaux témoins, Nx et Nx + ABT-627.....	60
Figure 20 : Concentrations urinaires d'ET-1 chez les animaux témoins, Nx et Nx + ABT-627	61
Figure 21 : Concentrations d'ET-1 dans le cortex rénal	62
Figure 22 : Expression de l'ARNm du TGF- β 1 et du récepteur ET _B dans le cortex rénal ...	63
Figure 23 : Immunodétection de l'ET-1 et du TGF- β 1 dans l'aorte thoracique	65
Figure 24 : Morphologie de sections de rein colorées au Masson-trichrome et expression de l' α -SMA	67
Figure 25 : Profil de la PAS chez les animaux témoins, Nx, Nx + 1D11 et Nx + Los.....	72
Figure 26 : Créatinine sérique chez les animaux témoins, Nx, Nx + 1D11 et Nx + Los	73
Figure 27 : Volume urinaire chez les animaux témoins, Nx, Nx + 1D11 et Nx + Los	74
Figure 28 : Protéinurie chez les animaux témoins, Nx, Nx + 1D11 et Nx + Los.....	75
Figure 29 : Clairance de la créatinine chez les animaux témoins, Nx, Nx + 1D11 et Nx + Los	76
Figure 30 : NO ₂ /NO ₃ urinaires chez les animaux témoins, Nx, Nx + 1D11 et Nx + Los	77
Figure 31 : Poids des animaux à la fin de l'étude.....	78
Figure 32 : Ratio du poids du rein/poids corporel	79
Figure 33 : Ratio du poids du coeur/poids corporel.....	80
Figure 34 : Expression de l'ARNm de l'ET-1 dans l'aorte thoracique	82
Figure 35 : Expression de l'ARNm du TGF- β 1 dans l'aorte thoracique	83
Figure 36 : Expression de l'ARNm du récepteur II du TGF- β dans l'aorte thoracique	84
Figure 37 : Expression de l'ARNm de PAI-1 dans l'aorte thoracique.....	85
Figure 38 : Expression de l'ARNm du TGF- β 1 dans le cortex rénal.....	86
Figure 39 : Expression de l'ARNm de la TSP-1 dans le cortex rénal.....	87

Liste des tableaux

Tableau 1 : Prévalence de l'hypertension artérielle selon l'âge et le sexe.....	17
Tableau 2 : Facteurs de risque traditionnels et non traditionnels des maladies rénales.....	22
Tableau 3 : Maladies rénales humaines dans lesquelles le TGF- β 1 serait impliqué	45
Tableau 4 : Quantification de l'expression vasculaire de l'ET-1 et du TGF- β 1	64
Tableau 5 : Quantification de l'expression de l' α -SMA dans le cortex rénal.....	66
Tableau 6 : Séquence des oligonucléotides, la température et le nombre de cycles utilisés pour le QRT-PCR .	71
Tableau 7 : Quantification de l'expression vasculaire de l'ET-1, du récepteur ET _B et de la eNOS .	81

Liste des abréviations

IRC	Insuffisance rénale chronique
ET-1	Endothéline-1
Ang II	Angiotensine II
NO	Monoxyde d'azote
TGF- β	<i>Transforming growth factor-Beta</i>
α -SMA	Alpha-actine de muscle lisse
CRF	<i>Chronic renal failure</i>
PA	Pression artérielle
DC	Débit cardiaque
RP	Résistance périphérique
FC	Fréquence cardiaque
VES	Volume d'éjection systolique
HTA	Hypertension artérielle
MCV	Maladie cardiovasculaire
GFR	Débit de filtration glomérulaire
SNA	Système nerveux autonome
ANP	Peptide natriurétique auriculaire
Na ⁺	Sodium
K ⁺	Potassium
Ca ²⁺	Calcium
H ⁺	Hydrogène
HCO ₃ ⁻	Bicarbonate
ADH	Hormone antidiurétique ou vasopressine
IR	Insuffisance rénale
EGF	<i>Epidermal growth factor</i>
HGF	<i>Hepatocyte growth factor</i>
PDGF	<i>Platelet-derived growth factor</i>
FGF	<i>Fibroblast growth factor</i>
IGF	<i>Insulin-like growth factor</i>
SRAA	Système rénine-angiotensine-aldostérone
PTH	Parathormone

VSMC	Cellules musculaires lisses vasculaires
NE	Norépinéphrine
ECA	Enzyme de conversion de l'angiotensine
NaCl	Chlorure de sodium
PGI ₂	Prostacycline
EDHF	Facteur hyperpolarisant dérivé de l'endothélium
TXA ₂	Thromboxane A ₂
ROS	Espèces réactives de l'oxygène
EDRF	<i>Endothelium-derived relaxing factor</i>
NOS	Monoxyde d'azote synthase
FAD	Flavine-adénine dinucléotide
FMN	Flavine mononucleotide
nNOS	NOS neuronale
eNOS	NOS endothéliale
iNOS	NOS inductible
O ₂	Oxygène
NO ₂	Nitrite
NO ₃	Nitrate
O ₂ ⁻	Anion superoxyde
ONOO ⁻	Peroxynitrite
L-NAME	N ^G -nitro-L-arginine méthyl ester
ADMA	Dyméthylarginine asymétrique
TNF- α	<i>Tumor necrosis factor-alpha</i>
GC	Guanylate cyclase
GMPc	Guanidine monophosphate cyclique
GTP	Guanidine triphosphate
SRA	Système rénine-angiotensine
ppET-1	Préproendothéline-1
ECE	Enzyme de conversion de l'endothéline
IP ₃	Inositol triphosphate
DAG	Diacyglycérol
MAPK	<i>Mitogen activated protein kinase</i>
ARA	Antagoniste des récepteurs de l'angiotensine

IECA	Inhibiteur de l'enzyme de conversion de l'angiotensine
BMP	Protéine morphogénétique osseuse
LAP	<i>Latency-associated peptide</i>
SLC	<i>Small latent complex</i>
LTBP	<i>latent TGF - β binding protein</i>
LLC	<i>Large latent complex</i>
TSP-1	Thrombospondine-1
SMAD	<i>Similar to mother against decapentaplegic</i>
SARA	<i>Smad anchor for receptor activation</i>
MH	<i>Mad homology</i>
SMURF	<i>Smad ubiquitin regulatory factors</i>
EMT	<i>Epithelial-to-mesenchymal transdifferentiation</i>
MMP	<i>Matrix Metalloproteinase</i>
PAI-1	<i>Plasminogen activator inhibitor-1</i>
ECM	Matrice extracellulaire
MBG	Membrane basale glomérulaire
ATS	Sérum anti-thymocyte
AP-1	<i>Activator protein-1</i>
TFA	Acide trifluoroacétique
RIA	Essai radio-immunologique
SDS	Dodécylsulfate de sodium
BSA	Albumine bovine sérique
FBS	Sérum bovin fœtal
PAS	Pression artérielle systolique
QRT-PCR	PCR quantitatif en temps réel

Chapitre 1 – Introduction

L'insuffisance rénale chronique nécessitant une suppléance rénale (dialyse et transplantation) atteint plus de 30,000 Canadiens. Le nombre de patients souffrant d'IRC augmente à un rythme d'environ 8 % par année, représentant un défi socioéconomique majeur. L'hypertension artérielle, les maladies cardiovasculaires et le diabète sont les principales causes d'insuffisance rénale terminale. En effet, plus de 80 % des personnes qui doivent recourir à la dialyse sont hypertendus. L'hypertension artérielle est un facteur de risque majeur chez les patients atteints d'IRC, aggravant la morbidité et la mortalité cardiovasculaire. Les mécanismes de l'hypertension artérielle associée aux maladies rénales sont encore mal définis. Des études récentes montrent, cependant, que l'hypertension artérielle secondaire à l'IRC est généralement associée à une dysfonction de l'endothélium vasculaire, caractérisée par une production exagérée de vasoconstricteurs tels que l'endothéline-1 (ET-1) et l'angiotensine II (Ang II) ainsi qu'à une réduction de la relâche de monoxyde d'azote (NO), un vasodilatateur. La dysfonction endothéliale est aussi associée à la production accrue d'agents de transformation cellulaire comme le *transforming growth factor beta-1* (TGF- β 1), qui peut à son tour affecter la production des facteurs vasoactifs endothéliaux. Afin de définir les mécanismes de l'hypertension associée à l'IRC, il est donc important de mieux comprendre les interactions entre les différents facteurs dérivés de l'endothélium.

1.1 - Hypertension artérielle

1.1.1 - Hémodynamie de la pression artérielle

La pression artérielle (PA) est la pression qu'exerce le sang sur les parois des vaisseaux sanguins. Chez l'adulte, la pression artérielle devrait se situer autour de 120 mm Hg lors de la systole (contraction ventriculaire) et de 80 mm Hg lors de la diastole (relaxation ventriculaire). Il est important de noter que la pression artérielle est déterminée et varie en fonction du débit cardiaque (DC) et de la résistance périphérique totale des vaisseaux (RP) sous l'équation suivante : $PA = DC \times RP$ ¹.

A - Débit cardiaque

Le débit cardiaque correspond à la quantité de sang éjectée du ventricule gauche (ou droit) dans l'aorte (ou le tronc pulmonaire) chaque minute ². Au repos, il devrait se situer en moyenne autour de 5,6 litres/minute chez l'homme, et 10 à 20 pourcent de moins chez la femme. Il dépend de la fréquence cardiaque (FC) (nombre de battements cardiaques par minute) et du volume d'éjection systolique (VES) (volume de sang éjecté par le coeur dans la circulation systémique à chaque battement), et varie en fonction de l'âge, de la taille, du métabolisme corporel et de l'activité physique déployée, entre autres ¹.

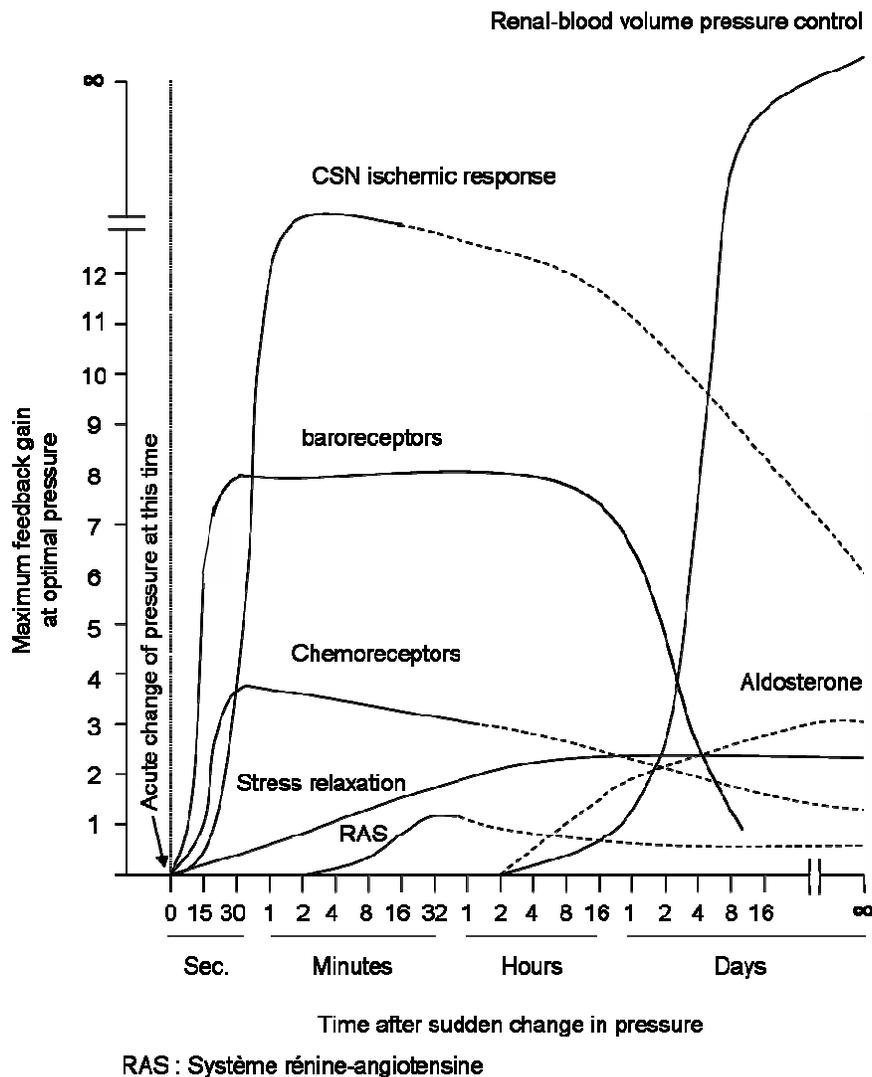
B - Résistance périphérique

La résistance périphérique correspond à l'impédance de l'ensemble des vaisseaux sanguins systémiques à l'écoulement sanguin, et le diamètre du vaisseau en est le facteur déterminant. Ainsi, la résistance augmente dans le cas d'un calibre de vaisseau diminué (artérioles, capillaires et veinules) ou lors d'une vasoconstriction, alors qu'elle diminue dans les vaisseaux de gros calibres (artères et veines) ou lors d'une vasodilatation ¹.

1.1.2 - Régulation de la pression artérielle

Divers mécanismes voient à la régulation et au maintien de la pression artérielle (figure 1). Certains agissent très rapidement et sont efficaces que sur une courte période de temps, comme les mécanismes nerveux et hormonaux, alors que d'autres associés à la fonction rénale et au contrôle du volume sanguin agissent à long terme ¹. Nous verrons l'implication de certains de ces mécanismes à la section 1.2.3.

Figure 1 : Mécanismes impliqués dans la régulation de la PA à court et à long terme



Source : figure adaptée de Guyton¹

1.1.3 - Hypertension artérielle

L'hypertension artérielle (HTA) se définit par des valeurs de pression artérielle supérieures à 140/90 mm Hg. Des études ont démontré qu'à partir de ces valeurs, les risques de développer une maladie cardiovasculaire deviennent considérables. L'HTA est dite « essentielle » lorsque de nature idiopathique ou « secondaire » lorsque liée à une autre pathologie, comme les maladies rénales, par exemple³.

1.1.4 - Facteurs de risque

Idiopathique dans 90 % des cas, l'hypertension artérielle peut toutefois s'expliquer par certains facteurs prédisposants ou diverses pathologies. Les principaux facteurs de risque de développer l'HTA sont l'âge, le sexe, l'ethnicité, l'obésité, l'alcool, la nicotine, le stress, les maladies rénales et les dysfonctionnements endocriniens et vasculaires ⁴. Notons que les hommes et les personnes âgées sont les plus sujets à développer l'HTA ⁵ (tableau 1).

Tableau 1 : Prévalence de l'hypertension artérielle selon l'âge et le sexe

Âge (année)	Sexe	N	Hypertension (%)
18-34	Homme	5 755	11
	Femme	6 041	2
35-64	Homme	3 621	31
	Femme	3 741	21
65-74	Homme	2 000	56
	Femme	1 971	58
18-74	Homme	11 376	26
	Femme	11 753	18
Total		23 159	22

Source : tableau adapté de Joffres ⁵

1.1.5 - Prévalence et liens avec les maladies cardiovasculaires (MCV)

En 1995, environ 24 %, soit 43 millions d'Américains, souffraient d'hypertension artérielle (NHANES III-1995) ⁶. Des chiffres similaires ont été obtenus au Canada, où 22 % des Canadiens présentaient une pression artérielle supérieure à 140/90 mm Hg (CHHS-1997) ⁵. Par ailleurs, la société québécoise d'hypertension artérielle estime à environ 5 millions le nombre de Canadiens souffrant d'hypertension, et prévoit qu'au niveau mondial en 2025, au moins 1,5 milliard d'individus seront touchés par cette maladie (2000) ³. Diverses études montrent que l'HTA est un des facteurs de risque modifiables les plus importants dans le développement d'événements cardiovasculaires, qui représentent la cause majeure de décès au Canada (38 % des décès) ^{5,6}. Ainsi, le traitement adéquat de l'HTA permet de réduire les risques d'événements cardiovasculaires tels les infarctus du myocarde de 15 %, les accidents cardiovasculaires (40 %), l'insuffisance cardiaque (50 %), l'hypertrophie ventriculaire gauche, les maladies valvulaires et vasculaires périphériques et l'insuffisance rénale chronique, qui sera traitée en détail à la section 1.2.2 ^{3,6,7}.

1.2 - Le rein

Tel que mentionné brièvement à la section 1.1.2, le rein participe à la régulation à long terme de la pression artérielle. À long terme, un changement soudain de la PA influe sur la pression de natriurèse et de diurèse rénale, qui modifient le volume extracellulaire, le volume sanguin et ultimement, le débit cardiaque afin de rétablir la PA à des valeurs normales. Comme nous le verrons en détail plus loin, les reins voient aussi à la régulation de la PA en sécrétant la rénine. Par ailleurs, la détérioration de la fonction rénale peut entraîner l'augmentation de la pression artérielle. De fait, l'IRC est une des causes principales du développement de l'HTA « secondaire », au même titre que l'HTA peut mener à la détérioration de la fonction rénale et à la progression de maladies rénales. Il existe donc une étroite relation entre le développement de l'HTA et les pathologies rénales.

1.2.1 - Physiologie générale

Le principal rôle des reins consiste à filtrer le sang et former l'urine, en réabsorbant l'eau et les solutés dans la circulation sanguine et en excréant certains produits métaboliques indésirables tels l'urée, la créatinine et l'acide urique, de même que certaines drogues⁸. Les reins reçoivent entre 20 et 25 % du débit sanguin en provenance du cœur par l'artère rénale, soit environ 1,25 L/min⁹. En plus du maintien de l'équilibre des liquides de l'organisme, le rein accomplit de multiples autres fonctions telles la régulation de la composition ionique du sang, du volume sanguin, de la pression artérielle de même que la libération d'hormones. Ainsi, le rein voit à la sécrétion d'hormones qui participent à la régulation de l'hémodynamie rénale et systémique (rénine, prostaglandines et bradykinine), à la production de globules rouges sanguins (érythropoïétine) et au métabolisme du calcium, du phosphore et des os (1,25-dihydrocholecalciférol; la forme active de la vitamine D)⁸.

Le néphron est l'unité fonctionnelle du rein et chaque rein en compte environ 1 million. Il est constitué de deux parties, le corpuscule rénal (glomérule et capsule de Bowman), où s'effectue la filtration du plasma, et le tubule rénal, dans lequel passe le liquide filtré et où les composants peuvent y être réabsorbés. Le sang atteint le corpuscule rénal en provenance de l'artériole glomérulaire afférente. À partir de la capsule glomérulaire, le liquide produit par la filtration du plasma passe dans le tubule rénal, formé du tubule contourné proximal,

de l'anse de Henlé (anse du néphron) et du tubule contourné distal. Finalement, l'urine est excrétée après avoir traversé le tube collecteur et les tubules droits.

A - Corpuscule rénal

Le corpuscule rénal se compose de deux parties : le glomérule et la capsule glomérulaire ou capsule de Bowman. C'est à cet endroit que s'effectue la filtration glomérulaire. Le volume quotidien de filtrat glomérulaire est de l'ordre de 180 L environ. Toutefois, 99 % du filtrat glomérulaire retourne à la circulation sanguine puisque réabsorbé, si bien que seulement 1 à 2 L est excrété sous forme d'urine ². Chaque glomérule est formé de la division d'une artériole glomérulaire afférente en un réseau de capillaires enchevêtrés de forme sphérique. La capsule comprend un feuillet viscéral et un feuillet pariétal; le feuillet viscéral est formé de cellules épithéliales modifiées appelées podocytes tandis que le feuillet pariétal constitue la paroi externe. La membrane de filtration qui permet le passage de l'eau et des petits solutés est formée des cellules endothéliales des capillaires glomérulaires, d'une membrane basale et des podocytes qui les entourent. Celle-ci est imperméable à la plupart des protéines plasmatiques ¹, aux globules sanguins ainsi qu'aux plaquettes ². La filtration glomérulaire est tributaire de 3 pressions : la pression hydrostatique glomérulaire, la pression hydrostatique capsulaire et la pression oncotique. Les 2 dernières pressions s'opposent à la filtration et ensemble, ces 3 pressions forment la pression nette de filtration. Une partie importante du corpuscule rénal est le mésangium, composé d'une matrice et de cellules mésangiales. Il apporte un support aux capillaires glomérulaires et sécrète la matrice extracellulaire, des prostaglandines et certaines cytokines ⁹. Les cellules mésangiales sont contractiles et peuvent ainsi influencer le débit de filtration glomérulaire (GFR), c'est-à-dire la quantité de filtrat produit dans tous les corpuscules rénaux par minute ⁹. Le débit de filtration glomérulaire est l'estimé clinique le plus révélateur de la fonction rénale ⁸. Il atteint en moyenne 125 ml/min chez l'adulte et dépend directement de la pression nette de filtration. Par ailleurs, les principaux mécanismes régulateurs du GFR agissent en réglant le débit sanguin rénal (régulation du diamètre des artérioles afférentes et efférentes) et en modifiant la superficie des capillaires glomérulaires disponibles pour la filtration. Ces mécanismes sont l'autorégulation par le rein, qui permet de conserver constant le GFR lorsque la pression artérielle systémique se situe entre 80 et 180 mm Hg, et les régulations nerveuses (impliquant le système nerveux

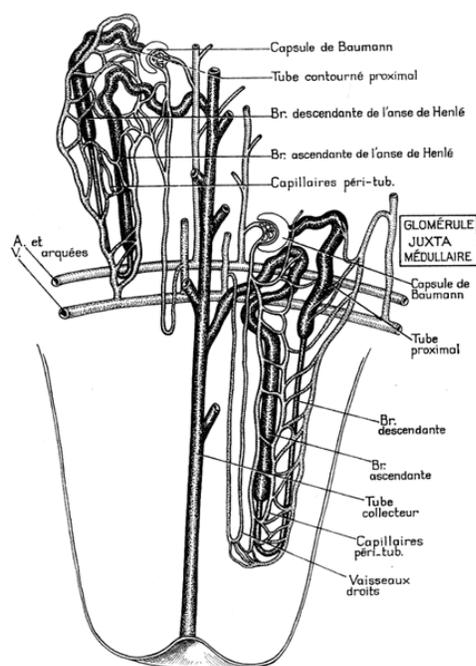
autonome (SNA) et les récepteurs adrénergiques) et hormonales (Ang II et peptide natriurétique auriculaire (ANP))².

B - Tubules rénaux

Les tubules rénaux comprennent le tubule contourné proximal, l'anse de Henlé, le tubule contourné distal et le tubule collecteur. Ils voient à la réabsorption du filtrat glomérulaire et à la sécrétion de diverses substances, de façon à maintenir l'équilibre homéostatique de l'eau, du glucose, de l'urée, de la créatinine et de certains ions tels le sodium (Na^+), le potassium (K^+), le calcium (Ca^{2+}), l'hydrogène (H^+) et le bicarbonate (HCO_3^-). Les mécanismes impliqués dans ces 2 processus ne seront expliqués en détail, mais comprennent, entre autres, des phénomènes passifs (pinocytose, osmose et diffusion passive) et actifs tels les pompes $\text{Na}^+ \text{K}^+ \text{ATPase}$ et les transporteurs d'ions (symporteurs Na^+ , antiporteurs $\text{Na}^+ \text{H}^+$ et cotransporteurs). Diverses hormones telles l'Ang II, l'aldostérone, l'hormone antidiurétique (ADH) et l'ANP influent sur la réabsorption et la sécrétion de l'eau et des électrolytes en régulant l'activité des transporteurs et la perméabilité à l'eau et au sodium².

C - Appareil juxtaglomérulaire

Le dernier segment de la partie ascendante de l'anse de Henlé est en contact avec l'artériole glomérulaire afférente qui dessert le corpuscule rénal du même néphron. Les cellules qui composent le tubule dans cette région sont prismatiques et entassées, et forment la macula densa. Le long de la macula densa, la paroi de l'artériole glomérulaire afférente (et parfois efférente) contient des fibres musculaires lisses modifiées appelées cellules juxtaglomérulaires; avec la macula densa, elles constituent l'appareil juxtaglomérulaire. L'appareil juxtaglomérulaire a pour principale fonction de sécréter la rénine. Les « événements » physiologiques qui entraînent la relâche de la rénine par les cellules juxtaglomérulaires comprennent la baisse de perfusion rénale via les artérioles afférentes glomérulaires, la diminution des concentrations de sodium dans le tubule contourné distal et l'activation du système nerveux sympathique¹⁰.

Figure 2 : Anatomie du rein

Source : figure tirée de www.nephrou.org

1.2.2 - Insuffisance rénale

L'insuffisance rénale (IR) consiste en une atteinte et une diminution de la fonction rénale. Elle est dite aiguë lorsque la détérioration de la fonction rénale est soudaine (réversible dans la plupart des cas) et chronique lorsque plus progressive (généralement irréversible). Dans les 2 cas, elle résulte d'une réduction du nombre de néphrons fonctionnels.

A - Mécanismes de progression de l'IR

L'insuffisance rénale chronique est le résultat de la destruction progressive du nombre de néphrons fonctionnels et est associée à l'altération structurelle et fonctionnelle à la fois des glomérules et des cellules tubulaires. Lors d'une perte importante de néphrons fonctionnels, les néphrons restants s'adaptent petit à petit à l'augmentation de la charge de travail en augmentant leur débit de filtration glomérulaire. Par exemple, lors de l'ablation complète d'un rein, l'hyperfiltration compensatoire du rein restant permet d'assurer environ 80 % de la fonction rénale « normale ». Ces changements hémodynamiques compensatoires visant à accroître le GFR sont responsables en partie de la progression des dommages glomérulaires tels la glomérulosclérose et l'accumulation de protéines de la matrice extracellulaire, qui à

leur tour peuvent entraîner l'apparition de dommages tubulointerstitiels et ainsi altérer la sécrétion et la réabsorption tubulaire ¹¹. L'hypertension glomérulaire, l'hypermétabolisme tubulaire et l'hypertrophie rénale peuvent aussi expliquer la détérioration progressive de la fonction rénale ¹². Par ailleurs, la production altérée de certains facteurs de croissance et cytokines synthétisées par les diverses cellules glomérulaires et tubulaires contribue également à la progression de l'IRC ¹². Ainsi, ces facteurs favorisent l'hyperplasie cellulaire (ET-1, EGF, HGF, PDGF), l'hypertrophie cellulaire (Ang II, FGF, IGF-1, TGF- β), la synthèse des composantes de la matrice extracellulaire (Ang II, FGF, PDGF, TGF- β) ¹² et l'apparition de la fibrose rénale (Ang II, TGF- β 1, ET-1). L'implication de l'ET-1, de l'Ang II et du TGF- β 1, de même que celle du NO dans la progression de l'IRC sera vue en détail dans la section 1.3.

B - Facteurs de risque

Les personnes les plus à risque de développer l'IRC sont celles souffrant de diabète, d'hypertension artérielle et de maladies rénales ¹³ (tableau 2).

Tableau 2 : Facteurs de risque traditionnels et non traditionnels des maladies rénales

Facteurs de risque traditionnels	Facteurs de risque non traditionnels
Âge avancé	Albuminurie
Sexe masculin	Surcharge volémique
Hypertension	Anémie
Cholestérol	Stress oxydatif
Diabète	Inflammation
Tabac	Malnutrition
Inactivité physique	Déséquilibre ET-1/NO
Histoire familiale de MCV et rénale	
Hypertrophie ventriculaire gauche	

Source : tableau adapté de Uhlig ¹³

C - Conséquences physiologiques et cliniques de l'IRC

Physiologiquement, l'IRC s'accompagne généralement d'urémie, de créatinémie, d'oedème, d'hyperkaliémie, d'acidémie (résultant d'une diminution de l'excrétion de l'eau et des électrolytes) et d'une réduction de l'excrétion de déchets métaboliques. L'IRC peut aussi entraîner l'anémie (diminution de la production d'érythropoïétine)⁸. Cliniquement, les symptômes de l'IRC sont l'asthénie, l'apparition de troubles digestifs (nausée, vomissement, anorexie), cardiovasculaires (péricardite, insuffisance cardiaque, HTA) neurologiques, osseux (diminution de la production des formes actives de la vitamine D) et urinaires, entre autres.

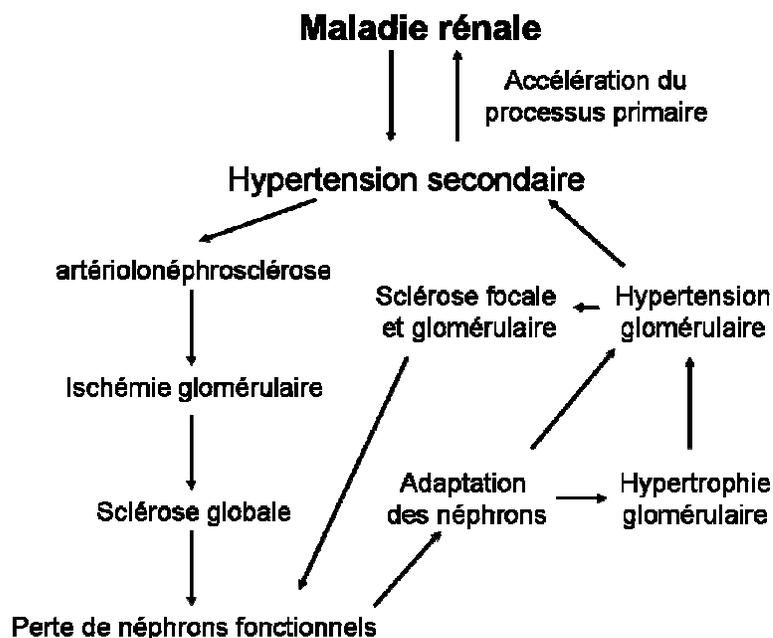
D - Prévalence et liens avec les MCV

Selon les fondations canadienne et nationale du rein, on estime à environ 1,9 et 20 millions le nombre de Canadiens et d'Américains souffrant de maladies rénales chroniques. L'IRC constitue un facteur de risque pour les maladies cardiovasculaires telles l'HTA, l'athérosclérose, l'insuffisance cardiaque et l'hypertrophie ventriculaire gauche¹⁴, de sorte que ces complications cardiovasculaires sont la cause première de morbidité et de mortalité chez les patients dialysés^{15,16}. En effet, la mortalité due aux MCV est de 10 à 30 fois plus élevée chez les patients dialysés que pour l'ensemble de la population¹⁴. Parallèlement, la plupart des facteurs de risque cardiovasculaire sont fortement répandus lors des maladies rénales chroniques. Par exemple, 70 à 80 % des personnes atteintes de maladies rénales chroniques souffrent d'hypertension artérielle¹³.

1.2.3 - Hypertension artérielle associée à l'IRC

Les maladies rénales chroniques sont les causes identifiables les plus communes de l'hypertension artérielle et représentent 5 % des cas d'HTA^{4,11}. Dans les cas de maladies rénales chroniques, la prévalence de l'HTA augmente au fur et à mesure que le GFR décroît et que la protéinurie augmente. Par ailleurs, l'HTA est nettement plus présente dans le cas de dommages glomérulaires que tubulointerstitiels¹³. L'IRC est donc un facteur de risque de l'hypertension artérielle, au même titre que l'hypertension artérielle essentielle peut conduire à l'IRC; ces 2 pathologies contribuent chacune à la progression et à l'aggravation de l'autre, à la manière d'un cercle vicieux (figure 3).

