

MÉLANIE NADEAU

**EFFET DE L'ÉRYTHROPOÏÉTINE SUR LA  
FONCTION ENDOTHÉLIALE EN 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.)

FACULTÉ DE MÉDECINE  
UNIVERSITÉ LAVAL  
QUÉBEC

2007

© Mélanie Nadeau, 2007

## Résumé

Le traitement de l'anémie en insuffisance rénale chronique (IRC) avec l'érythropoïétine recombinante humaine (rhEPO) est accompagné d'une élévation de la pression artérielle. Cet effet presseur de l'rhEPO est présent seulement en IRC. En effet, l'rhEPO n'augmente pas la pression artérielle en condition rénale normale. Nos objectifs sont donc d'élucider les mécanismes qui permettent le maintien de la pression en condition normale et l'effet hypertenseur de l'rhEPO en IRC.

Dans une première étude, l'rhEPO est administrée chez des rats Wistar normaux (100U/kg, 3 fois par semaine pendant 3 semaines) tandis qu'un second groupe de rats témoins reçoit le véhicule (saline). L'effet de l'rhEPO sur la réactivité vasculaire est évalué dans des segments d'aorte thoracique isolés. L'expression de l'endothéline-1 (ET-1) et de la NO synthase endothéliale (eNOS) est analysée par immunofluorescence en microscopie confocale dans ces mêmes vaisseaux. Les résultats montrent que la pression artérielle systolique et la créatinine sérique sont inchangées chez les animaux traités alors que l'hématocrite est augmenté chez les animaux recevant l'rhEPO. Le traitement à l'rhEPO provoque une augmentation de la contraction à la norépinéphrine (NE) dans les segments sans endothélium seulement. Il cause également une atténuation de la contraction à l'ET-1 dans les segments dont l'endothélium est intact ; ce phénomène est corrigé en absence de l'endothélium. L'incubation des segments avec le N<sup>G</sup>-nitro-L-arginine méthyl ester (L-NAME), un inhibiteur de la synthèse du monoxyde d'azote (NO), rétablit aussi la contraction à l'ET-1. L'expression de l'ET-1 dans l'endothélium des aortes thoraciques demeure inchangée tandis que l'expression de la eNOS est augmentée suite au traitement à l'rhEPO. L'rhEPO entraîne donc l'activation d'un mécanisme compensateur vasodilatateur de l'endothélium. Ce mécanisme impliquerait l'augmentation de la relâche de NO suite à une expression accrue de la eNOS.

Dans un deuxième temps, nous avons vérifié l'état de ce mécanisme compensateur en IRC. Nous avons donc comparé un groupe de rats Wistar rendus urémiques par néphrectomie 5/6 (Nx) à un groupe de rats témoins. Les mêmes analyses ont été effectuées pour cette étude. Nous avons observé une augmentation de la pression artérielle ainsi qu'une détérioration de la fonction rénale chez les animaux urémiques. L'IRC ne cause aucune altération de la réponse à l'acétylcholine (ACh) mais atténue cependant la vasodilatation au nitroprussiate de sodium (SNP). L'IRC cause également une augmentation de la réponse à la NE dans les segments sans endothélium seulement. La contraction à l'ET-1 est diminuée dans les segments d'aorte des rats Nx dont l'endothélium est intact tandis qu'elle est partiellement accentuée en son absence. La contraction à l'ET-1 est aussi augmentée par l'incubation des segments d'aorte de rats Nx avec le L-NAME. Ces résultats suggèrent que l'atténuation de la réponse à l'ET-1 dans les vaisseaux des rats Nx est causée en partie par une augmentation de la production endothéliale de l'ET-1. Par contre, l'urémie accentue aussi la relâche d'un facteur vasodilatateur, dont le NO, pour contrecarrer l'action des agents vasoconstricteurs (ET-1, NE). En effet, l'expression endothéliale de la eNOS est aussi augmentée dans les vaisseaux des animaux Nx.

Enfin, nous avons comparé les mêmes paramètres chez les animaux urémiques recevant ou non le traitement à l'rhEPO. L'rhEPO aggrave l'hypertension et détériore la fonction rénale présente en IRC. L'rhEPO diminue la relaxation à l'ACh et au SNP. Le traitement à l'rhEPO ne modifie pas la contraction à la NE. Elle augmente cependant l'atténuation de la réponse à l'ET-1 en présence de l'endothélium. L'absence d'endothélium et l'incubation avec le L-NAME rétablissent partiellement la contraction à l'ET-1 de façon similaire chez les animaux Nx recevant ou non l'rhEPO. Ces résultats indiquent que l'augmentation de l'expression endothéliale de l'ET-1 par le traitement à l'rhEPO en urémie peut être responsable de l'atténuation accrue de la contraction à l'ET-1 chez les animaux Nx traité à l'rhEPO. Tout comme chez les animaux normaux, l'rhEPO entraîne une augmentation de la relâche de NO suite à l'expression accrue de la eNOS. Ce mécanisme serait par contre insuffisant pour bloquer l'effet hypertenseur de l'rhEPO en urémie.

En conclusion, une augmentation de la production de NO suite à l'expression accrue de la eNOS explique, du moins en partie, le maintien de la pression artérielle en condition normale suite au traitement à l'rhEPO. Ce mécanisme compensateur est également activé en IRC mais ne serait pas modulé par le traitement à l'rhEPO. Il serait alors insuffisant pour prévenir l'augmentation de la pression artérielle.

## Abstract

Treatment of anemia in chronic renal failure (CRF) with recombinant human erythropoietin (rhEPO) is associated with increased blood pressure. This hypertensive effect of rhEPO is present only in CRF. Indeed, rhEPO does not increase blood pressure in normal renal conditions. The aim of our work is to elucidate the mechanisms involved in the maintenance of normal blood pressure in normal conditions and the hypertensive effect induced by rhEPO in CRF.

In a first study, normal Wistar rats were treated with rhEPO (100U/kg, 3 times per week for 3 weeks) while the second group of control rats received the vehicle (saline). The effect of rhEPO on vascular reactivity was evaluated in isolated thoracic aorta segments. The expression of endothelin-1 (ET-1) and endothelial nitric oxide synthase (eNOS) was assessed by immunofluorescence with confocal microscopy in these same vessels. The results show that blood pressure and serum creatinine were unchanged in normal rats treated with rhEPO, whereas hematocrit was increased in the same animals. RhEPO caused an increase of contraction response to norepinephrine (NE) only in segments without endothelium. It also caused an attenuation of ET-1 contraction in segments where endothelium was intact; this phenomenon was corrected in the absence of endothelium. The incubation of segments with N<sup>G</sup>-nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME), a nitric oxide (NO) synthesis inhibitor, also restored the ET-1 contraction. ET-1 expression in thoracic aorta endothelium was unchanged, whereas eNOS expression was increased after rhEPO therapy. Thus, rhEPO activates an endothelium-dependent compensatory mechanism. This mechanism involves increased NO release due to enhanced expression of eNOS.

Secondly, we evaluated this compensatory mechanism in CRF. Wistar rats were rendered uremic by subtotal 5/6 nephrectomy and were compared with sham-operated control rats. The analyses in the first study were repeated. We found an increase in blood pressure and a deterioration of renal function in uremic rats. CRF did not affect the response to acetylcholine (Ach) but decreased sodium nitroprusside (SNP) vasorelaxation. However,

CRF led to an alteration in the contraction response to NE in thoracic aorta segments without endothelium. The contraction to ET-1 was attenuated in segments from uremic rats with intact endothelium whereas it was partially increased in its absence. The ET-1 contraction was also restored by the incubation of segments with L-NAME. These results suggest that the attenuation of the ET-1 response in uremic rats is related, at least in part, to the increase in endothelial ET-1 production. On the other hand, uremia also accentuates the endothelial release of vasodilators, such as NO, which counteract the effects of the vasoconstrictors (ET-1, NE). Moreover, the endothelial expression of eNOS was also increased in vessels from uremic rats.

Finally, we compared the same parameters in uremic rats with and without rhEPO treatment. rhEPO aggravated hypertension and exacerbated the deterioration in renal function already present in CRF. rhEPO led to a decrease in the vasodilatation to ACh and SNP. Treatment with rhEPO had no effect on the contraction to NE. However, it increased the attenuation of ET-1 contraction in thoracic aorta segments with endothelium. Endothelium denudation and incubation with L-NAME partially restored the contraction to ET-1 similarly in untreated and rhEPO-treated uremic rats. These results indicate that the increased endothelial expression of ET-1 induced by rhEPO in uremic rats is responsible for the increase in the attenuation response to ET-1. In the same way, as in normal rats, rhEPO led to an increase in NO release due to increased eNOS expression. However, this mechanism appears to be insufficient to prevent the vasopressor effect of rhEPO in uremia.

In conclusion, increased production of NO as a result of increased eNOS expression may explain, at least in part, the maintenance of normal blood pressure under normal condition following rhEPO therapy. This compensatory mechanism is also activated in uremia, but is unaffected by rhEPO, and its effect is thus insufficient to prevent the development of hypertension in CRF.

## Remerciement

Je tiens tout d'abord à remercier mon directeur de maîtrise, le Dr Richard Larivière, ainsi que mon codirecteur, le Dr Marcel Lebel, deux hommes ayant à cœur l'avancement de la science et la réussite de leurs étudiants. Ils ont su, dès le départ, m'accorder toute leur confiance et leur soutien. Leurs précieux conseils ont été d'une grande importance dans la réalisation de ce projet.

Aux membres de l'équipe : Marie-Eve Rodrigue, Marie-Eve Rancourt, Nadia Chbinou, Frédérique Therrien, Patrick Taillon, Claude Villeneuve et Danielle Lizotte, des collègues, des amis, des complices, merci pour vos encouragements et votre aide. Ce fût un plaisir de travailler en votre compagnie.

Je tiens finalement à remercier mes parents, André Nadeau et Monique Boulé, mes sœurs et leurs conjoints, Isabelle et Jonathan Guay ainsi que Jacynthe et Michel Martel, sans oublier leurs enfants, Marie-Michelle, Raphaël, Loïc et Alix, une source intarissable de motivation et d'inspiration. Vous avez toujours été présents pour moi et je vous en suis grandement reconnaissante. Un merci tout spécial à Hélène, Robert et Claude Desrochers qui m'ont particulièrement aidé.

*À ceux que j'aime, vous m'avez tous inspiré*



# Table des matières

Résumé.....	i
Abstract.....	iv
Remerciement.....	vi
Table des matières.....	viii
Liste des tableaux.....	x
Liste des figures.....	xi
Liste des abréviations.....	xiii
Chapitre 1- Introduction.....	15
1.1- Contrôle de la pression artérielle.....	16
1.1.1- Généralité.....	16
1.1.2- Mécanismes nerveux.....	17
A- Le système nerveux autonome.....	17
B- Les barorécepteurs.....	17
C- Les chimiorécepteurs.....	18
1.1.3- Mécanismes hormonaux.....	18
A- Noradrénaline-adrénaline.....	18
B- Facteur natriurétique auriculaire (FNA).....	19
C- Hormone antidiurétique (ADH).....	19
1.1.4- Résistance vasculaire.....	19
A- Structure des vaisseaux.....	19
B- Fonction.....	21
1.1.5- Mécanismes rénaux.....	22
A- Physiologie rénale.....	22
B- Contrôle du volume sanguin.....	23
C- Système rénine angiotensine aldostérone.....	25
1.2- Hypertension artérielle.....	27
1.2.1- Définition.....	27
1.2.2- Causes.....	27
1.2.3- Conséquences.....	30
1.3- Insuffisance rénale chronique.....	31
1.3.1- Étiologie.....	31
1.3.2- Fonction rénale normale et l'IRC.....	31
1.3.3- Conséquences.....	32
A- Hypertension.....	32
B- Anémie.....	32
C- Urémie.....	32
D- Désordres électrolytiques et acido-basiques.....	33
1.4- Dysfonction endothéliale.....	34
1.4.1- Généralités.....	34
1.4.2- Endothéline-1.....	35
A- Structure et production.....	35
B- Récepteurs.....	38
C- Effets vasculaires.....	38
D- Effets rénaux.....	39

E- ET-1 en insuffisance rénale.....	40
1.4.3- Monoxyde d'azote .....	41
A- Biosynthèse.....	41
B- Effets vasculaires .....	43
C- Effets rénaux .....	44
D- Monoxyde d'azote et insuffisance rénale chronique .....	45
1.5- Traitement de l'anémie en IRC .....	47
1.5.1- Généralités .....	47
1.5.2- L'Érythropoïétine .....	48
A- Production et régulation.....	48
B- Récepteur et modes d'action.....	48
1.5.3- Effet de l'rhEPO sur la PA .....	50
A- Endothéline-1 .....	50
B- Monoxyde d'azote .....	51
Chapitre 2- Pertinence et objectifs du projet de recherche .....	53
2.1- Hypothèse .....	54
2.2- Objectifs spécifiques .....	54
Chapitre 3- Effet de l'rhEPO sur la réactivité vasculaire chez le rat normal.....	55
3.1- Protocole animal .....	55
3.2- Méthodologie.....	56
3.2.1- Mesure de la pression artérielle systolique.....	56
3.2.2- Réactivité vasculaire.....	56
3.2.3- Immunofluorescence en microscopie confocale .....	58
3.3- Résultats .....	59
3.3.1- Paramètres hématologiques .....	59
3.3.2- Réactivité vasculaire.....	59
3.3.3- Immunofluorescence en microscopie confocale .....	67
Chapitre 4- Modulation de la réactivité vasculaire en insuffisance rénale .....	70
4.1- Protocole animal .....	70
4.2- Méthodologie.....	72
4.3- Résultats .....	72
4.3.1- Paramètres hématologiques .....	72
4.3.2- Réactivité vasculaire.....	74
4.3.3- Immunofluorescence en microscopie confocale .....	79
Chapitre 5- Effet de l'rhEPO sur la réactivité vasculaire en insuffisance rénale .....	82
5.1- Protocole animal .....	82
5.2- Méthodologie.....	82
5.3- Résultats .....	83
5.3.1- Paramètres hématologiques .....	83
5.3.2- Réactivité vasculaire.....	86
5.3.3- Immunofluorescence en microscopie confocale .....	93
Chapitre 6- Discussion.....	96
Conclusion .....	100
Bibliographie .....	101

## Liste des tableaux

Tableau 1.	Facteurs de risque et pathologies associés à une dysfonction endothéliale..	34
Tableau 2.	Facteurs qui stimulent ou inhibent la transcription et/ou la sécrétion d'ET-1 in vitro.	37
Tableau 3.	Action de l'ET-1 sur le système vasculaire et le rein .....	40
Tableau 4.	Sommaire des paramètres des courbes dose-réponse à l'ET-1 des segments d'aortes thoraciques d'animaux normaux recevant l'rhEPO ou le véhicule (témoin)..	67
Tableau 5.	Sommaire des paramètres des courbes dose-réponse à l'ET-1 des segments d'aortes thoraciques provenant d'animaux urémiques ou témoins.....	79
Tableau 6.	Sommaire des paramètres des courbes dose-réponse à l'ET-1 des segments d'aorte thoracique provenant d'animaux urémiques recevant l'rhEPO ou le véhicule	93

## Liste des figures

Figure 1.	Pression sanguine dans les diverses parties du système cardiovasculaire .....	20
Figure 2.	Structure comparée des vaisseaux sanguins .....	21
Figure 3.	Appareil juxtaglomérulaire .....	24
Figure 4.	Mécanismes de régulation du débit de filtration glomérulaire .....	26
Figure 5.	Causes d'hypertension .....	29
Figure 6.	Biosynthèse de l'ET-1 .....	36
Figure 7.	Effet de l'ET-1 sur la réabsorption d'eau et de sodium par le tubule rénal.....	39
Figure 8.	Biosynthèse du NO et action sur les cellules musculaires lisses .....	43
Figure 9.	Conséquences cliniques de l'anémie .....	48
Figure 10.	Signalisation du récepteur à l'EPO .....	49
Figure 11.	Système de bains d'organes.....	57
Figure 12.	Effet de l'rhEPO sur l'hématocrite en condition normale .....	59
Figure 13.	Effet de l'rhEPO sur la relaxation-dépendant à l'ACh en condition normale .....	60
Figure 14.	Effet de l'rhEPO sur la relaxation endothélium-indépendant au SNP en condition normale .....	61
Figure 15.	Effet de l'rhEPO sur la contraction à la NE en condition normale.....	62
Figure 16.	Effet de l'rhEPO sur la contraction en réponse à l'ET-1 en condition normale .....	64
Figure 17.	Effet du L-NAME sur la contraction à l'ET-1 suite au traitement à l'rhEPO. ....	66
Figure 18.	Effet de l'rhEPO sur l'expression de l'ET-1 en condition normale .....	68
Figure 19.	Effet de l'rhEPO sur l'expression de la eNOS en condition normale .....	69
Figure 20.	Néphrectomie 5/6 par résection des pôles .....	71
Figure 21.	Augmentation de la PA en urémie.....	72
Figure 22.	Fonction rénale en IRC .....	73
Figure 23.	Effet de l'urémie sur la relaxation endothélium-dépendant à l'ACh.....	74
Figure 24.	Effet de l'urémie sur la relaxation endothélium-indépendant au SNP .....	75
Figure 25.	Effet de l'urémie sur la contraction à la NE .....	76
Figure 26.	Effet de l'urémie sur la contraction à l'ET-1 .....	77
Figure 27.	Effet du L-NAME sur la contraction à l'ET-1 en urémie.....	78
Figure 28.	Effet de l'urémie sur l'expression de l'ET-1 dans l'aorte thoracique.....	80
Figure 29.	Effet de l'urémie sur l'expression de la eNOS dans l'aorte thoracique.....	81
Figure 30.	Effet de l'rhEPO sur l'hématocrite en IRC.....	83
Figure 31.	Effet de l'rhEPO sur la PA en IRC .....	84
Figure 32.	Effet de l'rhEPO sur la créatinine sérique en IRC.....	85
Figure 33.	Effet de l'rhEPO sur la relaxation endothélium-dépendant à l'ACh en urémie .....	86
Figure 34.	Effet de l'rhEPO sur la relaxation endothélium-indépendante au SNP en urémie.....	87
Figure 35.	Effet de l'rhEPO sur la contraction à la NE en urémie.....	88
Figure 36.	Effet de l'rhEPO sur la contraction à l'ET-1 en urémie .....	90

Figure 37.	Effet du L-NAME sur l'atténuation de la contraction à l'ET-1 par l'rhEPO en urémie .....	92
Figure 38.	Effet de l'rhEPO sur l'expression de l'ET-1 en urémie.....	94
Figure 39.	Effet de l'rhEPO sur l'expression de la eNOS en urémie.....	95

## Liste des abréviations

ACh	acétylcholine
ADH	hormone antidiurétique
ADMA	asymmetric dimethyl arginine
Ang I	angiotensine I
Ang II	angiotensine II
BH <sub>4</sub>	(6R)-5,6,7,8-tetrahydrobiopterin
DC	débit cardiaque
ECA	enzyme de conversion de l'angiotensine
ECE	enzyme de conversion de l'endothéline
EDHF	facteur hyperpolarisant dérivé de l'endothélium
eNOS	NO synthase endothéliale
EPO	érythropoïétine
EPOR	récepteur de l'érythropoïétine
ET	endothéline
ET-1	endothéline-1
ET <sub>A</sub>	récepteur de l'endothéline A
ET <sub>B</sub>	récepteur de l'endothéline B
FC	fréquence cardiaque
FG	filtration glomérulaire
FMN	flavin mononucleotide
FNA	facteur natriurétique auriculaire
GMPc	guanosine monophosphate cyclique
IRC	insuffisance rénale chronique
L-NAME	N <sup>G</sup> -nitro-L-arginine méthyl ester
NADP	reduced nicotinamide-adenine-dinucleotide phosphate
NE	norépinéphrine
NO	monoxyde d'azote
Nx	urémique
•O <sup>2</sup>	anion superoxide
PA	pression artérielle

PBS	phosphate buffer saline
PDGF	platelet-derived growth factor
PG	prostaglandine
PGI <sub>2</sub>	prostacycline
rhEPO	érythropoïétine recombinante humaine
ROS	espèce réactive de l'oxygène
RP	résistance périphérique
SC	sous cutané
SNP	sodium nitroprusside
TXA <sub>2</sub>	thromboxane A <sub>2</sub>
VS	volume d'éjection systolique

## Chapitre 1- Introduction

La première cause de décès des patients en insuffisance rénale chronique (IRC) est reliée à des complications cardiovasculaires[1]. En effet, l'insuffisance rénale s'accompagne d'artériosclérose accélérée due à plusieurs conditions dont l'hypertension artérielle, la dyslipidémie et l'anémie. Ces facteurs sont associés à une dysfonction endothéliale sévère[2].

Parmi les progrès thérapeutiques récents pour les patients insuffisants rénaux, on peut souligner l'arrivée de l'érythropoïétine recombinante humaine (rhEPO) qui a révolutionné le traitement de l'anémie secondaire à l'insuffisance rénale et amélioré la qualité de vie de ces patients. Cependant, la correction de l'anémie avec l'rhEPO peut causer de l'hypertension *de novo* ou aggraver l'hypertension préexistante, et par conséquent, augmenter les risques cardiovasculaires déjà élevés dans cette population.

Plusieurs mécanismes ont été suggérés pour expliquer cette forme d'hypertension iatrogénique. Des travaux de notre laboratoire suggèrent que l'rhEPO pourrait accentuer la dysfonction endothéliale présente en IRC via un déséquilibre de la production et de la relâche des substances vasoactives endothéliales dont l'endothéline (ET), le monoxyde d'azote (NO) et les prostaglandines(PG).

Les travaux de recherche effectués dans le cadre de ma maîtrise portent sur l'étude de l'effet de l'rhEPO sur la modulation de la relâche de facteurs dérivés de l'endothélium et, par conséquent, sur la réactivité vasculaire *in vitro* dans les anneaux d'aorte d'animaux normaux et urémiques. Dans la première partie de mon mémoire, je présente une revue des connaissances nécessaires à la compréhension et l'interprétation de mes résultats de recherche.



## **1.1- Contrôle de la pression artérielle**

### ***1.1.1- Généralités***

La pression sanguine est la force que le sang exerce sur la paroi des vaisseaux sanguins. Cette force permet au sang d'être propulsé dans tout le système cardiovasculaire et est produite par la contraction des ventricules. Cette pression (PA) peut être affectée par le débit cardiaque (DC) et la résistance périphérique (RP).

$$\mathbf{PA = DC \times RP}$$

Le débit cardiaque est le résultat du volume d'éjection systolique (VS) (ml/battement) multiplié par la fréquence cardiaque (FC) (battement/min). Certains mécanismes de régulation agissent sur ces deux paramètres pour modifier la PA.

$$\mathbf{DC = VS \times FC}$$

La RP est la force qui s'oppose à l'écoulement du sang. Elle s'exerce par la friction du sang sur les parois vasculaires. La longueur des vaisseaux sanguins, la viscosité du sang et le diamètre des vaisseaux sont des facteurs influençant la RP. Plus un vaisseau sanguin est long, plus la résistance sera élevée. Ce paramètre demeure cependant invariable dans un organisme. La viscosité est également proportionnelle à la RP. Le diamètre des vaisseaux est le facteur le plus important pouvant agir sur la pression artérielle. La friction est plus élevée dans un petit conduit que dans un gros puisque la proportion de liquide en contact avec la paroi est plus grande. Plusieurs mécanismes régulateurs agissent au niveau de la contraction ou de la dilatation des artères et des artérioles, affectant ainsi la RP.