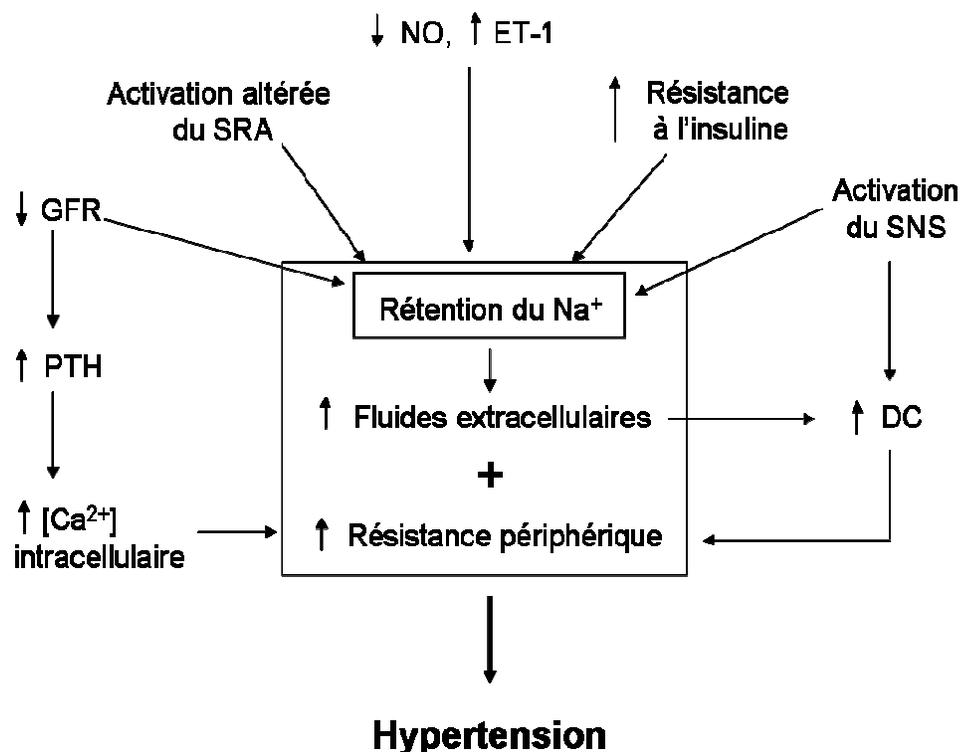
Figure 3 : Relation entre l'HTA et l'insuffisance rénale



Source : figure adaptée de Brenner¹¹

Brenner fait état de quelques mécanismes directement liés à l'IRC dans le développement de l'hypertension artérielle (figure 4)¹¹. Ainsi, à mesure que l'insuffisance rénale progresse et que le GFR décroît, on note une tendance à la rétention des ions Na^+ par les tubules rénaux. Cependant, la réponse natriurétique attendue est altérée suite à l'activation du système nerveux sympathique (réflexe des artères afférentes), du système rénine-angiotensine-aldostérone (SRAA) et de l'augmentation de l'ET-1 associée à une diminution de l'action du NO dans les vaisseaux rénaux¹¹. On note aussi une augmentation de la concentration intracellulaire de Ca^{2+} suite à la production d'hormones parathyroïdiennes (PTH), entre autres, favorisant ainsi la contraction des cellules musculaires lisses vasculaires (VSMC). En définitive, ces mécanismes mènent à l'accroissement de la résistance périphérique, des fluides extracellulaires et du débit cardiaque et contribuent ultimement à l'élévation de la PA.

Figure 4 : Mécanismes par lesquels l'insuffisance rénale mène à l'HTA



Source : figure adaptée de Brenner ¹¹

A - Implication du système nerveux autonome

Système nerveux autonome et barorécepteurs

Le centre cardiovasculaire du bulbe rachidien reçoit les influx des centres nerveux supérieurs et de divers récepteurs sensoriels tels les barorécepteurs. La réponse du centre cardiovasculaire consiste à augmenter ou à diminuer la fréquence des influx nerveux en faisant intervenir les parties sympathiques et parasympathiques du système nerveux autonome. Ainsi, des groupes de neurones disséminés dans le centre cardiovasculaire régissent la fréquence cardiaque, la contractilité des ventricules et le diamètre des vaisseaux sanguins par des boucles de rétro-inhibition dans lesquelles interviennent les réflexes des barorécepteurs ². Les barorécepteurs sont des nerfs/récepteurs situés dans la paroi d'artères systémiques de gros calibre, comme la crosse aortique et les sinus carotidiens, et sont sensibles à des variations de pression sanguine. Suite à un changement soudain de pression

artérielle, ces récepteurs sont stimulés et transmettent immédiatement un signal réflexe au centre cardiovasculaire afin de rétablir la pression artérielle à la normale.

L'activation du système nerveux sympathique entraîne une augmentation de la pression artérielle de plusieurs façons. L'augmentation de la PA suite à l'activation du SNA est due directement à l'élévation de la fréquence et du débit cardiaque, à la vasoconstriction des vaisseaux rénaux et systémiques et de façon indirecte, à la relâche de catécholamines telles la noradrénaline et l'adrénaline dans la circulation sanguine par la médullosurrénale ^{1,2}. Notons que les catécholamines ont un effet direct sur l'ensemble du système cardiovasculaire. Par ailleurs, la stimulation des récepteurs β -adrénergique favorise la relâche de la rénine par les cellules juxtaglomérulaires. Des patients en insuffisance rénale et hypertendus montrent une élévation de norépinéphrine (NE) plasmatique ainsi qu'une augmentation de la sensibilité aux effets « presseurs » de la NE, confirmant l'activation du système nerveux sympathique en IR et sa contribution dans le développement de l'HTA.

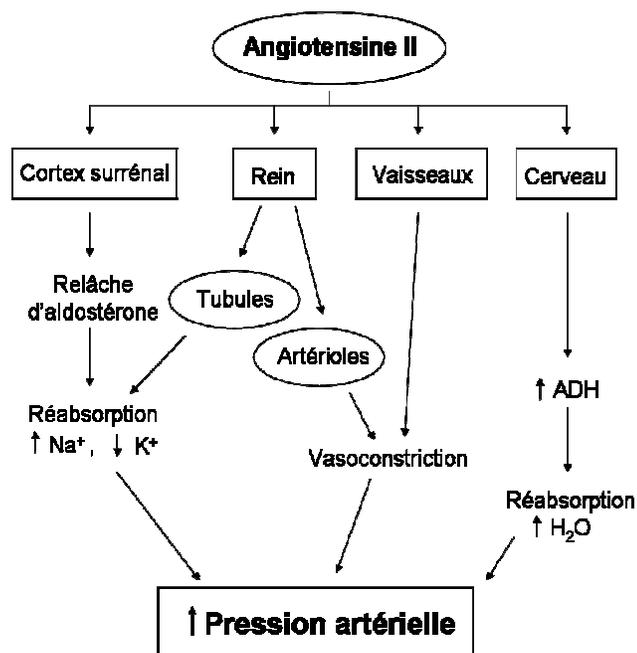
B - Contrôle hormonal

Système rénine-angiotensine

Lorsque le volume sanguin ou le débit sanguin rénal diminue, les cellules juxtaglomérulaires situées dans les parois de l'artériole afférente du rein sécrètent une protéase, la rénine. De plus, tel que mentionné plus haut, des influx en provenance des nerfs sympathiques situés à proximité de ces cellules peuvent aussi entraîner la sécrétion de rénine lorsque le système nerveux sympathique est activé ¹. La rénine, une fois sécrétée, persiste environ 30 minutes dans la circulation sanguine et clive l'angiotensinogène produite par le foie en angiotensine 1. L'angiotensine 1 est clivée à son tour par l'enzyme de conversion de l'angiotensine (ECA) et forme l'Ang II presque qu'exclusivement par les cellules endothéliales des poumons. L'Ang II est un puissant agent vasoconstricteur au niveau des artérioles, ce qui a pour effet d'accroître la résistance périphérique. Par ailleurs, l'Ang II stimule la sécrétion d'aldostérone par le cortex surrénal, une hormone qui, au même titre que l'Ang II, diminue l'excrétion d'eau et de sodium par le rein (tubule collecteur pour l'aldostérone et tubule contourné proximal pour l'Ang II). Ceci a pour effet d'accroître le volume sanguin et le débit cardiaque, et ultimement la pression artérielle.

L'Ang II stimule aussi la libération de l'ADH, qui entraîne l'augmentation de la réabsorption rénale d'eau ².

Figure 5 : Angiotensine II et élévation de la pression artérielle



Source : figure adaptée de Sandberg ¹⁷

ADH (hormone antidiurétique ou vasopressine)

L'activation du système nerveux sympathique et du SRAA entraîne aussi la sécrétion de vasopressine par l'hypothalamus (précisément la glande pituitaire), en réponse à une chute de pression artérielle. La vasopressine a un effet vasoconstricteur direct sur les vaisseaux sanguins, et augmente la résistance périphérique totale. La vasopressine agit aussi à long terme dans la régulation de la pression artérielle en causant une diminution de l'excrétion d'eau par les reins (tubule collecteur) et en augmentant la perméabilité des cellules épithéliales à l'eau, augmentant ainsi le volume sanguin et du même coup la PA ¹.

C - Facteurs métaboliques

La diminution du débit de filtration glomérulaire caractéristique de l'IRC entraîne la libération de l'hormone parathyroïdienne, une hormone qui stimule la contraction des

cellules musculaires lisses des vaisseaux en favorisant l'augmentation de la concentration intracellulaire du calcium, qui augmente la résistance périphérique vasculaire ¹¹. Par ailleurs, la résistance à l'insuline secondaire à l'IRC contribue à la pathogenèse de l'HTA en modulant la réponse des agents vasoactifs, en stimulant l'hypertrophie des parois vasculaires (VSMC) et en favorisant la rétention du chlorure de calcium (NaCl) ¹¹.

1.3 - Dysfonction endothéliale

L'endothélium vasculaire est maintenant considéré comme le plus grand « organe » endocrine du corps humain. Il correspond à la monocouche de cellules endothéliales qui tapissent la surface interne (intima) des vaisseaux sanguins, constituant une barrière physique interposée entre la lumière vasculaire et l'interstitium. L'endothélium est sensible à divers stimuli tels la pression sanguine, la force de cisaillement et l'action d'hormones vasoactives. Sous l'effet de ces stimuli, l'endothélium régule le tonus vasculaire en sécrétant diverses substances vasoactives (vasoconstrictrices ou vasodilatatrices), de façon à maintenir le tonus vasculaire constant en condition physiologique normale. Il existe donc un équilibre entre la production des facteurs vasoconstricteurs et vasodilatateurs locaux. Parmi les vasodilatateurs libérés par l'endothélium, on retrouve le NO, les prostacyclines (PGI₂) et le facteur hyperpolarisant dérivé de l'endothélium (EDHF). Les vasoconstricteurs comprennent l'ET-1, l'Ang II, la thromboxane A₂ (TXA₂) et les espèces réactives de l'oxygène (ROS).

Par contre, la dysfonction endothéliale réfère à un déséquilibre dans la production des vasodilatateurs et vasoconstricteurs, altérant ainsi les fonctions vasomotrices de l'endothélium. Généralement, la dysfonction endothéliale est associée à un déficit en vasodilatateurs et un excès en vasoconstricteurs. Elle est impliquée dans la pathophysiologie de plusieurs maladies cardiovasculaires telles que l'hypertension artérielle, les maladies coronariennes, l'insuffisance cardiaque, les maladies vasculaires périphériques, le diabète et les maladies rénales chroniques¹⁸⁻²⁰.

1.3.1 - Le monoxyde d'azote (NO)

A - Biosynthèse

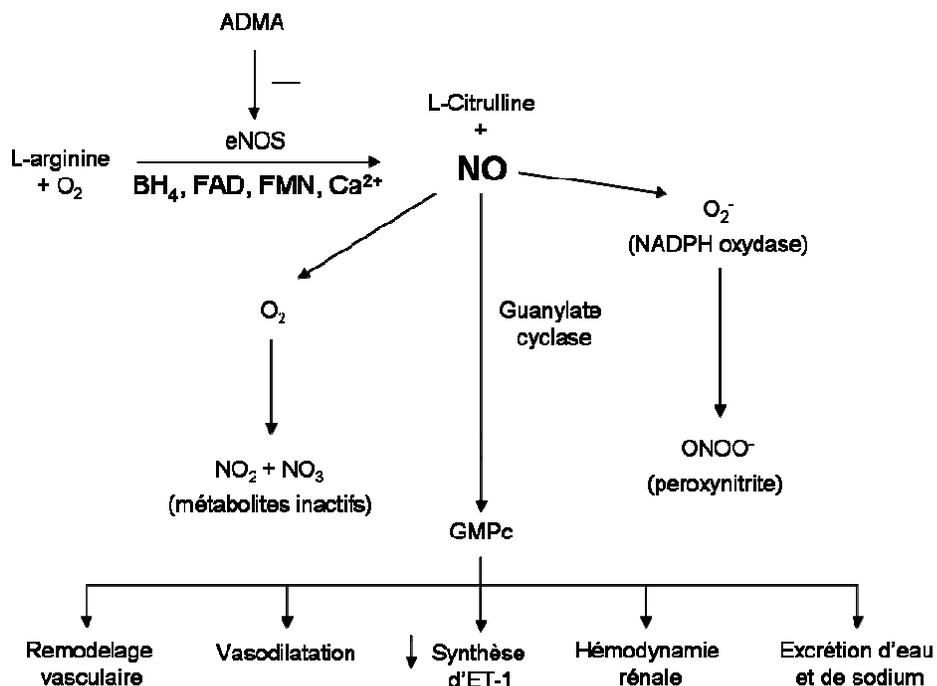
D'abord identifié par Furchgott et Zawadzki²¹ comme étant un facteur relaxant endothélial (*endothelium-derived relaxing factor; EDRF*) en 1980, le NO fut caractérisé par Palmer²² et Ignarro²³. Radical libre gazeux lipo/hydrosoluble jouant un rôle de messenger intra/extracellulaire, le NO est formé à partir de la L-arginine²⁴ par une enzyme nommée NO synthase (NOS), en présence de certains cofacteurs tels la tétrahydrobioptérine, le Ca²⁺, la calmoduline, la flavine-adénine dinucléotide (FAD) et la flavine mononucléotide (FMN) (figure 6)^{25,26}. Il existe 3 isoformes de la NOS : la nNOS (NOS neuronale), la eNOS

(NOS endothéliale) et la iNOS (NOS inductible). Les 2 premiers sont constitutivement exprimés et activés par le calcium et la calmoduline, alors que la iNOS est inductible. Le NO possède une courte demi-vie (3-5 secondes) en condition physiologique puisqu'il est catabolisé par l'oxygène (O_2) en nitrite/nitrate (NO_2/NO_3), par l'anion superoxide (O_2^-) en peroxy-nitrite ($ONOO^-$) et par le fer des noyaux hèmes circulants^{27,28}.

B - Mécanismes d'action

La eNOS, qui joue un rôle clé dans la régulation du tonus vasculaire, est présente dans les cellules endothéliales vasculaires et peut être modulée par plusieurs stimuli tant physiques qu'humoraux. Parmi ces facteurs, on retrouve la force de cisaillement et d'étirement exercée par le flot sanguin ainsi que les catécholamines, la vasopressine, l'ET-1 (récepteur ET_B), l'Ang II (récepteur AT_2), le TGF- β 1, la bradykinine, l'histamine et la substance P. Par contre, elle est inhibée de façon compétitive par des analogues synthétiques de la L-arginine tel le N^G -nitro-L-arginine méthyl ester (L-NAME), ou par des inhibiteurs endogènes comme la diméthylarginine asymétrique (ADMA)²⁵. La iNOS est présente dans les macrophages et est induite par certains médiateurs inflammatoires dont l'interleukine 1B, le *tumor necrosis factor*-alpha (TNF- α) et certaines endotoxines, alors que la nNOS est surtout localisée dans les tissus nerveux du cerveau ainsi que dans le rein. Le NO produit par la eNOS agit directement sur les cellules endothéliales et peut diffuser vers la lumière du vaisseau ou du côté abluminal. Le NO libéré par les cellules endothéliales stimule une enzyme cytosolique, la guanylate cyclase soluble (GC), qui catalyse la formation de guanosine monophosphate cyclique (GMPc) à partir de la guanosine triphosphate (GTP). L'augmentation intracellulaire de GMPc active la protéine kinase G, qui provoque la phosphorylation de protéines impliquées dans les processus de relaxation musculaire, de prolifération cellulaire (inhibition), d'agrégation plaquettaire (inhibition) et de l'expression de molécules d'adhésion (inhibition). Par ailleurs, le NO inhibe la production d'ET-1 par les cellules endothéliales^{25,27}.

Figure 6 : Synthèse du NO et ses principaux effets



C - Implications en IRC

Étant donné sa courte demi-vie et tenant compte du fait que le NO diffuse rapidement dans un rayon d'une centaine de micromètres seulement pour y activer ses cibles²⁰, la localisation des NOS est souvent tributaire des actions du NO. Ainsi, dans le rein, la eNOS est surtout présente dans les artères interlobulaires, les artères afférentes glomérulaires et les glomérules²⁹. De fait, le NO contrôle le débit sanguin rénal en s'opposant, entre autres, à l'effet vasoconstricteur de l'Ang II et de l'ET-1 sur l'artériole afférente^{30,31}. Par ailleurs, il régule le volume de filtration glomérulaire et inhibe la relâche de la rénine par les cellules juxtaglomérulaires, en plus de favoriser l'excrétion du sodium au niveau des tubules proximaux^{30,32-35}.

Nous avons montré que les rats urémiques avec néphrectomies 5/6 présentent une diminution de la synthèse de NO, caractérisée par une diminution de la concentration des métabolites NO₂/NO₃ urinaires, associée à une augmentation d'ET-1 et au développement de l'HTA. Il a aussi été rapporté que la production de NO était réduite chez les patients hypertendus³⁶, alors que des souris mutées pour le gène eNOS développent l'HTA³⁷. La supplémentation en L-arginine³¹ de même que l'administration d'un adénovirus

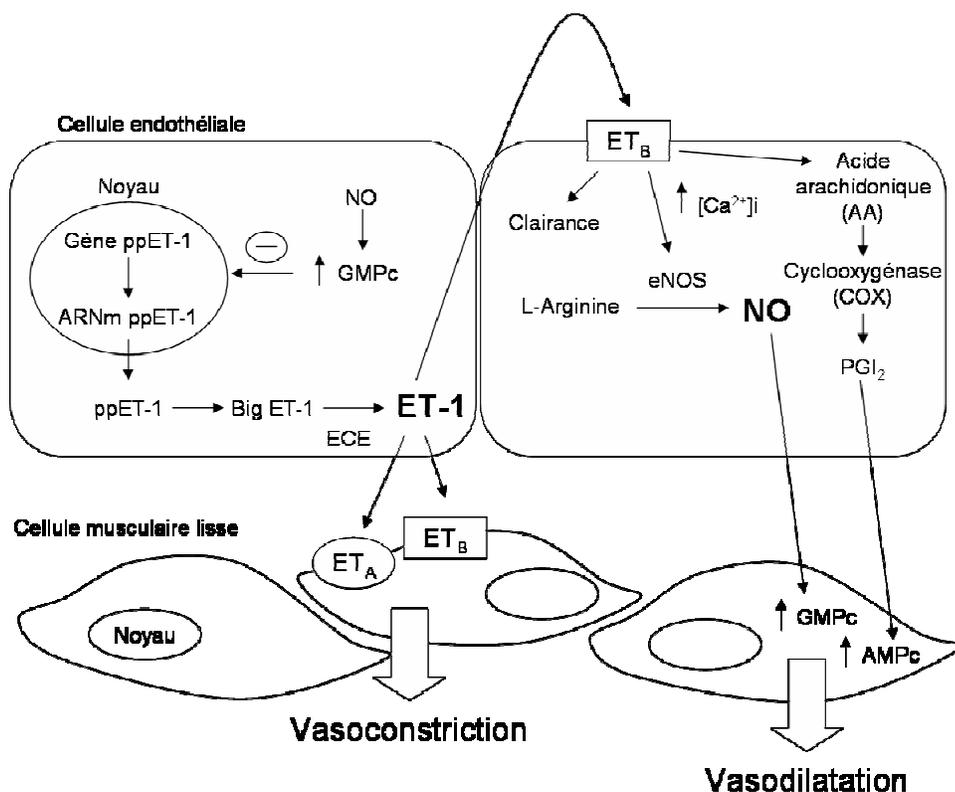
surexprimant la eNOS (résultats non publiés) chez le rat néphrectomisé permet de réduire l'aggravation de l'HTA, la détérioration de la fonction rénale et l'apparition des dommages glomérulaires et tubulointerstiels ³⁸. Ces observations sur le rôle du NO en IRC sont confirmées par diverses études chez le rat normal démontrant que l'inhibition de la synthèse de NO avec le L-NAME accroît la protéinurie, la pression artérielle, la résistance périphérique et favorise l'apparition de glomérulosclérose et de fibrose interstitielle, en plus de diminuer le GFR ^{39,40}. Ces effets étaient associés à une augmentation de l'expression de l'ET-1, du TGF- β 1 et à l'activation du système rénine-angiotensine (SRA) ^{40,41}. En condition normale, le NO est donc impliqué dans le maintien du tonus vasculaire, de la pression artérielle et de la fonction rénale. Cependant, la diminution de la biodisponibilité du NO causée par la diminution de sa synthèse (suite à l'accumulation dans le plasma de l'inhibiteur ADMA), la diminution de l'expression de la eNOS ou de ses cofacteurs et l'augmentation de son inactivation par l'oxygène et l'anion superoxyde pourraient être en partie responsables du développement et de la progression de l'HTA ainsi que des dommages glomérulaires et tubulointerstitiels observés en IRC.

1.3.2 - L'endothéline-1 (ET-1)

A - Biosynthèse

L'ET-1 est un puissant peptide vasoconstricteur de 21 acides aminés découvert par Yanagisawa en 1988 à partir du surnageant de cellules endothéliales aortiques porcines. L'ET-1 fait partie de la famille des endothélines, qui compte deux autres isoformes, ET-2 et ET-3, dont la structure et le potentiel vasoconstricteur diffèrent l'un de l'autre ⁴². L'ET-1 dérive du clivage de la préproendothéline (ppET-1) en « big-endothéline » par des endopeptidases, puis de la conversion ultérieure de la « big-endothéline » en ET-1 par l'enzyme de conversion de l'endothéline (ECE) (figure 7) ⁴³. L'ET-1 est principalement sécrétée par les cellules endothéliales en réponse à divers stimuli tels la thrombine, l'ionophore du calcium, les catécholamines ⁴³⁻⁴⁵, la vasopressine, l'Ang II, le TGF- β 1 ^{44,45} de même que la pression, l'hypoxie et la force de cisaillement ^{20,45}. Sa production par l'endothélium est contrebalancée par la libération de NO et de prostacycline (PGI₂) via un mécanisme impliquant le récepteur ET_B ^{46,47}.

Figure 7 : Synthèse et actions vasculaires de l'ET-1



B - Mécanismes d'action

Les actions autocrines et paracrines de l'ET-1 sont médiées par les récepteurs ET_A et ET_B , des récepteurs à 7 domaines transmembranaires couplés aux protéines G^{48,49}. Le récepteur ET_A est largement exprimé dans les cellules musculaires lisses et est responsable de l'effet vasoconstricteur et mitogénique de l'ET-1⁵⁰⁻⁵². Le récepteur ET_B est principalement exprimé dans les cellules endothéliales⁵⁰ et favorise la relâche compensatoire de facteurs vasodilatateurs dérivés de l'endothélium tel le NO et la PGI_2 ^{46,47}, de même que la clairance de l'ET-1⁵³. Diverses études ont démontré que les voies de signalisation concernées impliquent l'activation de la phospholipase C, la mobilisation du calcium intracellulaire par l'entremise de l'inositol triphosphate (IP_3), l'activation de la protéine kinase C par le diacylglycérol (DAG) et la cascade signalétique des MAPK (*mitogen activated protein kinase*) subséquente, ainsi que la stimulation de l'antiporteur Na^+/H^+ et l'alcalinisation intracellulaire^{47,51,52}. La mobilisation intracellulaire du calcium est responsable de la

constriction vasculaire médiée par l'ET-1 alors que l'activation des MAPK confère à l'ET-1 ses propriétés mitogéniques.

C - Implications en IRC

En condition normale, l'ET-1 est présente de façon prédominante dans la plupart des vaisseaux rénaux, dans la partie proximale du tubule contourné proximal de même que dans les régions mésangiales des glomérules⁵⁴. Infusée dans le rein, l'ET-1 entraîne la vasoconstriction des artérioles afférentes et efférentes glomérulaires et réduit le débit sanguin rénal et le GFR (via récepteur ET_A)⁵⁵, alors que la stimulation tubulaire du récepteur ET_B semble favoriser la natriurèse et la diurèse⁵⁶.

Des évidences suggèrent un rôle majeur de l'ET-1 dans le développement de l'hypertension et les dommages rénaux associés à l'IRC tant chez l'animal que chez l'humain⁵⁷⁻⁶³. Les patients en insuffisance rénale chronique et terminale présentent une augmentation des concentrations plasmatiques d'ET-1, corrélée avec la pression artérielle systolique et la détérioration de la fonction rénale⁵⁹⁻⁶². Par ailleurs, des études chez le rat en insuffisance rénale chronique montrent une augmentation d'ET-1 urinaire⁶⁴⁻⁶⁷, laquelle peut être associée avec l'hypertension artérielle, la protéinurie et la glomérulosclérose^{58,64,65,68}. Ces changements sont associés à une surproduction d'ET-1 dans les tissus vasculaires et rénaux^{64,65,67,69}. Nous avons démontré récemment que cette surexpression de l'ET-1 pouvait être modulée par diverses substances telles l'Ang II et le TGF-β1^{66,67,70}. L'implication de l'ET-1 dans la pathogenèse de l'hypertension artérielle et de l'IRC est renforcée par des études démontrant que l'utilisation d'un antagoniste des récepteurs ET_A parvient à réduire l'élévation de la pression artérielle^{68,71}, de la créatinine sérique^{68,71}, de la protéinurie^{71,72} et des concentrations tissulaires d'ET-1^{68,73}, en plus d'atténuer les lésions et les dommages glomérulaires et tubulaires^{71,74} chez le rat en IRC (néphrectomisé 5/6). Par ailleurs, le blocage des récepteurs ET_A de l'endothéline chez des patients en IRC diminue l'élévation de la pression artérielle et favorise l'augmentation du débit sanguin rénal, la diminution de la résistance vasculaire rénale et la diminution de la protéinurie⁷⁵.

Des études ont par ailleurs démontré une diminution du récepteur ET_B en IRC^{66,72}. La diminution du récepteur ET_B contribue à l'élévation de la pression artérielle en diminuant la relâche du NO par les cellules endothéliales et en augmentant la persistance des concentrations circulantes et tissulaires d'ET-1, par la diminution de sa clairance.

Cependant, même si son expression est diminuée en IRC, les effets rénoprotecteurs et antihypertenseurs du blocage des récepteurs ET_A pourraient être reliés à la stimulation subséquente du récepteur ET_B. En effet, l'induction de l'urémie par néphrectomie 5/6 chez le rat déficient en récepteurs ET_B accentue le développement de l'HTA et la vitesse de progression des dommages vasculaires et rénaux, confirmant le rôle protecteur du récepteur ET_B en IRC ^{76,77}.

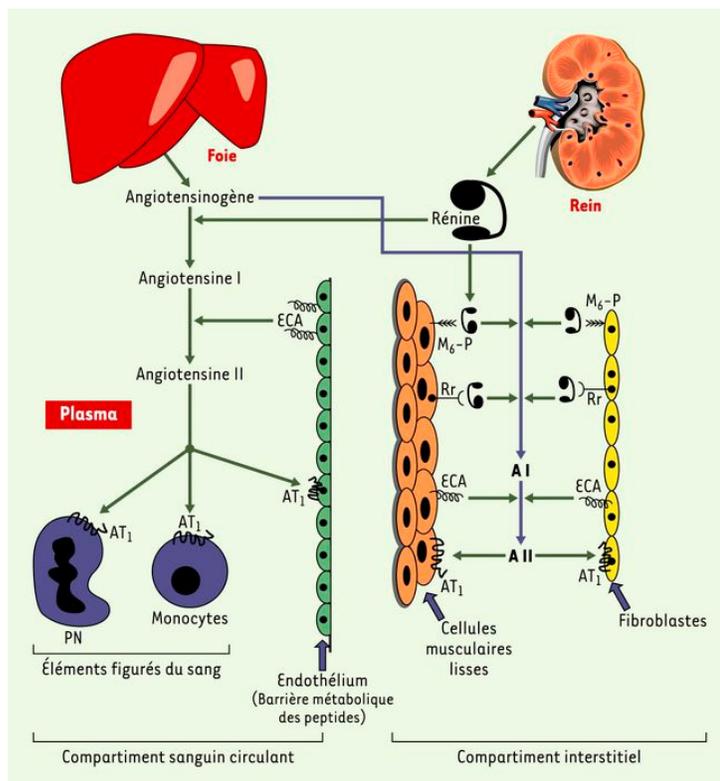
1.3.3 - L'Angiotensine II (Ang II)

L'Ang II est l'hormone peptidique physiologiquement active du SRAA et est impliquée dans la régulation de la pression artérielle et l'homéostasie des électrolytes et des fluides corporels. L'Ang II joue aussi un rôle prépondérant dans la pathophysiologie de l'hypertension artérielle, de l'hypertrophie cardiovasculaire et de l'insuffisance rénale ⁷⁸.

A - Système rénine-angiotensine

Tel que mentionné à la section 1.2.3, l'Ang II est produite suite au clivage de l'angiotensine I par l'enzyme de conversion de l'angiotensine et découle d'une cascade enzymatique impliquant aussi la rénine et l'angiotensinogène (figure 8). Notons que la formation de l'Ang II inhibe la relâche de rénine par les cellules juxtaglomérulaires ^{10,79}. Le SRA fut longtemps considéré comme un système autacoïde où l'Ang II produite était distribuée de la circulation sanguine vers les tissus périphériques pour ainsi médier ses effets via des interactions avec ses récepteurs. Cependant, les concentrations tissulaires nettement plus élevées que circulantes suggèrent la production locale de ce peptide (figure 8). En effet, on retrouve toutes les composantes du système rénine-angiotensine dans le cerveau, le cœur, les vaisseaux sanguins et le rein. Dans le rein, la rénine est exprimée dans les cellules juxtaglomérulaires alors que l'angiotensinogène est exprimée dans les tubules proximaux ^{80,81}. Par ailleurs, la rénine, l'ECA et l'angiotensinogène sont exprimées dans les cellules mésangiales glomérulaires ⁸².

Figure 8 : SRA classique et tissulaire



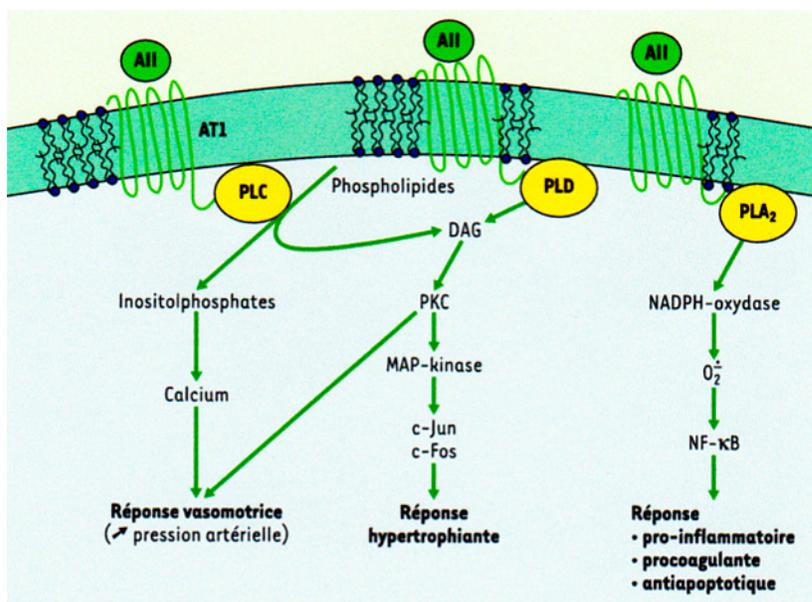
Source : figure tirée de Michel ⁷⁹

B - Mécanismes d'action

L'Ang II exerce ses effets en interagissant avec deux types de récepteurs, les récepteurs AT₁ et AT₂ ⁸³. Le récepteur AT₁ possède 7 domaines transmembranaires et est couplé à une protéine G. Il est distribué dans les vaisseaux sanguins, le cœur, le rein, le foie, les poumons et le cerveau et est plus précisément retrouvé sur les monocytes, les cellules endothéliales, les cellules musculaires lisses, les fibroblastes et les cellules mésangiales ^{78,79}. Dans ces cellules, la stimulation du récepteur AT₁, au même titre que l'ET-1, provoque l'activation immédiate d'une protéine G couplée à la phospholipase C, dont l'activation subséquente entraîne la formation de deux seconds messagers, le diacylglycérol et l'inositol triphosphate (figure 9). La formation d'inositol triphosphate mobilise le calcium intracellulaire, entraîne la contraction des cellules musculaires lisses et favorise l'augmentation de la pression artérielle. Le DAG, aussi issu de l'activation de la phospholipase D, active la protéine kinase C et il en résulte l'expression de gènes cibles de l'Ang II, dont l'ET-1, le TGF-β1 ainsi que certaines protéines de la matrice extracellulaire

via la voie des MAPK. L'activation de la voie des MAPK serait aussi responsable des propriétés mitogéniques et hypertrophiques de l'Ang II. Finalement, l'activation de la phospholipase A₂ entraîne la formation des ROS par la NADPH oxydase⁸⁴, responsable des effets pro-inflammatoires, procoagulants et antiapoptotiques de l'Ang II.⁷⁹

Figure 9 : Voies de signalisation de l'angiotensine II



Source : figure tirée de Michel⁷⁹

Le récepteur AT₂ de l'Ang II est aussi un récepteur à 7 domaines transmembranaires couplé à la protéine inhibitrice Gi. La stimulation du récepteur AT₂ par l'Ang II s'oppose aux effets médiés par l'activation du récepteur AT₁ en médiant la relâche de bradikinine, du NO et de prostaglandines et en favorisant la natriurèse dans le rein¹⁰. Il est donc responsable de la vasodilatation médiée par l'Ang II. Par ailleurs, la stimulation du récepteur AT₂ favorise l'apoptose et empêche la croissance et la différenciation cellulaire⁷⁸.

C - Implications en IRC

L'Ang II contribue de plusieurs façons au développement de l'hypertension artérielle et à la progression de l'insuffisance rénale. D'une part, il favorise la constriction des vaisseaux systémiques, des effets qui sont potentialisés par la stimulation de l'expression de l'ET-1 et de la thromboxane A₂ dans les cellules endothéliales^{10,85}. De plus, l'Ang II agit directement sur les tubules rénaux en diminuant l'excrétion d'eau et de sodium, accroissant le volume sanguin et le débit cardiaque et contribuant ainsi à l'élévation de la pression artérielle. Ces effets sont aussi amplifiés avec la stimulation de la sécrétion d'aldostérone et la libération de l'ADH par l'Ang II. De par ces effets vasoconstricteurs sur les artérioles glomérulaires, l'Ang II joue aussi un rôle clé dans l'augmentation de la résistance vasculaire rénale, qui augmente la pression capillaire glomérulaire et réduit le GFR en IRC⁸⁶. Ces effets sur le glomérule favorisent la détérioration de la fonction rénale, caractérisée par la protéinurie et une diminution de la clairance de la créatinine. D'autre part, l'Ang II contribue au processus de fibrose interstitielle et de glomérulosclérose en favorisant l'expression du TGF- β 1 dans les cellules mésangiales⁸⁷ et tubulaires, l'accumulation de diverses protéines de la matrice extracellulaire dont la fibronectine et le collagène^{87,88} ainsi que la transdifférenciation des cellules tubulaires épithéliales en myofibroblastes (révélée par l'expression de l' α -SMA)⁶⁶, des effets qui peuvent être médiés par le TGF- β 1.

L'implication de l'Ang II dans la pathogenèse de l'HTA en insuffisance rénale a été démontrée par l'utilisation d'antagonistes des récepteurs AT₁ (ARA) ou d'inhibiteurs de l'enzyme de conversion de l'angiotensine (IECA). Ainsi, il a été démontré chez le rat urémique néphrectomisé 5/6 que le losartan, un ARA, et le périndopril, un IECA, réduisent l'élévation de la pression artérielle systolique et la créatinine sérique, normalisent la protéinurie et augmentent la clairance de la créatinine^{66,89}. De plus, le blocage du SRA diminue les taux d'ET-1 dans l'aorte thoracique, les artères préglomérulaires et les glomérules, ainsi que l'excrétion urinaire d'ET-1⁶⁷. Par ailleurs, le blocage des récepteurs AT₁ de l'Ang II et l'utilisation d'un IECA atténuent les dommages rénaux en plus d'inhiber la transdifférenciation cellulaire^{66,89}. Ces changements étaient associés avec une diminution de l'expression rénale du TGF- β 1 et du collagène.

1.3.4 - Le transforming growth factor Beta-1 (TGF- β 1)

Le TGF- β 1 fait partie de la superfamille des TGF, qui compte divers polypeptides dimériques incluant les protéines morphogénétiques osseuses (BMP), les activines et les inhibines. Il est principalement exprimé par les cellules endothéliales, les cellules musculaires lisses vasculaires, les cellules mésangiales et les fibroblastes. Le TGF- β 1 est un facteur de croissance important dans l'inhibition du cycle cellulaire et l'apoptose, la différenciation et l'hypertrophie cellulaire, l'accumulation de la matrice extracellulaire, l'angiogenèse, la fibrose et la progression tumorale.

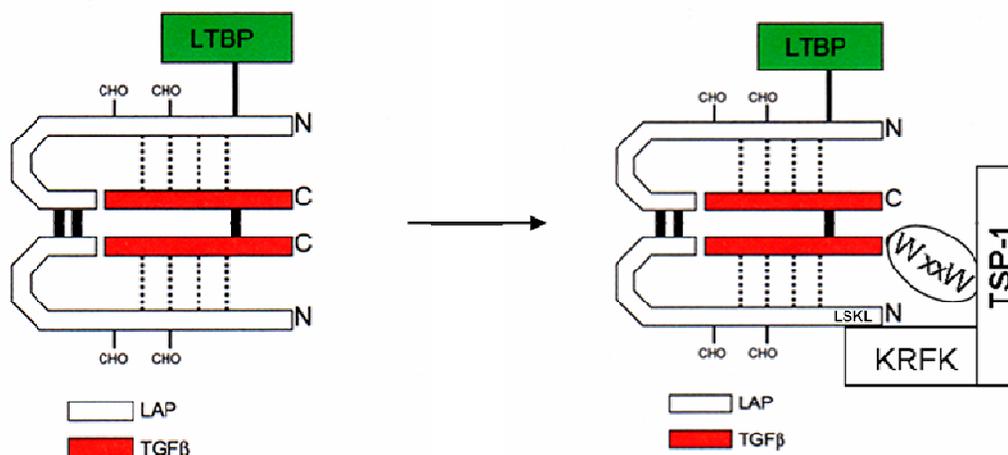
A - Biosynthèse et activation

Le TGF- β 1 est synthétisé en un complexe latent, avec à son extrémité N-terminale le LAP (*latency associated peptides*) ainsi que son domaine mature (TGF- β) en C-terminal, formant ainsi le *small latent complex* (SLC) (figure 10). La liaison du LAP avec le TGF- β mature empêche sa liaison avec son récepteur et prévient la signalisation induite par celui-ci. Parfois, le SLC est lié par des ponts disulfures avec le *latent TGF- β binding protein* (LTBP) pour former le *large latent complex* (LLC). L'activation du TGF- β requiert la dissociation du dimère TGF- β mature du LAP. La chaleur et les pH extrêmes, les peptidases et l'interaction avec les stéroïdes et les espèces réactives de l'oxygène peuvent tous être associés à l'activation du TGF- β ^{90,91}. Cependant, la thrombospondine-1 (TSP-1) est sans contredit l'activateur majeur du TGF- β ^{90,92-96}. La TSP-1, une glycoprotéine trimérique de la matrice extracellulaire, est sécrétée par une variété de cellules, dont les plaquettes, les fibroblastes et les cellules endothéliales. Elle est associée à la croissance des cellules musculaires lisses et des fibroblastes, possiblement en interagissant avec des domaines spécifiques du LAP et du TGF- β 1 mature.

La TSP-1 possède plusieurs domaines, dont le « properdin-like type 1 repeats ». Deux séquences présentes dans ce domaine sont requises pour l'activation du TGF- β 1 latent, tel qu'illustré ci-dessous. D'une part, une séquence de 3 acides aminés (RFK) est située entre le premier et le deuxième « *type 1 repeat* » et lie le LAP (figure 10). Le second motif nécessaire à l'activation du TGF- β 1 est présent sur chacun des « *type 1 repeat* ». Il s'agit de trois peptides de 4 acides aminés identifiés WxxW (WSPW, WSHW et WGPW) qui lient un site actif situé à l'extrémité C-terminale du TGF- β 1 mature. La séquence WxxW stabilise le complexe TGF- β 1/TSP-1 de façon à orienter RFK et ainsi faciliter sa liaison

avec son site de liaison sur le LAP, une séquence présente à l'extrémité N-terminale composée de 4 acides aminés; LSKL ⁹⁶. De façon hypothétique, cette interaction résulte en un changement de conformation du complexe, vraisemblablement du LAP, qui permet de libérer le TGF- β 1 et ainsi lier ses récepteurs.

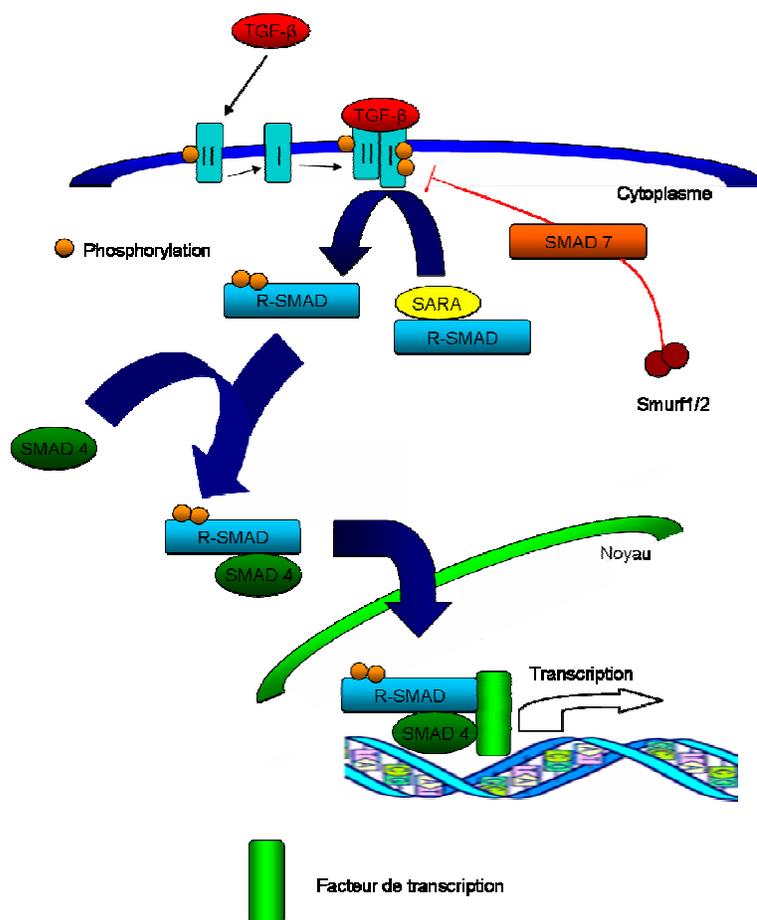
Figure 10 : Structure du TGF- β 1 et son interaction avec la TSP-1



Source : figure tirée de Ghosh ⁹⁰ et Hugo ⁹⁷

B - Signalisation par les SMAD

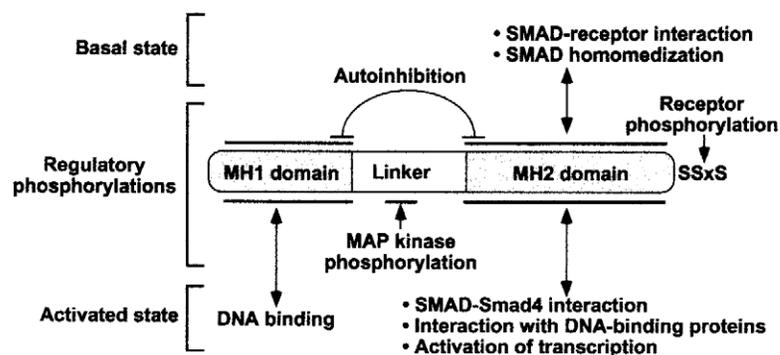
Le TGF- β 1 une fois actif se lie à 2 types de récepteurs à activité sérine-thréonine kinase (aussi appelés « *activin-receptor-like kinase* »), les récepteurs de type I (55 kDa) et II (75 kDa) ⁹⁸. Le TGF- β se lie d'abord à son récepteur de type II, qui recrute et transphosphorylise ensuite le récepteur de type I au niveau d'un domaine GS (riche en glycine et sérine) (figure 11). Le complexe ligand/récepteur permet ensuite la phosphorylation des protéines transductrices SMAD 2 et 3 (R-SMAD : récepteur SMAD), dont l'accès et le recrutement au récepteur de type I sont facilités par les protéines auxiliaires SARA (*smad anchor for receptor activation*). SMAD 2 et 3 phosphorylés forment ensuite un complexe hétérodimérique avec la CO-SMAD (médiateur commun-SMAD) SMAD 4, complexe qui est ensuite transloqué dans le noyau des cellules, où il favorisera l'expression de gènes cibles du TGF- β 1 en interagissant avec divers facteurs de transcription, coactivateurs et corépresseurs.

Figure 11 : Voie de signalisation du TGF- β 1

Source : figure adaptée de Schiller⁹⁹

D'un point de vue structurel, les SMAD disposent de 2 domaines, *Mad homology 1* et 2 (MH1 et MH2) (figure 12). Le domaine MH1 confère à la protéine son activité de liaison à l'ADN alors que le domaine MH2, outre son site de phosphorylation, est impliqué dans la liaison avec les récepteurs du TGF- β 1 et avec SMAD 4, permettant ainsi la translocation du complexe vers le noyau pour ainsi réguler la transcription de gènes¹⁰⁰.

Figure 12 : Structure des SMAD



Source : figure tirée de Massagué¹⁰⁰

Par ailleurs, la liaison des ligands de la famille du TGF- β induit l'expression des SMAD inhibitrices SMAD 6 et SMAD 7 (I-SMAD), qui s'opposent à leur signalisation. D'une part, SMAD 7 s'oppose à la signalisation induite par l'activation des R-SMAD 2 et 3 par le TGF- β 1, en compétitionnant pour le récepteur de type I et en favorisant son ubiquitination et sa dégradation par l'entremise de SMURF 1 et 2 (*Smad ubiquitin regulatory factors*) (figure 11)¹⁰¹. SMAD 6, quant à elle, inactive les voies de signalisation induite par les BMP¹⁰². Le rôle de SMAD 7 dans l'interférence avec la voie de signalisation induite par le TGF- β fut démontré par la surexpression de SMAD 7, qui renverse la phosphorylation de SMAD 2 et la synthèse de collagène dans les cellules musculaires lisses¹⁰³, ainsi que la transdifférenciation des cellules tubulaires épithéliales rénales en myofibroblastes¹⁰⁴.

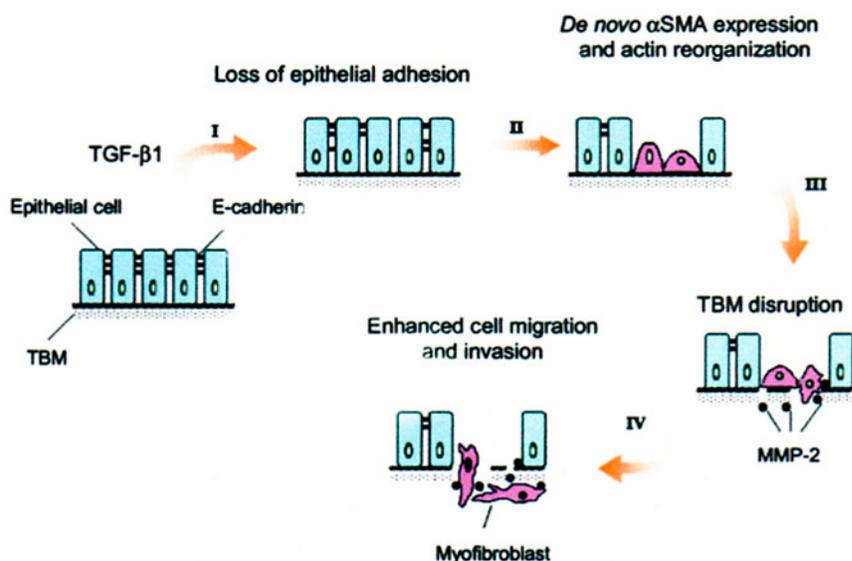
C - Implications en IRC

En plus de jouer un rôle déterminant dans l'activation du TGF- β 1 lors des maladies rénales^{97,105,106}, la TSP-1 semble impliquée directement dans la pathogenèse de ces maladies. Ainsi, l'expression de la TSP-1 est augmentée dans les cellules glomérulaires, tubulaires et les myofibroblastes, et est localisée principalement aux sites d'expression accrue du TGF- β 1 actif et diminuée du LAP. La TSP-1 est aussi associée à l'apparition de dommages glomérulaires, tubulaires et interstitiels lors de maladies rénales progressives^{107,108}. De fait, l'utilisation de peptides et d'oligonucléotides antisenses bloquant de manière sélective l'action de la TSP-1^{105,106} entraîne une diminution de l'accumulation glomérulaire de protéines de la matrice extracellulaire telles le collagène et la fibronectine, ainsi qu'une

diminution de la protéinurie. Les dommages rénaux observés lors de maladies rénales progressives pourraient aussi être attribuables à une diminution de l'expression de SMAD 7. En effet, dans un modèle de glomérulonéphrite, l'expression de l'ARNm de SMAD 7 est diminuée d'environ 70 %¹⁰⁹. Par ailleurs, la surexpression du gène de SMAD 7 dans un modèle d'urémie induit par réduction de masse rénale atténue les dommages histologiques rénaux et prévient la détérioration de la fonction rénale¹¹⁰. En IRC, l'augmentation de la TSP-1 et la diminution de SMAD 7 sont alors associées avec une production vasculaire et rénale accrue du TGF- β 1.

Le TGF- β 1 joue un rôle important dans la progression de diverses maladies rénales, principalement par son action fibrosante. Dans le rein, le TGF- β 1 est exprimé dans les cellules mésangiales et dans tous les segments des tubules rénaux (de façon prédominante au niveau du tubule contourné distal¹¹¹). D'une part, il favorise la différenciation des cellules tubulaires épithéliales rénales en myofibroblastes (*EMT: epithelial-to-mesenchymal transdifférenciation*), un processus confirmé par l'expression *de novo* d' α -SMA (figure 13)¹¹²⁻¹¹⁴. Lors de maladies rénales, les cellules tubulaires épithéliales, une fois stimulées par divers facteurs dont le TGF- β 1, s'activent. S'en suit la perte de molécules d'adhésion telle la E-cadhérine et la sécrétion concomitante par les cellules tubulaires de MMP-2 (*matrix metalloproteinases-2*), une protéase de la matrice extracellulaire qui favorise la dégradation de la membrane basale tubulaire. Les cellules tubulaires se différencient ensuite en myofibroblastes, qui expriment l' α -SMA et qui possèdent des propriétés migratoires et invasives. Ceux-ci migrent donc vers l'environnement interstitiel, où ils contribuent à la fibrose en favorisant la déposition de la matrice extracellulaire. La EMT est considérée comme étant défavorable puisqu'elle mène à la dégradation des couches polarisées des cellules tubulaires épithéliales rénales et entraîne la formation de cicatrices fibrotiques^{112,115}. Finalement, la EMT induite par le TGF- β 1 est un processus qui peut être renversé par le BMP-7 via la phosphorylation des SMAD 1 et 5¹¹⁴. D'autre part, indépendamment de la EMT, le TGF- β 1 favorise l'expansion et l'accumulation de la matrice extracellulaire en stimulant l'expression des protéines qui la compose telles le collagène I et IV, la fibronectine ainsi que PAI-1 (*plasminogen activator inhibitor-1*), un anti-fibrinolytique inhibiteur de la synthèse de protéases^{99,116-118} aussi responsable de l'hypertrophie cardiovasculaire.

Figure 13 : Rôle du TGF- β 1 dans la transdifférenciation cellulaire (EMT)



Source : figure tirée de yang¹¹²

On observe une augmentation marquée du TGF- β 1 tant chez l'homme que dans plusieurs modèles animaux souffrant de maladies rénales (tableau 3). De façon générale, le blocage des effets du TGF- β 1 (anticorps neutralisant le TGF- β 1 (1D11 ou α T) ou récepteur soluble II du TGF- β) retarde la progression de ces maladies en réduisant les dommages tubulaires et glomérulaires, l'expansion de la matrice extracellulaire (ECM), la réponse inflammatoire, la fibrose rénale et la détérioration de la fonction rénale¹¹⁹⁻¹²¹. Récemment, nous avons démontré que la neutralisation du TGF- β 1 chez le rat en IRC (néphrectomie 5/6) atténuait aussi la progression de l'HTA⁶⁶. Ceci confirme l'étude de *Li et al*, qui démontre que les concentrations sériques du TGF- β 1 sont corrélées de façon positive avec la pression artérielle chez les patients en insuffisance rénale terminale¹²². Ces changements sont accompagnés par une diminution de l'expression du collagène I^{120,123}, III¹¹⁹ et IV¹²⁴, de l'ET-1⁶⁶ de l' α -SMA¹²¹, de la fibronectine¹²⁴, de PAI-1¹²³ et de la normalisation du récepteur ET_B⁶⁶ et de l'activité des NOS^{119,125}. L'implication du TGF- β dans le développement de maladies rénales est supportée par un modèle de souris transgéniques surexprimant la forme active du TGF- β 1. Ces souris montrent des taux plasmatiques élevés du TGF- β 1 associés à l'expansion du mésangium, l'accumulation de protéine de la matrice

extracellulaire, la fibrose interstitielle, l'atrophie tubulaire, la protéinurie et ultimement, à un syndrome néphrotique ¹²⁶.

Tableau 3 : Maladies rénales humaines dans lesquelles le TGF- β 1 serait impliqué

Modèles expérimentaux	Maladies rénales humaines
Glomérulonéphrite anti-MBG	Néphropathie diabétique
Souris transgénique pour le TGF- β	Glomérulonéphrite
Néphrotoxicité à la cyclosporine	Néphropathie IgA
Glomérulonéphrite anti-thymocyte	Sclérose focale et segmentaire
Néphropathie membraneuse	Lupus néphrétique
Néphropathie diabétique	Rejet d'allogreffe
Obstruction urétrale	Néphropathie à la cyclosporine
Rats Dahl sensibles au sel	
Néphrectomie 5/6	
Maladies rénales polykystiques	
Protéinurie par surcharge protéique	

Source : tableau adapté de Cheng ¹²⁷

1.4 - Interactions entre les facteurs endothéliaux

En plus de représenter une barrière physiologique entre la circulation sanguine et les tissus avoisinants, l'endothélium vasculaire joue un rôle crucial dans la régulation du tonus vasculaire et l'homéostasie cardiovasculaire. L'endothélium module le tonus vasculaire par la relâche de vasodilatateurs dérivés de l'endothélium tels le NO, les prostacyclines et les bradykinines ainsi que des vasoconstricteurs comme l'ET-1 et l'Ang II en réponse à divers stimuli. Dans les cas d'hypertension artérielle et d'insuffisance rénale, il existe une altération dans la relâche de ces facteurs, qui contribue à la progression de ces pathologies. Nous dresserons dans cette section les différentes interactions entre les facteurs dérivés de l'endothélium.

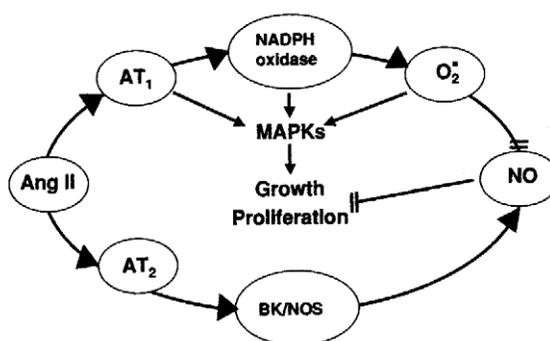
1.4.1 - ET-1 et NO

Plusieurs études montrent des effets compensatoires de la synthèse d'ET-1 et de NO. En condition physiologique normale, l'ET-1 favorise la formation et la relâche de NO des cellules endothéliales via la stimulation de son récepteur ET_B^{46,47}. La cascade de signalisation menant à la production de NO suite à l'activation des récepteurs ET_B implique l'augmentation du calcium intracellulaire résultante de l'activation de la phospholipase C et de l'IP₃, ce qui mène à l'activation de la eNOS. À l'inverse, le NO inhibe la formation de l'ET-1 dans les cellules endothéliales via un mécanisme dépendant de la GMPc⁴⁶ (figure 7). Par ailleurs, l'inhibition chronique de la synthèse du NO entraîne la potentialisation des effets vasoconstricteurs de l'ET-1¹²⁸, des effets qui peuvent être contrés par l'utilisation d'un antagoniste non-sélectif des récepteurs de l'endothéline¹²⁹. Ces observations démontrent l'interaction entre le NO et l'ET-1 dans le maintien du tonus vasculaire et, par le fait même, de la pression artérielle. Dans notre laboratoire, nous avons démontré l'altération des systèmes de l'ET-1 et du NO ainsi que leur implication dans la progression de l'hypertension et de l'insuffisance rénale^{31,64,68}. Ainsi, des animaux urémiques (néphrectomie 5/6) montrent une augmentation d'ET-1 à la fois vasculaire, glomérulaire, urinaire et plasmatique, des changements qui peuvent être associés à une diminution de la biodisponibilité du NO. Ceci pourrait s'expliquer, en partie, par la diminution de l'expression du récepteur ET_B observée dans ce modèle animal⁶⁶.

1.4.2 - Angiotensine II et NO

Le NO freine les effets médiés par le récepteur AT₁ de l'Ang II en diminuant l'expression de l'ARNm de l'enzyme de conversion de l'Ang II dans l'endothélium vasculaire. De plus, il réduit l'expression du récepteur AT₁ dans les cellules musculaires lisses¹³⁰ et inhibe la relâche de la rénine³⁴. Par ailleurs, l'Ang II, via la liaison avec le récepteur AT₁, stimule la formation de la NADPH oxydase⁸⁴, entraînant l'accumulation de l'anion superoxyde dans la cellule, qui se lie au NO et l'inactive en formant le peroxynitrite (figure 14). À l'inverse du récepteur AT₁, la stimulation du récepteur AT₂ de l'angiotensine favorise la synthèse du NO en augmentant les taux de bradykinine et en favorisant la formation des NOS¹³¹. L'utilisation d'un antagoniste des récepteurs AT₁ de l'Ang II suite à l'inhibition chronique de la synthèse du NO avec le L-NAME atténue l'hypertension artérielle, les dommages glomérulaires et les changements tubulaires et hémodynamiques^{30,40,41}. Ceci démontre que le NO et l'Ang II constituent des antagonistes physiologiques et confirme l'importance d'une balance NO/SRA adéquate dans le maintien de la pression artérielle, de la fonction rénale et de la prévention des dommages glomérulaires, en condition physiologique normale.

Figure 14 : Interactions entre l'angiotensine II et le NO



Source : figure tirée de de Gasparo¹³⁰

1.4.3 - Angiotensine II et ET-1

D'une part, l'Ang II stimule la relâche de l'ET-1 dans les cellules musculaires lisses, les cellules mésangiales et de façon dose-dépendante dans les cellules endothéliales^{85,132-134}. Nos études ont par ailleurs démontré que l'expression accrue d'ET-1 dans l'aorte thoracique, le rein et les glomérules en urémie était modulée par l'Ang II^{66,67,70}. La relation entre l'Ang II et l'ET-1 a de plus fait l'objet d'études démontrant le rôle de l'ET-1 dans la médiation de plusieurs effets de l'Ang II. Ainsi, il a été démontré que l'ET-1 médie la synthèse de collagène de type I dans le rein et l'aorte de souris infusées avec l'Ang II⁸⁸, de même que la fibronectine dans les cellules mésangiales stimulées avec l'Ang II¹³⁵. Dans un autre ordre d'idée, l'ET-1 inhibe la production de l'Ang II en inhibant la sécrétion de rénine par les cellules juxtaglomérulaires. Le mécanisme évoqué résulterait de l'activation de la phospholipase C et de l'augmentation calcique intracellulaire¹³⁶.

1.4.4 - Angiotensine II et TGF- β 1

Des études montrent aussi que l'Ang II stimule l'expression de l'ARNm du TGF- β 1 dans les cellules musculaires lisses vasculaires et favorise l'activation et la synthèse protéique du TGF- β 1 dans les cellules mésangiales¹³⁷⁻¹³⁹. Les mécanismes en cause impliquent la phosphorylation et l'activation de la voie ERK1/2 ainsi que l'augmentation de la TSP-1, le principal activateur du TGF- β 1, via p38 MAPK et JNK. Par ailleurs, comme il a été mentionné à la section 1.3, l'Ang II contribue au processus de fibrose interstitielle et de glomérulosclérose en favorisant l'expression rénale du TGF- β 1 et l'accumulation de diverses protéines de la matrice extracellulaire dont la fibronectine, le collagène de type I et l' α -SMA, par l'entremise du TGF- β 1. Par ailleurs, il a été démontré que le TGF- β 1 stimule l'expression de l'angiotensinogène dans les cellules tubulaires proximales via la formation des ROS et la voie des MAPK¹⁴⁰, ainsi que la sécrétion de rénine par les cellules juxtaglomérulaires¹⁴¹. L'Ang II et le TGF- β 1 favorisent donc leur production respective et contribuent de façon conjointe au développement de dommages histologiques rénaux en urémie.

1.4.5 - TGF- β 1 et ET-1

Le TGF- β 1 stimule l'expression de l'ET-1 (ARNm et peptide) dans les cellules musculaires lisses et les cellules endothéliales^{142,143}. Le mécanisme proposé implique la liaison des protéines effectrices du TGF- β 1, les R-SMAD, et le facteur de transcription AP-1 (*activator protein-1*) sur leur site respectif de liaison présent sur le promoteur du gène de l'ET-1¹⁴⁴. De plus, nous avons récemment démontré que la neutralisation du TGF- β à l'aide d'un anticorps monoclonal chez le rat urémique avec masse rénale réduite réduit l'expression rénale de l'ET-1 et augmente celle du récepteur ET_B. Ces changements sont associés à une diminution de la pression artérielle chez le rat urémique⁶⁶, suggérant l'implication du TGF- β 1 dans la régulation du tonus vasculaire et la pression artérielle par l'induction du système ET-1.