### ***1.1.2- Mécanismes nerveux***

Les mécanismes nerveux sont des mécanismes qui agissent rapidement pour maintenir une pression artérielle adéquate ou pour répondre à une demande précise. Ces mécanismes incluent les réponses baroréflexes et chimioréflexes et l'activité du système nerveux autonome.

#### ***A- Le système nerveux autonome***

Le système nerveux central joue un rôle important dans le maintien de la pression artérielle[3, 4]. En effet, le système nerveux autonome agit via les neurofibres vasomotrices qui innervent le muscle lisse des vaisseaux sanguins. Ces neurofibres relâchent des neurotransmetteurs tels que la noradrénaline et l'acétylcholine (ACh) pour induire une vasoconstriction ou une vasodilatation. Ils répondent à un centre vasomoteur situé dans le bulbe rachidien. Les artères et les artérioles sont sans arrêt partiellement contractées, c'est ce que l'on appelle le tonus vasculaire. Sous l'influence d'influx provenant des barorécepteurs et des chimiorécepteurs ainsi qu'en réponse à des agents chimiques, le centre vasomoteur module les influx envoyés aux muscles lisses pour augmenter ou diminuer le diamètre des vaisseaux sanguins ciblés.

#### ***B- Les barorécepteurs***

Situés particulièrement dans les sinus carotidiens et la crosse aortique, les barorécepteurs détectent les différences de pression et induisent un réflexe pour maintenir une pression artérielle normale[5]. Lorsque que la PA augmente, les barorécepteurs s'étirent et augmentent la fréquence d'envoi des influx vers le centre vasomoteur. Ce dernier sera alors inhibé entraînant ainsi une vasodilatation et donc une diminution de la PA. Le centre cardio-inhibiteur est également impliqué pour réduire la FC et la force de contraction cardiaque. Par contre, une diminution de la PA entraîne une stimulation du système nerveux sympathique qui active le centre vasomoteur, augmentant ainsi la vasoconstriction, la FC et la force de contraction cardiaque pour rétablir la PA. Les barorécepteurs agissent

rapidement et sont efficaces pour les changements de pression temporaires comme lors d'un changement de position.

### *C- Les chimiorécepteurs*

Les chimiorécepteurs sont situés dans la crosse aortique et les corpuscules carotidiens[5]. Ils sont en étroit contact avec le sang et en surveillent la composition. Lors d'une diminution du flot sanguin, les chimiorécepteurs détectent la diminution de la teneur en oxygène et du pH sanguin ainsi que l'augmentation du taux de dioxyde de carbone. Le centre vasomoteur est alors excité pour entraîner une vasoconstriction rapide et ainsi une augmentation de la PA. Ces récepteurs peuvent également influencer la fréquence respiratoire.

### **1.1.3- Mécanismes hormonaux**

En plus des mécanismes nerveux, certains mécanismes hormonaux agissent également dans la régulation de la PA en modifiant le DC, la RP et le VS.

#### *A- Noradrénaline-adrénaline*

Le système nerveux sympathique cause non seulement une excitation nerveuse des vaisseaux sanguins, mais également une augmentation de la relâche de noradrénaline et d'adrénaline dans la circulation sanguine par la médullosurrénale. Ces hormones entraînent une vasoconstriction rapide dans presque tout l'organisme sauf dans le muscle squelettique et augmentent le DC en augmentant la FC et la force de contraction cardiaque. Son action est rapide et de courte durée.

### *B- Facteur natriurétique auriculaire (FNA)*

Lors d'une augmentation de la PA, les oreillettes produisent une hormone peptidique, le facteur natriurétique auriculaire (FNA)[6, 7]. Cette hormone entraîne une diminution du VS en stimulant la sécrétion de sodium et d'eau par le rein. S'ensuit alors une diminution de PA. Le FNA entraîne également une vasodilatation générale.

### *C- Hormone antidiurétique (ADH)*

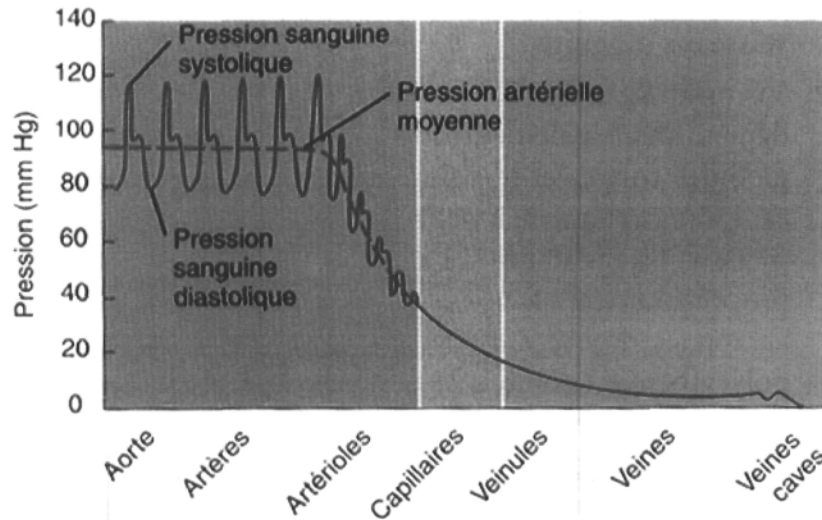
L'ADH produite par l'hypothalamus réduit la diurèse. Elle est normalement peu impliquée dans les changements de PA à court terme, mais peut être relâchée en plus grande quantité lors d'une diminution dramatique de la pression comme lors d'une hémorragie. Elle provoque alors une forte vasoconstriction pour augmenter la PA. Elle est également appelée vasopressine.

## **1.1.4- Résistance vasculaire**

### *A- Structure des vaisseaux*

Les vaisseaux sanguins se divisent en trois grands groupes: les artères, les capillaires et les veines. Les artères acheminent le sang du ventricule gauche jusqu'aux organes. C'est dans l'aorte que la pression est la plus élevée suite à l'éjection du sang du ventricule gauche. La chute de pression la plus importante s'effectue dans les artérioles qui offrent une plus grande résistance à l'écoulement du sang. La pression devient très faible au niveau des veinules et des veines (figure 1). C'est ce gradient de pression qui permet au sang de circuler.

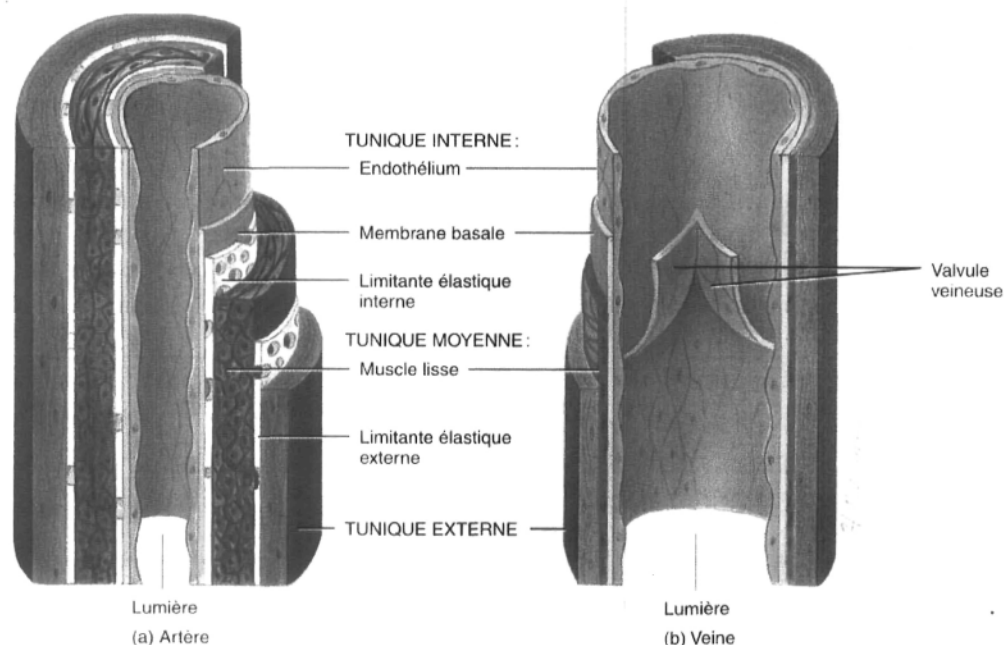
**Figure 1.** Pression sanguine dans les diverses parties du système cardiovasculaire



*Source: Principe d'anatomie et de physiologie [5]*

Les artères et les veines ont en commun les 3 couches qui composent leur paroi, mais en proportions différentes soit: la tunique interne (endothélium, membrane basale et limitante élastique interne), la tunique moyenne (cellules musculaires lisses et fibres élastiques) et la tunique externe (fibres élastiques et de collagène) (figure 2). La tunique moyenne est beaucoup plus épaisse dans les artères que dans les veines. En effet, les artères doivent résister à des pressions sanguines beaucoup plus élevées que les veines. Ce phénomène n'empêche cependant pas les veines de se dilater selon le VS et la pression sanguine.

**Figure 2. Structure comparée des vaisseaux sanguins**



*Source: Principes d'anatomie et de physiologie [5]*

### *B- Fonction*

L'endothélium n'est pas qu'une simple barrière qui sépare le sang des tissus sous-jacents [8]. C'est une monocouche cellulaire qui remplit un rôle de glande endocrine générant en permanence de nombreuses substances. En effet, elle relâche de façon constitutive ou suite à des stimulations des agents vasodilatateurs et vasoconstricteurs. Parmi les facteurs vasodilatateurs, on retrouve le NO, des dérivés de l'acide arachidonique tel que la prostacycline (PGI<sub>2</sub>) et le facteur hyperpolarisant dérivé de l'endothélium (EDHF). Il sécrète également un puissant vasoconstricteur, l'endothéline-1 (ET-1), mais également la thromboxane A<sub>2</sub> (TXA<sub>2</sub>), l'anion superoxyde ( $\cdot\text{O}^{2-}$ ) et l'angiotensine II (Ang II). De plus, elle contrôle le passage de nombreuses molécules et cellules entre le sang et les tissus sous-jacents. Dans certaines conditions, l'endothélium joue aussi un rôle important dans les processus inflammatoires de remodelage vasculaire et l'agrégation plaquettaire.

La tunique moyenne répond aux facteurs endothéliaux produits dans la tunique interne, mais également aux influx nerveux sympathiques provenant du centre vasomoteur pour le maintien de la PA. Les artères possédant une tunique moyenne beaucoup plus épaisse que les veines, elles peuvent absorber l'énergie cinétique lors de la contraction du ventricule gauche, ou systole, et reprendre leur forme en transmettant cette énergie pour maintenir le flot sanguin lors de la diastole.

### ***1.1.5- Mécanismes rénaux***

Le rein peut agir sur la PA systémique principalement par le contrôle du VS, mais aussi via la production de plusieurs substances vasoactives dont l'Ang II par l'activation du système rénine-angiotensine.

#### ***A- Physiologie rénale***

L'unité fonctionnelle du rein, le néphron, accomplit trois processus essentiels au maintien de l'équilibre électrolytique sanguin et à la production de l'urine : la filtration glomérulaire, la sécrétion tubulaire et la réabsorption tubulaire.

C'est au cours de la filtration glomérulaire que le plasma traverse la membrane de filtration du glomérule pour s'écouler dans le tubule. Chaque jour, c'est environ 180L de filtrat glomérulaire qui traverse cette membrane. De ces 180L, seulement 1 à 2 L seront excrétés sous forme d'urine. Les 99% restant seront réabsorbés pour retourner dans la circulation sanguine. Le débit de filtration glomérulaire (FG) est déterminé par trois facteurs: l'aire de la surface de filtration, la perméabilité de la membrane et la pression de filtration nette. La pression de filtration résulte de trois grandes pressions: la pression hydrostatique glomérulaire, la pression hydrostatique capsulaire ainsi que la pression oncotique. La première favorise la filtration glomérulaire tandis que les deux autres s'y opposent. La pression hydrostatique glomérulaire est la pression sanguine dans les capillaires glomérulaires et est d'environ 55 mm Hg. La pression hydrostatique capsulaire est la pression exercée par le liquide présent dans la chambre glomérulaire et est d'environ 15

mm Hg. La pression oncotique est reliée à l'osmolarité dû aux protéines plasmatiques tel que l'albumine. Cette pression d'environ 30 mm Hg s'oppose également à la filtration glomérulaire. La pression nette résultante de ces trois pressions est donc de 10 mm Hg en conditions normales. Cette pression est directement proportionnelle au débit de filtration glomérulaire.

La réabsorption tubulaire est essentielle pour récupérer les grandes quantités de filtrat glomérulaire. Ce mécanisme débute dès que le filtrat glomérulaire atteint le tubule contourné proximal. Elle est principalement faite dans cette portion du tubule mais également dans tout le long du tubule rénal et collecteur. L'eau et un grand nombre de solutés sont ainsi retournés dans la circulation sanguine par des mécanismes de réabsorption active et passive.

La sécrétion tubulaire, quant à elle, permet l'élimination d'ions  $H^+$  et de déchets sanguins du sang vers le liquide tubulaire. En effet, la sécrétion tubulaire permet d'éliminer des substances qui ne se trouvent pas déjà dans le filtrat ou qui ont été réabsorbées de façon passive et de réguler le pH sanguin.

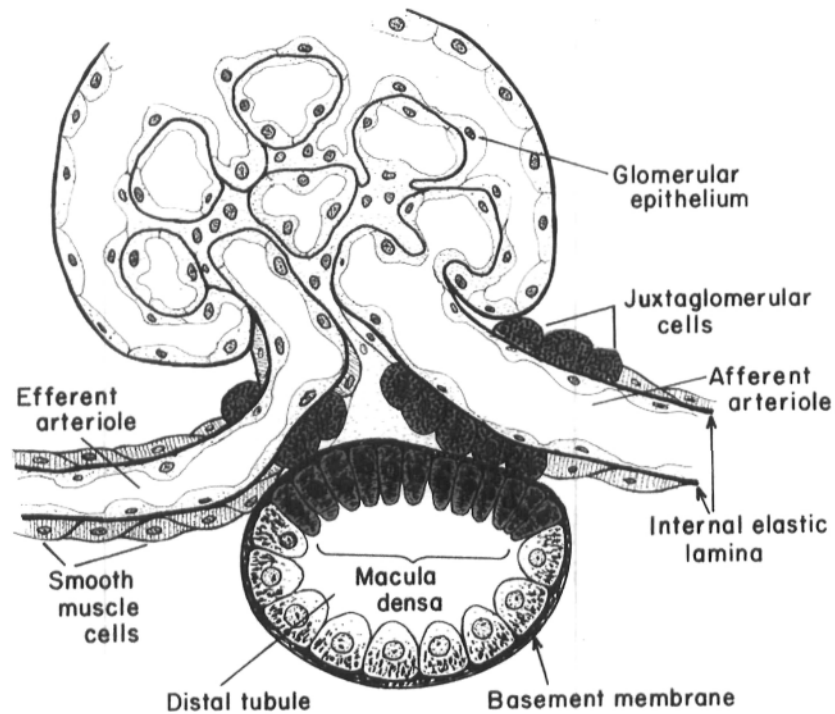
### *B- Contrôle du volume sanguin*

L'autorégulation rénale est essentielle au maintien de la FG malgré les variations de PA. Ce phénomène agirait selon deux mécanismes: l'autorégulation vasculaire myogène et la rétroaction tubulo-glomérulaire. L'autorégulation vasculaire myogène est la tendance des artérioles rénales à se contracter ou se dilater selon la PA systémique, permettant à la pression glomérulaire de rester constante malgré les variations de pression systémique. La rétroaction tubulo-glomérulaire implique l'appareil juxtaglomérulaire qui est constitué des cellules juxtaglomérulaires des artérioles afférentes et efférentes ainsi que de la macula densa (figure 3). La macula densa est la couche de cellules épithéliales de la portion du tubule distal qui est située à proximité des artérioles. Ces cellules sont plus denses que dans les autres tubules et leurs appareils de Golgi sont dirigés vers l'extérieur plutôt que vers la lumière tubulaire comme dans les autres cellules du tubule. La *macula densa* détecte les



modifications de concentration en sodium et module la contraction des artérioles rénales pour rétablir le débit de FG.

**Figure 3. Appareil juxtaglomérulaire**



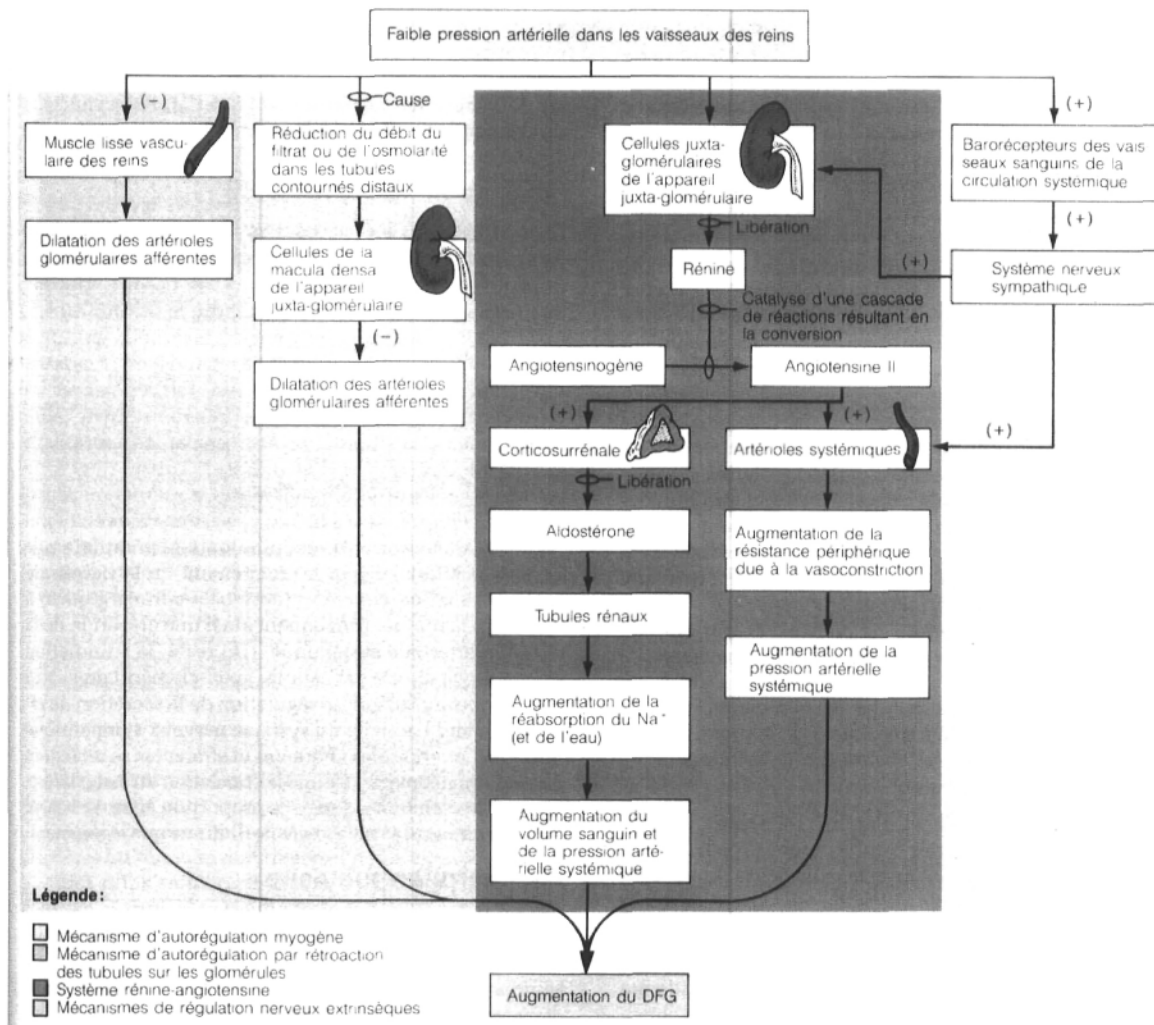
*Source: Textbook of medical physiology [9]*

Les vaisseaux sanguins du rein sont aussi innervés et réagissent aux influx du système nerveux autonome. Les artérioles glomérulaires possèdent de nombreux récepteurs  $\alpha$ -adrénergiques qui médient la vasoconstriction du muscle lisse par la noradrénaline. Lors d'une vasoconstriction de ces vaisseaux, le débit de FG diminue entraînant une diminution de la production d'urine, une augmentation du VS et donc une augmentation de la PA.

### *C- Système rénine angiotensine aldostérone*

Une baisse de la PA et du débit sanguin rénal entraîne la production de rénine par les cellules juxtaglomérulaires du rein (figure 4). La rénine circulante clive l'angiotensinogène provenant du foie pour produire l'angiotensine I (Ang I). L'Ang I est par la suite converti en Ang II par l'enzyme de conversion de l'angiotensine (ECA) présente à la surface des cellules endothéliales. L'Ang II induit une vasoconstriction des artérioles, une augmentation de la réabsorption d'eau et de sodium et stimule la sécrétion d'aldostérone par les corticosurrénales. L'aldostérone entraîne une diminution de l'excrétion d'eau et de sodium. L'Ang II stimule aussi la libération de l'ADH de la neurohypophyse qui favorise la réabsorption d'eau. Tous ces effets mènent à l'augmentation de la PA par l'augmentation du VS et de la RP.

**Figure 4. Mécanismes de régulation du débit de filtration glomérulaire**



Source : Anatomie et physiologie humaine [10]

+ : stimulation

- : inhibition

## **1.2- Hypertension artérielle**

### ***1.2.1- Définition***

L'hypertension artérielle est une élévation anormale et persistante de la PA. Une pression normale correspond à une pression systolique de 120 mm Hg et à une pression diastolique de 80 mm Hg (120/80). Une PA plus élevée que 140/90 est considérée comme étant de l'hypertension. L'hypertension constitue le principal facteur de risque de maladie cardiovasculaire [1]. En effet, l'hypertension peut entraîner des accidents vasculaires cérébraux, des infarctus du myocarde ainsi que de l'insuffisance cardiaque et rénale. L'hypertension porte bien son nom de « tueur silencieux » puisqu'elle présente un haut risque pour la santé et peu de symptômes.