1.4.6 - TGF- β 1 et NO

Le TGF- β 1 favorise l'expression de la eNOS dans les cellules endothéliales par l'activation de SMAD 2¹⁴⁵. À l'inverse, le NO inhibe la transcription de gènes induite par le TGF- β 1, en interférant avec la signalisation des SMAD, plus précisément en empêchant la phosphorylation et la translocation de SMAD 2 au noyau¹⁴⁶. Par ailleurs, il a été démontré que le NO inhibe l'augmentation de la synthèse du TGF- β 1 et l'expression du collagène de type I dans les cellules mésangiales incubées dans un milieu riche en glucose¹⁴⁷. De plus, l'inhibition chronique du NO chez le rat entraîne une augmentation de l'expression du TGF- β 1 dans le cortex rénal⁴⁰. La diminution de la biodisponibilité du NO observée en urémie pourrait donc expliquer en partie l'augmentation de l'expression rénale du TGF- β 1.

1.5 - Hypothèses et objectifs généraux de recherche

L'hypertension artérielle est un facteur de risque majeur de morbidité et de mortalité cardiovasculaire chez les patients en IRC. Bien que les mécanismes de l'hypertension artérielle associés à l'IRC soient encore mal définis, des études récentes indiquent que le déséquilibre entre les vasoconstricteurs dérivés de l'endothélium tels l'ET-1 et l'Ang II et les vasodilatateurs comme le NO est un mécanisme clé. La dysfonction endothéliale est aussi associée à la production accrue d'agents de transformation cellulaire dont le TGF- β 1, qui peut à son tour affecter la production des facteurs vasoactifs endothéliaux. Nous avons donc émis l'hypothèse que l'ET-1, l'Ang II, le TGF- β 1 et le NO interagissent entre eux pour accentuer la dysfonction endothéliale en IRC. Ces interactions entre les différents facteurs dérivés de l'endothélium jouent un rôle majeur dans la pathogenèse de l'hypertension et la progression de l'IRC. Dans le cadre de ma maîtrise, j'ai étudié l'effet d'un antagoniste des récepteurs ET_A de l'ET-1, d'un anticorps neutralisant le TGF- β 1 ainsi que d'un antagoniste des récepteurs AT₁ de l'Ang II sur la pression artérielle, la détérioration de la fonction rénale, les dommages histologiques rénaux ainsi que la production des facteurs vasoactifs dérivés de l'endothélium chez le rat urémique avec masse rénale réduite.

Chapitre 2 - Le blocage des récepteurs ET_A de l'endothéline atténue l'hypertension artérielle chez le rat urémique hypertendu

Les études impliquant des antagonistes des récepteurs ET_A de l'endothéline semblent contradictoires et mitigées quant à leurs effets bénéfiques chez le rat urémique et ce, malgré les multiples indices suggérant l'implication de l'ET-1 tant dans les modèles animaux que chez l'homme en IRC.

2.1 - Hypothèse et objectifs de l'étude

Nous avons donc émis l'hypothèse que le blocage des récepteurs ET_A de l'endothéline atténue la progression de l'hypertension artérielle et les altérations cardiovasculaires et rénales caractérisant l'IRC et associées à l'augmentation de la production d'ET-1. De plus, l'effet protecteur sur la fibrose interstitielle et la sclérose glomérulaire serait attribuable à l'atténuation de la production locale du TGF- β 1. Nous avons donc vérifié chez le rat urémique avec masse rénale réduite les effets de l'antagoniste sélectif des récepteurs ET_A de l'endothéline, l'ABT-627 sur :

- La pression artérielle systolique
- La progression de l'insuffisance rénale
- Les dommages histologiques vasculaires, glomérulaires et tubulaires rénaux
- La production rénale et vasculaire du TGF- β 1
- L'expression rénale du récepteur ET_B de l'endothéline
- L'expression et la localisation vasculaire de l'ET-1

2.2 - Matériel et méthodes

A - Protocole animal

Les études sont réalisées avec des rats Sprague-Dawley pesant environ 250g. L'insuffisance rénale est induite telle que décrite précédemment^{48,69} par la ligature de 2 à 3 branches de l'artère rénale gauche suivie de l'ablation totale du rein controlatéral, la semaine suivante. En tout temps, les animaux ont accès à de l'eau et de la nourriture standard de laboratoire et sont maintenus dans une pièce avec l'humidité et la température contrôlées, avec des cycles de lumière/noirceur de 12h. Suite à la néphrectomie 5/6, les rats sont divisés en 2 groupes avec des pressions artérielles systoliques similaires. Un premier groupe ne reçoit aucun traitement (Nx) alors que l'autre groupe reçoit l'antagoniste des récepteurs ET_A de l'endothéline ABT-627 (Nx + ABT-627) (10 mg/kg/jour) dans l'eau à boire. Des rats témoins servent de contrôles.

La pression artérielle est mesurée chaque semaine au niveau de la queue du rat à l'aide d'un capteur à pulsations. Après 6 semaines de traitement, une collecte des urines est effectuée sur une période de 24 heures pour la mesure de la protéinurie et de la créatinine urinaire. Les animaux sont ensuite anesthésiés et exsangüinés par une ponction au niveau de l'aorte abdominale. Le sang est préservé pour les mesures de la créatinine sérique. Le rein gauche restant, le ventricule gauche, un segment de l'aorte thoracique ainsi que le lit artériel mésentérique sont prélevés et conservés à -80 °C. Une section de l'aorte thoracique est prélevée et congelée à -80°C dans une solution d'OCT pour des analyses en immunofluorescence. Une section longitudinale du rein restant des animaux urémiques est fixée dans une solution de formaldéhyde 3,7 % et conservée pour la coloration Masson-trichrome et l'expression de l' α -SMA en immunohistochimie.

B - Mesure des concentrations rénales et urinaires d'ET-1 et du TGF- β 1

Des fragments de cortex rénal sont pesés, homogénéisés dans une solution formée de HCl 1N, d'acide acétique 1 %, d'acide trifluoroacétique 1 % (TFA) et de NaCl 1 %, puis centrifugés à 3000 X g pendant 30 minutes à 4°C. Les échantillons d'urine sont acidifiés avec une solution de TFA 0,2 %. Les extraits sont ensuite purifiés sur une colonne Sep-Pak

C₁₈ (Waters, Milford, Massachusetts, USA). Les concentrations rénales et urinaires d'ET-1 sont mesurées par essai radio-immunologique (RIA)^{69,135,148}. Les concentrations urinaires du TGF-β1 sont évaluées par ELISA après acidification des échantillons (Promega, Madison, Wisconsin, USA).

C - Expression du TGF-β1 et du récepteur ET_B et par analyse de type *Northern* dans le cortex rénal

L'ARN total est isolé à partir de fragments de cortex rénal selon la méthode standard guanidine isothiocyanate-phénol-chloroforme^{48,69}. Des échantillons de 25 µg d'ARNm par animal sont ensuite séparés sur gel d'agarose 1 % en condition dénaturante, transférés sur une membrane Hybon XL (Amersham Biosciences, Piscataway, New Jersey, USA) et exposés aux ultraviolets (UV Crosslinker XLE-1000; Fischer Scientific, Ottawa, Canada). Pour le récepteur ET_B, les membranes sont préhybridées pendant 4 heures à 60°C dans une solution formée de 50 % de formamide, 400 mM de NaPO₄ (pH 7.2), 1mM d'acide tétraacétique d'éthylenediamine (EDTA), 5% de dodécylsulfate de sodium (SDS) et 0,1 % d'albumine bovine sérique (BSA), puis hybridée durant 16h avec une sonde radiomarquée spécifique au récepteur ET_B. Pour le TGF-β1 et l'ARN ribosomal 18S, les membranes sont préhybridées à 42°C pendant 4h dans une solution de 50 % de formamide, 50 mM de NaPO₄ (pH 7.2), 5 X SSC, 10 % de solution de Denhardt, 1 % de SDS, 20 µg/ml d'ADN de sperme de saumon dénaturé et 100 µg/ml d'ARNt de levure, puis hybridée durant 16h avec des sondes radiomarquées spécifiques au TGF-β1 et à l'ARN ribosomal 18S. Les membranes sont ensuite lavées à 3 reprises pendant 30 minutes à 65°C dans une solution de 2 X SSC et 0,1 % SDS, puis exposées sur un film Biomax MS (Eastman Kodak, Rochester, NY, USA) avec écran intensifiant à -80°C. Pour chaque gène, l'analyse est effectuée à partir d'échantillons de 3 à 6 animaux par groupe.

La sonde d'ARN pour le récepteur ET_B chez le rat correspond à un fragment de 494 paires de bases de la séquence codante, précédemment préparée à partir de poumons de rat par RT-PCR^{48,69}. La sonde est marquée avec l'UTP [$\alpha^{32}\text{P}$] en utilisant la polymérase SP6 (Promega). La sonde d'ADNc pour le TGF-β1 chez le rat correspond à un fragment de 490 paires de bases obtenu à la suite d'une double digestion du vecteur pBlueScript (SK+) avec

les enzymes de restriction ECOR1 et Bgl1. La sonde est marquée avec le CTP [$\alpha^{32}\text{P}$] (*ready-to-go DNA Labelling Beads (-dCTP) kit*, Amersham Bioscience, Little Chalfont Buckinghamshire, England). La sonde d'oligonucléotides codant pour l'ARN ribosomal 18S est marquée avec l'ATP [$\gamma^{32}\text{P}$] en utilisant la polynucléotide kinase (Amersham Biosciences). Les sondes radioactives sont ensuite purifiées par chromatographie sur une colonne de séphadex G-50.

D - Immunofluorescence en microscopie confocale dans l'aorte thoracique

Des coupes de tissu de 7 μm sont montées sur lame et fixées dans l'acétone 100 % pendant 10 minutes à -20°C . Les tissus sont lavés dans une solution de 0,2 % triton (dans du PBS 1X) durant 5 minutes, puis lavés 2 autres fois uniquement dans le PBS 1X à température pièce. Les lames sont ensuite incubées dans une solution bloquante (10 % sérum bovin foetal (FBS) dans du PBS 1X) durant 30 minutes, puis à 4°C durant 16h avec le premier anticorps préalablement dilué dans le PBS 1X (ET-1 1:200; TGF- β 1 1:200). L'anticorps ET-1 provient du Dr. Marcel Lebel alors que l'anticorps TGF- β 1 provient de la compagnie Santa Cruz. L'actine du muscle lisse est révélée avec la phalloïdine Alexa fluor 488 (1:150; Molecular probes, Eugene, Oregon, USA). Les tissus sont ensuite lavés tel que décrit plus haut et la liaison du premier anticorps est détectée suite à l'incubation avec un second anticorps couplé avec Alexa fluor 594 (1:1000; Molecular Probes). La fluorescence de l'ET-1 et du TGF- β 1 est déterminée par microscopie confocale (MRC-1024 Confocal System, Bio-Rad, CA, USA), et quantifiée à l'aide du programme Metamorph (Molecular Devices Corporation, Orleans Drive Sunnyvale, CA, USA).

E - Analyses histologiques

Les sections de rein fixées dans le formaldéhyde sont déshydratées, fixées dans la paraffine et des coupes de 5 μm d'épaisseur sont montées sur lames. Les tissus sont ensuite colorés au Masson-trichrome pour l'évaluation des dommages histologiques rénaux. L'expression de l' α -SMA est déterminée par immunohistochimie à l'aide d'un anticorps de lapin anti- α -SMA (Sigma) par la technique avidine-biotine-peroxydase (Vectastain ABC-AP kit; Vector laboratories, Burlingame, California, USA). L'expression de l' α -SMA est quantifiée à l'aide du programme Image J (Wayne Rasband, Research Services Branch, National Institute of Mental Health, Bethesda, Maryland, USA).

F - Analyses biochimiques

Le sérum est obtenu suite à la centrifugation d'un millilitre de sang prélevé lors des sacrifices, préalablement incubé 1h à température pièce. La créatinine sérique, la protéinurie et la créatinine urinaire sont mesurées à l'aide d'un système automatisé d'analyse biochimique (Ilab 1800; Instrumentation laboratory, Lexington, Massachusetts, USA).

G - Analyses statistiques

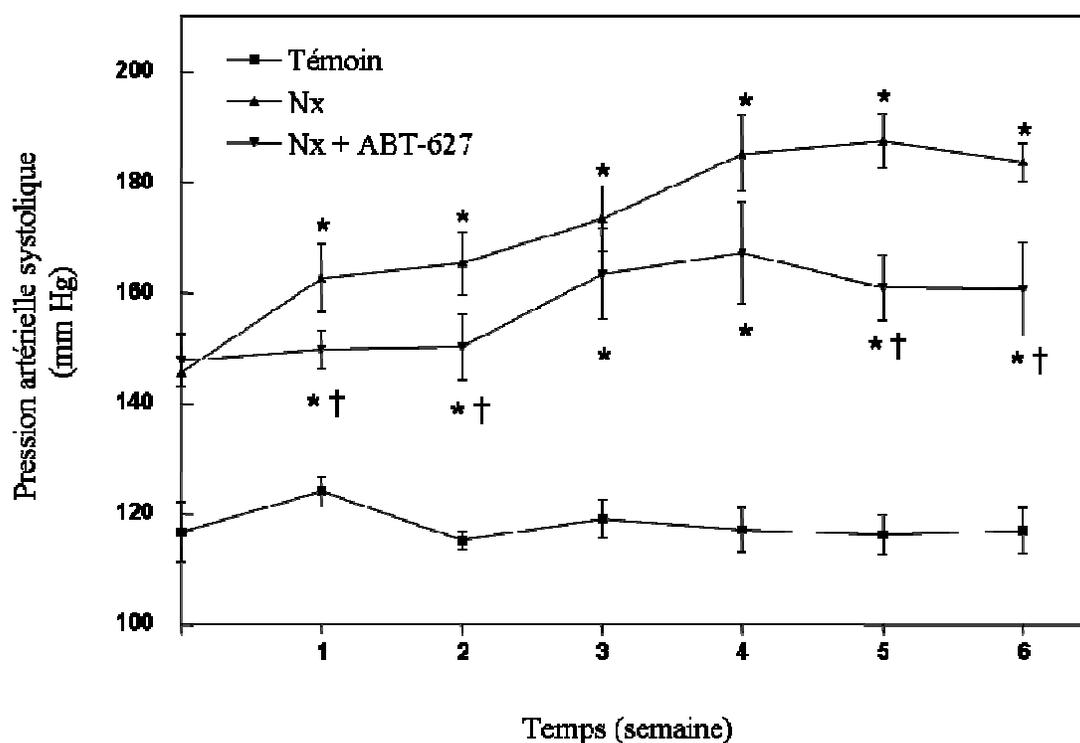
Les données sont analysées à l'aide du logiciel *GraphPad InStat* (graphPad Software, Mobile, CA, USA) et les résultats exprimés représentent la moyenne \pm SEM. Les valeurs sont comparées par analyse de variance ANOVA suivie du test de comparaison multiple de Student-Newman-Keul. L'écart entre les moyennes est considéré comme étant significatif lorsque $p < 0,05$.

2.3 - Résultats

2.3.1 - Pression artérielle systolique

Avant le traitement, la pression artérielle systolique (PAS) est augmentée de façon significative chez les animaux urémiques comparativement aux animaux témoins ($p < 0,01$). La PAS des animaux urémiques non-traités augmente de façon progressive tout au long de l'étude. Le traitement avec l'ABT-627 atténue de façon significative l'élévation de la pression artérielle chez les animaux urémiques ($p < 0,01$).

Figure 15 : Profil de la PAS chez les animaux témoins, Nx et Nx + ABT-627



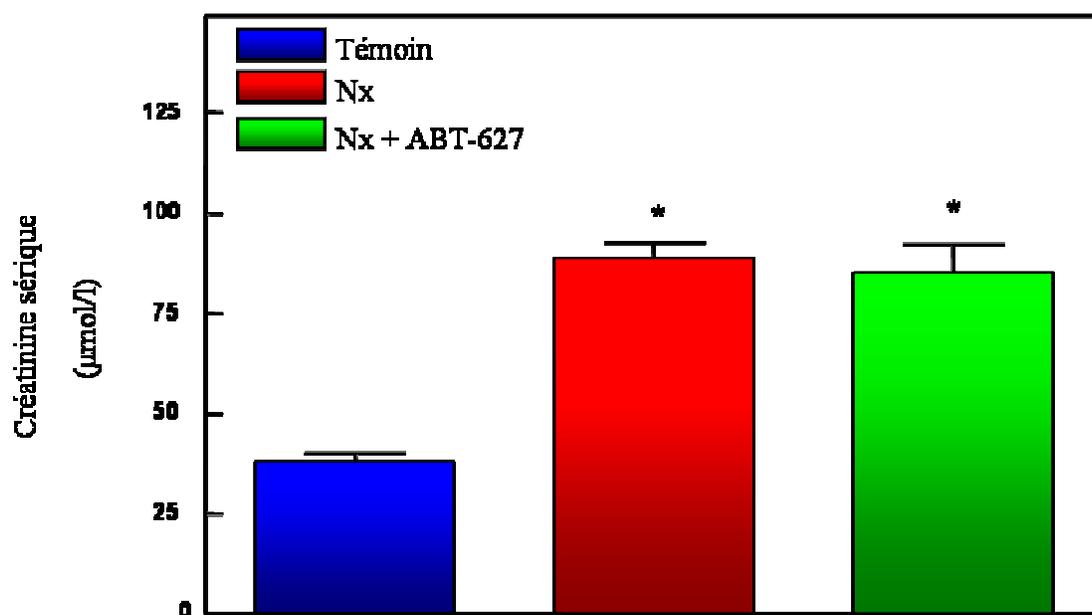
Valeurs exprimées : moyenne \pm SEM

* $p < 0,01$ vs témoins ; † $p < 0,01$ vs Nx

2.3.2 - Créatinine sérique

La créatinine sérique est augmentée de façon significative chez les animaux urémiques comparativement aux animaux témoins, à la fin de l'étude ($90 \pm 4 \mu\text{mol/l}$ versus $38 \pm 2 \mu\text{mol/l}$; $p < 0,05$). Le traitement avec l'ABT-627 n'a aucun effet sur l'élévation de la créatinine sérique chez les animaux urémiques ($81 \pm 6 \mu\text{mol/l}$).

Figure 16 : Créatinine sérique chez les animaux témoins, Nx et Nx + ABT-627



Valeurs exprimées : moyenne \pm SEM

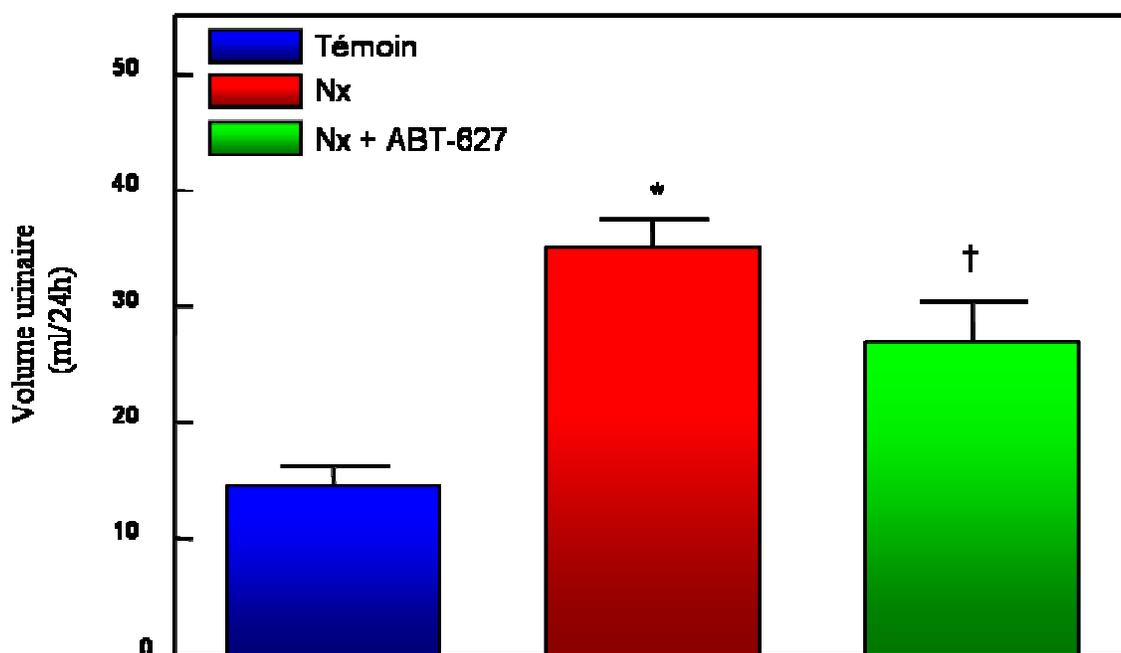
* $p < 0,05$ vs témoins

2.3.3 - Paramètres urinaires

A - Volume urinaire

Le volume urinaire des animaux urémiques est augmenté de façon significative comparativement aux animaux témoins (35 ± 3 ml/24h versus 15 ± 2 ml/24h; $p < 0,05$). Le traitement des animaux urémiques avec l'ABT-627 atténue l'élévation du volume urinaire (25 ± 3 ml /24h; $p < 0,05$).

Figure 17 : Volume urinaire chez les animaux témoins, Nx et Nx + ABT-627



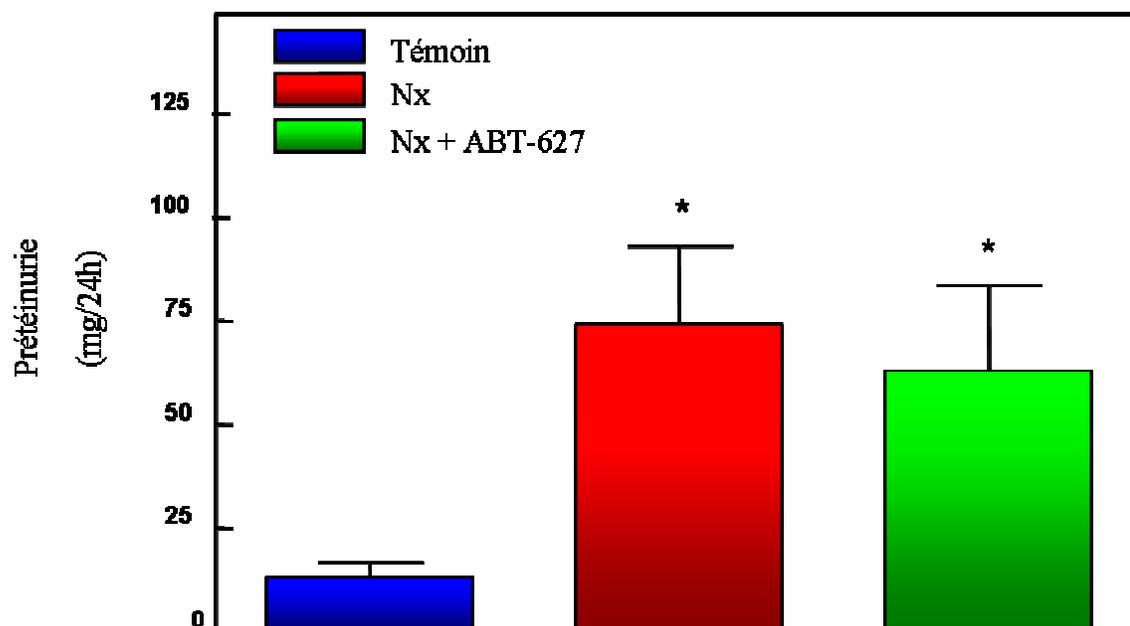
Valeurs exprimées : moyenne \pm SEM

* $p < 0,05$ vs témoins; † $p < 0,05$ vs autres groupes

B - Protéinurie

La protéinurie est accrue chez les animaux urémiques comparativement aux animaux témoins (66 ± 16 mg/24h versus 13 ± 3 mg/24h; $p < 0,05$). Le traitement des animaux urémiques avec l'ABT-627 n'a aucun effet sur la protéinurie (54 ± 16 mg/24h).

Figure 18 : Protéinurie chez les animaux témoins, Nx et Nx + ABT-627



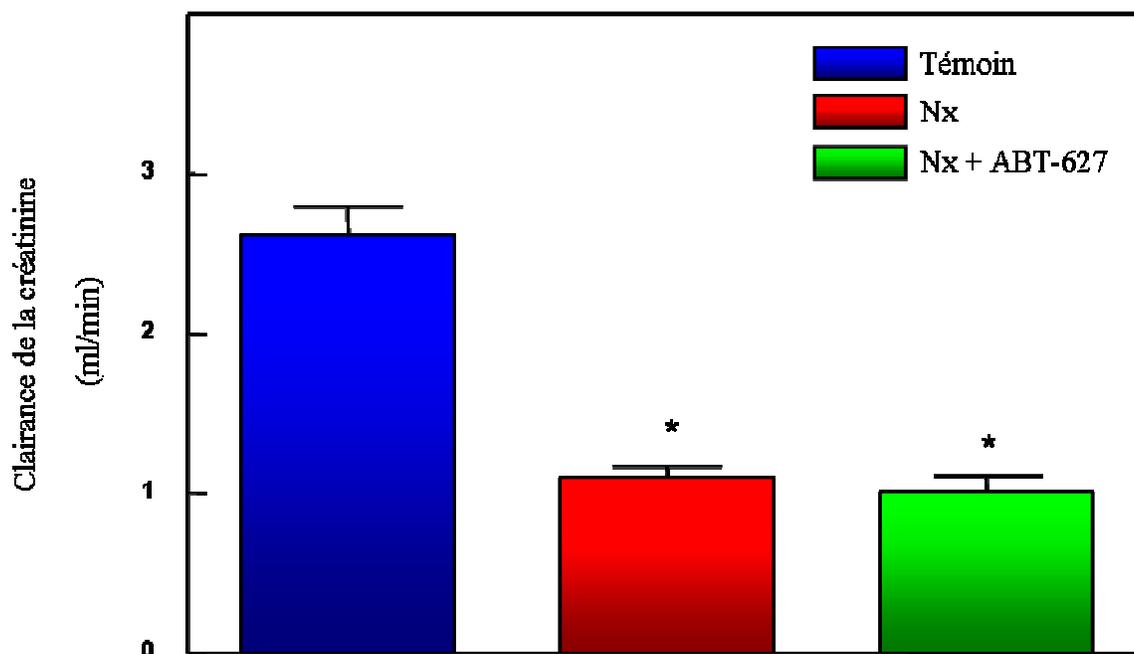
Valeurs exprimées : moyenne \pm SEM

* $p < 0,05$ vs témoins

C - Clairance de la créatinine

La clairance de la créatinine est diminuée chez les animaux urémiques comparativement aux animaux témoins ($1,1 \pm 0,1$ ml/min versus $2,6 \pm 0,9$ ml/min; $p < 0,05$). Le traitement avec l'ABT-627 ne permet pas d'atténuer la diminution de la clairance de la créatinine chez les animaux urémiques ($1,1 \pm 0,1$ ml/min).

Figure 19 : Clairance de la créatinine chez les animaux témoins, Nx et Nx + ABT-627



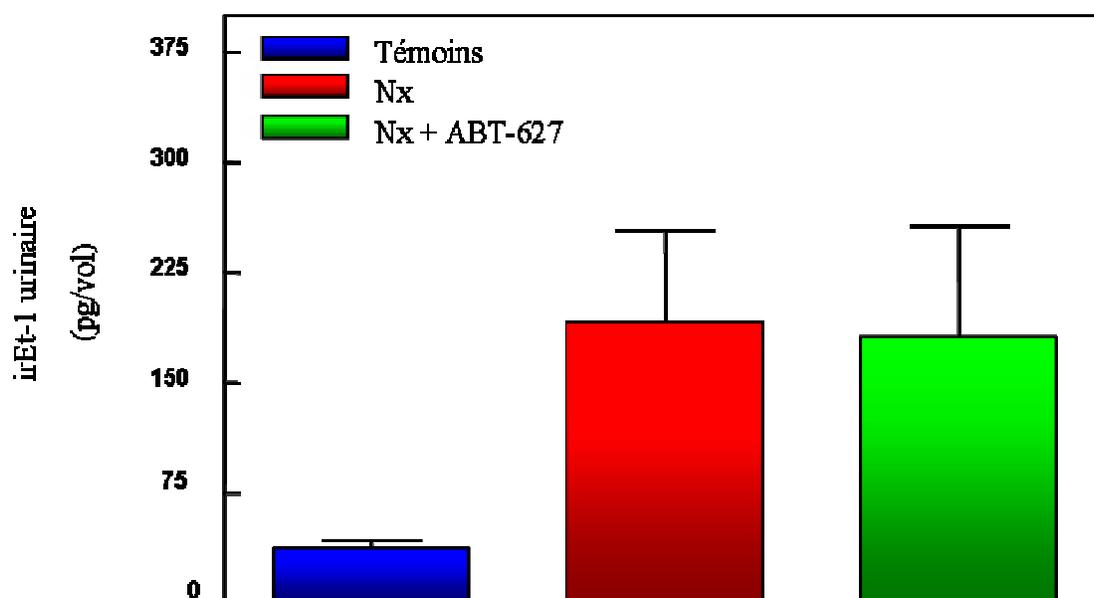
Valeurs exprimées : moyenne \pm SEM

* $p < 0,05$ vs témoins

D - Concentrations urinaires d'ET-1

Les concentrations urinaires d'ET-1 tendent à être augmentées chez les animaux urémiques comparativement aux animaux témoins (148 ± 53 pg/vol versus 37 ± 5 pg/vol). Le traitement des animaux urémiques avec l'ABT-627 n'a aucun effet sur les concentrations urinaires d'ET-1 (188 ± 81 pg/vol).

Figure 20 : Concentrations urinaires d'ET-1 chez les animaux témoins, Nx et Nx + ABT-627

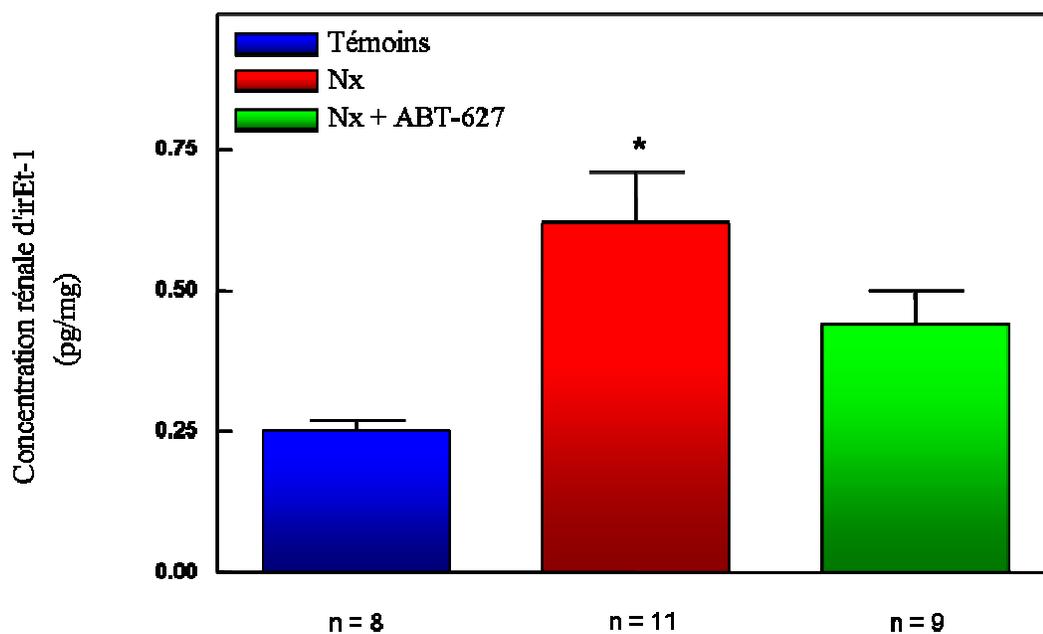


Valeurs exprimées : moyenne \pm SEM

2.3.4 - Concentrations tissulaires d'ET-1

La concentration d'ET-1 est augmentée dans le cortex rénal des animaux urémiques comparativement aux animaux témoins (0.62 ± 0.09 pg/mg vs 0.25 ± 0.02 pg/mg, $p < 0,01$). Le traitement des animaux urémiques avec l'ABT-627 atténue l'élévation de la concentration rénale d'ET-1 (0.44 ± 0.06 pg/mg).