### ***1.2.2- Causes***

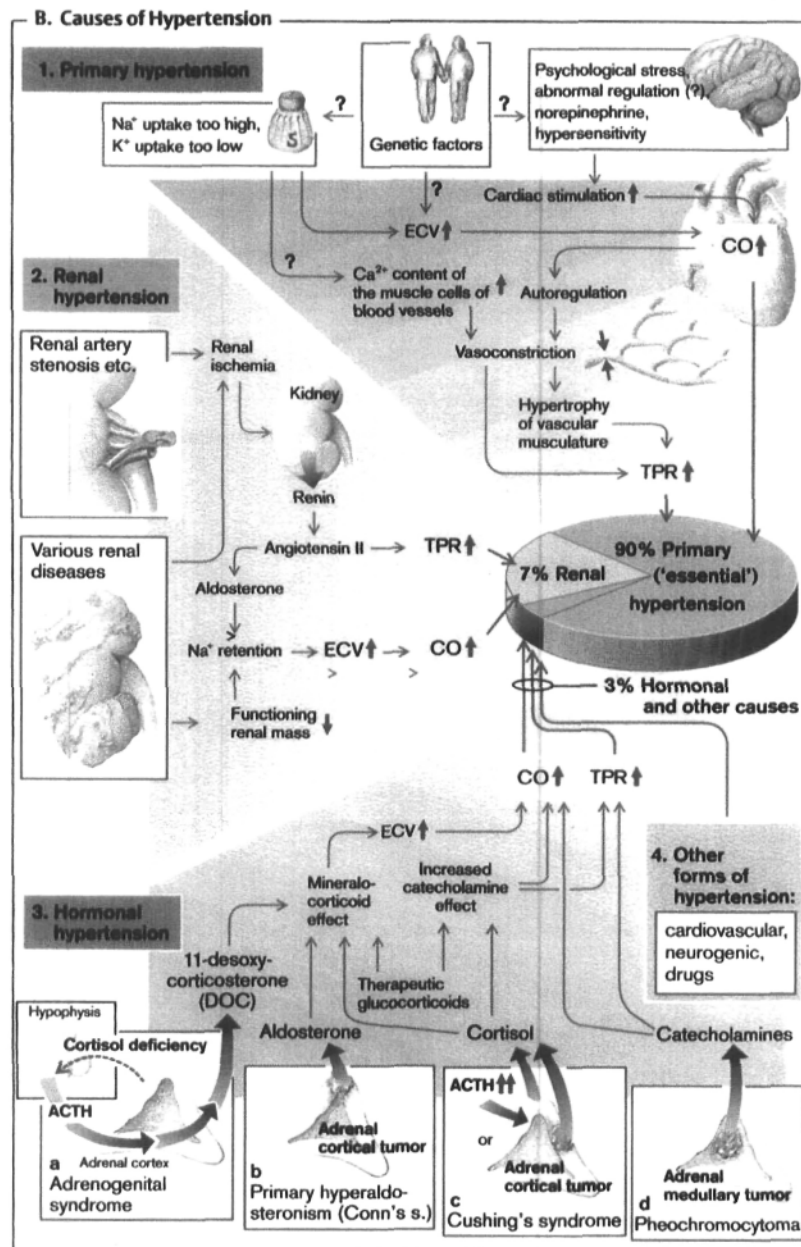
90 à 95 % des cas d'hypertension artérielle sont de causes imprécises, appelées hypertension essentielle ou primaire, tandis que les 5 à 10 % restant sont des cas d'hypertension secondaire, c'est-à-dire de causes connues (figure 5).

L'hypertension essentielle est avant tout de cause héréditaire [11]. Cependant, les facteurs environnementaux et les habitudes de vie peuvent contribuer à accentuer la susceptibilité héréditaire (figure 5, partie 1). Par exemple, le stress et l'alimentation peuvent être des facteurs aggravants de l'hypertension artérielle. La consommation de sel dans les pays industrialisés peut accélérer le développement de l'hypertension surtout chez les personnes sensibles génétiquement.

L'hypertension artérielle est dite secondaire lorsque l'on peut identifier une cause autre qu'héréditaire. L'hypertension secondaire est souvent causée par des maladies rénales (figure 5, partie 2) dont l'IRC qui sera discutée plus loin dans ce mémoire. Parmi les autres étiologies, on peut compter les causes hormonales et neuronales (figure 5, partie 3 et 4). Par exemple, une tumeur des corticosurrénales peut entraîner une augmentation inappropriée de

la relâche d'aldostérone (hyperaldostéronisme primaire) et donc de la rétention d'eau et de sel.

Figure 5. Causes of hypertension



Source: Color Atlas of Pathophysiology [12]

### ***1.2.3- Conséquences***

L'hypertension artérielle augmente significativement le taux de mortalité. C'est un facteur de risque majeur de maladie cardiovasculaire. Elle cause des dommages importants aux organes cibles dont les vaisseaux sanguins, les reins, le cœur et le cerveau. L'hypertension entraîne l'épaississement de la tunique moyenne des vaisseaux sanguins, augmente la résistance périphérique et permet la progression de l'athérosclérose. La paroi des vaisseaux rénaux s'épaissit également entraînant une augmentation de la résistance rénale et une diminution du débit sanguin rénal qui stimule le système rénine-angiotensine. Au niveau du cœur, l'hypertension entraîne l'hypertrophie du ventricule gauche qui augmente les risques de maladies coronariennes et d'infarctus du myocarde. La forte PA peut causer la rupture d'artères cérébrales et des accidents vasculaires cérébraux.

## **1.3- Insuffisance rénale chronique**

### ***1.3.1- Étiologie***

L'IRC est une diminution ou un arrêt complet de la FG. Elle peut résulter de la progression irréversible de plusieurs maladies rénales, dont le diabète, la glomérulonéphrite chronique, la pyélonéphrite, la polykystose rénale et l'obstruction du tractus urinaire. Ces pathologies entraînent la destruction des néphrons et mènent à l'insuffisance rénale terminale, condition qui nécessite la suppléance rénale (dialyse ou transplantation). Selon le Registre Canadien des Insuffisances et des Transplantations d'Organes (RCITO)[13], le nombre de patients en IRT a augmenté de 55% en 2002 comparativement à l'année 1993 et cette augmentation est comparable à celle de plusieurs pays.

### ***1.3.2- Fonction rénale normale et l'IRC***

En conditions normales, le rein maintient l'équilibre des liquides de l'organisme par la FG et la formation de l'urine. Pour ce faire, le rein remplit plusieurs fonctions : la régulation de la composition ionique du sang, le maintien de l'osmolarité sanguine, la régulation du VS, la régulation de la PA, la régulation du pH sanguin, la libération d'hormones et l'excrétion des déchets métaboliques et des substances toxiques.

Lors d'IRC, le manque de néphron fonctionnel entraîne une diminution de la FG et donc une accumulation des déchets sanguins, dont l'urée et la créatinine. Les néphrons restants deviennent rapidement surchargés. Ils augmentent de 50 à 100 % leur volume de filtrat glomérulaire sans toutefois répondre à la demande. La sécrétion ainsi que la réabsorption tubulaire sont également affectées. Le rein est alors dans l'incapacité de remplir ses fonctions normales.



### ***1.3.3- Conséquences***

#### ***A- Hypertension***

La diminution du débit de FG et la rétention d'eau et d'électrolytes entraînent une augmentation du volume extracellulaire et donc une augmentation de la PA systémique. En IRC, certaines portions du rein peuvent devenir ischémiques suite à une forte vasoconstriction des artérioles et à certains dommages vasculaires rénaux tels que de l'athérosclérose. Cette condition s'accompagne souvent d'une surproduction de rénine et donc d'Ang II et d'aldostérone qui augmentent la rétention d'eau et de sel dans les parties non-ischémiques du rein.

#### ***B- Anémie***

En conditions normales, les cellules péri-tubulaires du rein sont productrices d'érythropoïétine (EPO), une hormone qui intervient dans le développement des globules rouges. Lors d'IRC, la fibrose interstitielle rend le rein incapable de produire suffisamment d'EPO, menant à une diminution de la production de globules rouges par la moelle osseuse et donc à de l'anémie.

#### ***C- Urémie***

Les produits de dégradation des protéines tels que l'urée, l'acide urique et la créatinine sont normalement éliminés de l'organisme pour permettre un métabolisme normal des protéines. En IRC, suite à la diminution de la FG, le rein est incapable d'éliminer efficacement de certaines substances dont la concentration sanguine augmente considérablement. Plus particulièrement, le taux d'urée peut être augmenté jusqu'à dix fois le taux normal.

### *D- Désordres électrolytiques et acido-basiques*

Le rein est également impliqué dans l'équilibre électrolytique des fluides corporels. Une altération de cette fonction en IRC cause l'accumulation d'électrolytes et de déchets métaboliques dans le sang. Une augmentation du taux de calcium sanguin, l'hypercalcémie, inhibe le système nerveux central et périphérique. Une élévation de la concentration sanguine de calcium et de phosphate cause la calcification de plusieurs tissus, dont les tubules rénaux. Une altération de l'élimination des ions  $H^+$  produit par le métabolisme et une de la réabsorption du bicarbonate essentiel au maintien du pH sanguin cause de l'acidose métabolique. Cette acidose inhibe également le système nerveux central et peut mener au coma et à la mort.

Tous ces changements physiopathologiques ont des répercussions sur la réactivité et la fonction des différentes composantes des vaisseaux, et plus particulièrement sur l'endothélium.

## 1.4- Dysfonction endothéliale

### 1.4.1- Généralités

La dysfonction endothéliale est caractérisée par un déséquilibre dans la production et la relâche des facteurs vasoactifs tels que l'ET-1 et le NO. Ces changements pathologiques peuvent altérer plusieurs fonctions importantes de l'endothélium, dont la réactivité et la perméabilité vasculaires, la prolifération des cellules musculaires lisses, l'agrégation plaquettaire et l'adhésion des cellules immunitaires. En plus de l'insuffisance rénale, plusieurs pathologies et facteurs de risque sont associés à la dysfonction endothéliale (tableau 1).

**Tableau 1. Facteurs de risque et pathologies associés à une dysfonction endothéliale**

---

Diabète
Hypertension artérielle systémique
Hypertension artérielle pulmonaire
Hyperlipidémie
Hyperhomocystéinémie
Obésité
Tabagisme
Athérosclérose
Ischémie/reperfusion
Choc hémorragique
Insuffisance cardiaque
Insuffisance rénale
Transplantation

---

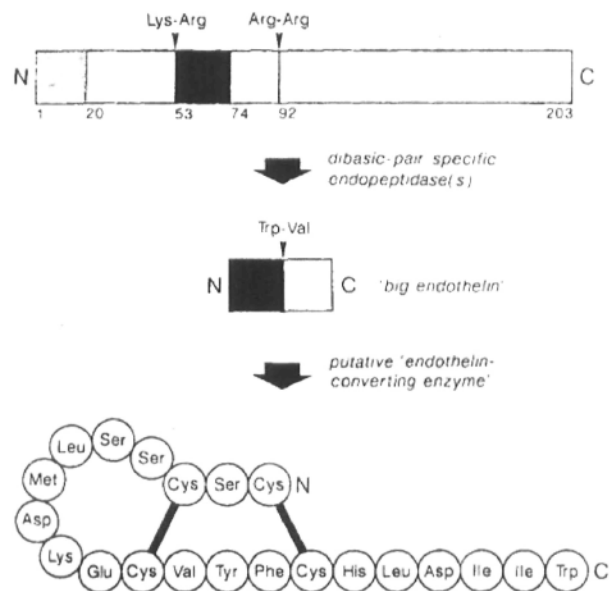
*Source: Biologie et pathologie du cœur et des vaisseaux [8]*

### ***1.4.2- Endothéline-1***

#### *A- Structure et production*

L'ET a été décrite pour la première fois par Yanagisawa en 1988 [14]. Ce dernier isola ce peptide du milieu de culture de cellules endothéliales d'aortes de porcs. L'ET fait partie d'une famille de trois isoformes : ET-1, ET-2 et ET-3. L'ET-1 est produite principalement dans les cellules endothéliales mais peut aussi être produite dans les cellules musculaires lisses, mésangiales et épithéliales. Elle est également produite dans différents tissus, dont le rein, le poumon, le système nerveux central, le cœur, le placenta et le tractus gastro-intestinal. L'ET-2 est produite presque exclusivement dans le système intestinal, alors que l'ET-3 est produite dans plusieurs tissus mais en quantité moindre que l'ET-1. Le gène de l'ET-1 code pour une protéine de 203 acides aminés, la prépro-ET-1, qui est clivée par une endopeptidase spécifique en big-ET-1, un peptide inactif (figure 6). L'enzyme de conversion de l'endothéline (ECE) clive ensuite ce précurseur en ET-1, cytokine active de 21 acides aminés.

**Figure 6. Biosynthèse de l'ET-1**



*Source: Yanagisawa, 1988 [14]*

Les cellules endothéliales produisent constitutivement l'ET-1, quoique cette production puisse être modulée par de nombreux facteurs tels que des hormones, des médiateurs de l'inflammation, des facteurs de croissance, des facteurs de la coagulation et d'autres (tableau 2).

**Tableau 2. Facteurs qui stimulent ou inhibent la transcription et/ou la sécrétion d'ET-1 in vitro.**

Stimulateurs	Inhibiteurs
Hormones	
Angiotensine II Vasopressine Bradykinine Endothéline-1 Epinéphrine Insuline Glucocorticoïdes Prolactine	Facteur natriurétique auriculaire (ANP) Facteur natriurétique cérébral (BNP) Bradykinine
Médiateurs de l'inflammation	
Endotoxine Interleukine-1 TNF (tumor necrosis factor)	
Facteurs de croissance	
EGF (Epidermal growth factor) ILGF (Insulin-like growth factor) TGF-B (Transforming growth factor-B)	
Facteurs de coagulation	
Thrombine Tromboxane A2 TPAF (Tissu plasminogen activating factor)	Héparine Prostacycline
Autres	
Ionophore Ca <sup>2+</sup> Hypoxie Force de cisaillement LDL oxydé Phorbol ester L-NMMA/bleu de méthylène	Activateurs de la protéine kinase A Monoxyde d'azote Inhibiteur de ACE

Source: adapté de AJ King, 1995 [15]

### *B- Récepteurs*

L'ET agit par l'entremise de deux récepteurs: ET<sub>A</sub> et ET<sub>B</sub>. Le récepteur ET<sub>A</sub> lie plus spécifiquement l'ET-1 que les autres isoformes de l'ET tandis que le récepteur ET<sub>B</sub> lie les trois isoformes avec la même affinité. On retrouve ces deux types de récepteurs dans de nombreux organes, dont le cerveau, le poumon, le rein, le cœur, les intestins, le placenta et les vaisseaux sanguins. Ces deux récepteurs font partie de la famille des récepteurs à sept domaines transmembranaires couplés aux protéines G.

### *C- Effets vasculaires*

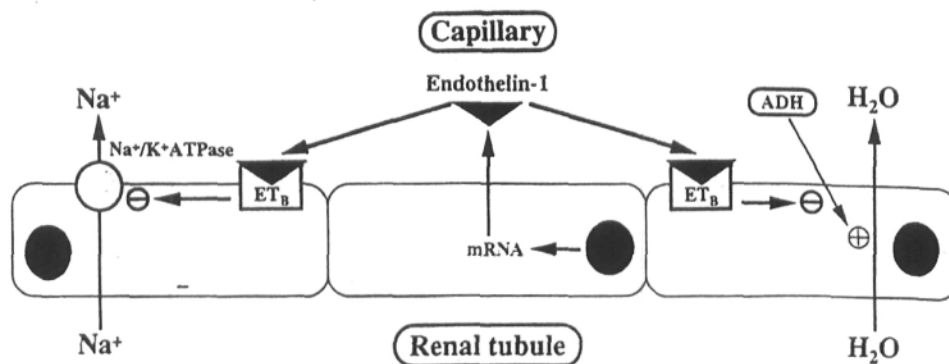
Dans la paroi vasculaire, l'ET-1 produite par les cellules endothéliales est sécrétée du côté basolatéral de l'endothélium, suggérant un effet paracrine et autocrine sur les cellules musculaires lisses et l'endothélium [21]. Les deux types de récepteur à l'ET sont présents dans le système vasculaire [16-18] (tableau 3). Le récepteur ET<sub>A</sub> est exprimé dans les cellules musculaires lisses, mais non dans l'endothélium, tandis que le récepteur ET<sub>B</sub> est exprimé principalement dans les cellules endothéliales et plus faiblement dans le muscle lisse vasculaire selon l'espèce ou le type de vaisseau. L'effet contracteur de l'ET-1 se fait via les récepteurs ET<sub>A</sub> et ET<sub>B</sub> présents sur les cellules musculaires lisses. Cet effet est contrebalancé par la stimulation des récepteurs ET<sub>B</sub> des cellules endothéliales qui entraîne la vasodilatation via la relâche de NO [19] et de PGI<sub>2</sub> [20]. En effet, l'injection d'ET-1 chez le rat anesthésié entraîne tout d'abord une baisse transitoire de PA suite à une vasodilatation endothélium-dépendante suivie d'une augmentation de la pression qui dépend de la concentration d'ET-1 [14, 20]. La courte durée de la vasodilatation est probablement causée par l'internalisation rapide du complexe ET-1-ET<sub>B</sub>. Le récepteur ET<sub>B</sub> est responsable de la clairance de l'ET-1 circulante [22, 23]. En effet, le complexe ET-1-ET<sub>B</sub> est internalisé et dégradé par les lysosomes surtout au niveau de la circulation pulmonaire et rénale. La demi-vie de l'ET-1 étant courte, de 1 à 7 minutes, son action vasoconstrictrice prolongée serait causée par la liaison irréversible avec les récepteurs ET<sub>A</sub> dû à leurs grandes affinités [15].

L'ET-1 possède également des propriétés pro-angiogéniques en stimulant la croissance et la prolifération des cellules endothéliales, musculaires lisses et mésangiales. L'ET-1 aurait donc un rôle à jouer dans le remodelage vasculaire.

#### D- Effets rénaux

Dans le rein, L'ET-1 est produite par l'endothélium vasculaire ainsi que par les cellules mésangiales et épithéliales glomérulaires et tubulaires. Le rein est également riche en récepteurs  $ET_A$  et  $ET_B$ . L'ET-1 module la régulation de l'hémodynamie rénale due à ses propriétés vasoactives, et l'excrétion hydrosodée par son action sur les cellules épithéliales tubulaires [24] (tableau 3). L'ET-1 cause la vasoconstriction des vaisseaux rénaux via les récepteurs  $ET_A$  et cette dernière est contrebalancée par la relâche de NO et de  $PGI_2$  via l'activation des récepteurs  $ET_B$ . L'ET-1 a également un effet diurétique et natriurétique sur le rein médié principalement par le récepteur  $ET_B$ . Une équipe de recherche a démontré que des rats déficients en récepteurs  $ET_B$  présentent une diminution de la sécrétion rénale de sodium [25]. L'ET-1 inhibe les transporteurs  $Na^+K^+$ -ATPases des tubules proximaux et collecteurs, d'où son effet natriurétique (figure 7). L'ET-1 inhibe également l'effet de l'ADH sur la réabsorption d'eau dans les cellules épithéliales du tubule collecteur.

**Figure 7. Effet de l'ET-1 sur la réabsorption d'eau et de sodium par le tubule rénal**



Source: Haynes 1998 [26]



L'ET-1 provoque la contraction et la prolifération des cellules mésangiales qui expriment les récepteurs de l'ET-1 et produisent de façon constitutive de l'ET-1. Cet effet est associé à une diminution du diamètre des capillaires ainsi que de leur perméabilité menant à une diminution du débit de FG. L'ET-1 peut aussi stimuler le système rénine-angiotensine-aldostérone.

**Tableau 3. Action de l'ET-1 sur le système vasculaire et le rein**

Effet de l'ET-1 sur le système vasculaire	
Récepteur ET <sub>A</sub>	Récepteur ET <sub>B</sub>
Vasoconstriction	Vasoconstriction
Augmentation de la rigidité artérielle	Vasodilatation endothélium-dépendante
Dysfonction endothéliale	Clairance de l'ET-1
Inflammation	
Athérosclérose	
Hypertrophie cardiaque	

Effet de l'ET-1 sur le rein	
Récepteur ET <sub>A</sub>	Récepteur ET <sub>B</sub>
Vasoconstriction rénale	Vasodilatation rénale
Vasoconstriction corticale	Vasodilatation médullaire
Contraction des artérioles afférentes	Contraction des artérioles afférentes
Dilatation des artérioles efférentes	Dilatation des artérioles efférentes
Contraction des cellules mésangiales	Natriurèse
Prolifération des cellules mésangiales	
Accumulation de la matrice extracellulaire	
Fibrose interstitielle	

Source: adapté de Daunh, 2006 [27]

### *E- ET-1 en insuffisance rénale*

L'altération du système ET-1 est impliquée dans la dysfonction endothéliale et l'hypertension en IRC [24]. Nous avons démontré dans notre laboratoire une augmentation de la production d'ET-1 dans l'aorte ainsi que dans les artères mésentériques et préglomérulaires de rats en insuffisance rénale et que cette augmentation est reliée à l'augmentation de la PA dans cette condition [28, 29]. Ces changements sont observés malgré une concentration plasmatique d'ET-1 normale ou faiblement élevée chez ces

animaux. La concentration plasmatique d'ET-1 est pourtant plus élevée chez les patients dialysés que chez les personnes saines [30]. L'ET-1 étant relâchée du côté basolatéral des cellules endothéliales [21], on peut croire que la concentration plasmatique d'ET-1 n'est pas nécessairement représentative de la production endothéliale de ce puissant vasoconstricteur. De plus, L'ET-1 plasmatique est rapidement éliminée par le rein et le poumon permettant ainsi de maintenir la concentration plasmatique faible.

Morris et al. [31] ont montré que la vasoconstriction à l'ET-1 est augmentée et que la vasodilatation à l'ACh est atténuée dans les vaisseaux sous-cutanés des patients souffrants d'IRC. L'excrétion urinaire d'ET-1 est augmentée en IRC. Il a également été démontré dans notre laboratoire que l'excrétion urinaire d'ET-1 corrèle avec le degré d'insuffisance rénale et de sclérose glomérulaire [29]. Enfin, l'administration d'antagoniste du récepteur ET<sub>A</sub> prévient l'augmentation de la PA systolique, l'hypertrophie cardiovasculaire ainsi que la diminution de la fonction rénale confirmant un rôle important pour l'ET-1 dans cette pathologie [28].

### ***1.4.3- Monoxyde d'azote***

#### ***A- Biosynthèse***

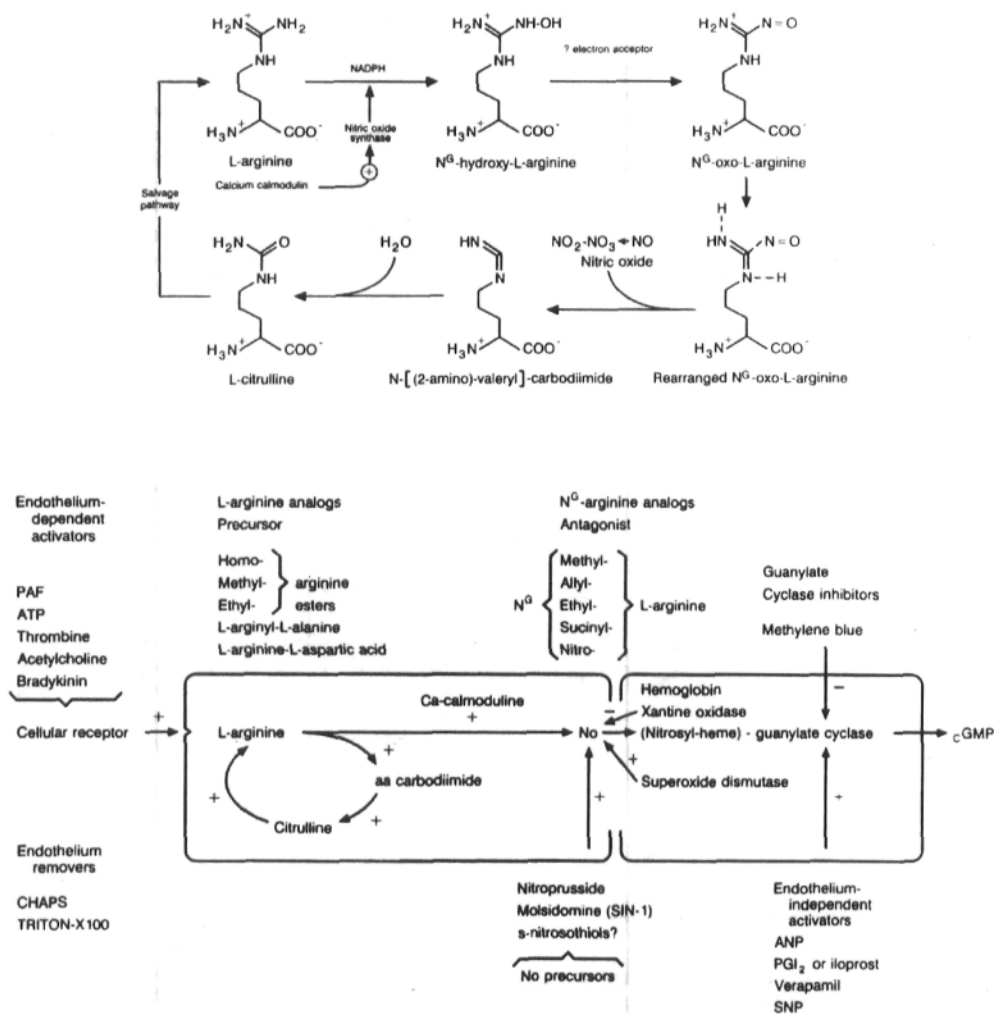
En 1980, Furchgott et al. [32] démontrèrent que l'ACh produit une relaxation endothélium-dépendante via les récepteurs muscariniques. Cette relaxation est causée par la relâche d'une substance vasodilatatrice alors inconnue. Ce n'est que plus tard que cette substance fût identifiée comme étant du NO formé à partir de la L-arginine par une NO synthase (NOS) dans les cellules endothéliales vasculaires [33].

Il existe trois isoformes de NOS : la NOS neuronale (nNOS), la NOS inductible (iNOS) ainsi que la NOS endothéliale (eNOS) [34]. Tous ces isoformes synthétisent le NO de la même façon à partir de L-arginine (figure 8). La nNOS fût tout d'abord nommée ainsi suite à sa découverte dans les tissus nerveux. Il est maintenant connu que cet isoforme est exprimé dans d'autres tissus que le système nerveux central et périphérique. La production

de NO par la nNOS est stimulée par une augmentation de  $\text{Ca}^{2+}$  dans les terminaisons nerveuses. Elle est responsable de la dilatation du muscle lisse des artères cérébrales. L'expression de la iNOS a été démontrée dans toutes les cellules du système cardiovasculaire ainsi que dans les cellules inflammatoires. La iNOS est induite dans les macrophages, les neutrophiles, les cellules endothéliales et les cellules musculaires lisses pour entraîner une réponse inflammatoire suite à l'exposition à certaines cytokines et endotoxines. Enfin, la eNOS est l'isoforme que l'on retrouve dans les cellules endothéliales et qui est responsable en grande partie de la production vasculaire de NO.

Dans l'endothélium vasculaire, le NO est synthétisé lors de la transformation de L-arginine en L-citrulline par la eNOS (figure 8). Plusieurs cofacteurs sont nécessaires à la biosynthèse du NO: le NADPH (reduced nicotinamide-adenine-dinucleotide phosphate), le FAD (flavin adenine dinucleotide), le FMN (flavin mononucleotide) et le  $\text{BH}_4$  ((6R)-5,6,7,8-tetrahydrobiopterin). De plus, la eNOS a besoin de calcium et de calmoduline pour être activée. Le NO diffuse rapidement à travers la membrane de la cellule endothéliale où il stimule la production de guanosine monophosphate cyclique (GMPc) par la guanylate cyclase des cellules musculaires lisses. Le GMPc entraîne alors la dilatation du muscle lisse et donc la vasodilatation. Le NO agit rapidement et son action est de courte durée puisque sa demi-vie n'est que de quelques secondes.

Figure 8. Biosynthèse du NO et action sur les cellules musculaires lisses



Source: Romero, 1992 [35]

### B- Effets vasculaires

La eNOS produit du NO de façon constitutive dans les cellules endothéliales. Cette production peut par contre être régulée par plusieurs facteurs comme l'augmentation des forces de cisaillement sur les cellules endothéliales ou la liaison de certains agonistes à leurs récepteurs tels que l'ACh et la bradykinine [36]. Elle serait donc la principale responsable de la production de NO visant au maintien de la RP et donc de la PA

systémique. Son action sert à contrebalancer l'action de facteurs vasoconstricteurs tels que l'ET-1 et l'AngII ainsi que le système nerveux sympathique. L'administration d'un inhibiteur de la synthèse du NO entraîne une élévation de pression sanguine chez le rat [37]. De plus, des souris dont le gène de la eNOS est inactivé développent de l'hypertension [38].

En plus de ces effets sur la vasodilatation vasculaire, le NO a un effet protecteur sur le système sanguin en diminuant l'agrégation plaquettaire et en inhibant la synthèse de PDGF (platelet-derived growth factor). Ce dernier stimule la prolifération des cellules musculaires. Le NO régule également l'expression de gènes impliqués dans l'athérosclérose. De plus, par la stimulation de la production de GMPc, le NO inhibe la synthèse d'ADN, la mitose et la prolifération des cellules musculaires lisses.

La nNOS serait également impliquée dans le maintien de la PA [39]. En effet, la production de NO dans le système nerveux inhibe la stimulation du système nerveux sympathique sur le système vasculaire. De plus, la plupart des vaisseaux sanguins sont innervés par des cellules nerveuses produisant du NO. Cette stimulation nerveuse viendrait contrer la stimulation par le système nerveux sympathique. Cette fonction de la nNOS serait, par contre, beaucoup moins importante que celle de la eNOS.

### *C- Effets rénaux*

Le NO agit également sur la circulation sanguine par des actions rénales. Son action sur les artérioles afférentes est d'une grande importance pour le maintien de la pression sanguine rénale et le débit de FG. L'administration intra-veineuse de L-NAME, un inhibiteur de la synthèse du NO, diminue le débit sanguin rénal et la FG chez le rat normal [43]. À des doses plus élevées, la PA est augmentée et on peut observer une augmentation de la pression et des dommages glomérulaires [44]. Des expérimentations animales démontrent également un effet inhibiteur du NO sur la synthèse de rénine dans l'appareil juxtaglomérulaire [45] et que le NO produit par la macula densa permet la vasodilatation des artérioles afférentes et donc le contrôle de la FG [46].

Le NO contribue également à l'excrétion hydrosodée. En effet le NO est essentiel à plusieurs transporteurs tubulaires pour l'excrétion et la réabsorption de plusieurs molécules, dont le sodium et les bicarbonates.

#### *D- Monoxyde d'azote et insuffisance rénale chronique*

La production de NO en IRC demeure encore aujourd'hui controversée autant au niveau rénal que vasculaire. La relaxation endothélium-dépendant et indépendant semble altérée en IRC [51, 52]. Chez le rat rendu urémique par néphrectomie 5/6, nous avons montré que l'excrétion urinaire de  $\text{NO}_2$  et  $\text{NO}_3$ , les métabolites stables du NO, est diminuée [49], ce qui suggère une diminution de la production rénale de NO. Une équipe de recherche a également observé une diminution de l'expression de la iNOS et de la eNOS dans le rein et l'aorte de rat avec masse rénale réduite par résection de pôles [48]. Une étude menée sur des rats avec une masse rénale réduite par ligature montre une production de NO diminuée dans le rein et augmentée dans la circulation systémique [50].

La dysfonction endothéliale a souvent été associée à une diminution de la production de NO. Cette diminution peut être expliquée soit par une diminution de l'activité de la eNOS, par des inhibiteurs endogènes ou exogènes, par un manque de précurseurs ou de cofacteurs nécessaires à la synthèse du NO, ainsi que par la diminution de la biodisponibilité du NO [40]. Ces mécanismes causent la diminution de la relaxation endothélium-dépendante. Les espèces réactives de l'oxygène (ROS), tels que  $\text{l}^{\bullet}\text{O}^{2-}$ , réagissent avec le NO pour former du peroxy-nitrite, diminuant ainsi la biodisponibilité du NO. De plus, cette molécule proathérogénique cause la dégradation d'un cofacteur essentiel à la eNOS, le  $\text{BH}_4$ . L'asymétrique diméthyl arginine (ADMA) est un inhibiteur compétitif endogène de la eNOS associé à la dysfonction endothéliale. Il cause la diminution de la production de NO par les cellules endothéliales. Il a été démontré chez des patients hyperlipidémiques que le taux d'ADMA est inversement proportionnel à la relaxation endothéliale-dépendante [41]. Cette molécule semble être un important facteur de risque de maladies cardiovasculaires [42].

Par ailleurs, l'accumulation d'ADMA dans le plasma pourrait être responsable de la diminution de la biodisponibilité du NO en IRC [53]. Une expérience menée sur des cellules endothéliales montre que l'incubation avec du plasma provenant de patients en IRC chronique entraîne l'inhibition de la eNOS liée à une augmentation du taux d'ADMA [54]. Enfin, la présence de ROS peut également être responsable de la diminution de la biodisponibilité du NO en IRC.

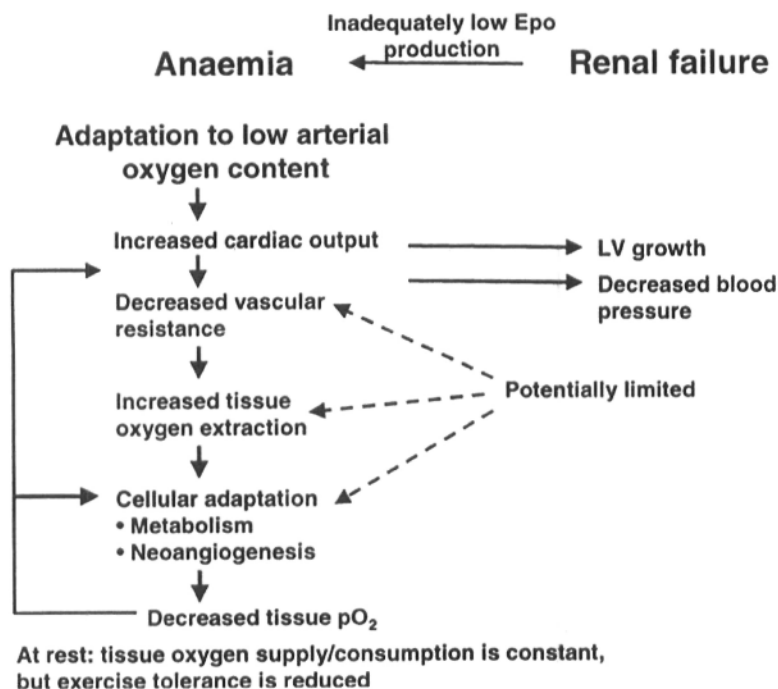
## **1.5- Traitement de l'anémie en IRC**

### ***1.5.1- Généralités***

Tel que mentionné au chapitre 1.3.3.B, presque tous les patients souffrants d'IRC développent de l'anémie suite à une réduction de la production rénale d'EPO. L'anémie entraîne plusieurs conséquences dont la diminution de la quantité d'oxygène dans le sang et les tissus et une déficience au niveau du système immunitaire [55] (figure 9). Les principaux symptômes sont la fatigue, l'incapacité à faire de l'exercice, une diminution des facultés cognitives et des dysfonctions sexuelles. L'organisme développe plusieurs mécanismes de compensation pour contrer ces conséquences tels que l'augmentation du débit cardiaque et de l'extraction de l'oxygène de l'hémoglobine, la modification de la distribution sanguine et l'adaptation cellulaire. Lorsque tous ces mécanismes sont saturés, le manque d'oxygène entraîne des dommages tissulaires. En IRC, le DC est augmenté, ce qui entraîne à long terme une hypertrophie du ventricule gauche qui est un risque d'insuffisance cardiaque. L'arrivée de l'EPO recombinante humaine (rhEPO) dans le traitement de l'anémie en IRC a grandement contribué à l'amélioration de la qualité de vie de ces patients tout en diminuant les besoins de transfusions et les risques de transmissions infectieuses (Hépatites, VIH).



**Figure 9. Conséquences cliniques de l'anémie**



Source: Eckart, 2001[55]

### 1.5.2- L'Érythropoïétine

#### A- Production et régulation

L'EPO est une glycoprotéine de 34 kDa formée de 192 acides aminés produite principalement par les cellules péritubulaires du rein et qui régule la formation des globules rouges [56]. Son expression est régulée par le taux d'oxygène sanguin. Lors d'hypoxie, le facteur de transcription HIF-1 augmente l'expression d'EPO pour ainsi rétablir la quantité de globules rouges et la concentration d'oxygène [57].

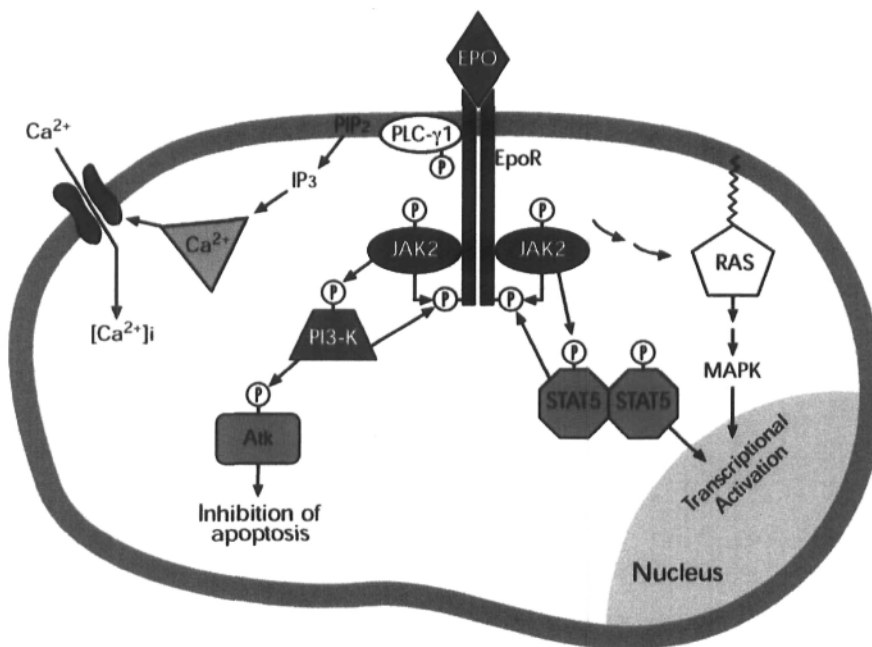
#### B- Récepteur et modes d'action

Le récepteur à l'EPO (EPOR) est principalement exprimé par les cellules érythrocytaires de la moelle osseuse à certains stades précis de leur développement. Les globules rouges

matures n'expriment pas ce récepteur. Il a été également montré que les cellules endothéliales vasculaires expriment l'EPOR [58]. Leur expression serait régulée par l'hypoxie tout comme la relâche de l'EPO [59].

Ce récepteur est un dimère de 66 à 78 kDa qui appartient à la superfamille des récepteurs des cytokines. La liaison de l'EPO à son récepteur entraîne sa dimérisation, ce qui induit la phosphorylation des protéines JAK2 [60] (figure 10). JAK2 phosphoryle à son tour l'EPOR, ce qui active de nombreux médiateurs de la signalisation tels que STAT5 et la voie des MAP kinases qui permettent la transcription de gènes au noyau. L'activation de l'EPOR provoque l'entrée de calcium dans la cellule via  $PIP_2$  et  $IP_3$ . L'activation de la voie PI3-kinase provoque l'inhibition de l'apoptose.

**Figure 10. Signalisation du récepteur à l'EPO**



Source: Smith 2003[61]

### ***1.5.3- Effet de l'rhEPO sur la PA***

L'rhEPO corrige efficacement l'anémie en IRC mais a comme effet secondaire d'augmenter la PA chez la plupart des patients [62-64]. Cette augmentation de la PA n'est observée que chez les patients atteints d'IRC. En effet, l'administration d'rhEPO en conditions normales n'entraîne pas d'augmentation de la PA [65, 66]. L'rhEPO augmente la PA chez les rats rendus urémiques par néphrectomie 5/6 et n'a aucun effet hypertenseur chez les animaux sains [67]. Les mécanismes par lesquels l'rhEPO augmente la pression en IRC ne sont pas encore élucidés mais certains phénomènes ont été postulés, dont l'augmentation de la viscosité de sang, l'altération de la vasodilatation endothélium dépendante et l'augmentation de la résistance périphérique [68]. Cependant, il a déjà été démontré que l'augmentation de l'hématocrite n'était pas responsable de l'effet hypertenseur de l'rhEPO [69]. L'effet de l'rhEPO sur la réactivité vasculaire demeure incertain, mais la présence de récepteurs sur les cellules endothéliales nous permet de croire que l'endothélium est une cible potentielle de l'rhEPO. L'rhEPO semblerait aussi avoir un effet direct sur la vasoconstriction de vaisseaux de résistance [70]. Cet effet nécessite cependant des doses très élevées d'rhEPO, beaucoup plus élevées que celles utilisées en clinique. Selon Vaziri [71], l'rhEPO altérerait le métabolisme du NO. Le maintien de la pression en conditions normales suite à l'administration d'rhEPO est également sans explications. Kanagy et al [72] ont montré une augmentation de l'expression de la eNOS chez des rats sains recevant l'rhEPO. Cette augmentation peut également être un mécanisme important du maintien de la pression normale.

#### ***A- Endothéline-1***

Des études sur des cellules endothéliales en culture ont montré une augmentation de la production d'ET-1 dans le milieu suite à l'incubation avec de l'rhEPO [73-75]. Il a été prouvé dans notre laboratoire que l'rhEPO entraîne une augmentation de l'expression de l'ET-1 dans l'aorte et le lit artériel mésentérique chez les rats en IRC recevant l'rhEPO [76]. Dans cette étude, le taux plasmatique d'ET-1 est augmenté en IRC mais n'est pas affecté par le traitement à l'rhEPO. Carlini a, quant à lui, observé une augmentation de la concentration plasmatique d'ET-1 chez des patients hémodialysés recevant l'rhEPO par

voie intraveineuse [77]. En clinique, c'est plutôt la voie sous cutanée (SC) qui est utilisée. Par cette voie, le taux plasmatique d'ET-1 demeure inchangé comparativement à des patients IRC sans traitements [64, 77]. Puisque cette voie d'administration permet une libération plus lente de l'rhEPO dans la circulation sanguine, l'effet sur la production d'ET-1 n'est peut être pas détectable au niveau de la concentration plasmatique en ayant toutefois un effet local sur les cellules musculaires lisses. De plus, comme il en a été discuté dans la section 1.4.2.C, la concentration plasmatique d'ET-1 n'est pas un bon indicateur de sa production endothéliale. Pour confirmer le rôle de l'ET-1 dans l'effet hypertenseur de l'rhEPO en IRC, des antagonistes des récepteurs à l'ET-1 ont été administrés chez des rats urémiques [28]. L'antagoniste du récepteur ET<sub>A</sub> a pour effet de contrer l'augmentation de la PA chez les animaux recevant l'rhEPO. Par contre, le blocage des récepteurs ET<sub>A</sub> et ET<sub>B</sub> ne permet pas de contrer cette augmentation de pression. Ainsi, les récepteurs ET<sub>A</sub> et ET<sub>B</sub> seraient impliqués dans l'effet hypertenseur de l'rhEPO tout en ayant des rôles différents.

### *B- Monoxyde d'azote*

Certaines études montrent une augmentation de l'excrétion de nitrates et de nitrites, les métabolites stables du NO, suite à l'administration d'rhEPO en urémie [78, 79]. Ces résultats indiquent le rôle possible d'un mécanisme compensateur pour contrer l'augmentation de la PA. Certains résultats dans notre laboratoire tendent à confirmer ces observations. En effet, l'augmentation de la PA chez les rats urémiques traités à l'rhEPO est plus grande que chez les rats urémiques recevant le véhicule lors de l'administration d'un inhibiteur de la synthèse de NO [80]. Certaines études affirment que le traitement à l'rhEPO augmente la production de NO par les cellules endothéliales [59, 81, 82]. L'incubation de cellules endothéliales avec l'rhEPO augmente aussi la libération d'ADMA par ces cellules [83]. De plus, la concentration plasmatique d'ADMA est augmentée en IRC [54]. La combinaison d'urémie et d'rhEPO peut donc augmenter de façon importante le taux d'ADMA et diminuer la biodisponibilité du NO. L'expression de la eNOS étant influencée par la disponibilité du NO, une diminution de la biodisponibilité du NO peut entraîner une augmentation de l'expression de la eNOS [84]. Selon l'équipe de recherche de Vaziri [68, 71], l'effet hypertenseur de l'rhEPO n'est pas attribuable à une déficience en

NO et serait même associé à un mécanisme de compensation augmentant la production de NO. Cette augmentation serait en réponse à une résistance à la vasodilatation au NO suite à l'administration chronique d'rhEPO.

## **Chapitre 2- Pertinence et objectifs du projet de recherche**

L'aggravation de l'hypertension artérielle existante ou l'apparition *de novo* d'hypertension est un effet secondaire majeur du traitement de l'anémie par l'rhEPO en insuffisance rénale chronique. L'arrivée de ce médicament a grandement amélioré la qualité de vie de ces patients mais il est toutefois important de comprendre les mécanismes par lesquels l'rhEPO augmente la pression artérielle. En effet, l'hypertension artérielle est un facteur de risque majeur de maladies cardiovasculaires et la compréhension de ces mécanismes pourrait mener au développement de thérapies visant le maintien efficace de la pression artérielle pour les patients insuffisants rénaux recevant l'rhEPO. De plus, la compréhension des mécanismes permettant le maintien de la pression artérielle en condition normale suite au traitement à l'rhEPO peut également éclairer la compréhension des mécanismes altérés en insuffisance rénale. Les facteurs vasoactifs endothéliaux jouant un rôle important dans le maintien de la pression artérielle, il est normal de croire que l'insuffisance rénale module la relâche de ces facteurs tels que l'ET-1 et le NO. En effet, des travaux de notre laboratoire montrent que l'altération de la biodisponibilité du NO en insuffisance rénale est associée à l'hypertension [49]. Un effet similaire pourrait expliquer l'effet hypertenseur de l'rhEPO. La modulation de la relâche des facteurs dérivés de l'endothélium par l'rhEPO pourrait alors affecter la réponse vasculaire de façon différentielle en condition normale et en IRC.

## 2.1- Hypothèse

Nous avons émis l'hypothèse que l'rhEPO en condition normale ainsi qu'en insuffisance rénale module la relâche de facteurs vasoactifs dérivés de l'endothélium tels que l'ET-1 et le NO. En condition normale, des mécanismes compensateurs préservent l'équilibre entre presseurs et dépresseurs. Ces mécanismes sont déficients en IRC causant une dysfonction endothéliale qui expliquerait en partie l'hypertension artérielle. De plus, cette modulation est associée à une altération de la réactivité vasculaire.

## 2.2- Objectifs spécifiques

- Étudier la modulation de la réponse vasomotrice à l'ET-1, l'ACh, le SNP et la NE *in vitro* dans des segments d'aorte thoracique de rats en insuffisance rénale.
- Déterminer l'effet de l'rhEPO sur la réactivité vasculaire de l'aorte thoracique à ces mêmes facteurs en condition normale et en insuffisance rénale.
- Investiguer l'implication de l'endothélium dans la réponse vasoconstrictrice à l'ET-1.
- Déterminer le rôle du NO dans la modulation de la réponse à l'ET-1 dans ces différentes conditions par l'incubation des segments d'aortes avec un inhibiteur de la synthèse du NO, le L-NAME.
- Évaluer la modulation de l'expression de l'ET-1 et de la eNOS dans l'endothélium des segments d'aorte thoracique.

## **Chapitre 3- Effet de l'rhEPO sur la réactivité vasculaire chez le rat normal**

Nous avons tout d'abord déterminé l'effet de l'rhEPO sur la réponse vasomotrice de segments d'aorte thoracique de rats normaux et l'implication de facteurs vasoactifs endothéliaux tels que l'ET-1 et le NO dans cette modulation.