Figure 21 : Concentrations d'ET-1 dans le cortex rénal



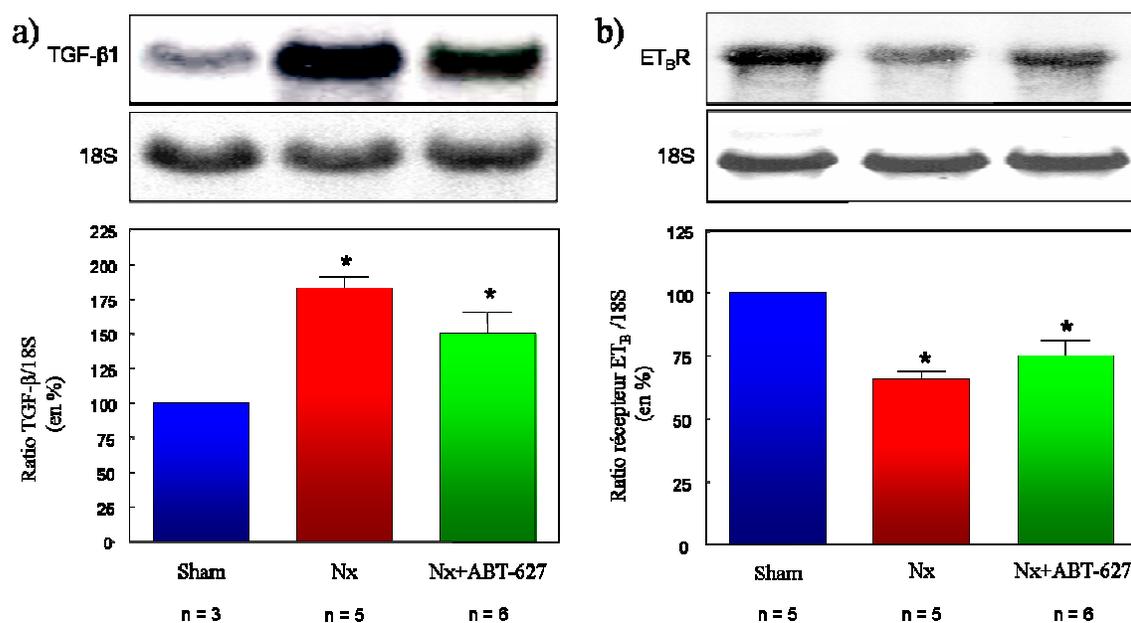
Valeurs exprimées : moyenne ± SEM

* $p < 0,01$ vs témoins

2.3.5 - Expression du TGF- β 1 et du récepteur ET_B par analyse de type Northern dans le cortex rénal

Comparativement aux animaux témoins, l'expression de l'ARNm du TGF- β 1 est augmentée dans le cortex rénal des animaux urémiques (a), alors que l'expression de l'ARNm du récepteur ET_B est diminuée ($p < 0,05$) (b). Le blocage des récepteurs ET_A chez les animaux urémiques n'a aucun effet sur la surexpression du TGF- β 1, ni sur la diminution de l'expression du récepteur ET_B de l'endothéline.

Figure 22 : Expression de l'ARNm du TGF- β 1 et du récepteur ET_B dans le cortex rénal



Valeurs exprimées : moyenne \pm SEM

* $p < 0,05$ vs témoin

2.3.6 - Immunofluorescence en microscopie confocale dans l'aorte thoracique

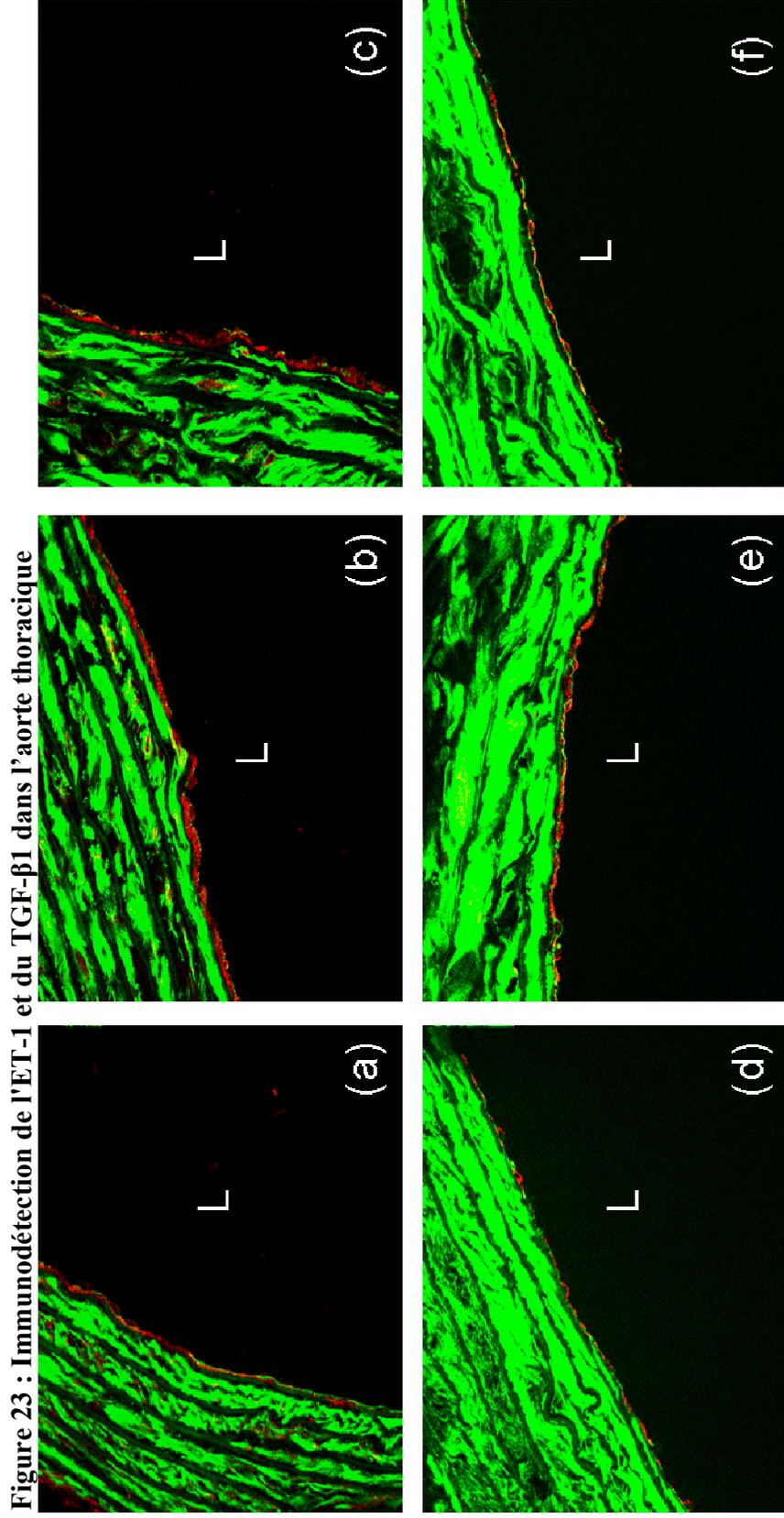
L'expression de l'ET-1 et du TGF- β 1 est localisée dans l'endothélium de l'aorte thoracique et est significativement augmentée chez les animaux urémiques comparativement aux animaux témoins (figure 23 et tableau 3; $p < 0,05$). Le traitement des animaux urémiques avec l'ABT-627 normalise l'expression de l'ET-1 ($p < 0,01$) alors que l'expression du TGF- β 1 demeure inchangée.

Tableau 4 : Quantification de l'expression vasculaire de l'ET-1 et du TGF- β 1

Groupe	Expression de l'ET-1	Expression du TGF- β 1
Témoins	100	100
Nx	136 \pm 4*	133 \pm 9*
Nx + ABT-627	94 \pm 5‡	132 \pm 2*

Valeurs exprimées : moyenne \pm SEM. Les unités sont arbitraires

* $p < 0,05$ vs témoins; ‡ $p < 0,01$ vs Nx.



Immunodétection de l'ET-1 (a-c) et du TGF- β 1 (d-f) dans l'aorte thoracique des animaux témoins (a,d), urémiques (b,e) et urémiques recevant le l'ABT-627 (c,f). L, lumière. Grossissement 40X.

2.3.7 - Analyse histologique des dommages rénaux et expression de l' α -SMA

Des sections de rein colorées au Masson-Trichrome révèlent de la glomérulosclérose focale et segmentale, de l'hypertrophie vasculaire et de la fibrose interstitielle chez l'animal urémique comparativement aux animaux témoins (figure 24 : flèches en b). La fibrose interstitielle est associée à une augmentation de l'expression interstitielle de l' α -SMA (flèche en e; tableau 5) chez l'animal urémique, alors que l' α -SMA est exclusivement exprimée dans les vaisseaux rénaux chez l'animal témoin (flèche en d). Le traitement des animaux urémiques avec l'ABT-627 atténue l'apparition des dommages histologiques rénaux et prévient l'élévation de l'expression interstitielle d' α -SMA.

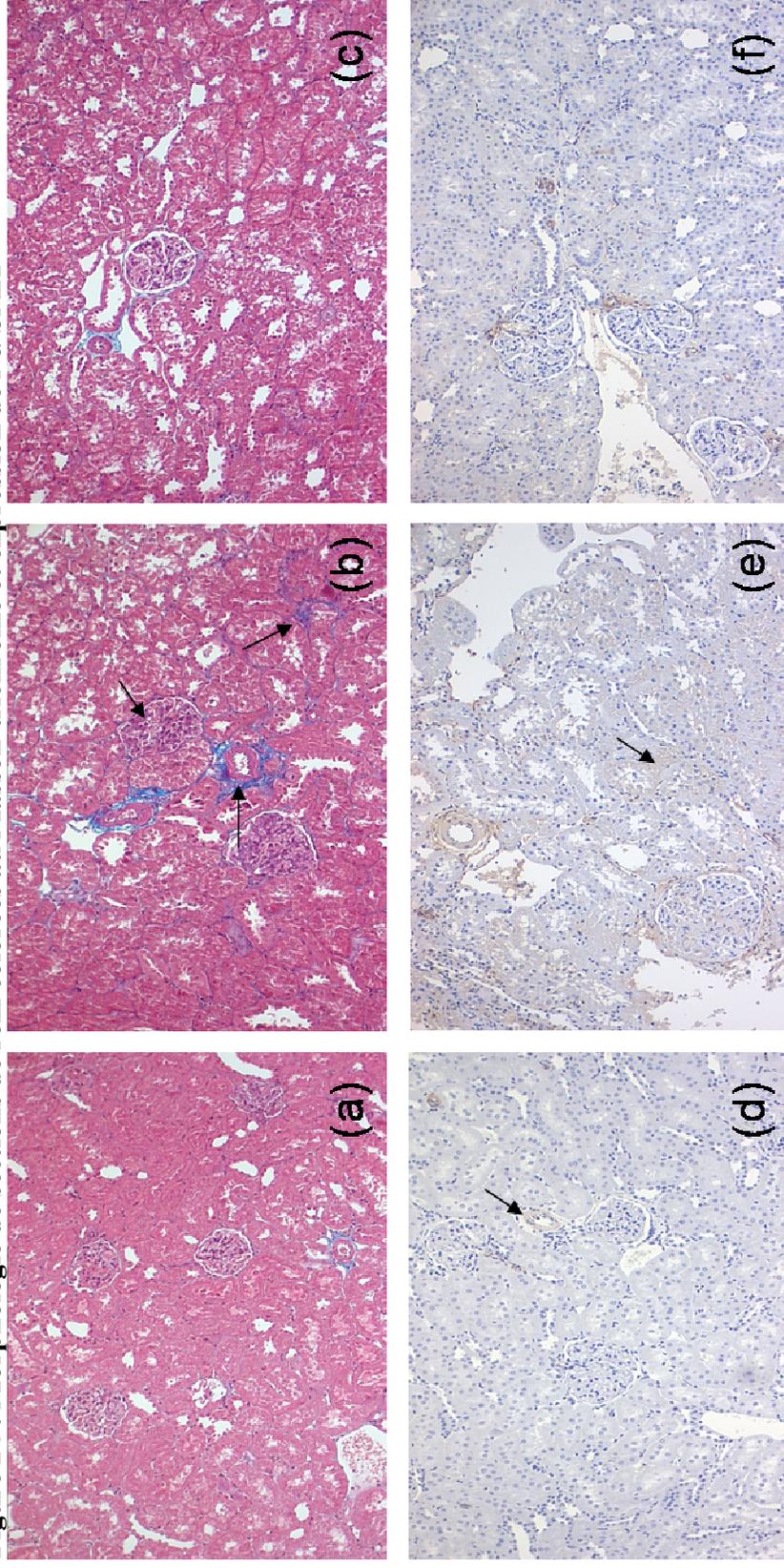
Tableau 5 : Quantification de l'expression de l' α -SMA dans le cortex rénal

Groupe	Expresion de l' α -SMA
Témoins	1,44 \pm 0,03
Nx	4,74 \pm 0,45*
Nx + ABT-627	3,46 \pm 0,27*†

Valeurs exprimées : moyenne \pm SEM. Les unités sont arbitraires

* p<0,01 vs témoins; † p<0,05 vs Nx

Figure 24 : Morphologie de sections de rein colorées au Masson-trichrome et expression de l' α -SMA



Sections de rein des animaux témoins (a,d), urémiques (b,e) et urémiques recevant l'ABT-627 (c,f) colorées au Masson-trichrome (a-c) et immunodétection de l' α -SMA (d-f), un marqueur de la différenciation des cellules tubulaires épithéliales en myofibroblastes. Les flèches en (b) montrent de la glomérulosclérose, de l'hypertrophie vasculaire et la fibrose interstitielle et les flèches en (d,e) montrent l'expression de l' α -SMA. Grossissement 20X

Chapitre 3 - Effets de la neutralisation du TGF- β 1 chez le rat en insuffisance rénale chronique

Le TGF- β 1 joue un rôle clé dans la progression des maladies rénales par son action fibrosante et hypertrophique. Cependant, l'implication du TGF- β 1 dans la dysfonction endothéliale et conséquemment dans le développement de l'hypertension artérielle demeure encore méconnue.

3.1 - Hypothèse et objectifs de l'étude

Nous avons donc émis l'hypothèse que la neutralisation du TGF- β 1 chez le rat urémique atténue l'élévation de la pression artérielle, prévient la détérioration de la fonction rénale et procure une protection cardiovasculaire et rénale en diminuant l'expression de facteurs dérivés de l'endothélium et de gènes locaux impliqués dans la progression de l'hypertension et l'IRC. Afin de valider cette hypothèse, nous avons évalué chez le rat urémique avec masse rénale réduite les effets de la neutralisation du TGF- β 1, à l'aide de l'anticorps monoclonal 1D11, sur la pression artérielle systolique, la détérioration de la fonction rénale et l'expression de l'ET-1 et son récepteur ET_B, du TGF- β 1 et son récepteur de type II ainsi que de PAI-1 dans l'aorte thoracique. Ces effets ont été comparés au blocage des récepteurs AT₁ de l'Ang II à l'aide d'un ARA, le losartan.

3.2 - Matériel et méthodes

A - Protocole animal

Les études sont réalisées chez des rats Sprague-Dawley pesant 250g. L'insuffisance rénale est induite par la ligature de 2 à 3 branches de l'artère rénale gauche, suivie de l'ablation complète du rein controlatéral, la semaine suivante. En tout temps, les animaux ont accès à de l'eau et de la nourriture standard de laboratoire et sont maintenus dans une pièce avec l'humidité et la température contrôlées avec des cycles de lumière/noirceur de 12h. Suite à la néphrectomie 5/6, les rats sont séparés en 3 groupes avec des pressions artérielles systoliques similaires : un groupe urémique ne recevant aucun traitement (Nx), un groupe urémique recevant l'anticorps monoclonal 1D11 neutralisant le TGF- β 1 (Nx + 1D11) (0,5 mg/kg/jour) et un groupe urémique recevant un antagoniste des récepteurs AT₁ de l'Ang II, le losartan (Nx + Los) (20mg/kg/jour). Des rats témoins servent de contrôles.

La pression artérielle est mesurée de façon hebdomadaire au niveau de la queue à l'aide d'un capteur à pulsations. Après 6 semaines de traitement, une collecte des urines est effectuée durant 24 heures. Les échantillons d'urine sont utilisés pour la détermination de la protéinurie et du taux de nitrites/nitrates. Les animaux sont ensuite anesthésiés, puis exsanguinés par ponction de l'aorte abdominale. Le sang est préservé pour les mesures de la créatinine sérique. Le rein gauche restant, le ventricule gauche, un segment de l'aorte thoracique ainsi que le lit artériel mésentérique sont prélevés et conservés à -80 °C. Une section de l'aorte thoracique est prélevée et congelée à -80°C dans une solution d'OCT pour des analyses en immunofluorescence.

B - Dosage des Nitrites/Nitrates (NO₂/NO₃)

La concentration de NO₂/NO₃, les métabolites inactifs du NO, est mesurée dans l'urine par une méthode colorimétrique avec le réactif de Griess. Les échantillons sont dilués dans un volume égal de tampon phosphate (pH 7.4) et déprotéinés avec des tubes Centrisart (potentiel filtrant de 20 000 Dalton; Sartorius, Goettingen, Allemagne) par ultrafiltration à 3000 rpm pendant 45 minutes à 4°C. 25 μ L d'ultrafiltrat pour les animaux témoins et 50 μ L pour les animaux urémiques sont ensuite dilués et complétés à 250 μ L avec du tampon phosphate. Les échantillons sont ensuite incubés en présence de 0,4 U/ml de nitrate

réductase, 150 μ g/mL de NADPH et 3 μ g/mL de FAD (Roche Diagnostics). Un aliquote de 150 μ L est ensuite incubé 5 minutes en présence d'un volume égal du réactif de Griess, préparé en combinant une solution de sulfanilamide 1 % dans du HCl 10N et une solution de N-(1-naphthyl) éthylènediamide 0.1 % dans du H₃PO₄ 5 %, selon une proportion 1:1. L'absorbance est mesurée à 550 nm et la concentration des nitrites/nitrates est déterminée à l'aide d'une courbe standard linéaire de 1.25 à 80 μ M.

C - Immunofluorescence en microscopie confocale dans l'aorte thoracique

L'immunofluorescence est effectuée selon la méthode déjà décrite à la section 2.2 D. L'anticorps eNOS provient de la compagnie BD Transduction Laboratories tandis que l'anticorps pour le récepteur ET_B provient de la compagnie Maine Biotechnology. La concentration de l'anticorps eNOS utilisée est de 1 :200 alors que celle du récepteur ET_B est de 1 :100.

D - PCR quantitatif en temps réel (QRT-PCR)

L'ARN total est isolé à partir d'un segment de l'aorte thoracique en utilisant la méthode standard au Trizol (Lifes technologies). L'ADNc est obtenu à l'aide de la trousse *T-Primed First-Strand Kit* (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ, USA) à partir d'1 μ g d'ARN. Les préparations d'ADNc sont dilués 1:20 dans l'eau pure et sont ensuite amplifiés par PCR quantitatif en temps réel (MX 3005 Ptm, Stratagene) à l'aide du *kit master mix* fourni par le fabricant, qui contient le *brillant SYBR green I dye*, lequel lie l'ADN double brin et émet de la fluorescence. Les différents oligonucléotides propres à chaque gène à l'étude sont présentés dans le tableau 6. La β -actine est utilisée comme contrôle pour vérifier l'homogénéité des échantillons et l'efficacité de la réaction.

Tableau 6 : Séquence des oligonucléotides, la température et le nombre de cycles utilisés pour le QRT-PCR

Gène	Séquence des oligonucléotides	Températures (en °C)			cycles
		dénaturation	appariement	élongation	
ET-1	(+)5'CTAGGTCTAAGCGATCCTTG 3' (-)5'TTCTGGTCTCTGTAGAGTTCC 3'	95	60	72	45
TGF-β1	(+)5'GGACCGCAACAACGCAATCTATG 3' (-)5'TGTATTCCGTCTCCTTGGTTCAGC 3'	95	60	72	40
TGF-β RII	(+)5'CGCCAACAACATCAACCACAATAC 3' (-)5'CATCTCCGTCTCCGCTCCTC 3'	95	60	72	40
PAI-1	(+)5'GCCTCCAAAGACCGAAATGTG 3' (-)5'GTCGTTGATGATGAATCTGGCTC 3'	95	58	72	45
β-actine	(+)5'GACCTCTATGCCAACACAGT 3' (-)5'CTCATCGTACTCCTGCTTGC 3'	95	60	72	40

E - Expression du TGF-β1 et la TSP-1 par analyse de type *Northern*

L'ARN total est isolé à partir du cortex rénal en utilisant la méthode standard au Trizol (Lifes technologies). Des échantillons de 25 ug d'ARN par animal sont utilisés. Les analyses *Northern* sont réalisées selon le protocole déjà décrit en détail à la section 2.2 C. Les sondes pour le TGF-β1 et l'ARN ribosomal 18S sont les mêmes, alors que la sonde utilisée pour la TSP-1 correspond à un fragment de 572 paires de bases de la séquence codante obtenue par PCR. Les séquences d'oligonucléotides utilisées sont les suivantes :

TSP-1 (+) 5' GTGTTCGACATTTTTGAACTC 3'

TSP-1 (-) 5' CCAAAGACAAACCTCACATTC 3'

F - Analyses statistiques

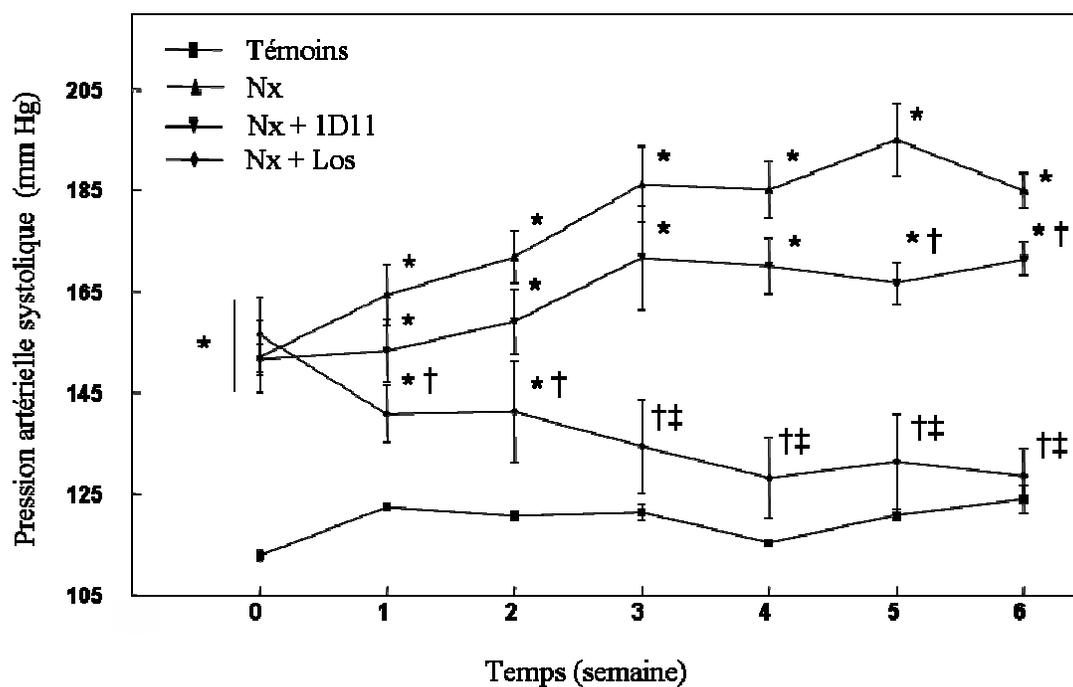
Les données sont analysées à l'aide du logiciel *GraphPad InStat* (graphPad Software, Mobile, CA, USA) et les résultats exprimés représentent la moyenne ± SEM. Les valeurs sont comparées par analyse de variance ANOVA suivie du test de comparaison multiple de Student-Newman-Keul. L'écart entre les moyennes est considéré comme étant significatif lorsque $p < 0,05$.

3.3 - Résultats

3.3.1 - Pression artérielle systolique

Avant les traitements, la pression artérielle systolique est augmentée de façon significative chez les animaux urémiques comparativement aux animaux témoins ($p < 0,05$). La PAS des animaux urémiques non-traités augmente de façon progressive tout au long de l'étude. Le traitement avec l'anticorps 1D11 atténue de façon significative l'élévation de la pression artérielle chez les animaux urémiques ($p < 0,05$) alors que le losartan normalise la PAS à des valeurs comparables à celles des animaux témoins.

Figure 25 : Profil de la PAS chez les animaux témoins, Nx, Nx + 1D11 et Nx + Los



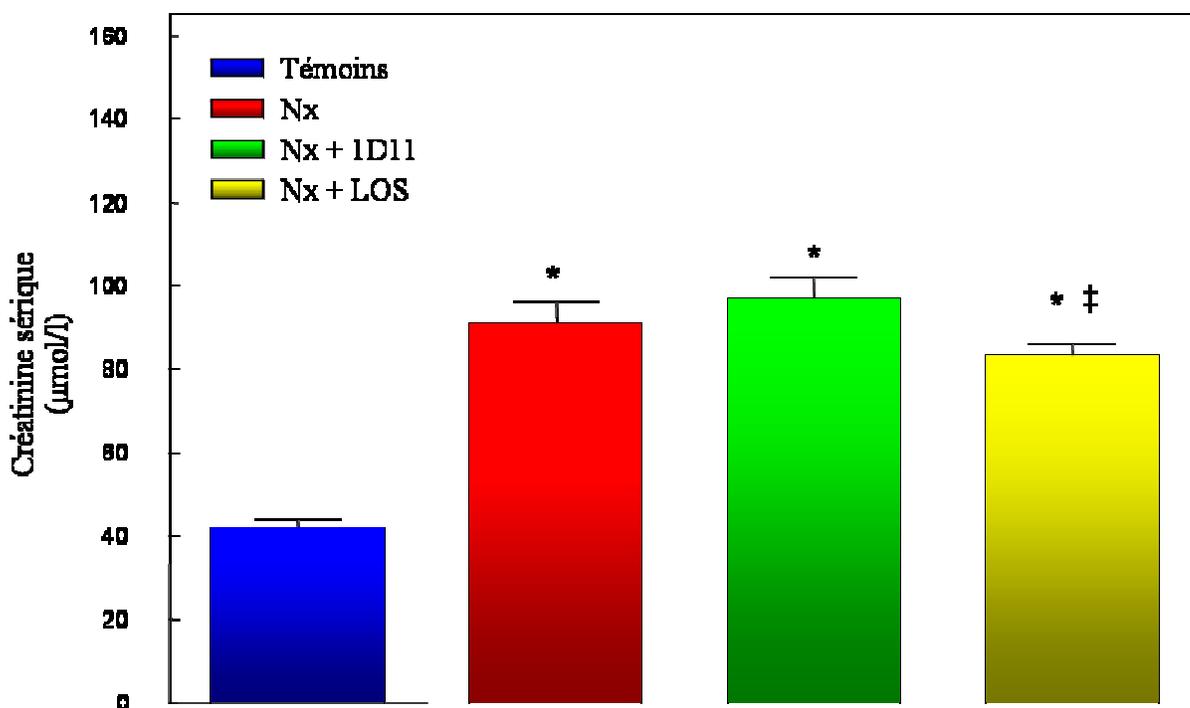
Valeurs exprimées : moyenne \pm SEM

* $p < 0,05$ vs témoins ; † $p < 0,05$ vs Nx ; ‡ $p < 0,05$ vs Nx + 1D11

3.3.2 - Créatinine sérique

À la fin de l'étude, la créatinine sérique est augmentée de façon significative chez les animaux urémiques comparativement aux animaux témoins ($91 \pm 5 \mu\text{mol/l}$ versus $42 \pm 2 \mu\text{mol/l}$; $p < 0,01$). Le traitement des animaux urémiques avec l'anticorps 1D11 n'a aucune influence sur la créatinine sérique ($97 \pm 5 \mu\text{mol/l}$) alors qu'elle est diminuée avec le losartan ($83 \pm 3 \mu\text{mol/l}$; $p < 0,05$).

Figure 26 : Créatinine sérique chez les animaux témoins, Nx, Nx + 1D11 et Nx + Los



Valeurs exprimées : moyenne \pm SEM

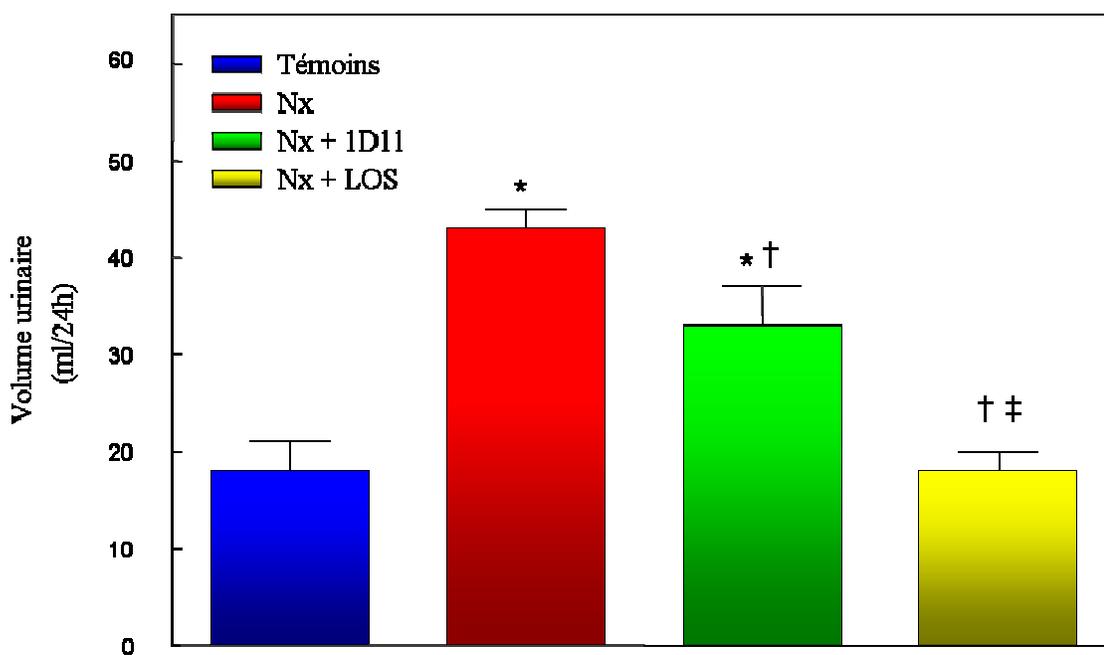
* $p < 0,01$ vs témoins ; ‡ $p < 0,05$ vs Nx + 1D11

3.3.3 - Paramètres urinaires

A - Volume urinaire

Le volume urinaire des animaux urémiques est augmenté de façon significative comparativement aux animaux témoins (43 ± 2 ml/24h versus 18 ± 3 ml/24h; $p < 0,01$). Le traitement des animaux urémiques avec l'anticorps 1D11 atténue l'élévation du volume urinaire (33 ± 4 ml /24h; $p < 0,05$), alors qu'il est normalisé avec le losartan (18 ± 2 ml/24h; $p < 0,05$).