### **3.1- Protocole animal**

Des rats Wistar normaux (Charles Rivers, St-Constant, Québec, Canada) de 200 à 225g sont hébergés sous humidité et température contrôlées. Ils disposent d'eau et de nourriture standard à volonté sans enrichissement alimentaire. Aucune procédure n'est effectuée la première semaine suivant leur arrivée à l'animalerie. Ils reçoivent de l'rhEPO (Eprex, Jeanssen-Ortho. Inc, Toronto, Ontario, Canada; 100U/kg) ou le véhicule par voie sous-cutanée (SC) 3 fois par semaine pendant 3 semaines. À la fin des protocoles animaux, les animaux sont anesthésiés au pentothobarbital sodique (50 mg/kg IP) et exsanguinés par une ponction de l'aorte abdominale. Le sang est conservé pour évaluer l'hématocrite ainsi que la créatinine sérique. L'aorte thoracique est prélevée délicatement et conservée dans du KREBS ((mM); NaCl 118, KCl 4.7, CaCl<sub>2</sub> 2.5, MgSO<sub>4</sub> 1.2, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.2, dextrose 5.5, NaHCO<sub>3</sub> 25; pH 7.4) sur glace. Une portion de l'aorte thoracique est conservée dans l'OCT pour des analyses en microscopie confocale.



## **3.2- Méthodologie**

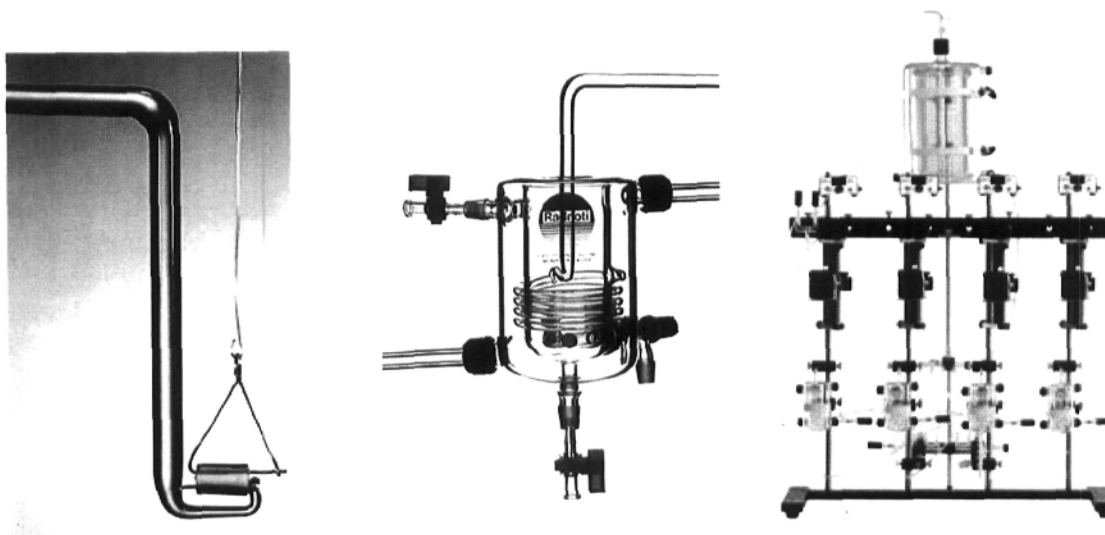
### ***3.2.1- Mesure de la pression artérielle systolique***

Hebdomadairement, la pression artérielle est mesurée au niveau de la queue. Lors de cette procédure, les rats sont placés dans une chambre sur un tapis chauffant pour augmenter la circulation sanguine dans la queue. Ils sont par la suite placés dans une cage de contention sous une lumière pour maintenir la chaleur sur la queue. Un détecteur photosensible avec ballonnet standard est placé autour de la queue de l'animal. Les données sont recueillies par un système d'acquisition (IITC, modèle 29, Life Science, Woodland Hills, Californie, USA) couplé à un ordinateur (Système Biopac, modèle MP100, Goleta, Californie, USA). Les valeurs sont analysées avec un logiciel informatique (Acqknowledge, Microsoft) qui permet de visualiser l'amplitude des pulsations ainsi que la pression pratiquée par le ballonnet sur la queue de l'animal. La valeur retenue correspond à la pression lors de l'augmentation de l'amplitude de la pulsation. La valeur finale de pression correspond à la moyenne de trois lectures.

### ***3.2.2- Réactivité vasculaire***

L'aorte thoracique est nettoyée des tissus adipeux l'entourant et coupée en segment de 3 à 4 mm. Chaque segment est monté dans un bain à organe (Radnoti Technology Inc, Monrovia, California, USA) dans du KREBS à 37°C, continuellement aéré avec 95% O<sub>2</sub> – 5% CO<sub>2</sub> (figure 11). Dans certains segments, l'endothélium est enlevé par friction de la lumière du vaisseau.

**Figure 11. Système de bains d'organes**



Les segments sont laissés pour équilibration à une tension de base de 2g pendant une heure entrecoupée de lavages aux 20 minutes. La réponse myogénique (musculaire lisse) est évaluée par l'ajout de KCl (25mM). Un segment qui ne contracte pas au KCl est éliminé de l'étude. L'intégrité de l'endothélium est également vérifiée par une contraction à la NE ( $10^{-7}$  à  $10^{-6}$  M) suivi d'une relaxation à l'ACh ( $10^{-6}$  M). Les segments ne montrant pas de relaxation d'au moins 60% à l'ACh sont également éliminés. Les segments sans endothélium ne doivent présenter aucune relaxation à l'ACh. Des courbes dose-réponse à l'ACh ( $10^{-11}$  à  $10^{-5}$  M) et au SNP ( $10^{-11}$  à  $10^{-5}$  M) sont obtenues dans des segments précontractés à la NE ( $10^{-7}$  M). La courbe dose-réponse à l'ET-1 (American Peptide, Sunnyvale, CA, USA) ( $10^{-9}$  à  $10^{-5}$  M) est obtenue avec et sans endothélium ou L-NAME (0.01 mM, 20 minutes de préincubation). Chaque courbe est suivie de lavages pendant 30 minutes. La courbe dose-réponse à l'ET-1 est toujours effectuée la dernière puisque, due à la réponse prolongée à l'ET-1.

### ***3.2.3- Immunofluorescence en microscopie confocale***

Des coupes de 7  $\mu\text{m}$  d'épaisseur d'aortes thoraciques congelées dans l'OCT sont utilisées pour l'analyse en immunofluorescence de l'ET-1 et de la eNOS. Les coupes sont fixées sur la lame dans de l'acétone à  $-20^{\circ}\text{C}$  pendant 10 minutes. Les sites non spécifiques sont par la suite bloqués par une incubation de 30 minutes dans du PBS contenant 10% de sérum bovin fœtal. Les coupes sont par la suite incubées avec l'anticorps primaire pour la détection de l'ET-1 (1 : 100 obtenue de lapins immunisés) ou celle de la eNOS (1 : 200, BD Transduction Laboratories, Rockville, MD, USA) toute la nuit à  $4^{\circ}\text{C}$ . Après des lavages avec du PBS, la coupe est incubée avec l'anticorps secondaire, un anti-IgG de lapin chez la chèvre conjugué avec AlexFluor594® (1 : 1000, Molecular Probe, Oregon, USA) dans le cas de la détection de l'ET-1 ou d'un anticorps anti-IgG de souris chez la chèvre conjugués avec AlexFluor594® (1 : 1000, Molecular Probe, Oregon, USA) pour ce qui est de la eNOS. Dans certains cas, des coupes sont contre-colorer avec la phalloïdine conjuguée avec AlexaFluor488® (1 : 100, Molecular Probes, Oregon, USA) qui interagit avec les filament d'actine du muscle lisse.

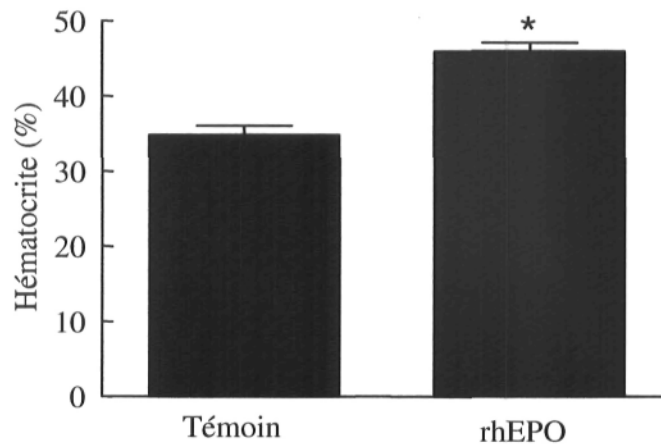
Les coupes sont ensuite observées avec un microscope confocal à 60X. Les images sont prises à l'aide du logiciel Laser Sharp Acquisition version 3.2 (MRC-1024 Confocal System, Bio-Rad, Californie, USA). La quantification de la fluorescence est effectuée avec le logiciel Métamorph (Universal Imaging Corporation, Pensylvanie, USA). La quantification est effectuée à partir des coupes sans contre-coloration et à partir d'image obtenues dans les mêmes conditions d'exposition au laser et de temps d'exposition. Dans ces conditions, l'autofluorescence (obtenue en absence d'anticorps secondaires) et la fluorescence non-spécifique (obtenue sans anticorps primaires) sont faibles et soustraient de la fluorescence totale mesurée pour ainsi obtenir la fluorescence spécifique.

### 3.3- Résultats

#### 3.3.1- Paramètres hématologiques

À la fin du protocole, les animaux ne présentent pas de différences de poids, de pression et de créatinine sérique. L'hématocrite est augmenté (figure 12) de  $34 \pm 1 \%$  à  $46 \pm 1 \%$  chez les animaux recevant l'rhEPO ( $p < 0.001$ ).

**Figure 12.** Effet de l'rhEPO sur l'hématocrite en condition normale

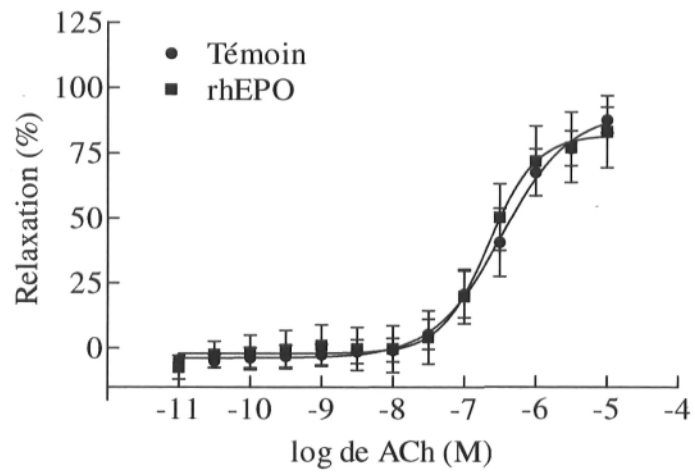


*Hématocrite à la fin du traitement des animaux normaux recevant l'rhEPO ou le véhicule (témoin). n=8. Moyenne  $\pm$  SEM. \*,  $p < 0.001$  vs témoin.*

#### 3.3.2- Réactivité vasculaire

Le traitement à l'rhEPO chez les animaux normaux ne modifie pas la vasorelaxation endothélium-dépendante à l'ACh (figure 13). En effet, le maximum de relaxation atteint  $90 \pm 8 \%$  chez les rats témoins et  $82 \pm 8 \%$  chez les animaux recevant l'rhEPO.

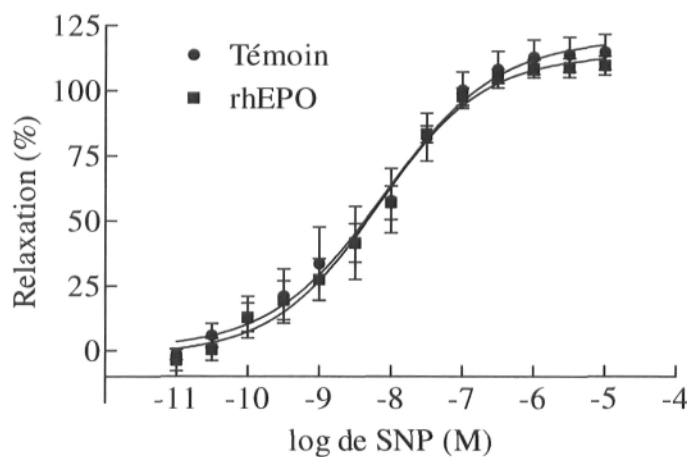
**Figure 13.** Effet de l'rhEPO sur la relaxation-dépendant à l'ACh en condition normale



*Courbes dose-réponse à l'ACh dans les segments d'aorte thoracique précontractées à la NE d'animaux recevant l'rhEPO ou le véhicule (témoin). n=8. Moyenne  $\pm$ SEM.*

La vasorelaxation endothélium-indépendant au SNP n'est également pas affectée par le traitement à l'rhEPO :  $E_{\max}$  de  $120 \pm 8 \%$  chez les témoins et de  $114 \pm 4 \%$  chez les animaux recevant l'rhEPO (figure 14).

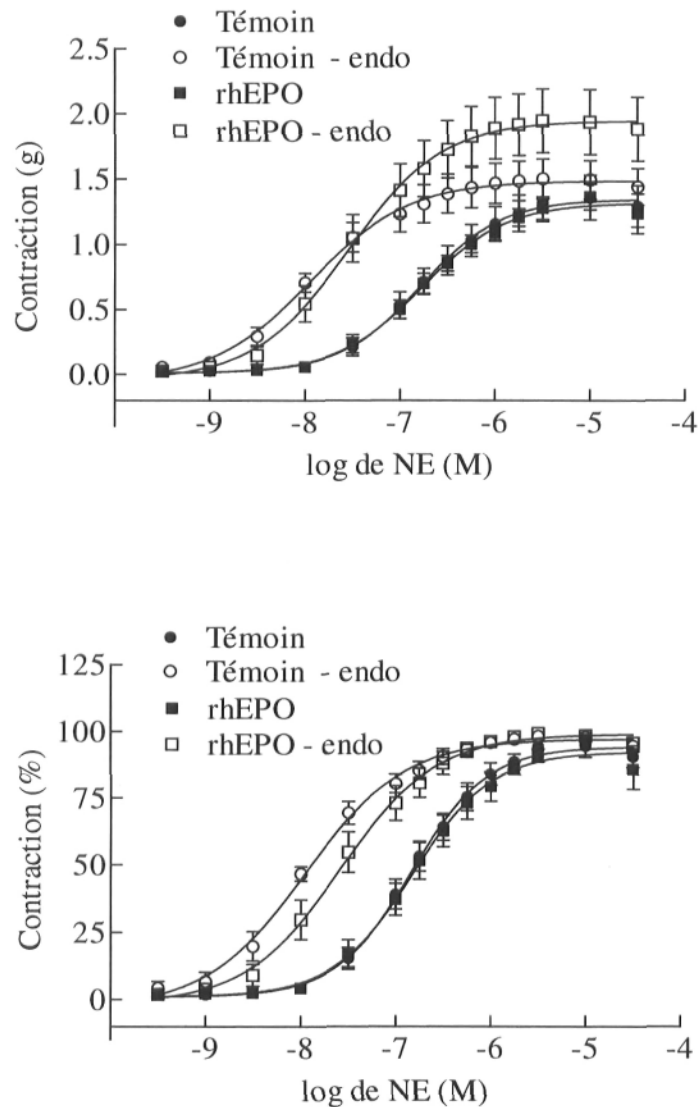
**Figure 14. Effet de l'rhEPO sur la relaxation endothélium-indépendant au SNP en condition normale**



*Courbes dose-réponse au SNP dans les segments d'aorte thoracique précontractées au NE des animaux recevant l'rhEPO ou le véhicule (témoin). n=8. Moyenne  $\pm$  SEM.*

La contraction à la NE n'est pas modifiée en présence de l'endothélium. En absence d'endothélium, la contraction à la NE est toutefois altérée par le traitement à l'rhEPO (figure 15). En effet, le maximum de contraction est augmenté en passant de  $1.48 \pm 0.06$  g à  $1.95 \pm 0.10$  g ( $p < 0.01$ ). Le log du  $EC_{50}$  dans les segments d'animaux témoins est de  $-7.9 \pm 0.2$  M tandis que dans les segments d'animaux recevant l'rhEPO, il est de  $-7.5 \pm 0.2$  M. Ce déplacement vers la droite n'est cependant pas significatif.

**Figure 15.** Effet de l'rhEPO sur la contraction à la NE en condition normale

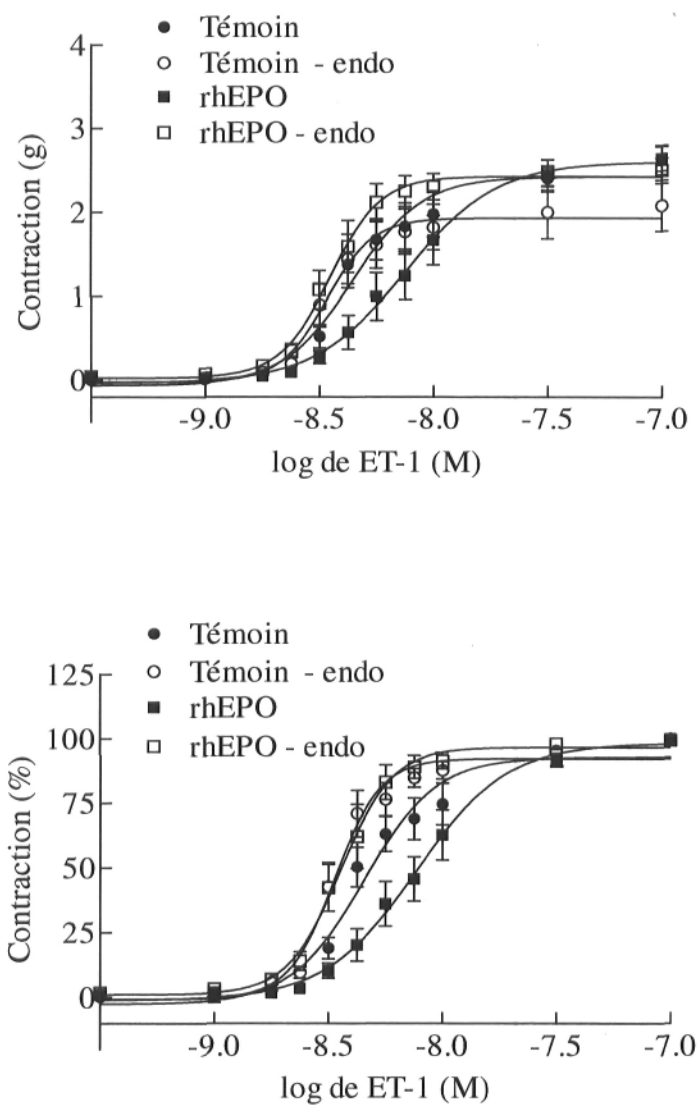


*Courbes dose-réponse à la NE avec et sans endothélium dans les segments d'aorte thoracique provenant d'animaux recevant l'rhEPO ou le véhicule (témoin). Les résultats sont exprimés en gramme de tension et en pourcentage de contraction. n=8, Moyenne  $\pm$  SEM.*

Chez les animaux recevant l'rhEPO, la contraction à l'ET-1 est diminuée (figure 16). En effet, la courbe est déplacée significativement vers la droite (tableau 4). Le maximum de contraction demeure toutefois inchangé. En absence d'endothélium, les courbes sont déplacées significativement vers la gauche aussi bien dans les vaisseaux des animaux témoins que traités à l'rhEPO. La différence observée dans les segments dont l'endothélium est intact est alors abolie. Le traitement à l'rhEPO chez les animaux normaux entraîne une diminution de la réponse vasoconstrictrice à l'ET-1 qui serait associée à un facteur vasodilatateur de l'endothélium.



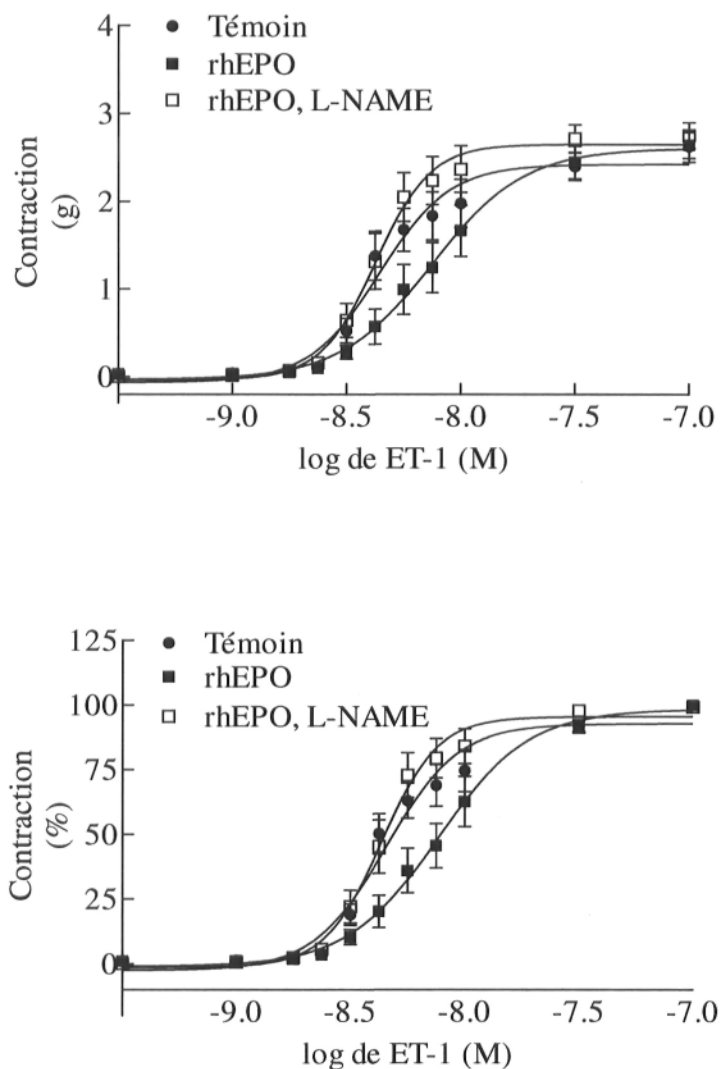
**Figure 16.** Effet de l'rhEPO sur la contraction en réponse à l'ET-1 en condition normale



*Courbes dose-réponse à l'ET-1 avec et sans endothélium dans les segments d'aorte thoracique d'animaux recevant l'rhEPO ou le véhicule (témoin). Les résultats sont exprimés en gramme de tension et en pourcentage de contraction. n=8. Moyenne  $\pm$  SEM.*

L'ajout de L-NAME, un inhibiteur de la synthèse du NO, corrige l'atténuation de la contraction à l'ET-1 dans les segments provenant d'animaux recevant l'rhEPO (figure 17, tableau 4). Le L-NAME n'a cependant aucun effet sur la contraction à l'ET-1 des segments sans endothélium des deux groupes d'animaux ainsi que dans les segments avec endothélium du groupe témoin.

**Figure 17.** Effet du L-NAME sur la contraction à l'ET-1 suite au traitement à l'rhEPO.



*Courbes dose-réponse à l'ET-1 avec et sans L-NAME dans les segments d'aorte thoracique d'animaux normaux recevant l'rhEPO ou le véhicule (témoin). Les résultats sont exprimés en gramme de tension et en pourcentage de contraction. n=8, Moyenne  $\pm$  SEM.*

**Tableau 4. Sommaire des paramètres des courbes dose-réponse à l'ET-1 des segments d'aortes thoraciques d'animaux normaux recevant l'rhEPO ou le véhicule (témoin)**

Groupes	Contraction (g)		Contraction (%)
	EC <sub>50</sub> (-log of ET-1 M)	E <sub>max</sub> (g)	EC <sub>50</sub> (-log of ET-1 M)
Témoin	8.35	2.42	8.34
Témoin - endo	8.46	1.93 ‡	8.47 *
rhEPO	8.12 *	2.60	8.11 *
rhEPO - endo	8.45 *†	2.42	8.44 †
Témoin	8.35	2.42	8.34
rhEPO	8.12 *	2.63	8.11 *
RhEPO + L- NAME	8.37 †	2.64	8.43 †

\*,  $p < 0.001$  vs témoin

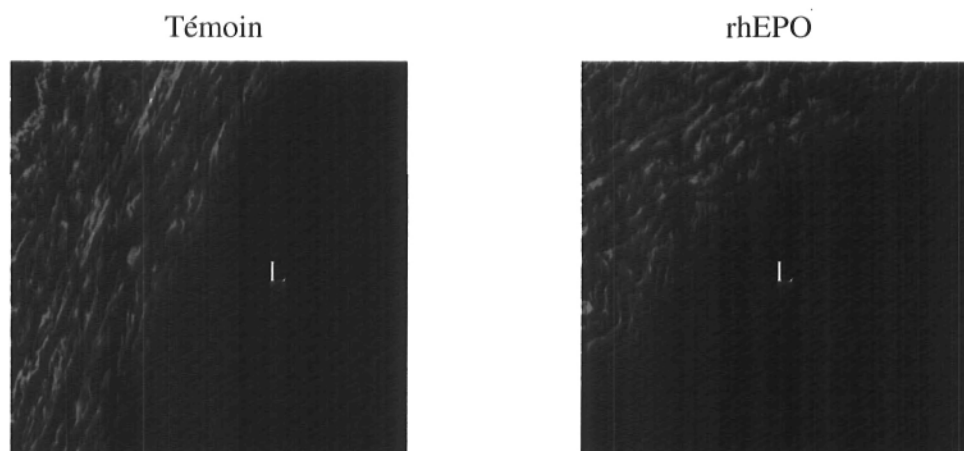
†,  $p < 0.001$  vs rhEPO

‡,  $p < 0.05$  vs témoin

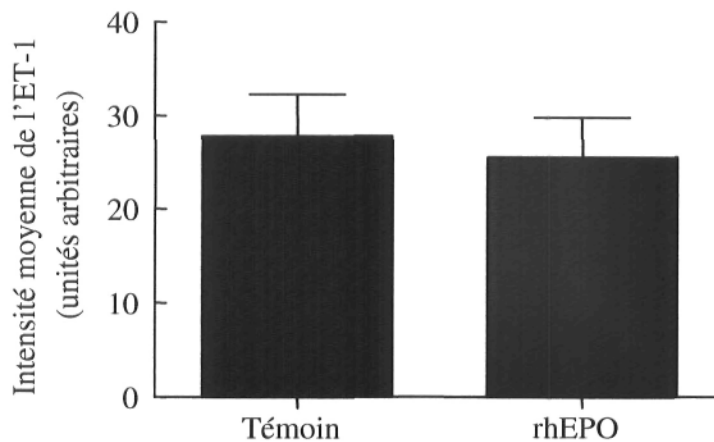
### 3.3.3- Immunofluorescence en microscopie confocale

Comme nous l'avions prévu, l'rhEPO n'a pas eu d'effet sur le taux d'ET-1 dans les cellules endothéliales de l'aorte thoracique d'animaux normaux (figure 18). En effet, la quantification de la fluorescence émise dans l'endothélium montre que l'expression de l'ET-1 est similaire chez les animaux témoins et les animaux normaux traités à l'rhEPO.

**Figure 18.** Effet de l'rhEPO sur l'expression de l'ET-1 en condition normale



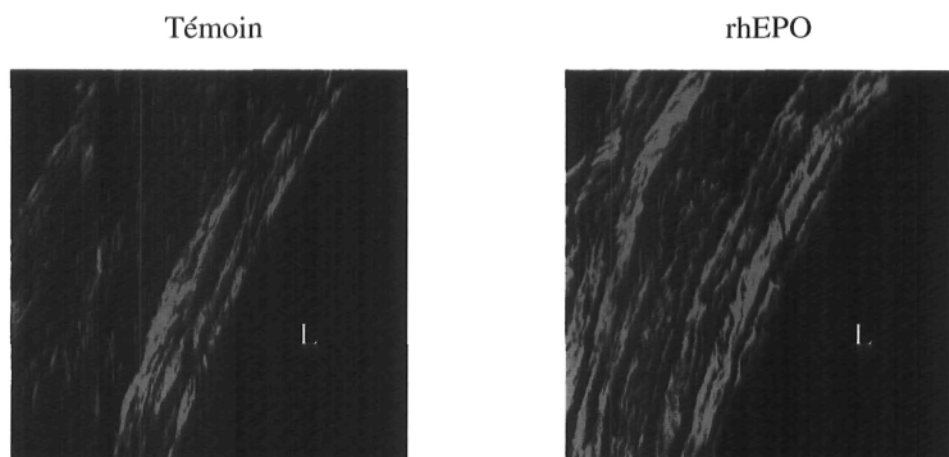
*Immunodétection de l'ET-1 (rouge) dans l'endothélium d'aorte thoracique provenant d'animaux normaux recevant l'rhEPO ou le véhicule (témoin). La phalloïdine montre les filaments d'actine du muscle lisse vasculaire (vert). L= lumière du vaisseau*



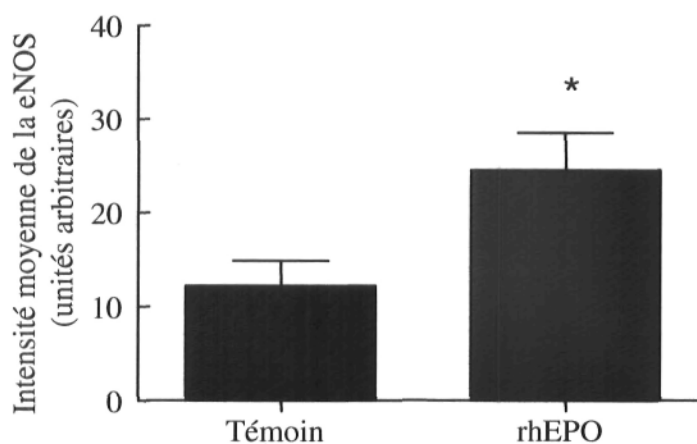
*Quantification de la fluorescence de l'ET-1 dans l'endothélium d'aorte thoracique d'animaux normaux recevant l'rhEPO ou le véhicule (témoin), n=8. Moyenne  $\pm$  SEM.*

L'immunodétection de la eNOS, par contre, indique que l'rhEPO augmente l'expression de cette protéine dans l'endothélium d'aorte thoracique de rats normaux (figure 19). La quantification de la fluorescence émise dans l'endothélium montre en effet que l'expression de la eNOS est accrue d'un facteur de 2 passant de  $12.2 \pm 2.6$  à  $24.5 \pm 4.0$  ( $p < 0.05$ ).

**Figure 19.** Effet de l'rhEPO sur l'expression de la eNOS en condition normale



*Immunodétection de la eNOS (rouge) dans l'endothélium d'aorte thoracique provenant d'animaux normaux recevant l'rhEPO ou le véhicule (témoin). La phalloïdine montre les filaments d'actine du muscle lisse vasculaire (vert). L= lumière du vaisseau*



*Quantification de la fluorescence de la eNOS dans l'endothélium d'aorte thoracique d'animaux normaux recevant l'rhEPO ou le véhicule (témoin). n=8. Moyenne  $\pm$  SEM. \*,  $p < 0.05$  vs témoin.*

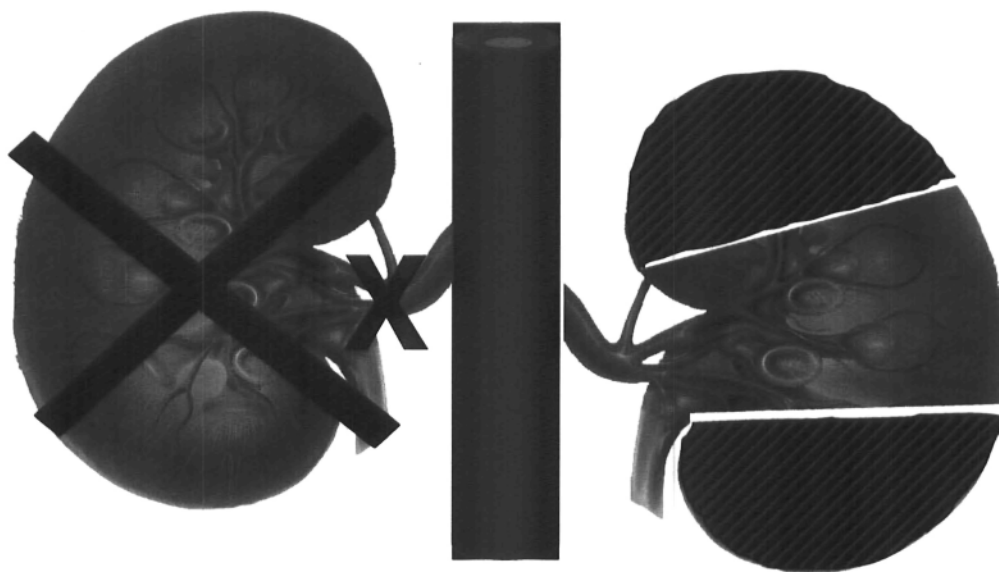
## **Chapitre 4- Modulation de la réactivité vasculaire en insuffisance rénale**

Nous avons par la suite étudié la réponse vasomotrice en IRC et l'implication des facteurs vasoactifs dérivés de l'endothélium dans la modulation de la réponse vasoconstrictrice à l'ET-1.

### **4.1- Protocole animal**

Des rats Wistar sont hébergés comme décrit au chapitre 3. Les animaux sont subdivisés en deux groupes : un groupe témoin et un groupe rendu urémique par néphrectomie 5/6 (Nx). La procédure chirurgicale est échelonnée sur deux semaines. La première semaine, la néphrectomie partielle est effectuée. Elle consiste à l'ablation des deux pôles du rein gauche (figure 20). Sous anesthésie à l'isoflurane (2%, Abbot Laboratories, Montréal, Québec, Canada), une incision est pratiquée sur le flanc gauche de l'animal. Le rein gauche est dégagé des tissus adipeux l'entourant et les deux pôles sont enlevés à l'aide d'une lame de scalpel. Une éponge contenant un agent hémostatique (GelFoam, Upjohn, DonMills, Ontario, Canada) est appliquée sur le rein pour minimiser la perte de sang. La semaine suivante, le rein droit est enlevé complètement suite à la ligature de l'artère et de la veine rénale ainsi que de l'uretère.

**Figure 20.** Néphrectomie 5/6 par résection des pôles



Suite à chacune des chirurgies, les rats reçoivent des injections de buprénorphine (0.05 mg/kg SC deux fois par jour pendant 3 jours). L'hypertension et l'urémie se développent progressivement au cours des 3 à 4 semaines suivant la néphrectomie totale. La PA systolique est mesurée hebdomadairement par la queue de l'animal tel que décrit précédemment. Après 7 semaines d'urémie, ou une période équivalente chez les animaux témoins, les animaux sont euthanasiés et les tissus sont conservés tel que décrit au chapitre 3.



## 4.2- Méthodologie

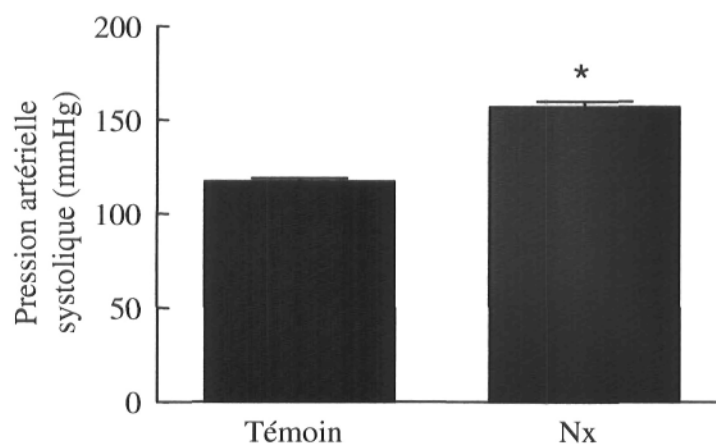
Tel que décrit au chapitre 3, l'aorte thoracique est utilisée pour étudier la réponse vasomotrice à l'ACh, au SNP, à la NE et à l'ET-1 avec et sans incubation avec le L-NAME. L'immunofluorescence en microscopie confocale de l'ET-1 et la eNOS est effectuée selon la même méthode.

## 4.3- Résultats

### 4.3.1- Paramètres hématologiques

La première observation est celle d'une augmentation de la pression artérielle systolique chez les animaux urémiques (figure 21). En effet, à la fin du traitement, la PA est augmentée à  $157 \pm 3$  mm Hg comparativement aux animaux témoins dont la PA est de  $117 \pm 2$  mm Hg.

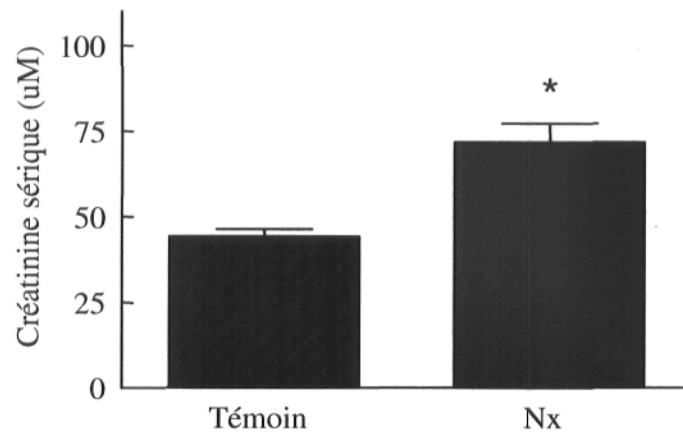
**Figure 21.** Augmentation de la PA en urémie



*Pression artérielle systolique (mmHg) des animaux témoins (n=7) ainsi que des animaux urémiques (Nx, n=9) à la fin du protocole. Moyenne ± SEM. \*, p<0.001 vs témoin.*

Tel qu'attendu, on peut également observer une détérioration de la fonction rénale démontrée par une augmentation de la créatinine sérique (figure 22). La créatinine sérique est presque doublée en IRC passant de  $44.1 \pm 2.2 \mu\text{M}$  à  $71.6 \pm 5.6 \mu\text{M}$ .

**Figure 22. Fonction rénale en IRC**

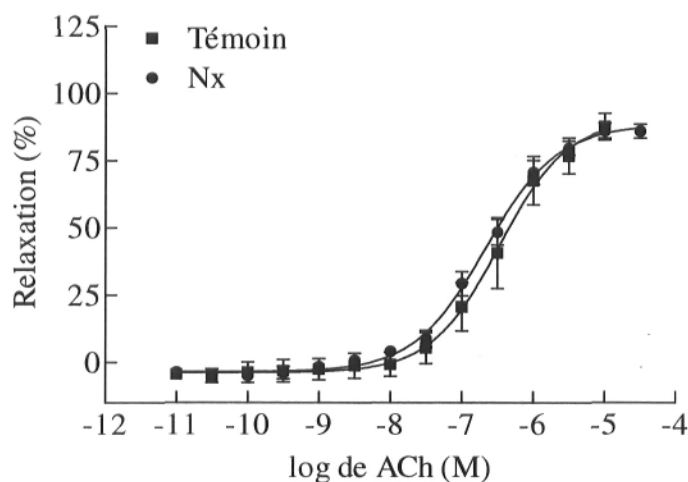


*Créatinine sérique chez les animaux témoins (n=8) et urémiques (Nx, n=10). Moyenne  $\pm$  SEM. \*,  $p < 0.001$  vs témoin.*

### 4.3.2- Réactivité vasculaire

L'urémie n'a pas eu d'effet significatif sur la relaxation endothélium-dépendant à l'ACh (figure 23).

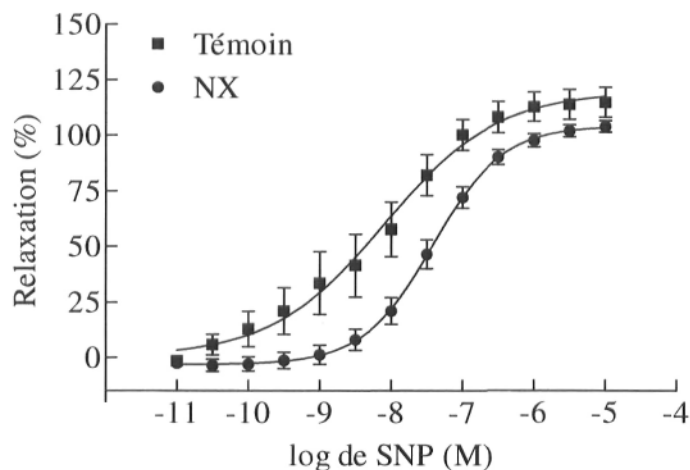
**Figure 23.** Effet de l'urémie sur la relaxation endothélium-dépendant à l'ACh



*Courbes dose-réponse à l'ACh dans les segments d'aorte thoracique provenant d'animaux témoins (n=7) et urémiques (Nx, n=10). Moyenne  $\pm$  SEM.*

On peut par contre observer en urémie une altération de la relaxation à un donneur de NO (figure 24). La courbe dose-réponse au SNP est atténuée en urémie. La courbe est déplacée vers la droite et le maximum de relaxation est diminué significativement. La courbe chez les témoins a un log du EC<sub>50</sub> de  $-8.09 \pm 0.20$  M tandis que celui de la courbe chez les Nx a un log du EC<sub>50</sub> de  $-7.42 \pm 0.06$  M ( $p < 0.001$ ).

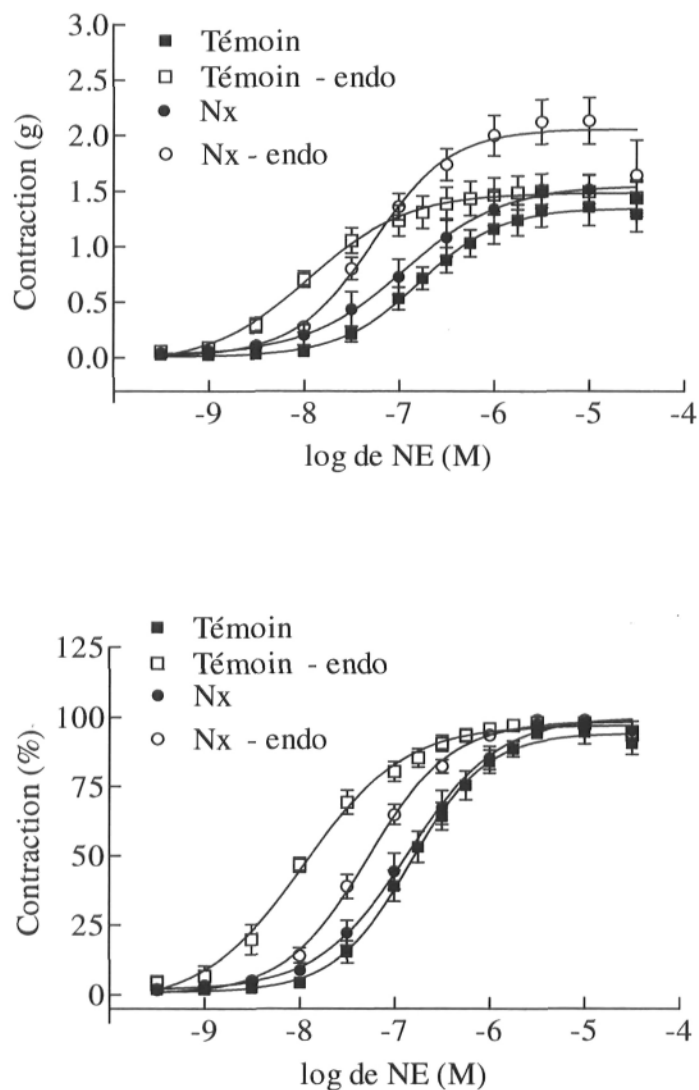
**Figure 24.** Effet de l'urémie sur la relaxation endothélium-indépendant au SNP



*Courbes dose-réponse au SNP des segments d'aorte thoracique provenant d'animaux témoins (n=7) et urémiques (Nx, n=10). Moyenne  $\pm$  SEM.*

L'urémie n'entraîne pas de modulation de la contraction à la NE en présence de l'endothélium (figure 25). Cependant, en absence d'endothélium, la réponse vasomotrice est modifiée. Le maximum de contraction est augmenté ( $E_{\max}$  témoin =  $1.35 \pm 0.07$  g,  $E_{\max}$  Nx =  $1.55 \pm 0.11$  g,  $p < 0.01$ ). Bien que la courbe soit également déplacée vers la gauche ( $EC_{50}$  Nx =  $-7.28 \pm 0.04$  M), elle l'est moins que dans les anneaux d'aorte des animaux témoins (log du  $EC_{50}$  témoin =  $-7.95 \pm 0.07$  M,  $p < 0.001$ ).

**Figure 25.** Effet de l'urémie sur la contraction à la NE

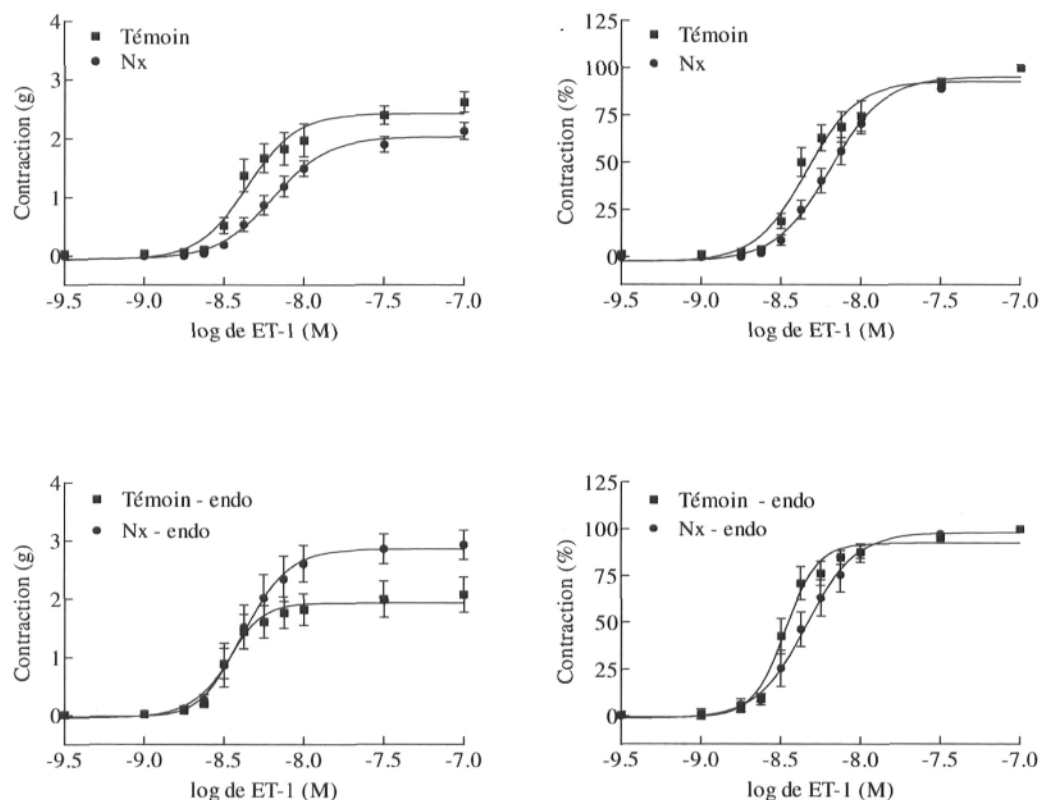


*Courbes dose-réponse à la NE avec et sans endothélium dans les segments d'aorte thoracique provenant d'animaux témoins (n=7) et urémiques (Nx, n=10). Les résultats sont exprimés en gramme de tension et en pourcentage de relaxation. Moyenne  $\pm$  SEM.*

On peut observer en IRC une atténuation de la contraction à l'ET-1 (figure 26). En effet, la courbe dose-réponse des segments d'aorte thoracique provenant des animaux urémiques est déplacée vers la droite ( $p < 0.05$ ) et le maximum de contraction est diminué ( $p < 0.01$ )

comparativement à la courbe dose-réponse des segments provenant des animaux témoins (tableau 2). En absence d'endothélium, la réponse maximum à l'ET-1 est significativement augmentée dans les segments d'aorte d'animaux Nx ( $p < 0.001$ ) alors que les  $EC_{50}$  ne sont pas modifiés (tableau 5).