Figure 27 : Volume urinaire chez les animaux témoins, Nx, Nx + 1D11 et Nx + Los



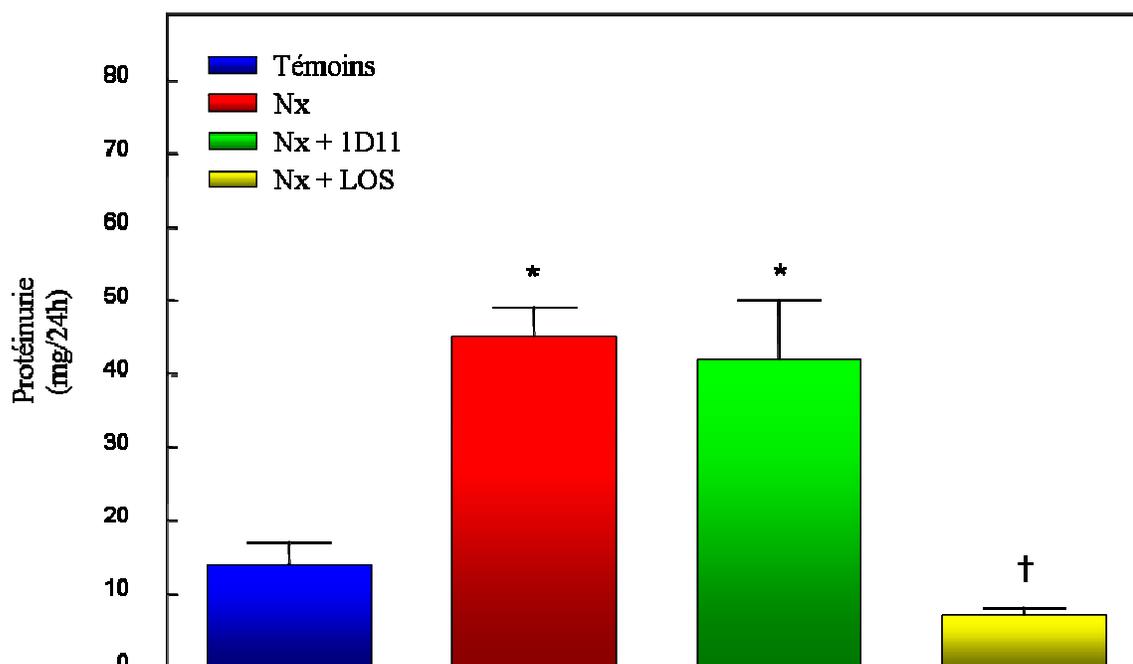
Valeurs exprimées : moyenne \pm SEM

* $p < 0,01$ vs témoins ; † $p < 0,05$ vs Nx ; ‡ $p < 0,05$ vs Nx + 1D11

B - Protéinurie

La protéinurie est accrue chez les animaux urémiques comparativement aux animaux témoins (45 ± 4 mg/24h versus 14 ± 3 mg/24h; $p < 0,01$). Le traitement des animaux urémiques avec l'anticorps 1D11 n'a aucun effet sur la protéinurie (42 ± 8 mg/24h), alors qu'elle est normalisée avec le losartan (7 ± 1 mg/24h; $p < 0,01$).

Figure 28 : Protéinurie chez les animaux témoins, Nx, Nx + 1D11 et Nx + Los



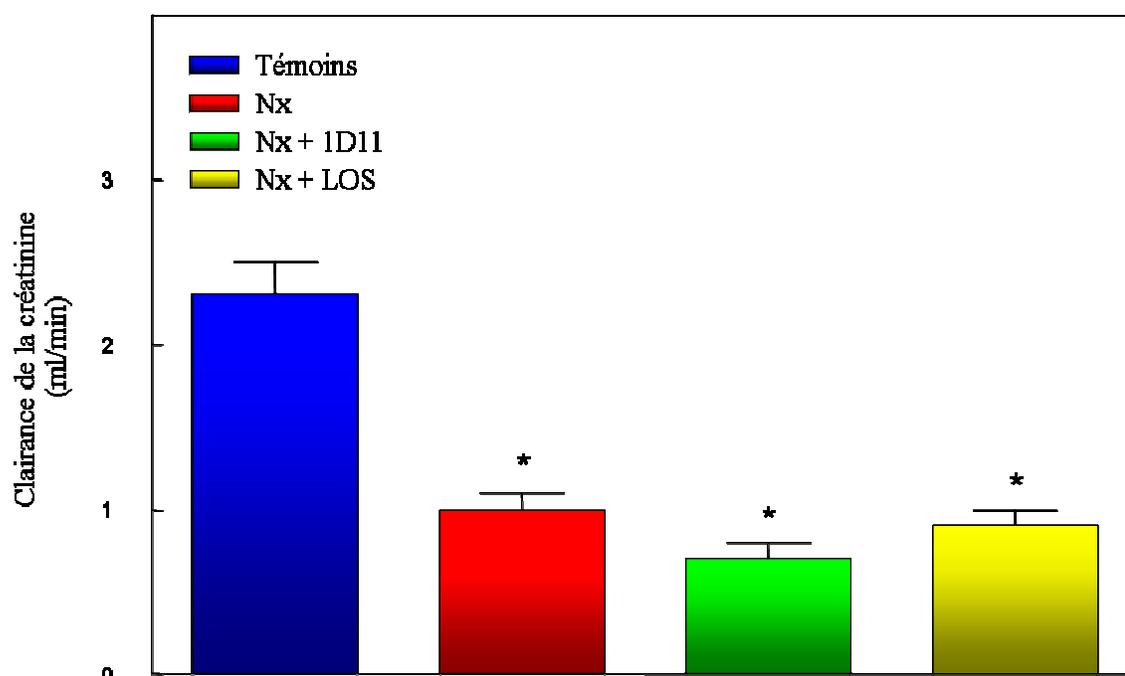
Valeurs exprimées : moyenne \pm SEM

* $p < 0,01$ vs témoins ; † $p < 0,01$ vs Nx et Nx + 1D11

C - Clairance de la créatinine

La clairance de la créatinine est diminuée chez les animaux urémiques comparativement aux animaux témoins ($1,0 \pm 0,2$ ml/min versus $2,3 \pm 0,2$ ml/min; $p < 0,01$). Le traitement avec l'anticorps 1D11 et le losartan ne permet pas d'atténuer la diminution de la clairance de la créatinine chez les animaux urémiques ($0,7 \pm 0,1$ ml/min et $0,9 \pm 0,1$ ml/min respectivement).

Figure 29 : Clairance de la créatinine chez les animaux témoins, Nx, Nx + 1D11 et Nx + Los



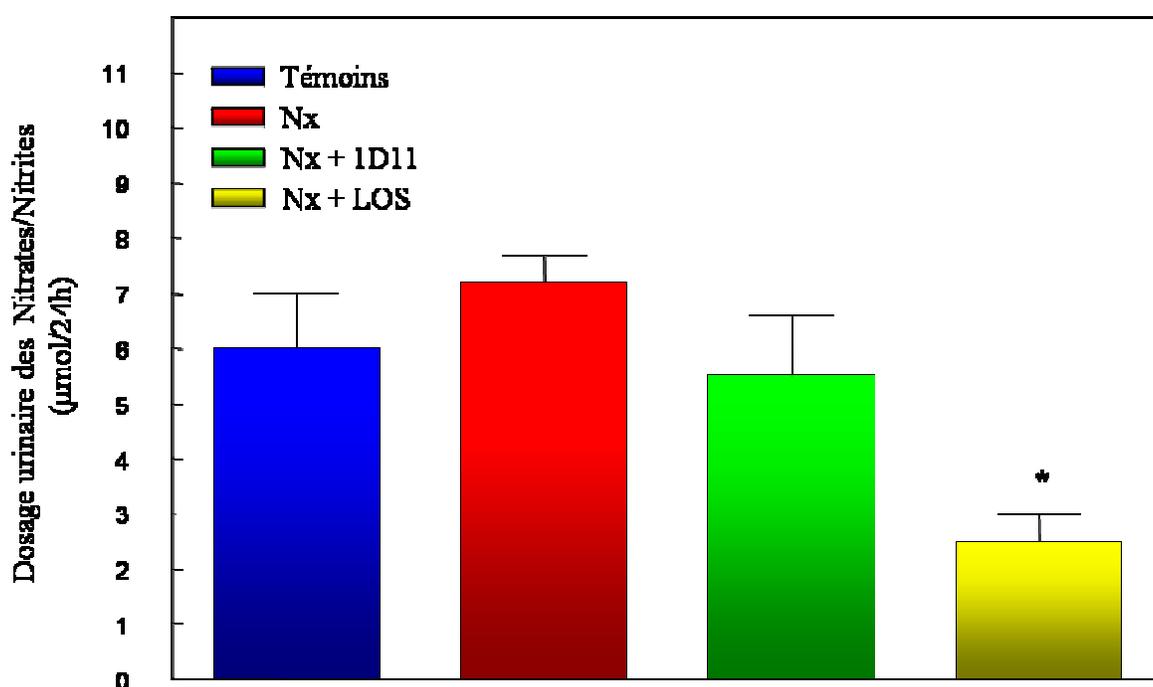
Valeurs exprimées : moyenne \pm SEM

* $p < 0,01$ vs témoins

D - Nitrites/Nitrates (NO₂/NO₃) urinaires

Les concentrations de nitrites/nitrates dans l'urine sont comparables chez les animaux témoins, urémiques et urémiques recevant l'anticorps 1D11 ($6 \pm 1 \mu\text{mol}/24\text{h}$, $7,2 \pm 0,5 \mu\text{mol}/24\text{h}$ et $5,5 \pm 1,1 \mu\text{mol}/24\text{h}$ respectivement). Cependant, le traitement des animaux urémiques avec le losartan diminue l'excrétion urinaire des NO₂/NO₃ comparativement aux autres groupes ($2,5 \pm 0,5 \mu\text{mol}/24\text{h}$; $p < 0,05$).

Figure 30 : NO₂/NO₃ urinaires chez les animaux témoins, Nx, Nx + 1D11 et Nx + Los



Valeurs exprimées : moyenne \pm SEM

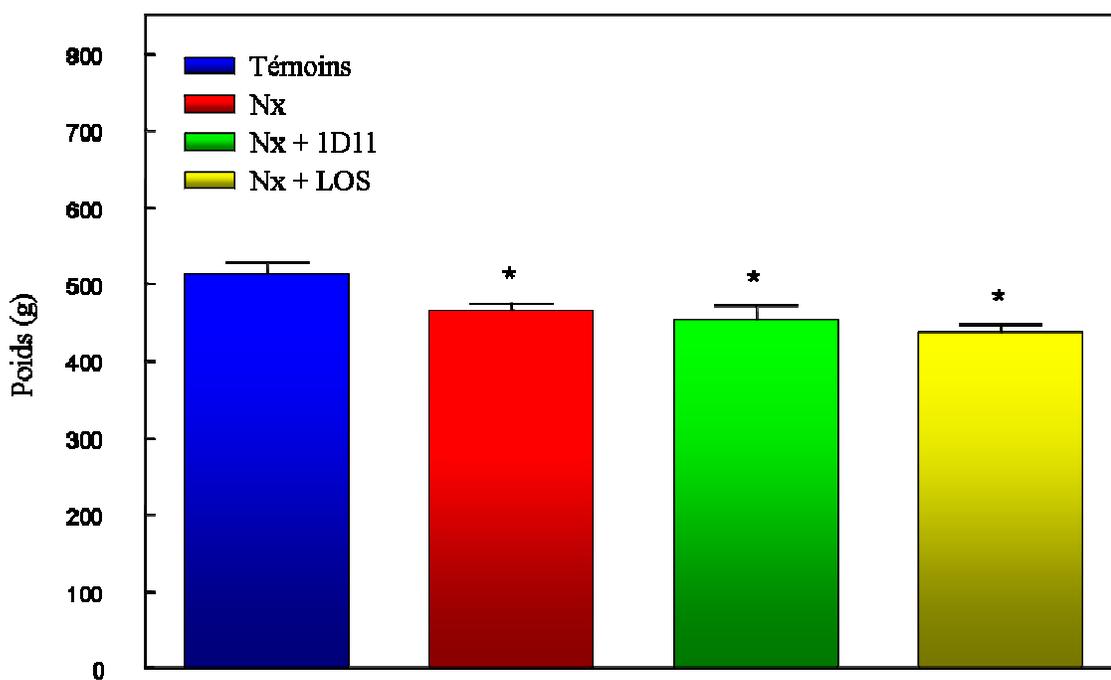
* $p < 0,01$ vs les autres groupes

3.3.4 - Paramètres tissulaires

A - Poids des animaux

Le poids des animaux à la fin de l'étude est légèrement diminué chez les animaux urémiques comparativement aux animaux témoins (465 ± 9 g versus 513 ± 16 g; $p < 0,05$). Le traitement avec le 1D11 et le losartan n'a aucun effet sur le poids des animaux urémiques au cours de cette étude (454 ± 18 g et 437 ± 11 g respectivement).

Figure 31 : Poids des animaux à la fin de l'étude



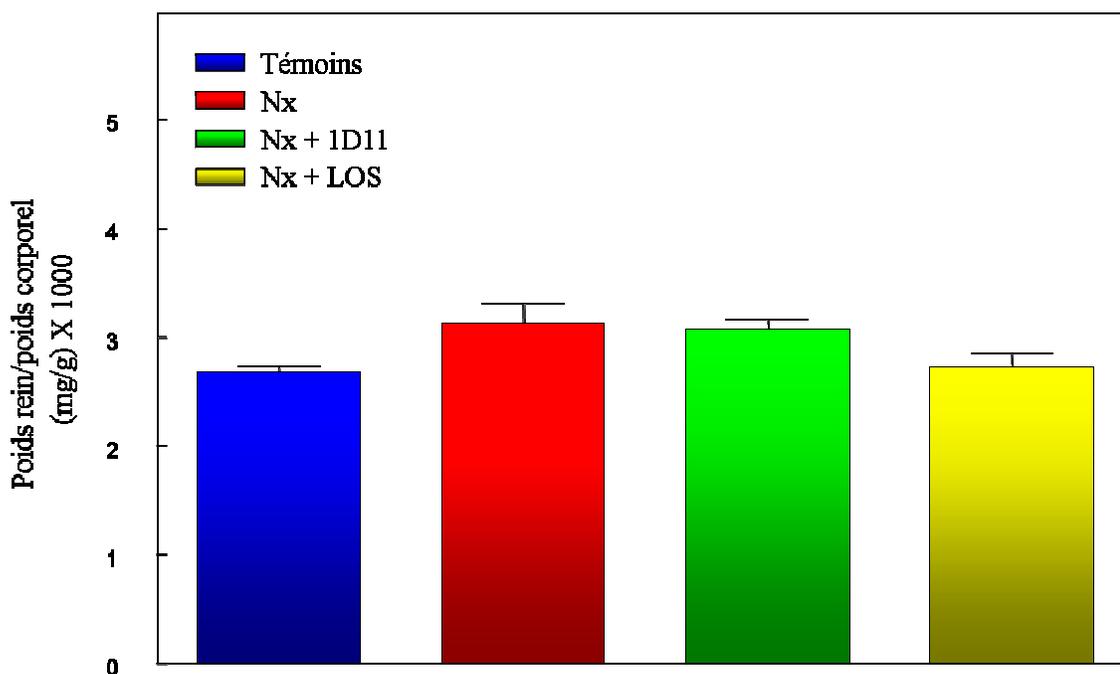
Valeurs exprimées : moyenne \pm SEM

* $p < 0,05$ vs témoins

B - Poids du rein/poids corporel

À la fin de l'étude, le ratio du poids du rein sur le poids corporel est comparable pour les animaux témoins ($2,68 \pm 0,05 \times 10^{-3}$ mg/g), urémiques ($3,13 \pm 0,18 \times 10^{-3}$ mg/g), urémiques recevant l'anticorps 1D11 ($3,07 \pm 0,10$ mg/g) et urémiques recevant le losartan ($2,72 \pm 0,13 \times 10^{-3}$ mg/g).

Figure 32 : Ratio du poids du rein/poids corporel

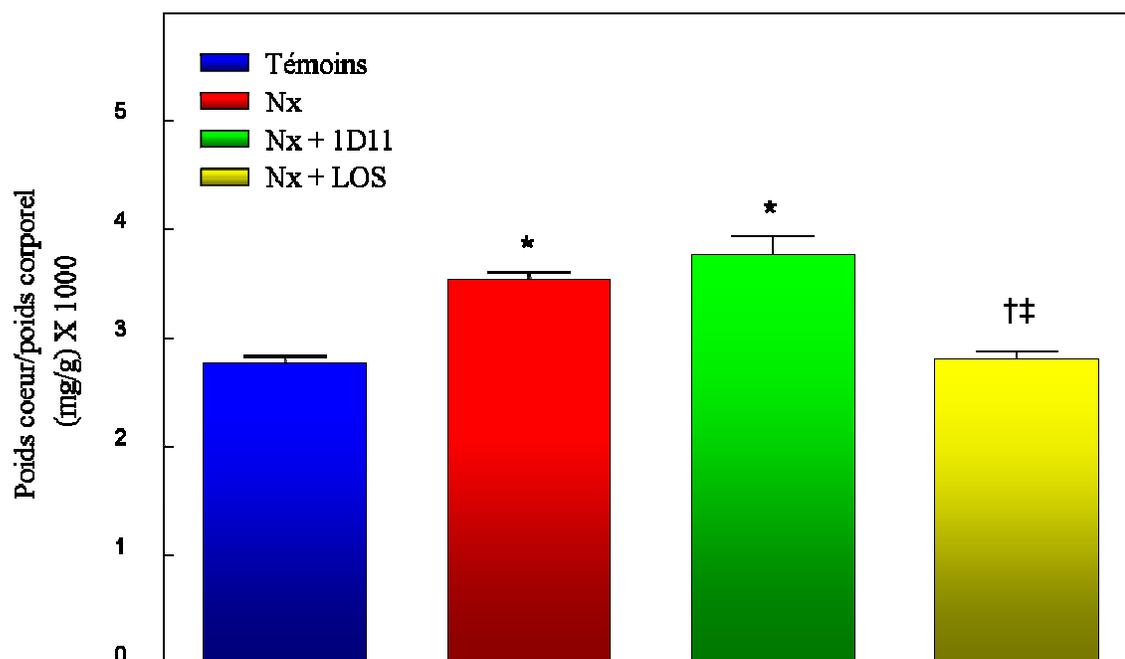


Valeurs exprimées : moyenne \pm SEM

C - Poids du cœur/poids corporel

Les animaux urémiques développent de l'hypertrophie cardiovasculaire comparativement aux animaux témoins ($3,53 \pm 0,08 \times 10^{-3}$ mg/g versus $2,76 \pm 0,07 \times 10^{-3}$ mg/g; $p < 0,01$). Le traitement avec le losartan prévient cette hypertrophie chez les animaux urémiques ($2,81 \pm 0,06 \times 10^{-3}$ mg/g; $p < 0,01$) alors que l'anticorps 1D11 ne semble pas avoir d'effet.

Figure 33 : Ratio du poids du cœur/poids corporel



Valeurs exprimées : moyenne \pm SEM

* $p < 0,01$ vs témoins ; † $p < 0,01$ vs Nx ; ‡ $p < 0,01$ vs Nx + 1D11

3.3.5 - Immunofluorescence en microscopie confocale dans l'aorte thoracique

A - Expression vasculaire de l'ET-1

L'expression de l'ET-1 est localisée dans l'endothélium de l'aorte thoracique et est significativement augmentée chez les animaux urémiques comparativement aux animaux témoins (115 ± 4 versus 100; $p < 0,05$) (tableau 7). Le traitement des animaux urémiques avec le losartan réduit l'expression endothéliale d'ET-1 (103 ± 2 ; $p < 0,05$) alors que l'anticorps 1D11 n'a aucun effet sur son expression (119 ± 3).

B - Expression vasculaire du récepteur ET_B

L'expression du récepteur ET_B de l'endothéline est localisée dans l'endothélium de l'aorte thoracique et est légèrement diminuée chez les animaux urémiques comparativement aux animaux témoins (93 ± 2 versus 100) (tableau 7). Le traitement des animaux urémiques avec l'anticorps 1D11 favorise l'expression du récepteur ET_B (107 ± 3 ; $p < 0,05$) alors que le losartan tend à normaliser son expression (101 ± 1).

C - Expression vasculaire de la eNOS

L'expression de la eNOS est localisée dans l'endothélium de l'aorte thoracique et tend à être diminuée chez les animaux urémiques comparativement aux animaux témoins (85 ± 5 versus 100) (tableau 7). Le traitement des animaux urémiques avec l'anticorps 1D11 et le losartan tend à normaliser son expression (95 ± 6 et 94 ± 2 respectivement).

Tableau 7 : Quantification de l'expression vasculaire de l'ET-1, du récepteur ET_B et de la eNOS

Groupe	Expression de l'ET-1	Expression du récepteur ET _B	Expression de la eNOS
Témoins	100	100	100
Nx	$115 \pm 4^*$	93 ± 2	85 ± 5
Nx + 1D11	$119 \pm 3^*$	$107 \pm 3 \dagger$	95 ± 6
Nx + Los	$103 \pm 2 \ddagger$	101 ± 1	94 ± 2

Valeurs exprimées : moyenne \pm SEM; Les unités sont arbitraires

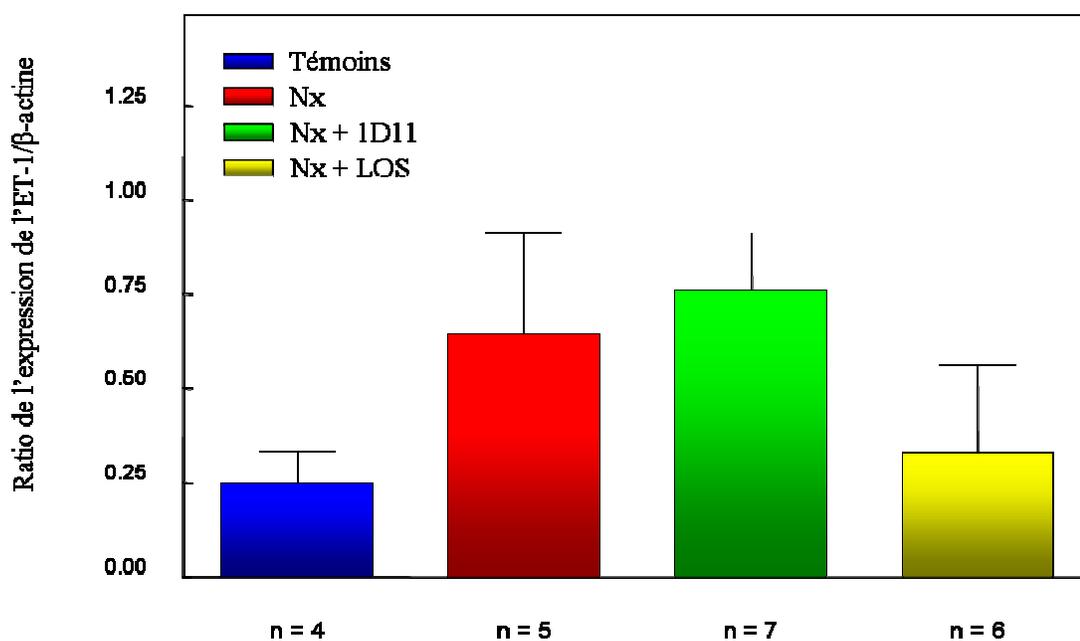
* $p < 0,05$ vs témoins; \dagger $p < 0,05$ vs Nx ; \ddagger $p < 0,05$ vs Nx et Nx +1D11

3.3.6 - Analyse de l'expression de gènes par PCR quantitatif en temps réel dans l'aorte thoracique

A - Expression de l'ET-1

L'expression de l'ARNm de l'ET-1 est augmentée chez les animaux urémiques comparativement aux animaux témoins ($0,644 \pm 0,272$ versus $0,249 \pm 0,082$). Le traitement des animaux urémiques avec l'anticorps 1D11 n'affecte pas l'expression de l'ET-1 ($0,761 \pm 0,151$) alors que le losartan diminue son expression ($0,328 \pm 0,235$).

Figure 34 : Expression de l'ARNm de l'ET-1 dans l'aorte thoracique

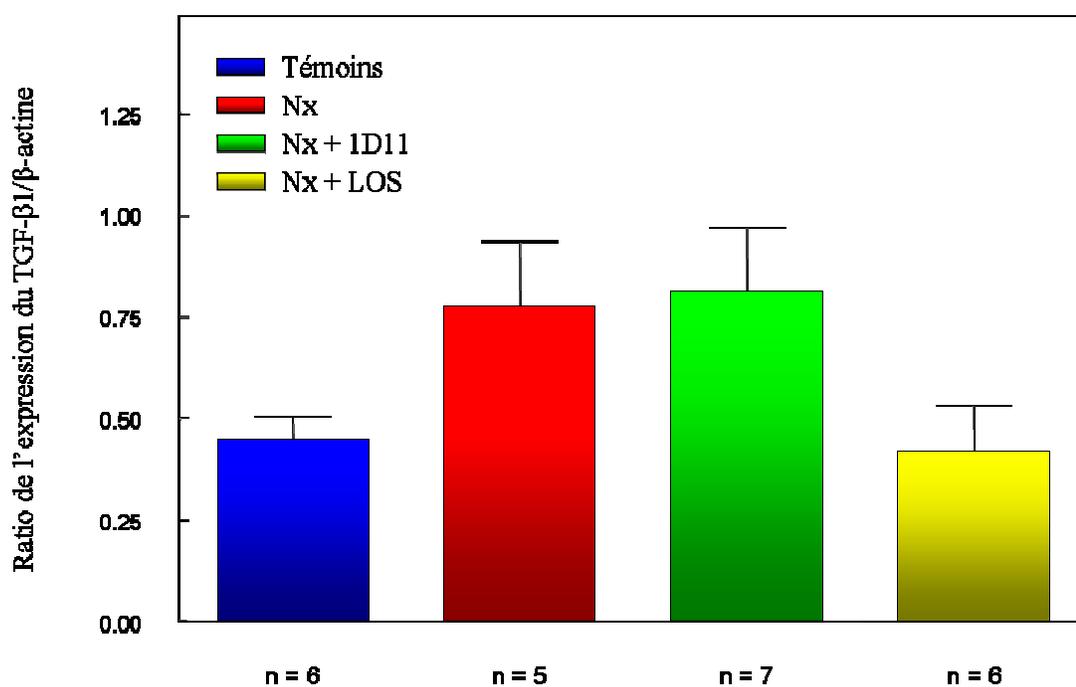


Valeurs exprimées : moyenne \pm SEM

B - Expression du TGF- β 1

L'expression de l'ARNm du TGF- β 1 est augmentée chez les animaux urémiques comparativement aux animaux témoins, sans toutefois atteindre le seuil de signification ($0,775 \pm 0,16$ versus $0,447 \pm 0,055$). Le traitement avec l'anticorps 1D11 n'influe pas sur l'expression de l'ET-1 ($0,812 \pm 0,158$) alors que le losartan semble normaliser son expression chez les animaux urémiques ($0,42 \pm 0,112$).

Figure 35 : Expression de l'ARNm du TGF- β 1 dans l'aorte thoracique

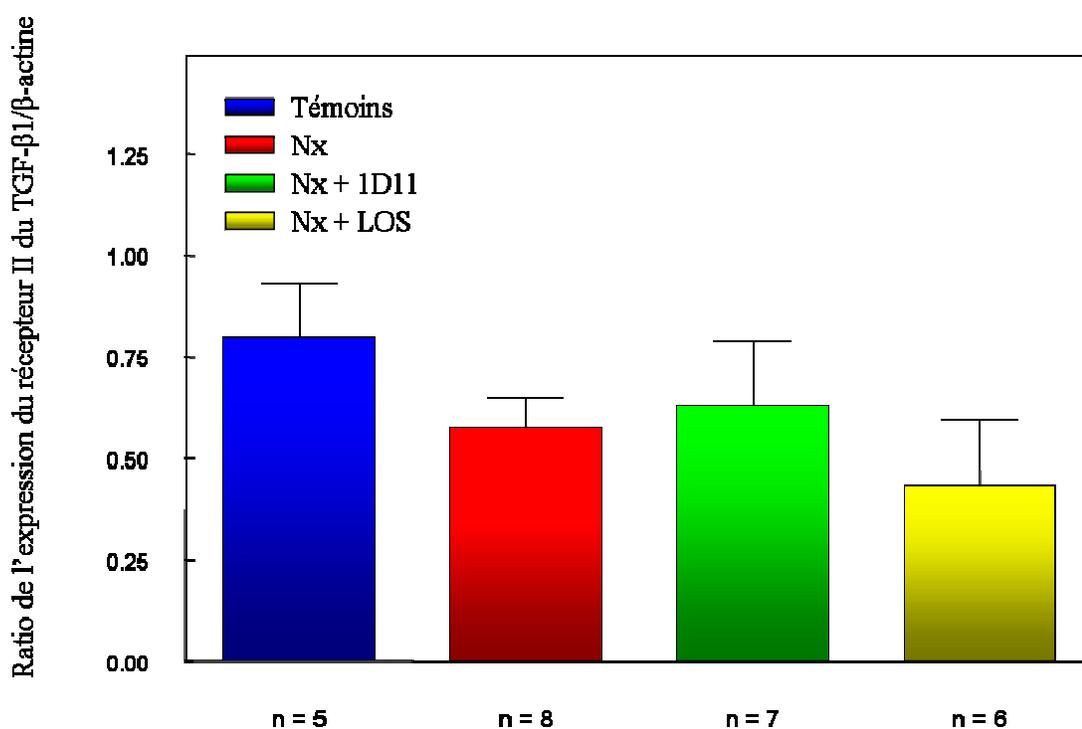


Valeurs exprimées : moyenne \pm SEM

C - Expression du récepteur II du TGF- β

L'expression de l'ARNm du récepteur II du TGF- β tend à être diminuée chez les animaux urémiques comparativement aux animaux témoins ($0,573 \pm 0,073$ versus $0,794 \pm 0,139$). Le traitement des animaux urémiques avec l'anticorps 1D11 n'a aucun effet sur l'expression de son récepteur de type II ($0,630 \pm 0,158$) alors que le losartan semble diminuer davantage son expression ($0,430 \pm 0,163$).