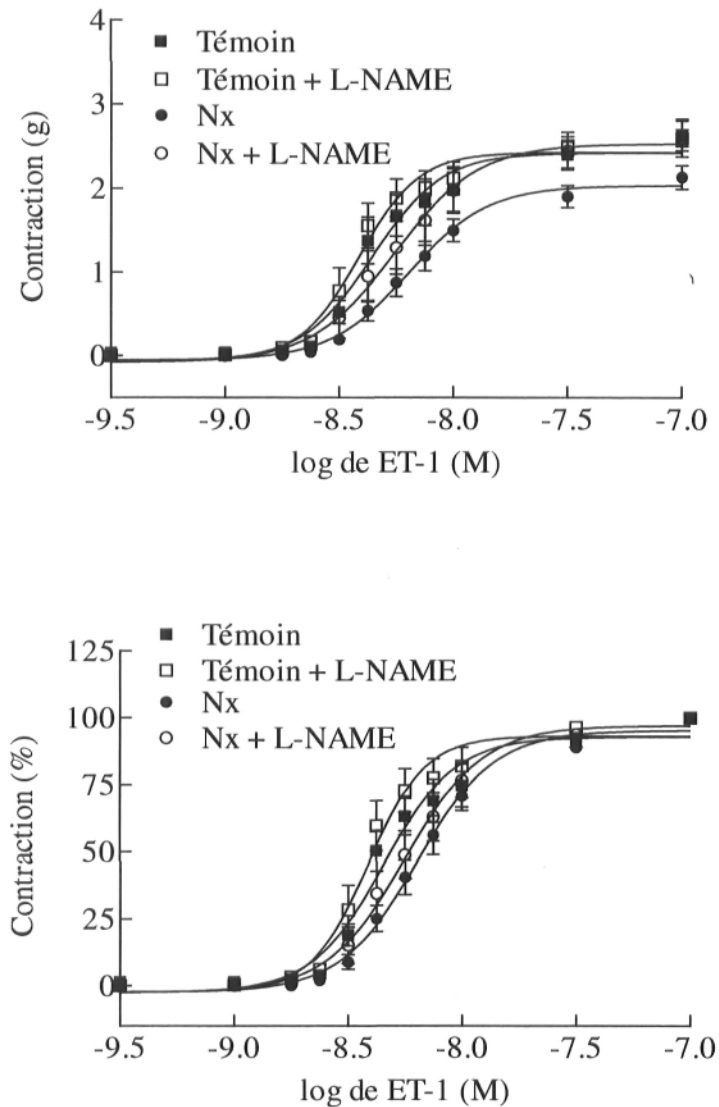
**Figure 26. Effet de l'urémie sur la contraction à l'ET-1**



*Courbes dose-réponse à l'ET-1 avec et sans endothélium dans les segments d'aorte thoracique provenant d'animaux urémiques (Nx, n=10) ou témoins (n=8). Les résultats sont exprimés en gramme de tension et en pourcentage de contraction. Moyenne  $\pm$  SEM*

L'incubation des segments d'aorte thoracique avec le L-NAME ramène la contraction maximale à l'ET-1 dans les vaisseaux de rats Nx à celle des vaisseaux des témoins (figure 27, tableau 5). En absence d'endothélium, le L-NAME n'entraîne pas de modification significative de la contraction à l'ET-1.

**Figure 27. Effet du L-NAME sur la contraction à l'ET-1 en urémie**



*Courbes dose-réponse à l'ET-1 avec et sans L-NAME dans les segments d'aorte thoracique provenant d'animaux urémiques (Nx, n=10) ou témoins (n=8). Les résultats sont exprimés en gramme de tension et en pourcentage de contraction. Moyenne  $\pm$  SEM*

**Tableau 5. Sommaire des paramètres des courbes dose-réponse à l'ET-1 des segments d'aortes thoraciques provenant d'animaux urémiques ou témoins**

Groupes	Contraction (g)		Contraction (%)
	EC <sub>50</sub> (-log de ET-1 M)	E <sub>max</sub> (g)	EC <sub>50</sub> (-log de ET-1 M)
Témoin	8.35	2.42	8.34
Témoin - endo	8.46	1.93 †	8.47 *
Témoin + L-NAME	8.41	2.42	8.41
Témoin - endo + L-NAME	8.49	1.72	8.48
Nx	8.19 *	2.03 †	8.19 *
Nx - endo	8.37 ‡	2.85 ‡	8.34 ‡
Nx + L-NAME	8.25	2.53 ‡	8.25
Nx - endo + L-NAME	8.33	3.19	8.32

\*,  $p < 0.01$  vs Témoin

†,  $p < 0.05$  vs Témoin

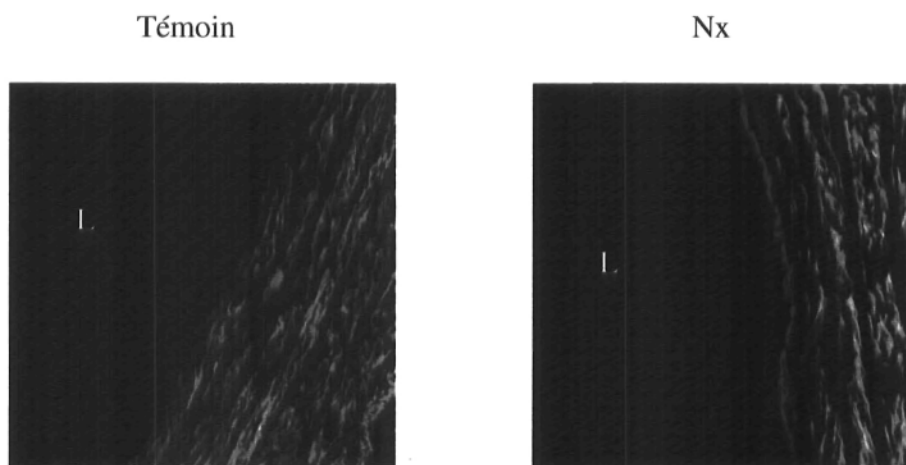
‡,  $p < 0.01$  vs Nx

#### 4.3.3- Immunofluorescence en microscopie confocale

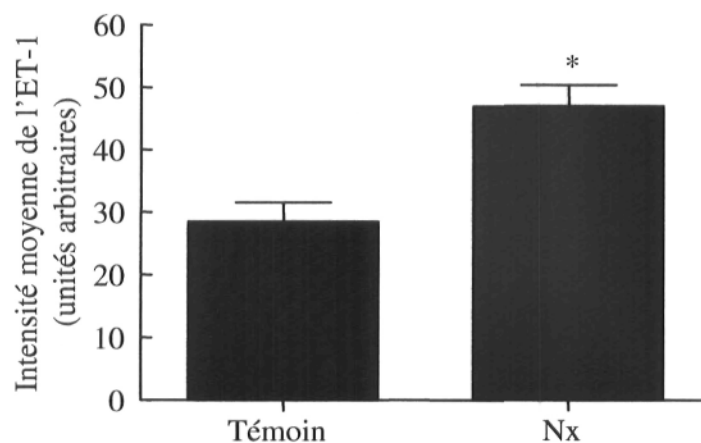
L'immunodétection de l'ET-1 dans l'aorte thoracique d'animaux urémiques montre une augmentation de l'expression de cette protéine dans l'endothélium comparativement aux animaux témoins (figure 28). La quantification de la fluorescence émise dans l'endothélium de ces vaisseaux confirme cette augmentation (Intensité moyenne : Témoin =  $28.5 \pm 3.0$ , Nx =  $47.0 \pm 3.3$ ) ( $p < 0.01$ ).



**Figure 28.** Effet de l'urémie sur l'expression de l'ET-1 dans l'aorte thoracique



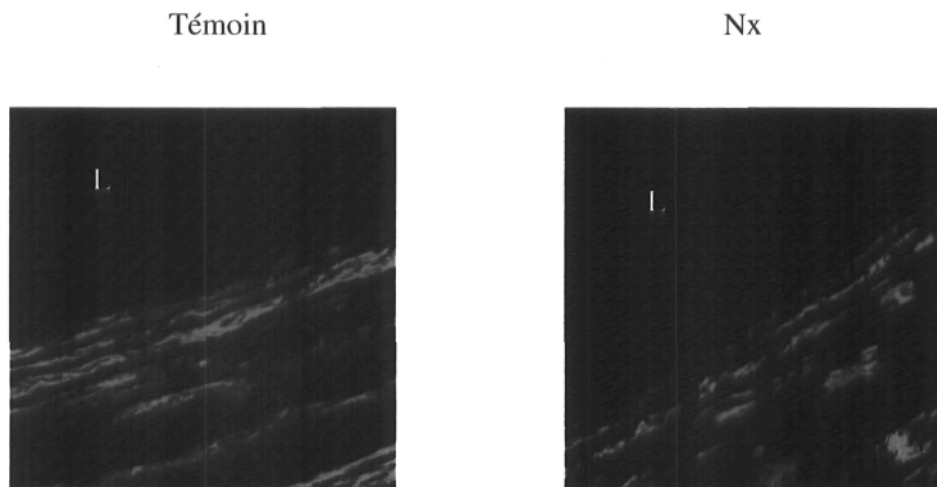
*Immunodétection de l'ET-1 (rouge) dans l'endothélium d'aorte thoracique d'animaux urémiques et témoins. La phalloïdine révèle les filaments d'actine (vert). L=lumière du vaisseau.*



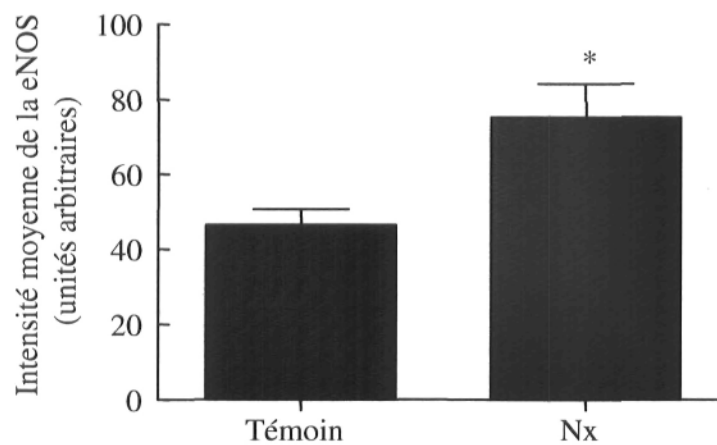
*Quantification de la fluorescence de l'ET-1 dans l'endothélium d'aorte thoracique provenant d'animaux urémiques (Nx, n=4) ou témoins (n=6). Moyenne  $\pm$  SEM. \*,  $p < 0.01$ .*

Nous avons également observé une augmentation de l'expression de la eNOS dans l'endothélium d'aorte thoracique d'animaux urémiques ( $75.2 \pm 8.9$ ) comparativement aux témoins ( $46.4 \pm 4.2$ ) ( $p < 0.05$ ) (figure 29).

**Figure 29.** Effet de l'urémie sur l'expression de la eNOS dans l'aorte thoracique



*Immunodétection de la eNOS (rouge) dans l'endothélium d'aorte thoracique provenant d'animaux urémiques (Nx, n=5) et témoins (n=6). La phalloïdine révèle les filaments d'actine (vert). Moyenne  $\pm$  SEM. L=lumière du vaisseau.*



*Quantification de la fluorescence de la eNOS émise dans l'endothélium d'aorte thoracique provenant d'animaux urémiques (Nx, n=5) et témoins (n=6). Moyenne  $\pm$  SEM. \*, $p < 0.05$ .*

## **Chapitre 5- Effet de l'rhEPO sur la réactivité vasculaire en insuffisance rénale**

Nous avons finalement vérifié l'effet de l'rhEPO sur la dysfonction endothéliale en IRC et l'implication des modifications de la relâche de facteurs vasoactifs endothéliaux sur la réponse vasomotrice dans l'aorte thoracique.

### **5.1- Protocole animal**

L'urémie est induite par néphrectomie 5/6 chez tous les animaux selon la procédure décrite au chapitre 4. Ils sont ensuite subdivisés en deux groupes : un groupe recevant l'rhEPO (Eprex, 100U/kg) et le second recevant le véhicule SC, 3 fois par semaine pendant 3 semaines.

### **5.2- Méthodologie**

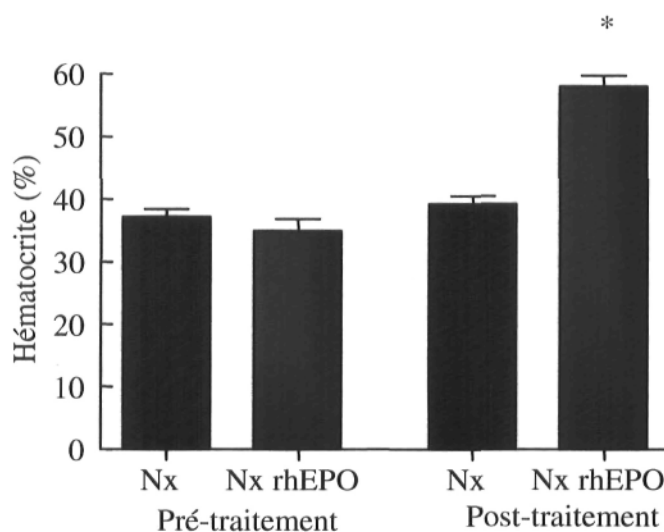
Chez tous les animaux, la pression est mesurée hebdomadairement. L'hématocrite, la créatinine sérique sont également déterminés. Les analyses de réactivité vasculaire et d'immunofluorescence en microscopie confocale sont effectuées tel que décrit au chapitre 3.

## 5.3- Résultats

### 5.3.1- Paramètres hématologiques

Au début du traitement, l'hématocrite était similaire dans les deux groupes d'animaux (Nx :  $37.2 \pm 1.2$  %, Nx rhEPO :  $35.0 \pm 1.9$  %). Suite au traitement à l'rhEPO ( $58.0 \pm 1.7$  %), l'hématocrite est augmenté significativement comparativement aux animaux urémiques recevant le véhicule ( $39.2 \pm 1.2$  %) ( $p < 0.001$ ) (figure 30).

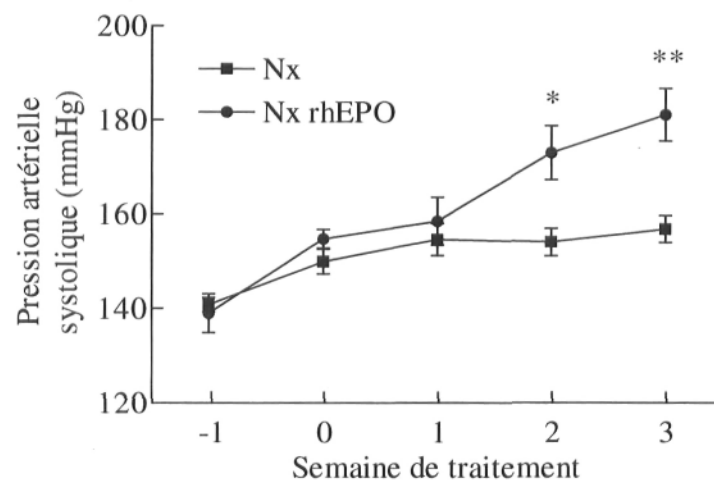
**Figure 30.** Effet de l'rhEPO sur l'hématocrite en IRC



*Hématocrite au début et à la fin du traitement chez les animaux urémiques recevant l'rhEPO (Nx rhEPO) ou le véhicule (Nx). n=9. Moyenne  $\pm$  SEM. \*,  $p < 0.001$  vs Nx post traitement.*

La PA est élevée chez les animaux urémiques ( $157 \pm 3$  mmHg) et cette hypertension est aggravée par le traitement à l'rhEPO ( $181 \pm 6$  mmHg) ( $p < 0.001$ ) (figure 31).

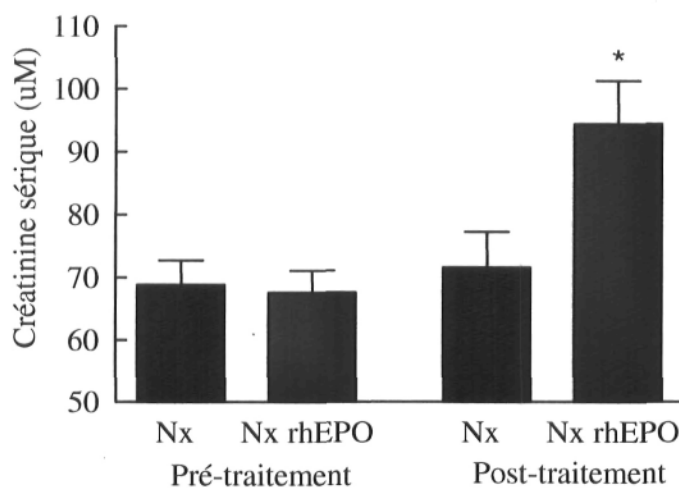
**Figure 31.** Effet de l'rhEPO sur la PA en IRC



*Progression de la PA pendant le protocole chez les animaux urémiques recevant l'rhEPO (Nx rhEPO) ou le véhicule (Nx). n=9. Moyenne  $\pm$  SEM. \*,  $p < 0.05$  vs Nx, \*\*,  $p < 0.01$  vx Nx.*

En plus d'augmenter la PA, l'rhEPO aggrave la détérioration de la fonction rénale (figure 32). Au début du traitement, la créatinine sérique est similaire dans les deux groupes (Nx :  $68.8 \pm 3.9 \mu\text{M}$ , Nx rhEPO :  $67.6 \pm 3.5 \mu\text{M}$ ). Nous pouvons par contre observer, à la fin du traitement, une augmentation de la créatinine sérique chez les animaux recevant l'rhEPO ( $94.3 \pm 7.0 \mu\text{M}$ ) comparativement aux animaux recevant le véhicule ( $71.6 \pm 5.7 \mu\text{M}$ ) ( $p < 0.01$ ).

**Figure 32. Effet de l'rhEPO sur la créatinine sérique en IRC**

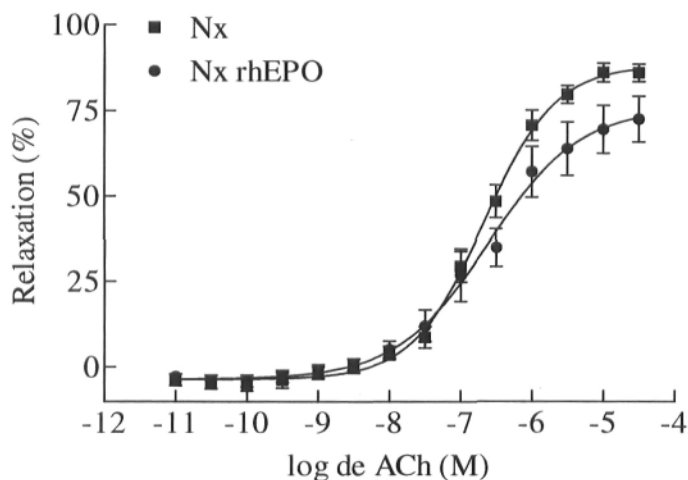


*Créatinine sérique au début et à la fin du traitement chez les animaux recevant l'rhEPO (Nx rhEPO) ou le véhicule (Nx). n=10. Moyenne  $\pm$  SEM. \*,  $p < 0.01$  vs Nx post-traitement.*

### 5.3.2- Réactivité vasculaire

Nous pouvons tout d'abord observé une diminution de la relaxation endothélium-dépendant à l'ACh chez les animaux recevant l'rhEPO (figure 33). Cette tendance n'est toutefois pas significative ( $p=0.06$ ).

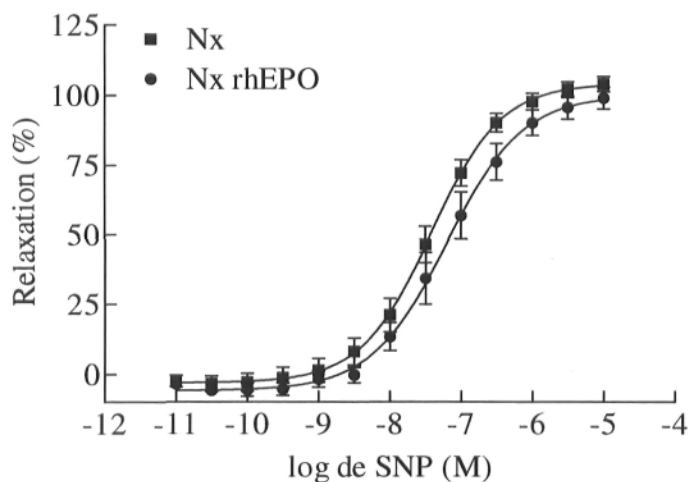
**Figure 33.** Effet de l'rhEPO sur la relaxation endothélium-dépendant à l'ACh en urémie



*Courbes dose-réponse à l'ACh dans les segments d'aorte thoracique provenant de rats urémiques recevant l'rhEPO (Nx rhEPO) ou le véhicule (Nx).  $n=10$ . Moyenne  $\pm$  SEM.*

Nous avons également remarqué une altération de la relaxation au SNP (figure 34). Nous avons déjà observé en urémie un léger déplacement de la courbe dose-réponse au SNP vers la droite. Le traitement à l'rhEPO en urémie accentue ce déplacement (log du  $EC_{50}$  : Nx =  $-7.42 \pm 0.06$  M, Nx rhEPO =  $-7.20 \pm 0.08$  M) ( $p<0.05$ ).