Figure 36 : Expression de l'ARNm du récepteur II du TGF- β dans l'aorte thoracique

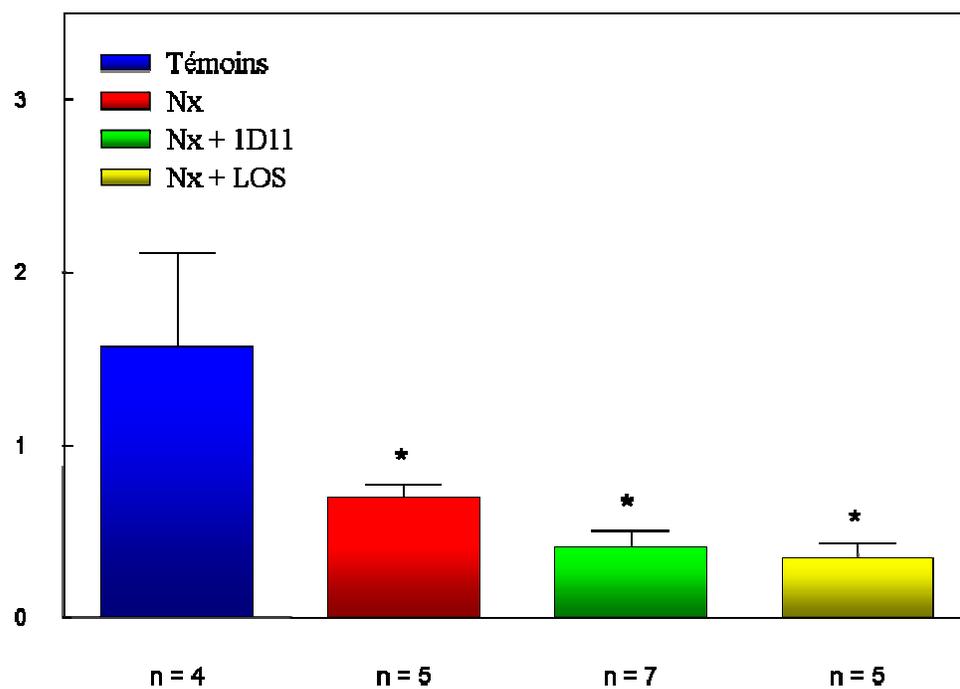


Valeurs exprimées : moyenne \pm SEM

D - Expression de PAI-1

L'expression de l'ARNm de PAI-1 est diminuée chez les animaux urémiques comparativement aux animaux témoins ($0,69 \pm 0,082$ versus $1,565 \pm 0,544$; $p < 0,05$). Le traitement avec l'anticorps 1D11 ou le losartan n'a aucune influence sur l'expression de PAI-1 chez les animaux urémiques ($0,412 \pm 0,089$ et $0,346 \pm 0,085$ respectivement).

Figure 37 : Expression de l'ARNm de PAI-1 dans l'aorte thoracique



Valeurs exprimées : moyenne \pm SEM

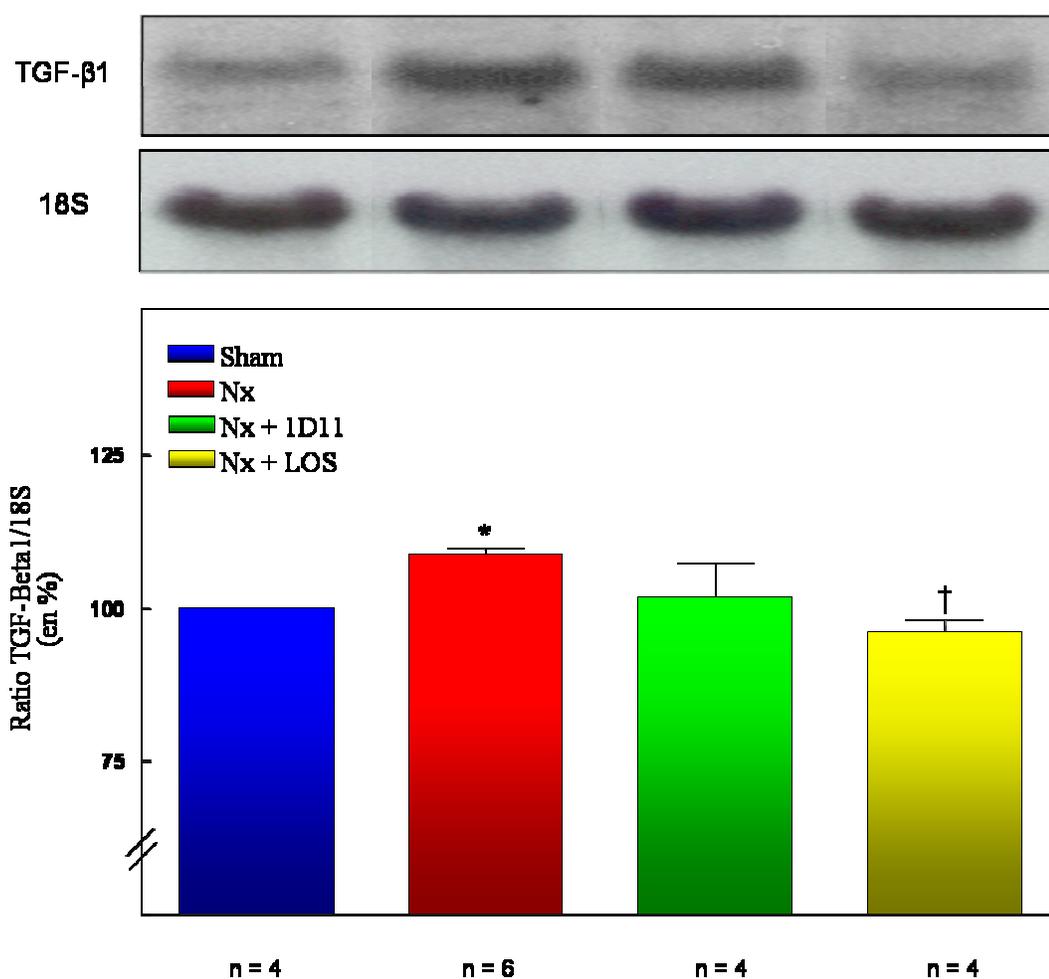
* $p < 0,05$ vs témoins

3.3.7 - Expression du TGF- β 1 et de la TSP-1 par analyse de type Northern dans le cortex rénal

A - Expression rénale du TGF- β 1

L'expression de l'ARNm du TGF- β 1 dans le cortex rénal des animaux urémiques est augmentée de façon significative comparativement aux animaux témoins (109 ± 1 versus 100; $p < 0,05$). Le traitement avec l'anticorps 1D11 tend à diminuer l'expression du TGF- β 1 (102 ± 6), alors que le losartan la normalise chez les animaux urémiques (96 ± 2 ; $p < 0,05$).

Figure 38 : Expression de l'ARNm du TGF- β 1 dans le cortex rénal



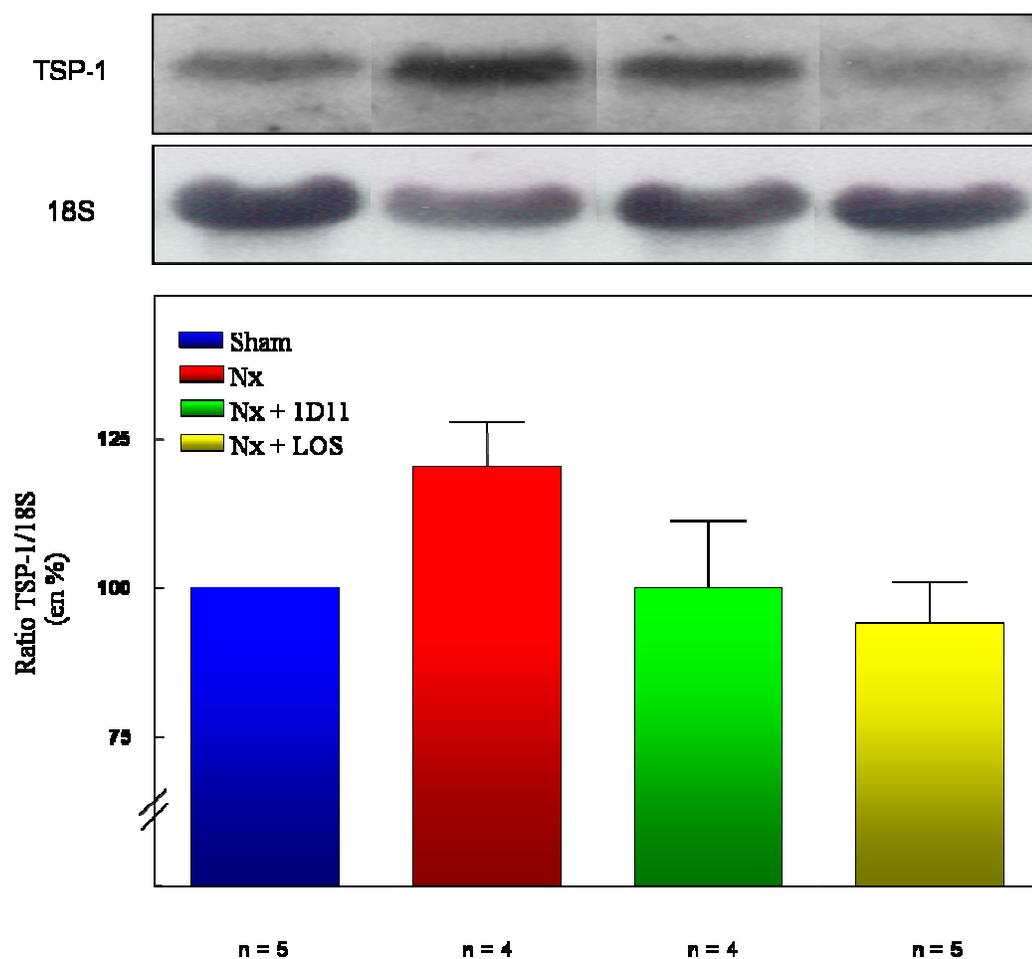
Valeurs exprimées : moyenne \pm SEM

* $p < 0,05$ vs témoins ; † $p < 0,05$ vs Nx

B - Expression rénale de la TSP-1

L'expression de la TSP-1 dans le cortex rénal des animaux urémiques tend à augmenter comparativement aux animaux témoins (120 ± 7 versus 100). Le traitement avec l'anticorps 1D11 et le losartan semblent normaliser l'expression de la TSP-1 chez les animaux urémiques (100 ± 11 et 94 ± 7 respectivement).

Figure 39 : Expression de l'ARNm de la TSP-1 dans le cortex rénal



Valeurs exprimées : moyenne \pm SEM

Discussion

L'hypertension artérielle est un facteur de risque majeur en IRC, aggravant la morbidité et la mortalité cardiovasculaire chez ces patients. En effet, près de 80 % des patients en IRC souffrent d'HTA. Cependant, les mécanismes impliqués dans la pathogenèse de l'HTA associée à l'IRC sont encore mal définis. Des études récentes montrent qu'ils sont associés à un déséquilibre de la production des différents facteurs vasoactifs dérivés de l'endothélium (ET-1, NO, Ang II) ainsi qu'à une surproduction de facteurs de croissance cellulaire tel que le TGF- β 1. Cette dysfonction endothéliale peut être accentuée par les interactions entre les différents facteurs endothéliaux, en IRC. Lors de ma maîtrise, j'ai étudié spécifiquement l'implication de l'ET-1, du TGF- β 1 et de l'Ang II chez le rat urémique hypertendu.

Dans un premier temps, j'ai montré que le blocage des récepteurs ET_A de l'endothéline atténue la progression de l'hypertension artérielle ainsi que les dommages rénaux chez l'animal urémique, confirmant un rôle pour l'ET-1. En effet, il a été proposé que l'ET-1 serait impliquée dans diverses maladies rénales chez l'humain aussi bien que dans différents modèles expérimentaux. Ces observations sont surtout attribuées à une augmentation de l'ET-1 circulante ou urinaire. Dans notre modèle, la concentration plasmatique d'ET-1 demeure toutefois inchangée^{64,67}. Par contre, les concentrations vasculaires et rénales sont significativement augmentées, lesquelles sont associées à une augmentation de l'expression de la préproET-1. Dans la présente étude, nous avons confirmé que les animaux urémiques présentent une augmentation de l'expression vasculaire d'ET-1. De plus, par immunofluorescence en microscopie confocale, nous avons démontré que cette hausse d'ET-1 vasculaire survient exclusivement dans l'endothélium. L'élévation de l'expression vasculaire d'ET-1 peut alors causer une puissante vasoconstriction des artérioles et artères systémiques, accroissant la résistance périphérique totale et la hausse de la pression artérielle. Ces effets pathologiques de l'ET-1 sont supportés par le blocage des récepteurs ET_A avec l'ABT-627, qui atténue de façon significative l'élévation de la pression artérielle chez le rat urémique.

Par ailleurs, l'excrétion urinaire accrue de l'ET-1 en IRC peut être attribuable à l'augmentation de la production rénale d'ET-1. Ces phénomènes sont étroitement reliés au degré d'insuffisance rénale et aux dommages glomérulaires chez l'animal urémique^{64,65,69}. Le rôle joué par l'ET-1 dans la détérioration de la fonction rénale a été démontré par l'infusion intra-rénale d'ET-1, qui réduit le débit sanguin rénal ainsi que le GFR par ses effets constricteurs sur les artérioles afférentes et efférentes glomérulaire⁵⁵. En relation avec l'augmentation rénale d'ET-1, les animaux néphrectomisés 5/6 développent de l'hypertrophie vasculaire, de la glomérulosclérose focale et segmentale modérée, de la nécrose tubulaire ainsi que de la fibrose interstitielle. De fait, l'ET-1 favorise l'hypertrophie vasculaire, en modulant la prolifération des cellules musculaires lisses vasculaires, ainsi que l'expansion de la matrice extracellulaire, en stimulant la production de ses composantes principales, le collagène et la fibronectine¹³⁵. Le rôle de l'ET-1 dans le développement de la glomérulosclérose et de la fibrose interstitielle a été confirmé chez des souris transgéniques pour le gène de l'ET-1¹⁴⁹. L'hyperfiltration compensatoire à la baisse du GFR ainsi que l'accumulation de protéines de la matrice extracellulaire peuvent expliquer en partie ces changements morphologiques rénaux. De plus, l'ET-1 serait impliquée dans la transdifférenciation des cellules tubulaires épithéliales en myofibroblastes (EMT), révélés par l'expression de l' α -SMA. La EMT est un processus essentiel du développement de la fibrose interstitielle rénale^{112,150}. *Boukhalfa et Al* ont montré que l'expression d' α -SMA est corrélée avec le degré de fibrose interstitielle dans des biopsies rénales prélevées chez l'humain¹⁵¹. En association avec la présence de fibrose rénale, nous avons observé une expression marquée d' α -SMA dans les régions péritubulaires et interstitielles du rein restant des animaux urémiques. Contrairement aux animaux urémiques, les animaux témoins expriment exclusivement l' α -SMA dans les cellules musculaires lisses des vaisseaux rénaux. Le blocage des récepteurs ET_A de l'endothéline a permis d'atténuer la production rénale d'ET-1 ainsi que les dommages vasculaires, glomérulaires et tubulaires rénaux. Par ailleurs, l'ABT-627 a réduit l'apparition de la fibrose et l'expression de l' α -SMA interstitielle. Ces résultats confirment l'implication de l'ET-1 dans l'apparition des dommages rénaux ainsi que dans la transdifférenciation des cellules tubulaires épithéliales en myofibroblastes chez le rat urémique.

Malgré le fait que le blocage des récepteurs ET_A de l'endothéline démontre l'implication de l'ET-1 dans la pathogenèse de l'hypertension et l'IRC, nos résultats révèlent que le traitement des animaux urémiques avec l'ABT-627 n'offre pas une protection cardiovasculaire et rénale marquée. En effet, l'ABT-627 ne normalise pas la PA et n'a aucun effet sur la protéinurie, la créatinine sérique et l'excrétion urinaire d'ET-1, contrairement au blocage des récepteurs AT₁ de l'Ang II (voir plus loin). Les effets du blocage des récepteurs ET_A de l'endothéline sont contradictoires dans la littérature^{68,71,73,74} et peuvent s'expliquer par les différentes méthodes d'induction de l'insuffisance rénale ou le type d'antagoniste des récepteurs ET_A utilisé. Cependant, les antagonistes des récepteurs ET_A de l'ET-1 semblent préserver davantage la fonction rénale dans le cas d'insuffisance rénale chronique sévère^{68,74}. Par contre, comme nous venons de le démontrer, les effets néoprotecteurs peuvent survenir en dépit de l'amélioration de la fonction rénale⁷⁴. Ceci suggère que d'autres facteurs qui ne sont pas affectés par le blocage des récepteurs ET_A de l'endothéline tel l'Ang II, le TGF-β1 et la relâche du NO contribuent aussi à la hausse de la PAS et à la détérioration de la fonction rénale chez l'animal urémique. En effet, nous avons récemment démontré les effets protecteurs de la neutralisation du TGF-β1, du blocage des récepteurs AT₁ de l'Ang II et de la supplémentation en L-arginine sur la PA, la fonction rénale et les dommages rénaux. De plus, ces traitements peuvent diminuer les concentrations glomérulaires et vasculaires d'ET-1^{31,66,67,70}. Ceci suggère que l'ET-1, bien qu'impliquée en IRC, ne serait pas un facteur primaire de la pathologie. En accord avec cette hypothèse, l'ABT-627 ne parvient pas à réduire la surexpression du TGF-β1 dans le cortex rénal des animaux urémiques, ainsi que son expression vasculaire accrue.

Dans cette étude, nous avons aussi observé une diminution de l'expression de l'ARNm du récepteur ET_B de l'endothéline dans le cortex rénal des animaux urémiques. Cette observation confirme les études de Philippe Lavoie⁶⁶ et de Shimizu et Nabokov, dans un modèle d'urémie par réduction de la masse rénale^{72,74}. Cependant, le blocage des récepteurs ET_A de l'endothéline ne parvient pas à accroître l'expression du récepteur ET_B. L'expression inchangée du récepteur ET_B chez le rat urémique traité avec l'ABT-627 peut être reliée à la production rénale exagérée du TGF-β1. En effet, Philippe Lavoie a démontré que la neutralisation du TGF-β1 augmentait l'expression du récepteur ET_B⁶⁶, suggérant ainsi l'implication du TGF-β1 dans la modulation du récepteur ET_B en IRC. Tandis que les

effets vasoconstricteurs de l'ET-1 sont reliés à sa liaison avec le récepteur ET_A, la stimulation du récepteur ET_B compense les effets presseurs de l'ET-1 par la relâche de facteurs relaxants dérivés de l'endothélium comme le NO^{46,47,152}. En accord, des souris déficientes en récepteurs ET_B développent de l'hypertension artérielle¹⁵³. De plus, l'induction de l'urémie par néphrectomie 5/6 chez des rats déficients en récepteurs ET_B accentue le développement de l'HTA et la vitesse de progression de l'insuffisance rénale et des dommages vasculaires et rénaux^{76,77}. Ces observations démontrent que le récepteur ET_B joue un rôle protecteur dans le développement et la progression de l'HTA associée à l'IRC. Ainsi, bien que l'expression du récepteur ET_B soit diminuée dans notre modèle expérimental, les effets antihypertenseurs et rénoprotecteurs observés chez le rat urémique traité avec l'ABT-627 pourraient néanmoins être attribuables à la stimulation du récepteur ET_B.

En résumé, le blocage des récepteurs ET_A de l'endothéline atténue le développement de l'HTA, des dommages rénaux et de la EMT chez l'animal urémique, confirmant un rôle pour l'ET-1. Toutefois, il ne parvient pas à prévenir le déclin de la fonction rénale, la diminution de l'expression du récepteur ET_B de l'endothéline et la surproduction du TGF-β1 dans le cortex rénal, suggérant la contribution d'autres facteurs, dont le TGF-β1.

La seconde étude visait à élucider le rôle du TGF-β1 dans la dysfonction endothéliale associée à l'insuffisance rénale. Dans cette étude, j'ai démontré que la neutralisation du TGF-β avec l'anticorps monoclonal 1D11 atténue la PA chez l'animal urémique et prévient la diminution de l'expression vasculaire du récepteur ET_B de l'endothéline. À la fin de l'étude, la pression artérielle des animaux urémiques traités avec l'anticorps 1D11 est diminuée de façon significative comparativement aux animaux urémiques non-traités. Dans ce modèle expérimental, l'implication du TGF-β1 dans la modulation de la pression artérielle demeure néanmoins difficile à expliquer puisque le TGF-β1 n'est pas reconnu comme étant un facteur vasoactif. L'effet presseur du TGF-β1 pourrait cependant être causé par la modulation de facteurs vasoactifs locaux comme l'ET-1. En effet, le TGF-β1 est un puissant stimulateur de la production de l'ET-1 dans les cellules endothéliales¹⁴³. Bien que le TGF-β1 puisse moduler la production vasculaire et rénale de l'ET-1 en IRC⁶⁶, la diminution de la PA à l'aide de l'anticorps 1D11 ne peut être attribuable à la modulation du système endothéline dans cette étude. De fait, la neutralisation du TGF-β n'a eu aucun effet

sur l'expression vasculaire de l'ET-1 chez l'animal urémique, suggérant que d'autres mécanismes seraient responsables de la diminution de la PA observée.

Comme nous l'avons préalablement démontré, il existe une certaine corrélation entre la détérioration de la fonction rénale et l'élévation de la PA. Dans cette étude, les animaux urémiques montrent une augmentation de la créatinine sérique et de la protéinurie, lesquelles sont associées à l'augmentation de la PA. La neutralisation du TGF- β ne permet pas de réduire de façon significative la protéinurie et la créatinine sérique, suggérant que la diminution de la PA observée est indépendante de la fonction rénale. L'effet antihypertenseur de l'anticorps 1D11 pourrait cependant être relié à l'atténuation des dommages tubulaires et glomérulaires rénaux ⁶⁶. Par ailleurs, la neutralisation du TGF- β accroît le débit sanguin médullaire chez les rats Dahl sensibles au sel, ce qui limite l'expansion du volume extracellulaire et entraîne ainsi la diminution de la PAS ¹⁵⁴. Contrairement à l'anticorps 1D11, le losartan normalise la pression artérielle chez les animaux urémiques, ce qui peut être associée à la neutralisation des effets hémodynamiques systémiques et glomérulaires de l'Ang II. De fait, le losartan normalise la protéinurie et tend à diminuer la créatinine sérique chez les animaux urémiques. Ces changements sont associés à une diminution de l'expression rénale et vasculaire d'ET-1 et du TGF- β 1 chez les animaux urémiques. Ainsi, l'ET-1 et le TGF- β 1 semblent jouer un rôle de médiateurs dans les effets hypertenseurs de l'Ang II. L'hypertension artérielle associée à l'IRC peut donc être attribuable en partie à l'interaction entre les principaux facteurs vasoactifs dérivés de l'endothélium.

Nous avons aussi vérifié l'interaction possible entre l'ET-1, le TGF- β 1 et l'Ang II en évaluant les effets de la neutralisation du TGF- β 1 et du blocage des récepteurs AT₁ de l'Ang II sur l'expression vasculaire du récepteur ET_B de l'endothéline ainsi que du récepteur de type II du TGF- β 1. D'une part, on note une diminution de l'expression du récepteur ET_B de l'endothéline dans l'aorte thoracique des animaux urémiques. Tel que mentionné précédemment, la diminution de l'expression du récepteur ET_B peut jouer un rôle important dans le développement de l'HTA et la progression de l'insuffisance rénale chronique en urémie ⁷⁷. Le récepteur ET_B est responsable de la vasodilatation compensatoire médiée par l'ET-1 au niveau des cellules endothéliales, en favorisant la relâche du NO. Cependant, nous avons observé une diminution de l'expression de la eNOS

chez l'animal urémique, suggérant une diminution de la relâche de NO. Dans cette étude, la neutralisation du TGF- β 1 et le blocage des récepteurs AT₁ de l'Ang II augmentent l'expression vasculaire du récepteur ET_B et de la eNOS chez l'animal urémique. À la lumière des résultats obtenus, il semble que le TGF- β 1 et l'Ang II modulent de façon négative l'expression du récepteur ET_B, ce qui peut alors limiter la relâche endothéliale du NO en urémie. Ces effets peuvent accentuer l'effet vasoconstricteur de l'ET-1 médié par le récepteur ET_A.

D'autre part, on note une diminution de l'expression du récepteur de type II du TGF- β chez l'animal urémique avec néphrectomie 5/6. Aucune étude à ce jour ne fait état de la modulation vasculaire du récepteur de type II du TGF- β lors de maladies rénales progressives, bien qu'on observe une expression rénale accrue dans les cas de néphropathies diabétiques et de néphrites progressives^{155,156}. Par ailleurs, il a été démontré que le TGF- β 1 réduit de 40 % l'expression du récepteur de type II du TGF- β , alors que l'angiotensine II augmente de 70 % son expression dans les cellules musculaires lisses vasculaires¹⁵⁷. Chez l'animal urémique, l'expression du récepteur de type II du TGF- β tend à augmenter suite au traitement avec l'anticorps 1D11, alors que le losartan semble diminuer davantage son expression. Ces résultats suggèrent que le TGF- β 1, à l'opposé de l'Ang II, régule de façon négative l'expression de son récepteur de type II chez le rat urémique.

Il est reconnu que les effets fibrosants et hypertrophiants du TGF- β 1 et de l'Ang II sont reliés à l'expansion de la matrice extracellulaire en stimulant l'expression des protéines qui la compose telles le collagène I et IV et la fibronectine, ainsi qu'à la synthèse de PAI-1, un anti-fibrinolytique qui inhibe la synthèse de protéases^{118,158}. De plus, l'Ang II stimule l'expression de la TSP-1¹³⁹, qui est responsable de l'activation du TGF- β 1. Au cours de cette étude, nous avons vérifié les effets de la neutralisation du TGF- β 1 et du blocage des récepteurs AT₁ de l'Ang II sur l'expression de PAI-1 et de la TSP-1. Nos résultats montrent que l'expression vasculaire de l'ARNm de PAI-1 est diminuée chez le rat en insuffisance rénale, alors que celle de la TSP-1 est augmentée. Les résultats obtenus dans le cas de PAI-1 vont à l'encontre d'autres études, qui montrent plutôt une augmentation vasculaire et rénale de PAI-1 dans le cas de diverses maladies rénales progressives ainsi que chez des rats Dahl sensibles au sel¹⁵⁹⁻¹⁶¹. Le traitement des animaux urémiques avec l'anticorps

1D11 ou le losartan n'a aucun effet sur l'expression vasculaire de PAI-1. Par contre, seul le losartan parvient à réduire l'augmentation de l'expression de la TSP-1 dans le cortex rénal des animaux urémiques, ce qui peut contribuer à la diminution de l'activité du TGF- β 1 induite par la TSP-1 en urémie.

Certains résultats obtenus dans la présente étude peuvent être affectés par le degré d'insuffisance rénale. En effet, l'urémie induite suite aux néphrectomies 5/6 est considérée comme étant moindre comparativement aux études antérieures effectuées dans notre laboratoire^{31,66,68}. De fait, la protéinurie, qui constitue un excellent indicateur de la détérioration de la fonction rénale et de la présence de dommages rénaux, est inférieure à celle généralement obtenue dans ce même modèle expérimental d'IRC. Le degré modéré d'IRC est aussi confirmé par l'analyse histologique de coupes de rein colorées au Masson-trichrome, qui montrent de la glomérulosclérose, de la fibrose interstitielle et des dommages tubulointerstitiels légers. Par ailleurs, on note la présence d'hypertrophie vasculaire modérée dans des sections d'aorte thoracique des animaux urémiques. Dans cette étude, les systèmes TGF- β /rénine-Ang II contribuent au développement de l'HTA, puisque les traitements avec l'anticorps 1D11 et le losartan parviennent à réduire l'élévation de la PA secondaire à l'insuffisance rénale induite. Cependant, les effets protecteurs modérés de l'anticorps 1D11 et du losartan pourraient être attribuables au faible degré d'urémie et de dommages rénaux chez l'animal urémique. De fait, nous avons démontré l'implication du TGF- β 1 et de l'Ang II dans le développement de l'HTA, le déclin de la fonction rénale, la glomérulosclérose, l'apparition de fibrose interstitielle ainsi que dans la modulation de la synthèse rénale de l'ET-1 chez des rats avec un degré d'urémie plus important⁶⁶.

Conclusion

Mes travaux à la maîtrise montrent que le blocage des récepteurs ET_A de l'endothéline et la neutralisation du $TGF-\beta_1$ chez le rat urémique avec masse rénale réduite permettent d'atténuer l'élévation de la pression artérielle, sans toutefois prévenir le déclin de la fonction rénale et offrir une protection cardiovasculaire et rénale marquée, contrairement au blocage des récepteurs AT_1 de l'Ang II. Ainsi, le développement de l'HTA et la progression de l'IRC dans notre modèle expérimental semblent être principalement attribuables à l'action de l'Ang II. Par ailleurs, l'Ang II module l'expression vasculaire et rénale de l'ET-1 et du $TGF-\beta_1$, suggérant que les effets pathophysiologiques de l'Ang II seraient médiés par ces facteurs, qui agiraient possiblement de façon indépendante.

Bibliographie

1. Guyton AC. *Textbook of medical physiology*. 7th ed. Philadelphia; 1986.
2. Tortora GJ GS. *Principe d'anatomie et de physiologie*. 9e ed. Saint-Laurent; 2001.
3. Société québécoise d'hypertension artérielle.
4. NM K. *Kaplan's Clinical Hypertension*. 8th ed. Philadelphia; 2002.
5. Joffres MR, Ghadirian P, Fodor JG, Petrasovits A, Chockalingam A, Hamet P. Awareness, treatment, and control of hypertension in Canada. *Am J Hypertens*. 1997;10:1097-102.
6. Burt VL, Whelton P, Roccella EJ, Brown C, Cutler JA, Higgins M, Horan MJ, Labarthe D. Prevalence of hypertension in the US adult population. Results from the Third National Health and Nutrition Examination Survey, 1988-1991. *Hypertension*. 1995;25:305-13.
7. Kannel WB. Fifty years of Framingham Study contributions to understanding hypertension. *J Hum Hypertens*. 2000;14:83-90.
8. BD R. *Pathophysiology of renal disease*. 2nd ed. New-York; 1987.
9. Koeppen BM SB. *Renal physiology*. 2nd ed. Missouri; 1997.
10. TL G. *Angiotensins: actions and receptors*; 2003.
11. Brenner R. *The kidney*. 5th ed; 1996.
12. Terzi F, Burtin M, Friedlander G. Early molecular mechanisms in the progression of renal failure: role of growth factors and protooncogenes. *Kidney Int Suppl*. 1998;65:S68-73.
13. Uhlig K, Levey AS, Sarnak MJ. Traditional cardiac risk factors in individuals with chronic kidney disease. *Semin Dial*. 2003;16:118-27.
14. Sarnak MJ, Levey AS, Schoolwerth AC, Coresh J, Culleton B, Hamm LL, McCullough PA, Kasiske BL, Kelepouris E, Klag MJ, Parfrey P, Pfeffer M, Raij L, Spinosa DJ, Wilson PW. Kidney disease as a risk factor for development of cardiovascular disease: a statement from the American Heart Association Councils on Kidney in Cardiovascular Disease, High Blood Pressure Research, Clinical Cardiology, and Epidemiology and Prevention. *Hypertension*. 2003;42:1050-65.
15. Madore F. [Vascular risk factors and renal failure]. *Med Sci (Paris)*. 2004;20:1100-3.
16. Foley RN, Parfrey PS, Sarnak MJ. Epidemiology of cardiovascular disease in chronic renal disease. *J Am Soc Nephrol*. 1998;9:S16-23.
17. Sandberg K, Ji H. Kidney angiotensin receptors and their role in renal pathophysiology. *Semin Nephrol*. 2000;20:402-16.
18. Endemann DH, Schiffrin EL. Endothelial dysfunction. *J Am Soc Nephrol*. 2004;15:1983-92.
19. Boulanger CM. Secondary endothelial dysfunction: hypertension and heart failure. *J Mol Cell Cardiol*. 1999;31:39-49.
20. *Biologie et pathologie du coeur et des vaisseaux*.
21. Furchgott RF, Zawadzki JV. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature*. 1980;288:373-6.
22. Palmer RM, Ferrige AG, Moncada S. Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature*. 1987;327:524-6.

23. Ignarro LJ, Buga GM, Byrns RE, Wood KS, Chaudhuri G. Endothelium-derived relaxing factor and nitric oxide possess identical pharmacologic properties as relaxants of bovine arterial and venous smooth muscle. *J Pharmacol Exp Ther.* 1988;246:218-26.
24. Palmer RM, Ashton DS, Moncada S. Vascular endothelial cells synthesize nitric oxide from L-arginine. *Nature.* 1988;333:664-6.
25. PM V. *Vascular Nitric Oxide*; 2003.
26. Xia Y, Tsai AL, Berka V, Zweier JL. Superoxide generation from endothelial nitric-oxide synthase. A Ca²⁺/calmodulin-dependent and tetrahydrobiopterin regulatory process. *J Biol Chem.* 1998;273:25804-8.
27. Gabbai FB, Garcia GE, Blantz RC, De Nicola L. Role of nitric oxide in glomerular physiology and pathophysiology. *Adv Nephrol Necker Hosp.* 1995;24:3-18.
28. Radi R, Beckman JS, Bush KM, Freeman BA. Peroxynitrite-induced membrane lipid peroxidation: the cytotoxic potential of superoxide and nitric oxide. *Arch Biochem Biophys.* 1991;288:481-7.
29. Ujiiie K, Yuen J, Hogarth L, Danziger R, Star RA. Localization and regulation of endothelial NO synthase mRNA expression in rat kidney. *Am J Physiol.* 1994;267:F296-302.
30. De Nicola L, Blantz RC, Gabbai FB. Nitric oxide and angiotensin II. Glomerular and tubular interaction in the rat. *J Clin Invest.* 1992;89:1248-56.
31. Dumont Y, D'Amours M, Lebel M, Lariviere R. Supplementation with a low dose of L-arginine reduces blood pressure and endothelin-1 production in hypertensive uraemic rats. *Nephrol Dial Transplant.* 2001;16:746-54.
32. L R. Nitric oxide and the kidney. *Circulation.* 1993;87:V-26 - V-29.
33. Zatz R, Baylis C. Chronic nitric oxide inhibition model six years on. *Hypertension.* 1998;32:958-64.
34. Vidal MJ, Romero JC, Vanhoutte PM. Endothelium-derived relaxing factor inhibits renin release. *Eur J Pharmacol.* 1988;149:401-2.
35. Romero JC, Lahera V, Salom MG, Biondi ML. Role of the endothelium-dependent relaxing factor nitric oxide on renal function. *J Am Soc Nephrol.* 1992;2:1371-87.
36. Forte P, Copland M, Smith LM, Milne E, Sutherland J, Benjamin N. Basal nitric oxide synthesis in essential hypertension. *Lancet.* 1997;349:837-42.
37. Klahr S. The role of nitric oxide in hypertension and renal disease progression. *Nephrol Dial Transplant.* 2001;16 Suppl 1:60-2.
38. Reyes AA, Purkerson ML, Karl I, Klahr S. Dietary supplementation with L-arginine ameliorates the progression of renal disease in rats with subtotal nephrectomy. *Am J Kidney Dis.* 1992;20:168-76.
39. Baylis C, Mitruka B, Deng A. Chronic blockade of nitric oxide synthesis in the rat produces systemic hypertension and glomerular damage. *J Clin Invest.* 1992;90:278-81.
40. Kashiwagi M, Shinozaki M, Hirakata H, Tamaki K, Hirano T, Tokumoto M, Goto H, Okuda S, Fujishima M. Locally activated renin-angiotensin system associated with TGF-beta1 as a major factor for renal injury induced by chronic inhibition of nitric oxide synthase in rats. *J Am Soc Nephrol.* 2000;11:616-24.
41. D'Amours M, Lebel M, Grose JH, Lariviere R. Renal and vascular effects of chronic nitric oxide synthase inhibition: involvement of endothelin 1 and angiotensin II. *Can J Physiol Pharmacol.* 1999;77:8-16.

42. Inoue A, Yanagisawa M, Kimura S, Kasuya Y, Miyauchi T, Goto K, Masaki T. The human endothelin family: three structurally and pharmacologically distinct isopeptides predicted by three separate genes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1989;86:2863-7.
43. Yanagisawa M, Kurihara H, Kimura S, Tomobe Y, Kobayashi M, Mitsui Y, Yazaki Y, Goto K, Masaki T. A novel potent vasoconstrictor peptide produced by vascular endothelial cells. *Nature*. 1988;332:411-5.
44. Emori T, Hirata Y, Ohta K, Shichiri M, Marumo F. Secretory mechanism of immunoreactive endothelin in cultured bovine endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 1989;160:93-100.
45. EL S. *Endothelin*; 2003.
46. Boulanger C, Luscher TF. Release of endothelin from the porcine aorta. Inhibition by endothelium-derived nitric oxide. *J Clin Invest*. 1990;85:587-90.
47. Hirata Y, Emori T, Eguchi S, Kanno K, Imai T, Ohta K, Marumo F. Endothelin receptor subtype B mediates synthesis of nitric oxide by cultured bovine endothelial cells. *J Clin Invest*. 1993;91:1367-73.
48. Arai H, Hori S, Aramori I, Ohkubo H, Nakanishi S. Cloning and expression of a cDNA encoding an endothelin receptor. *Nature*. 1990;348:730-2.
49. Sakurai T, Yanagisawa M, Inoue A, Ryan US, Kimura S, Mitsui Y, Goto K, Masaki T. cDNA cloning, sequence analysis and tissue distribution of rat preproendothelin-1 mRNA. *Biochem Biophys Res Commun*. 1991;175:44-7.
50. Clavell AL, Stingo AJ, Margulies KB, Brandt RR, Burnett JC, Jr. Role of endothelin receptor subtypes in the in vivo regulation of renal function. *Am J Physiol*. 1995;268:F455-60.
51. Simonson MS, Wann S, Mene P, Dubyak GR, Kester M, Nakazato Y, Sedor JR, Dunn MJ. Endothelin stimulates phospholipase C, Na⁺/H⁺ exchange, c-fos expression, and mitogenesis in rat mesangial cells. *J Clin Invest*. 1989;83:708-12.
52. Wang Y, Simonson MS, Pouyssegur J, Dunn MJ. Endothelin rapidly stimulates mitogen-activated protein kinase activity in rat mesangial cells. *Biochem J*. 1992;287 (Pt 2):589-94.
53. Fukuroda T, Fujikawa T, Ozaki S, Ishikawa K, Yano M, Nishikibe M. Clearance of circulating endothelin-1 by ETB receptors in rats. *Biochem Biophys Res Commun*. 1994;199:1461-5.
54. Wilkes BM, Susin M, Mento PF, Macica CM, Girardi EP, Boss E, Nord EP. Localization of endothelin-like immunoreactivity in rat kidneys. *Am J Physiol*. 1991;260:F913-20.
55. Simonson MS, Dunn MJ. Renal actions of endothelin peptides. *Curr Opin Nephrol Hypertens*. 1993;2:51-60.
56. Hoffman A, Abassi ZA, Brodsky S, Ramadan R, Winaver J. Mechanisms of big endothelin-1-induced diuresis and natriuresis : role of ET(B) receptors. *Hypertension*. 2000;35:732-9.
57. Lariviere R, Lebel M. Endothelin-1 in chronic renal failure and hypertension. *Can J Physiol Pharmacol*. 2003;81:607-21.
58. Brooks DP, Contino LC, Storer B, Ohlstein EH. Increased endothelin excretion in rats with renal failure induced by partial nephrectomy. *Br J Pharmacol*. 1991;104:987-9.

59. Lebel M, Grose JH, Kingma I, Langlois S. Plasma endothelin levels and blood pressure in hemodialysis and in CAPD patients. Effect of subcutaneous erythropoietin replacement therapy. *Clin Exp Hypertens*. 1994;16:565-75.
60. Koyama H, Tabata T, Nishizawa Y, Inoue T, Morii H, Yamaji T. Plasma endothelin levels in patients with uraemia. *Lancet*. 1989;1:991-2.
61. Vlachojannis J, Tsakas S, Petropoulou C, Kurz P. Increased renal excretion of endothelin-1 in nephrotic patients. *Nephrol Dial Transplant*. 1997;12:470-3.
62. Ohta K, Hirata Y, Shichiri M, Kanno K, Emori T, Tomita K, Marumo F. Urinary excretion of endothelin-1 in normal subjects and patients with renal disease. *Kidney Int*. 1991;39:307-11.
63. Vuurmans JL, Boer P, Koomans HA. Effects of endothelin-1 and endothelin-1-receptor blockade on renal function in humans. *Nephrol Dial Transplant*. 2004;19:2742-6.
64. Lariviere R, D'Amours M, Lebel M, Kingma I, Grose JH, Caron L. Increased immunoreactive endothelin-1 levels in blood vessels and glomeruli of rats with reduced renal mass. *Kidney Blood Press Res*. 1997;20:372-80.
65. Orisio S, Benigni A, Bruzzi I, Corna D, Perico N, Zoja C, Benatti L, Remuzzi G. Renal endothelin gene expression is increased in remnant kidney and correlates with disease progression. *Kidney Int*. 1993;43:354-8.
66. Lavoie P, Robitaille G, Agharazii M, Ledbetter S, Lebel M, Lariviere R. Neutralization of transforming growth factor-beta attenuates hypertension and prevents renal injury in uremic rats. *J Hypertens*. 2005;23:1895-903.
67. Lariviere R, Lebel M, Kingma I, Grose JH, Boucher D. Effects of losartan and captopril on endothelin-1 production in blood vessels and glomeruli of rats with reduced renal mass. *Am J Hypertens*. 1998;11:989-97.
68. Brochu E, Lacasse S, Moreau C, Lebel M, Kingma I, Grose JH, Lariviere R. Endothelin ET(A) receptor blockade prevents the progression of renal failure and hypertension in uraemic rats. *Nephrol Dial Transplant*. 1999;14:1881-8.
69. Benigni A, Perico N, Gaspari F, Zoja C, Bellizzi L, Gabanelli M, Remuzzi G. Increased renal endothelin production in rats with reduced renal mass. *Am J Physiol*. 1991;260:F331-9.
70. Dumont Y, D'Amours M, Lebel M, Lariviere R. Blood pressure-independent effect of angiotensin AT1 receptor blockade on renal endothelin-1 production in hypertensive uremic rats. *J Hypertens*. 2001;19:1479-87.
71. Benigni A, Zoja C, Corna D, Orisio S, Longaretti L, Bertani T, Remuzzi G. A specific endothelin subtype A receptor antagonist protects against injury in renal disease progression. *Kidney Int*. 1993;44:440-4.
72. Shimizu T, Hata S, Kuroda T, Mihara S, Fujimoto M. Different roles of two types of endothelin receptors in partial ablation-induced chronic renal failure in rats. *Eur J Pharmacol*. 1999;381:39-49.
73. 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;41:388-95.
74. Nabokov A, Amann K, Wagner J, Gehlen F, Munter K, Ritz E. Influence of specific and non-specific endothelin receptor antagonists on renal morphology in rats with surgical renal ablation. *Nephrol Dial Transplant*. 1996;11:514-20.

75. Goddard J, Johnston NR, Hand MF, Cumming AD, Rabelink TJ, Rankin AJ, Webb DJ. Endothelin-A receptor antagonism reduces blood pressure and increases renal blood flow in hypertensive patients with chronic renal failure: a comparison of selective and combined endothelin receptor blockade. *Circulation*. 2004;109:1186-93.
76. Tazawa N, Okada Y, Nakata M, Izumoto H, Takasu M, Takaoka M, Garipey CE, Yanagisawa M, Matsumura Y. Exaggerated Vascular and Renal Pathology in Endothelin-B-receptor-deficient Rats with Subtotal Nephrectomy. *J Cardiovasc Pharmacol*. 2004;44:S467-S470.
77. Okada Y, Nakata M, Izumoto H, Takasu M, Tazawa N, Takaoka M, Garipey CE, Yanagisawa M, Matsumura Y. Role of endothelin ETB receptor in partial ablation-induced chronic renal failure in rats. *Eur J Pharmacol*. 2004;494:63-71.
78. Kim S, Iwao H. Molecular and cellular mechanisms of angiotensin II-mediated cardiovascular and renal diseases. *Pharmacol Rev*. 2000;52:11-34.
79. Michel JB. [Renin-angiotensin system and vascular remodelling]. *Med Sci (Paris)*. 2004;20:409-13.
80. Lavoie JL, Sigmund CD. Minireview: overview of the renin-angiotensin system--an endocrine and paracrine system. *Endocrinology*. 2003;144:2179-83.
81. Campbell DJ, Habener JF. Angiotensinogen gene is expressed and differentially regulated in multiple tissues of the rat. *J Clin Invest*. 1986;78:31-9.
82. Lai KN, Leung JC, Lai KB, To WY, Yeung VT, Lai FM. Gene expression of the renin-angiotensin system in human kidney. *J Hypertens*. 1998;16:91-102.
83. Chiu AT, Herblin WF, McCall DE, Ardecky RJ, Carini DJ, Duncia JV, Pease LJ, Wong PC, Wexler RR, Johnson AL, et al. Identification of angiotensin II receptor subtypes. *Biochem Biophys Res Commun*. 1989;165:196-203.
84. Griendling KK, Minieri CA, Ollerenshaw JD, Alexander RW. Angiotensin II stimulates NADH and NADPH oxidase activity in cultured vascular smooth muscle cells. *Circ Res*. 1994;74:1141-8.
85. Ciafre SA, D'Armiento FP, Di Gregorio F, Colasanti P, Di Benedetto A, Langella A, Di Ieso N, Liguori A, Colasanti R, Napoli C, et al. [Angiotensin II stimulates endothelin-1 release from human endothelial cells]. *Recenti Prog Med*. 1993;84:248-53.
86. Miller PL, Rennke HG, Meyer TW. Glomerular hypertrophy accelerates hypertensive glomerular injury in rats. *Am J Physiol*. 1991;261:F459-65.
87. Kagami S, Border WA, Miller DE, Noble NA. Angiotensin II stimulates extracellular matrix protein synthesis through induction of transforming growth factor-beta expression in rat glomerular mesangial cells. *J Clin Invest*. 1994;93:2431-7.
88. Fakhouri F, Placier S, Ardaillou R, Dussaule JC, Chatziantoniou C. Angiotensin II activates collagen type I gene in the renal cortex and aorta of transgenic mice through interaction with endothelin and TGF-beta. *J Am Soc Nephrol*. 2001;12:2701-10.
89. Cao Z, Cooper ME, Wu LL, Cox AJ, Jandeleit-Dahm K, Kelly DJ, Gilbert RE. Blockade of the renin-angiotensin and endothelin systems on progressive renal injury. *Hypertension*. 2000;36:561-8.

90. Ghosh J, Murphy MO, Turner N, Khwaja N, Halka A, Kielty CM, Walker MG. The role of transforming growth factor beta1 in the vascular system. *Cardiovasc Pathol*. 2005;14:28-36.
91. Young GD, Murphy-Ullrich JE. Molecular interactions that confer latency to transforming growth factor-beta. *J Biol Chem*. 2004;279:38032-9.
92. Schultz-Cherry S, Lawler J, Murphy-Ullrich JE. The type 1 repeats of thrombospondin 1 activate latent transforming growth factor-beta. *J Biol Chem*. 1994;269:26783-8.
93. Schultz-Cherry S, Chen H, Mosher DF, Misenheimer TM, Krutzsch HC, Roberts DD, Murphy-Ullrich JE. Regulation of transforming growth factor-beta activation by discrete sequences of thrombospondin 1. *J Biol Chem*. 1995;270:7304-10.
94. Yevdokimova N, Wahab NA, Mason RM. Thrombospondin-1 is the key activator of TGF-beta1 in human mesangial cells exposed to high glucose. *J Am Soc Nephrol*. 2001;12:703-12.
95. Breitkopf K, Sawitza I, Westhoff JH, Wickert L, Dooley S, Gressner AM. Thrombospondin 1 acts as a strong promoter of transforming growth factor beta effects via two distinct mechanisms in hepatic stellate cells. *Gut*. 2005;54:673-81.
96. Murphy-Ullrich JE, Poczatek M. Activation of latent TGF-beta by thrombospondin-1: mechanisms and physiology. *Cytokine Growth Factor Rev*. 2000;11:59-69.
97. Hugo C. The thrombospondin 1-TGF-beta axis in fibrotic renal disease. *Nephrol Dial Transplant*. 2003;18:1241-5.
98. Wrana JL, Attisano L, Carcamo J, Zentella A, Doody J, Laiho M, Wang XF, Massague J. TGF beta signals through a heteromeric protein kinase receptor complex. *Cell*. 1992;71:1003-14.
99. Schiller M, Javelaud D, Mauviel A. TGF-beta-induced SMAD signaling and gene regulation: consequences for extracellular matrix remodeling and wound healing. *J Dermatol Sci*. 2004;35:83-92.
100. Massague J. TGF-beta signal transduction. *Annu Rev Biochem*. 1998;67:753-91.
101. Mehra A, Wrana JL. TGF-beta and the Smad signal transduction pathway. *Biochem Cell Biol*. 2002;80:605-22.
102. Shi Y, Massague J. Mechanisms of TGF-beta signaling from cell membrane to the nucleus. *Cell*. 2003;113:685-700.
103. Kato S, Ueda S, Tamaki K, Fujii M, Miyazono K, ten Dijke P, Morimatsu M, Okuda S. Ectopic expression of Smad7 inhibits transforming growth factor-beta responses in vascular smooth muscle cells. *Life Sci*. 2001;69:2641-52.
104. Li JH, Zhu HJ, Huang XR, Lai KN, Johnson RJ, Lan HY. Smad7 inhibits fibrotic effect of TGF-Beta on renal tubular epithelial cells by blocking Smad2 activation. *J Am Soc Nephrol*. 2002;13:1464-72.
105. Daniel C, Wiede J, Krutzsch HC, Ribeiro SM, Roberts DD, Murphy-Ullrich JE, Hugo C. Thrombospondin-1 is a major activator of TGF-beta in fibrotic renal disease in the rat in vivo. *Kidney Int*. 2004;65:459-68.
106. Daniel C, Takabatake Y, Mizui M, Isaka Y, Kawashi H, Rupperecht H, Imai E, Hugo C. Antisense oligonucleotides against thrombospondin-1 inhibit activation of tgf-beta in fibrotic renal disease in the rat in vivo. *Am J Pathol*. 2003;163:1185-92.
107. Hugo C, Kang DH, Johnson RJ. Sustained expression of thrombospondin-1 is associated with the development of glomerular and tubulointerstitial fibrosis in the remnant kidney model. *Nephron*. 2002;90:460-70.

108. Hugo C, Shankland SJ, Pichler RH, Couser WG, Johnson RJ. Thrombospondin 1 precedes and predicts the development of tubulointerstitial fibrosis in glomerular disease in the rat. *Kidney Int.* 1998;53:302-11.
109. Uchida K, Nitta K, Kobayashi H, Kawachi H, Shimizu F, Yumura W, Nihei H. Localization of Smad6 and Smad7 in the rat kidney and their regulated expression in the anti-Thy-1 nephritis. *Mol Cell Biol Res Commun.* 2000;4:98-105.
110. Ng YY, Hou CC, Wang W, Huang XR, Lan HY. Blockade of NFkappaB activation and renal inflammation by ultrasound-mediated gene transfer of Smad7 in rat remnant kidney. *Kidney Int Suppl.* 2005:S83-91.
111. Ando T, Okuda S, Tamaki K, Yoshitomi K, Fujishima M. Localization of transforming growth factor-beta and latent transforming growth factor-beta binding protein in rat kidney. *Kidney Int.* 1995;47:733-9.
112. Yang J, Liu Y. Dissection of key events in tubular epithelial to myofibroblast transition and its implications in renal interstitial fibrosis. *Am J Pathol.* 2001;159:1465-75.
113. Fan JM, Ng YY, Hill PA, Nikolic-Paterson DJ, Mu W, Atkins RC, Lan HY. Transforming growth factor-beta regulates tubular epithelial-myofibroblast transdifferentiation in vitro. *Kidney Int.* 1999;56:1455-67.
114. Zeisberg M, Hanai J, Sugimoto H, Mammoto T, Charytan D, Strutz F, Kalluri R. BMP-7 counteracts TGF-beta1-induced epithelial-to-mesenchymal transition and reverses chronic renal injury. *Nat Med.* 2003;9:964-8.
115. Zeisberg M, Kalluri R. The role of epithelial-to-mesenchymal transition in renal fibrosis. *J Mol Med.* 2004;82:175-81.
116. Schnaper HW, Hayashida T, Hubchak SC, Poncelet AC. TGF-beta signal transduction and mesangial cell fibrogenesis. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2003;284:F243-52.
117. Ignatz RA, Massague J. Transforming growth factor-beta stimulates the expression of fibronectin and collagen and their incorporation into the extracellular matrix. *J Biol Chem.* 1986;261:4337-45.
118. Ikedo H, Tamaki K, Ueda S, Kato S, Fujii M, Ten Dijke P, Okuda S. Smad protein and TGF-beta signaling in vascular smooth muscle cells. *Int J Mol Med.* 2003;11:645-50.
119. Ling H, Li X, Jha S, Wang W, Karetskaya L, Pratt B, Ledbetter S. Therapeutic role of TGF-beta-neutralizing antibody in mouse cyclosporin A nephropathy: morphologic improvement associated with functional preservation. *J Am Soc Nephrol.* 2003;14:377-88.
120. Islam M, Burke JF, Jr., McGowan TA, Zhu Y, Dunn SR, McCue P, Kanalas J, Sharma K. Effect of anti-transforming growth factor-beta antibodies in cyclosporine-induced renal dysfunction. *Kidney Int.* 2001;59:498-506.
121. Zhou A, Ueno H, Shimomura M, Tanaka R, Shirakawa T, Nakamura H, Matsuo M, Iijima K. Blockade of TGF-beta action ameliorates renal dysfunction and histologic progression in anti-GBM nephritis. *Kidney Int.* 2003;64:92-101.
122. Li B, Khanna A, Sharma V, Singh T, Suthanthiran M, August P. TGF-beta1 DNA polymorphisms, protein levels, and blood pressure. *Hypertension.* 1999;33:271-5.
123. Fukasawa H, Yamamoto T, Suzuki H, Togawa A, Ohashi N, Fujigaki Y, Uchida C, Aoki M, Hosono M, Kitagawa M, Hishida A. Treatment with anti-TGF-beta

- antibody ameliorates chronic progressive nephritis by inhibiting Smad/TGF-beta signaling. *Kidney Int.* 2004;65:63-74.
124. Ziyadeh FN, Hoffman BB, Han DC, Iglesias-De La Cruz MC, Hong SW, Isono M, Chen S, McGowan TA, Sharma K. Long-term prevention of renal insufficiency, excess matrix gene expression, and glomerular mesangial matrix expansion by treatment with monoclonal antitransforming growth factor-beta antibody in db/db diabetic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2000;97:8015-20.
 125. Miyajima A, Chen J, Lawrence C, Ledbetter S, Soslow RA, Stern J, Jha S, Pigato J, Lemer ML, Poppas DP, Vaughan ED, Felsen D. Antibody to transforming growth factor-beta ameliorates tubular apoptosis in unilateral ureteral obstruction. *Kidney Int.* 2000;58:2301-13.
 126. Kopp JB, Factor VM, Mozes M, Nagy P, Sanderson N, Bottinger EP, Klotman PE, Thorgeirsson SS. Transgenic mice with increased plasma levels of TGF-beta 1 develop progressive renal disease. *Lab Invest.* 1996;74:991-1003.
 127. Cheng J, Grande JP. Transforming growth factor-beta signal transduction and progressive renal disease. *Exp Biol Med (Maywood).* 2002;227:943-56.
 128. Lerman A, Sandok EK, Hildebrand FL, Jr., Burnett JC, Jr. Inhibition of endothelium-derived relaxing factor enhances endothelin-mediated vasoconstriction. *Circulation.* 1992;85:1894-8.
 129. Banting JD, Friberg P, Adams MA. Acute hypertension after nitric oxide synthase inhibition is mediated primarily by increased endothelin vasoconstriction. *J Hypertens.* 1996;14:975-81.
 130. de Gasparo M. Angiotensin II and nitric oxide interaction. *Heart Fail Rev.* 2002;7:347-58.
 131. Siragy HM, Carey RM. The subtype 2 (AT2) angiotensin receptor mediates renal production of nitric oxide in conscious rats. *J Clin Invest.* 1997;100:264-9.
 132. Barton M, Shaw S, d'Uscio LV, Moreau P, Luscher TF. Angiotensin II increases vascular and renal endothelin-1 and functional endothelin converting enzyme activity in vivo: role of ETA receptors for endothelin regulation. *Biochem Biophys Res Commun.* 1997;238:861-5.
 133. Sung CP, Arleth AJ, Storer BL, Ohlstein EH. Angiotensin type 1 receptors mediate smooth muscle proliferation and endothelin biosynthesis in rat vascular smooth muscle. *J Pharmacol Exp Ther.* 1994;271:429-37.
 134. Kohno M, Horio T, Ikeda M, Yokokawa K, Fukui T, Yasunari K, Kurihara N, Takeda T. Angiotensin II stimulates endothelin-1 secretion in cultured rat mesangial cells. *Kidney Int.* 1992;42:860-6.
 135. Gomez-Garre D, Ruiz-Ortega M, Ortego M, Largo R, Lopez-Armada MJ, Plaza JJ, Gonzalez E, Egido J. Effects and interactions of endothelin-1 and angiotensin II on matrix protein expression and synthesis and mesangial cell growth. *Hypertension.* 1996;27:885-92.
 136. Ritthaler T, Scholz H, Ackermann M, Riegger G, Kurtz A, Kramer BK. Effects of endothelins on renin secretion from isolated mouse renal juxtaglomerular cells. *Am J Physiol.* 1995;268:F39-45.
 137. Hamaguchi A, Kim S, Izumi Y, Zhan Y, Yamanaka S, Iwao H. Contribution of extracellular signal-regulated kinase to angiotensin II-induced transforming growth factor-beta1 expression in vascular smooth muscle cells. *Hypertension.* 1999;34:126-31.

138. Zhou Y, Poczatek MH, Berecek KH, Murphy-Ullrich JE. Thrombospondin 1 mediates angiotensin II induction of TGF-beta activation by cardiac and renal cells under both high and low glucose conditions. *Biochem Biophys Res Commun.* 2006;339:633-41.
139. Naito T, Masaki T, Nikolic-Paterson DJ, Tanji C, Yorioka N, Kohno N. Angiotensin II induces thrombospondin-1 production in human mesangial cells via p38 MAPK and JNK: a mechanism for activation of latent TGF-beta1. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2004;286:F278-87.
140. Brezniceanu ML, Wei CC, Zhang SL, Hsieh TJ, Guo DF, Hebert MJ, Ingelfinger JR, Filep JG, Chan JS. Transforming growth factor-beta 1 stimulates angiotensinogen gene expression in kidney proximal tubular cells. *Kidney Int.* 2006;69:1977-85.
141. Border WA, Noble NA. Interactions of transforming growth factor-beta and angiotensin II in renal fibrosis. *Hypertension.* 1998;31:181-8.
142. Gonzalez W, Chen Z, Damon DH. Transforming growth factor-beta regulation of endothelin expression in rat vascular cell and organ cultures. *J Cardiovasc Pharmacol.* 2001;37:219-26.
143. Kurihara H, Yoshizumi M, Sugiyama T, Takaku F, Yanagisawa M, Masaki T, Hamaoki M, Kato H, Yazaki Y. Transforming growth factor-beta stimulates the expression of endothelin mRNA by vascular endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 1989;159:1435-40.
144. Rodriguez-Pascual F, Reimunde FM, Redondo-Horcajo M, Lamas S. Transforming Growth Factor-beta Induces Endothelin-1 Expression Through Activation of the Smad Signaling Pathway. *J Cardiovasc Pharmacol.* 2004;44:S39-S42.
145. Saura M, Zaragoza C, Cao W, Bao C, Rodriguez-Puyol M, Rodriguez-Puyol D, Lowenstein CJ. Smad2 mediates transforming growth factor-beta induction of endothelial nitric oxide synthase expression. *Circ Res.* 2002;91:806-13.
146. Saura M, Zaragoza C, Herranz B, Griera M, Diez-Marques L, Rodriguez-Puyol D, Rodriguez-Puyol M. Nitric oxide regulates transforming growth factor-beta signaling in endothelial cells. *Circ Res.* 2005;97:1115-23.
147. Craven PA, Studer RK, Felder J, Phillips S, DeRubertis FR. Nitric oxide inhibition of transforming growth factor-beta and collagen synthesis in mesangial cells. *Diabetes.* 1997;46:671-81.
148. Grinnell F. Fibroblast biology in three-dimensional collagen matrices. *Trends Cell Biol.* 2003;13:264-9.
149. Hocher B, Thone-Reineke C, Rohmeiss P, Schmager F, Slowinski T, Burst V, Siegmund F, Quertermous T, Bauer C, Neumayer HH, Schleuning WD, Theuring F. Endothelin-1 transgenic mice develop glomerulosclerosis, interstitial fibrosis, and renal cysts but not hypertension. *J Clin Invest.* 1997;99:1380-9.
150. Yang J, Liu Y. Blockage of tubular epithelial to myofibroblast transition by hepatocyte growth factor prevents renal interstitial fibrosis. *J Am Soc Nephrol.* 2002;13:96-107.
151. Boukhalfa G, Desmouliere A, Rondeau E, Gabbiani G, Sraer JD. Relationship between alpha-smooth muscle actin expression and fibrotic changes in human kidney. *Exp Nephrol.* 1996;4:241-7.
152. de Nucci G, Thomas R, D'Orleans-Juste P, Antunes E, Walder C, Warner TD, Vane JR. Pressor effects of circulating endothelin are limited by its removal in the

- pulmonary circulation and by the release of prostacyclin and endothelium-derived relaxing factor. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1988;85:9797-800.
153. Ohuchi T, Kuwaki T, Ling GY, Dewit D, Ju KH, Onodera M, Cao WH, Yanagisawa M, Kumada M. Elevation of blood pressure by genetic and pharmacological disruption of the ETB receptor in mice. *Am J Physiol*. 1999;276:R1071-7.
 154. Dahly AJ, Hoagland KM, Flasch AK, Jha S, Ledbetter SR, Roman RJ. Antihypertensive effects of chronic anti-TGF-beta antibody therapy in Dahl S rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2002;283:R757-67.
 155. Hill C, Flyvbjerg A, Gronbaek H, Petrik J, Hill DJ, Thomas CR, Sheppard MC, Logan A. The renal expression of transforming growth factor-beta isoforms and their receptors in acute and chronic experimental diabetes in rats. *Endocrinology*. 2000;141:1196-208.
 156. Watanabe T, Yamamoto T, Ikegaya N, Fujigaki Y, Suzuki H, Togawa A, Fukasawa H, Nagase M, Hishida A. Transforming growth factor-beta receptors in self-limited vs. chronic progressive nephritis in rats. *J Pathol*. 2002;198:397-406.
 157. Siegert A, Ritz E, Orth S, Wagner J. Differential regulation of transforming growth factor receptors by angiotensin II and transforming growth factor-beta1 in vascular smooth muscle. *J Mol Med*. 1999;77:437-45.
 158. Chen HC, Bouchie JL, Perez AS, Clermont AC, Izumo S, Hampe J, Feener EP. Role of the angiotensin AT(1) receptor in rat aortic and cardiac PAI-1 gene expression. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2000;20:2297-302.
 159. Hamano K, Iwano M, Akai Y, Sato H, Kubo A, Nishitani Y, Uyama H, Yoshida Y, Miyazaki M, Shiiki H, Kohno S, Dohi K. Expression of glomerular plasminogen activator inhibitor type 1 in glomerulonephritis. *Am J Kidney Dis*. 2002;39:695-705.
 160. Eddy AA, Giachelli CM. Renal expression of genes that promote interstitial inflammation and fibrosis in rats with protein-overload proteinuria. *Kidney Int*. 1995;47:1546-57.
 161. Duymelinck C, Dauwe SE, De Greef KE, Ysebaert DK, Verpooten GA, De Broe ME. TIMP-1 gene expression and PAI-1 antigen after unilateral ureteral obstruction in the adult male rat. *Kidney Int*. 2000;58:1186-201.