**Figure 34. Effet de l'rhEPO sur la relaxation endothélium-indépendante au SNP en urémie**

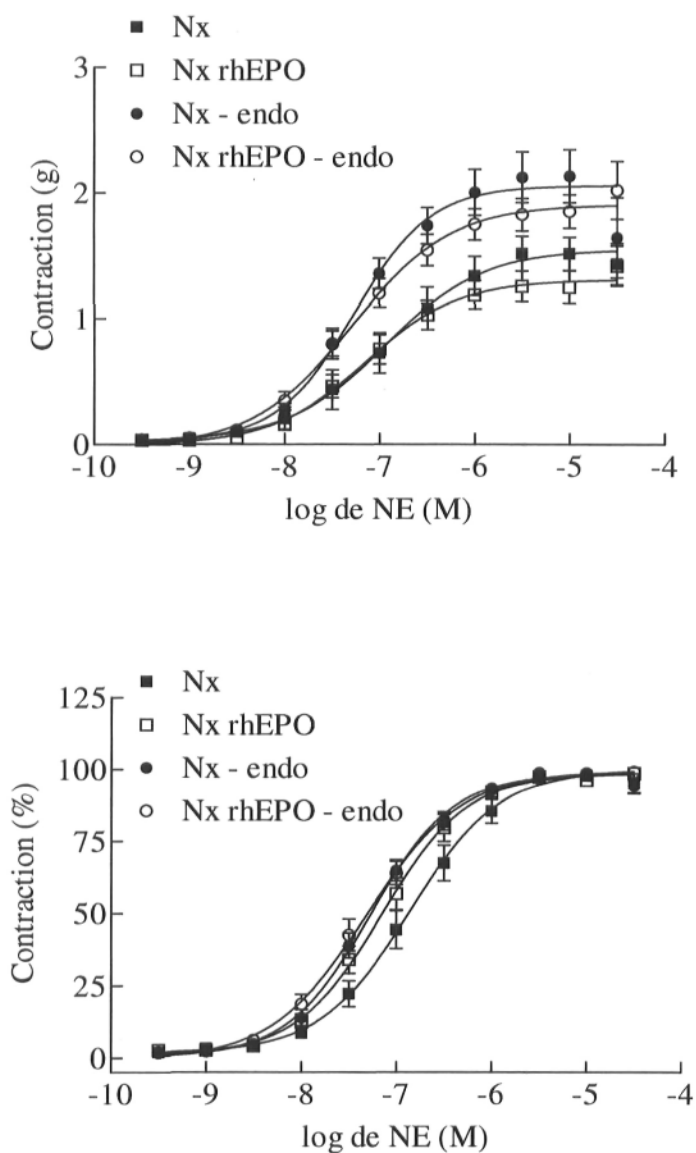


*Courbes dose-réponse au SNP dans les segments d'aorte thoracique provenant de rats urémiques recevant l'rhEPO (Nx rhEPO) ou le véhicule (Nx). Les résultats sont exprimés en gramme de tension et en pourcentage de relaxation. n=10. Moyenne  $\pm$  SEM.*

L'rhEPO ne modifie pas la contraction à la NE des segments d'aorte thoracique en urémie (figure 35). En effet, le  $E_{\max}$  et le  $EC_{50}$  reste inchangé dans les deux groupes d'animaux avec endothélium ( $E_{\max}$  Nx =  $1.55 \pm 0.11$  g,  $E_{\max}$  Nx rhEPO =  $1.31 \pm 0.07$  g,  $EC_{50}$  Nx =  $-6.86 \pm 0.06$  M,  $EC_{50}$  Nx rhEPO =  $-7.15 \pm 0.05$  m) ou sans ( $E_{\max}$  Nx - endo =  $2.06 \pm 0.08$  g,  $E_{\max}$  Nx rhEPO - endo =  $1.91 \pm 0.08$  g,  $EC_{50}$  Nx - endo =  $-7.28 \pm 0.04$  m,  $EC_{50}$  Nx rhEPO - endo =  $-7.32 \pm 0.05$  M). L'absence d'endothélium déplace cependant les courbes vers la droite, et ce de façon similaire dans les deux groupes ( $p < 0.01$ ).



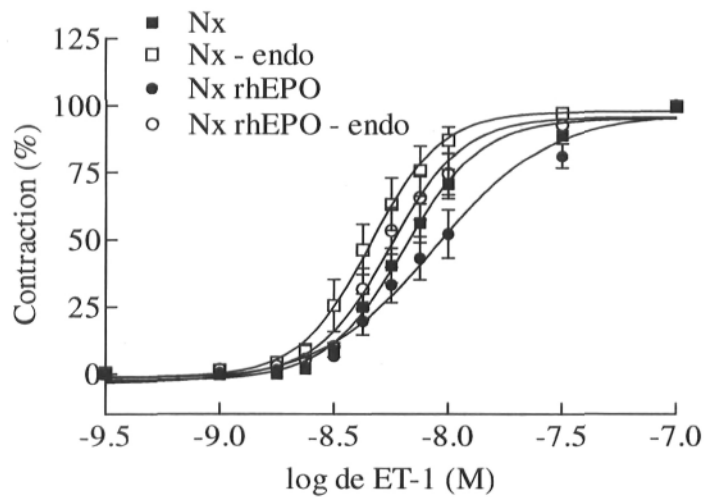
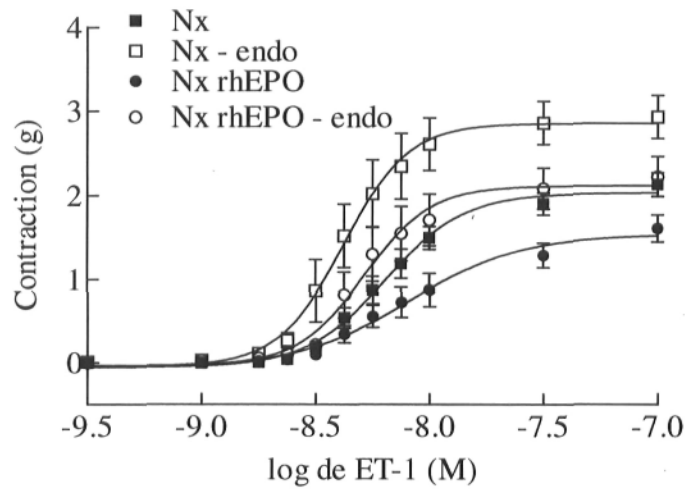
**Figure 35.** Effet de l'rhEPO sur la contraction à la NE en urémie



*Courbes dose-réponse à la NE avec et sans endothélium dans les segments d'aorte thoracique d'animaux urémiques recevant l'rhEPO (Nx rhEPO) ou le véhicule (Nx). Les résultats sont exprimés en gramme de tension et en pourcentage de contraction. n=10. Moyenne  $\pm$  SEM.*

Par ailleurs, l'atténuation de la vasoconstriction à l'ET-1 que nous avons observée en urémie est accentuée par le traitement à l'rhEPO (figure 36). En plus du déplacement de la courbe dose-réponse vers la droite ( $p < 0.01$ ), le maximum de contraction est diminué significativement ( $p < 0.05$ ) (tableau 6). L'absence d'endothélium cause une augmentation de la contraction à l'ET-1 semblable dans les segments d'aorte des rats Nx recevant le véhicule ou l'rhEPO ( $p < 0.001$ ). Cependant, la contraction à l'ET-1 demeure inférieure dans les segments d'aorte des animaux Nx rhEPO ( $p < 0.001$ ).

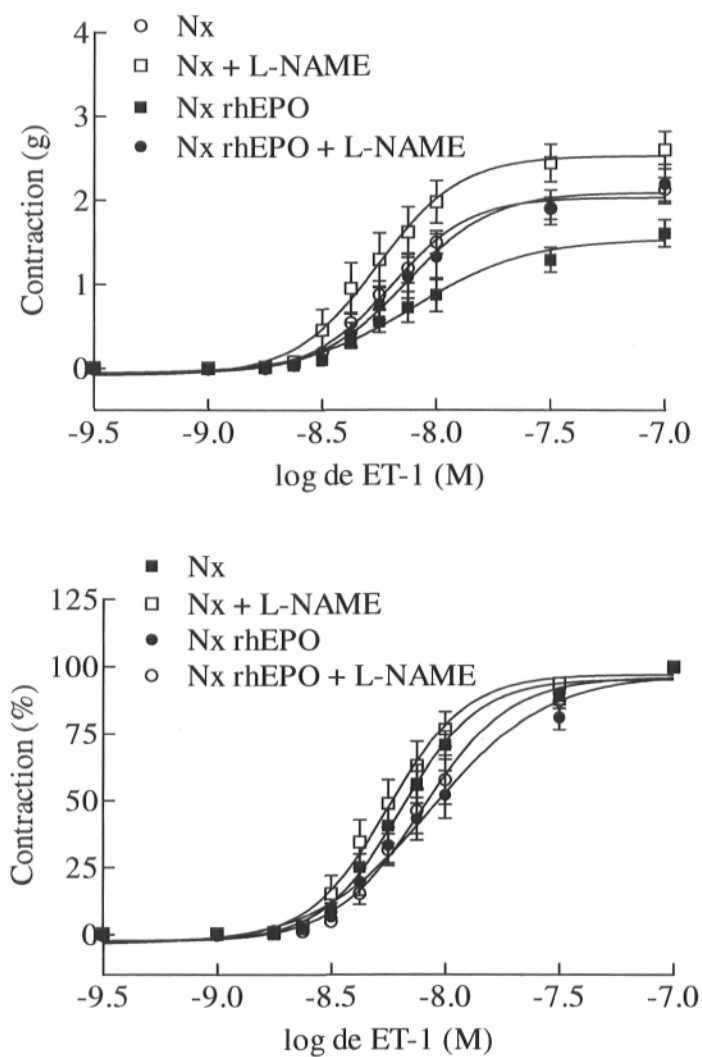
**Figure 36. Effet de l'rhEPO sur la contraction à l'ET-1 en urémie**



*Courbes dose-réponse à l'ET-1 avec et sans endothélium dans les segments d'aorte thoracique provenant d'animaux urémiques recevant l'rhEPO (Nx rhEPO) ou le véhicule (Nx). Les résultats sont exprimés en gramme de tension et en pourcentage de contraction. n=10. Moyenne  $\pm$  SEM.*

L'incubation des segments d'aorte thoracique d'animaux urémiques avec le L-NAME accentue la contraction à l'ET-1 autant chez les animaux recevant l'rhEPO que chez ceux recevant le véhicule (figure 37) de la même manière qu'en absence d'endothélium (tableau 6). Le L-NAME n'a pas d'effet significatif sur les segments d'aorte thoracique sans endothélium.

**Figure 37. Effet du L-NAME sur l'atténuation de la contraction à l'ET-1 par l'rhEPO en urémie**



*Courbes dose-réponse à l'ET-1 avec et sans L-NAME dans les segments d'aorte thoracique provenant d'animaux urémiques recevant l'rhEPO (Nx rhEPO) ou le véhicule (Nx). Les résultats sont exprimés en gramme de tension et en pourcentage de contraction. n=10. Moyenne  $\pm$  SEM.*

**Tableau 6. Sommaire des paramètres des courbes dose-réponse à l'ET-1 des segments d'aorte thoracique provenant d'animaux urémiques recevant l'rhEPO ou le véhicule**

Groupes	Contraction (g)		Contraction (%)
	EC <sub>50</sub> (-log de ET-1 M)	E <sub>max</sub> (g)	EC <sub>50</sub> (-log de ET-1 M)
Nx	8.19	2.03	8.19
Nx - endo	8.37 †	2.85 †	8.34 †
Nx + L-NAME	8.25	2.53 †	8.25
Nx - endo + L-NAME	8.33	3.19	8.32
Nx rhEPO	8.09	1.53 *	8.06 †
Nx rhEPO - endo	8.28 ‡	2.11	8.25 §
Nx rhEPO + L-NAME	8.13	2.09	8.10
Nx rhEPO – endo + L-NAME	8.28	2.34	8.24

\*,  $p < 0.05$  vs Nx

†,  $p < 0.01$  vs Nx

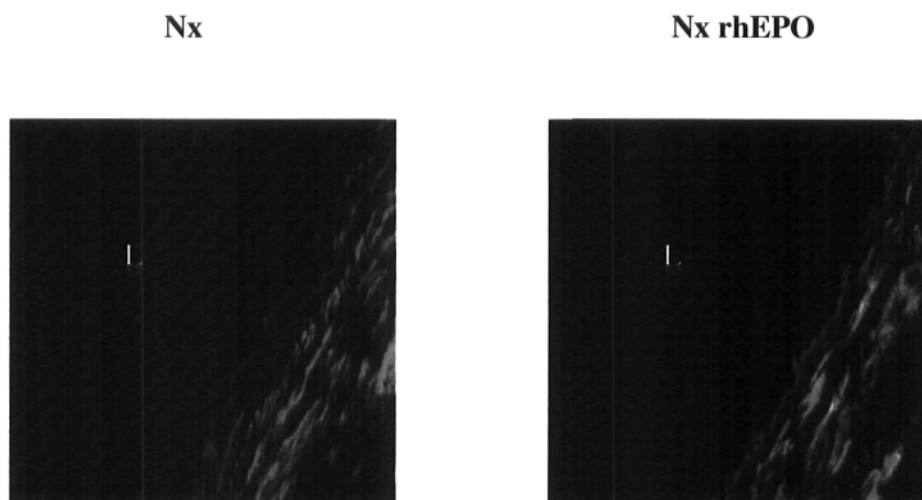
‡,  $p < 0.05$  vs Nx rhEPO

§,  $p < 0.01$  vs Nx rhEPO

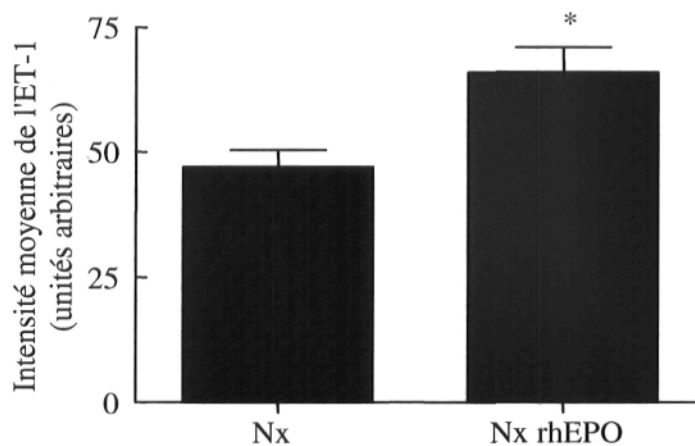
### 5.3.3- Immunofluorescence en microscopie confocale

Nous avons observé une augmentation de l'expression de l'ET-1 dans les segments d'aorte thoracique d'animaux urémiques recevant l'rhEPO ( $66.0 \pm 5.0$ ) comparativement aux animaux urémiques recevant le véhicule ( $47.0 \pm 3.3$ ) (figure38).

**Figure 38.** Effet de l'rhEPO sur l'expression de l'ET-1 en urémie



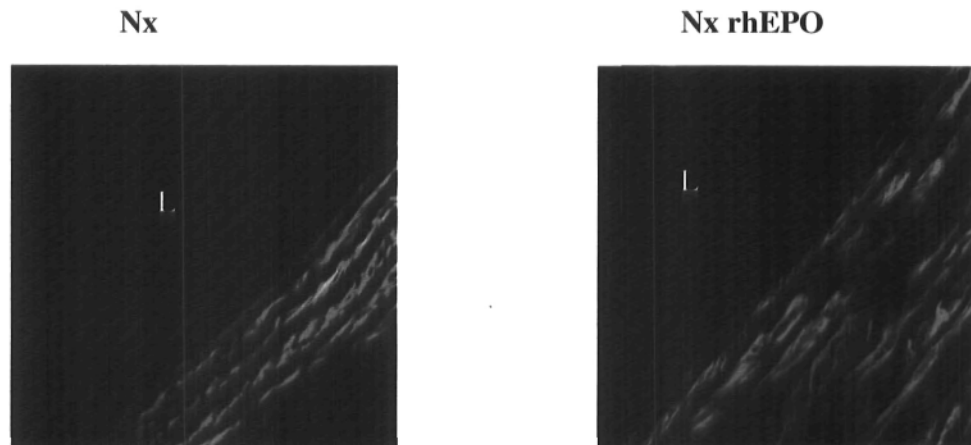
*Immunodétection de l'ET-1 (rouge) dans l'endothélium d'aorte thoracique provenant d'animaux urémiques recevant l'rhEPO (Nx rhEPO) ou le véhicule (Nx). La phalloïdine montre les filaments d'actine du muscle lisse vasculaire (vert). L= lumière du vaisseau*



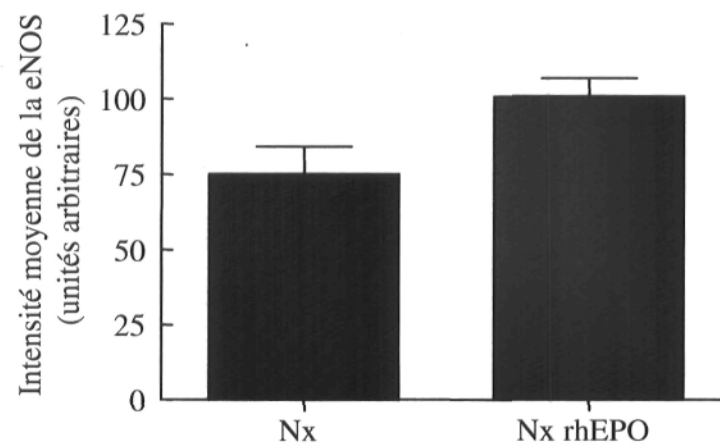
*Quantification de la fluorescence de l'ET-1 émise dans l'endothélium d'aorte thoracique provenant d'animaux urémiques recevant l'rhEPO (Nx rhEPO, n=5) ou le véhicule (Nx, n=4). Moyenne  $\pm$  SEM. \*,  $p < 0.05$ .*

L'rhEPO semble avoir un effet similaire sur l'expression de la eNOS en urémie qu'en condition normale (figure 39). En effet, l'expression de la eNOS tend à augmenter suite au traitement à l'rhEPO ( $p=0.0597$ ).

**Figure 39.** Effet de l'rhEPO sur l'expression de la eNOS en urémie



*Immunodétection de la eNOS (rouge) dans l'endothélium d'aorte thoracique provenant d'animaux urémiques recevant l'rhEPO (Nx rhEPO) ou le véhicule (Nx). L= lumière du vaisseau.*



*Quantification de la fluorescence de la eNOS émise dans l'endothélium d'aorte thoracique provenant d'animaux urémiques recevant l'rhEPO (Nx rhEPO) ( $n=4$ ) ou le véhicule (Nx) ( $n=5$ ). Moyenne  $\pm$  SEM.  $p=0.0597$ .*



## Chapitre 6- Discussion

La disponibilité de l'rhEPO constitue une révolution majeure dans le traitement de l'anémie en IRC. Cependant l'rhEPO augmente la PA causant une hypertension *de novo* ou aggravant l'hypertension déjà existante chez les patients en IRC. L'effet presseur de l'rhEPO est observé exclusivement en IRC puisqu'elle n'a pas d'effet sur la PA en condition normale ou dans le cas de maladies non rénales. Des travaux antérieurs de notre laboratoire indiquent que l'rhEPO peut accentuer la dysfonction endothéliale présente en IRC [76, 80]. Nous avons donc émis l'hypothèse que l'rhEPO module la relâche des facteurs vasoactifs dérivés de l'endothélium tels que l'ET-1 et le NO de façon différentielle en condition normale et en IRC. L'objectif de mes travaux à la maîtrise était donc d'élucider les mécanismes impliqués dans le maintien de la PA en condition normale ainsi que dans l'effet hypertenseur de l'rhEPO en IRC. Mes études ont permis de mettre en évidence un mécanisme vasodilatateur compensatoire endothélium-dépendant modulé par l'rhEPO chez l'animal normal. Un mécanisme semblable est aussi présent en IRC, qui n'est cependant pas modulé par l'rhEPO dans cette condition.

En condition normale, nous avons observé que la réponse à la NE est inchangée dans les segments d'aorte thoracique dont l'endothélium est intact, mais qu'elle est par contre augmentée en absence de l'endothélium suite au traitement à l'rhEPO. Cette observation est en accord avec des travaux réalisés sur des aortes de lapin en culture [73]. L'augmentation de la réponse à la NE en absence d'endothélium comparativement aux témoins suggère une augmentation de la réponse adrénérgique soit par l'augmentation de la relâche de facteurs vasoconstricteurs endothéliaux autres que l'ET-1, qui n'est pas affecté par l'rhEPO en condition normale, ou soit par une sensibilité accrue du muscle lisse. Cet effet de la NE reste cependant à être élucidé. L'absence de cet effet dans les segments dont l'endothélium est intact indique la présence d'un mécanisme vasodilatateur compensateur de l'endothélium vasculaire qui s'oppose à l'effet presseur de la NE. Contrairement à la NE, la contraction à l'ET-1 est atténuée dans les segments d'aorte de rats traités à l'rhEPO dont l'endothélium est intact. Cependant, l'observation que la contraction à l'ET-1 est augmentée au même niveau dans l'aorte dénudée des rats traités à l'rhEPO et des témoins

indique que le mécanisme vasodilatateur compensateur est responsable de l'atténuation de la réponse à l'ET-1. Ce mécanisme peut donc jouer un rôle important dans le maintien de la PA normale en condition normale suite au traitement à l'rhEPO.

Nous avons aussi observé que l'incubation des segments d'aorte avec le L-NAME augmente aussi la contraction à l'ET-1 comme en l'absence de l'endothélium. Cet effet du L-NAME démontre que le principal facteur compensateur vasodilatateur modulé par l'rhEPO est le NO. L'augmentation de l'expression de la eNOS observée en microscopie confocale dans l'endothélium des vaisseaux de rats traités à l'rhEPO indique que l'augmentation de l'action du NO sur la réactivité vasculaire à la NE et à l'ET-1 est causée par une augmentation de sa synthèse. Ces résultats sont supportés par ceux de certaines équipes de recherches montrant que l'rhEPO augmente la production de NO dans les cellules endothéliales vasculaires [59, 81, 82]. De plus, Kanagy et al. [72] avait déjà montré une augmentation de l'expression de la eNOS par l'rhEPO chez le rat en condition normale par analyse de type Western. Cette équipe avait aussi observé une augmentation de la relaxation à l'ACH *in vivo*. Par contre, nous n'avons pas obtenu ce résultat dans les segments d'aorte thoracique isolés malgré l'expression accrue de la eNOS. Il est possible qu'une augmentation de la relâche de NO suite au traitement à l'rhEPO en condition normale n'influence pas la relaxation à l'ACH puisqu'elle est maximale dans cette situation.

Cette première étude chez le rat normal montre donc que l'rhEPO induit l'activation d'un mécanisme vasodilatateur compensatoire endothélium-dépendant. Ce mécanisme implique une augmentation de la relâche de NO suite à une augmentation de l'expression de la eNOS. Ce mécanisme peut être responsable du maintien de la pression en condition normale suite au traitement à l'rhEPO.

Par la suite, nous voulions vérifier la présence de ce mécanisme compensateur en IRC et plus spécifiquement s'il est modulé par le traitement à l'rhEPO dans cette condition. Premièrement, l'urémie entraîne également une modification de la réponse à la NE dans les segments sans endothélium seulement, similaire à celle observée suite au traitement à

l'rhEPO en condition normale. Cette observation concorde avec différentes études montrant une modulation de la réponse adrénérgique en urémie [73, 85-87]. Le fait qu'il n'y ait pas de différence en présence de l'endothélium indique une fois de plus un effet vasodilatateur compensatoire de l'endothélium. Par ailleurs, la contraction à l'ET-1 est atténuée dans les vaisseaux de rats urémiques lorsque l'endothélium est intact, tandis qu'elle est accentuée en son absence. Ces résultats démontrent donc qu'en urémie, un mécanisme vasodilatateur atténue la réponse vasoconstrictrice à la NE et à l'ET-1.

L'observation que l'incubation des segments d'aortes avec le L-NAME cause aussi une augmentation de la réponse à l'ET-1 démontre que le NO serait impliqué dans l'effet vasodilatateur compensateur en IRC. De plus, l'expression de la eNOS est accrue dans l'aorte thoracique des animaux en IRC en comparaison avec les animaux témoins. Ceci suggère une augmentation de la synthèse de NO en IRC. Bien que nos résultats démontrent un effet accru du NO dans les vaisseaux isolés d'animaux urémiques, ce mécanisme ne semble pas efficace *in vivo* pour contrer l'augmentation de la résistance périphérique et de la PA. Une diminution de la biodisponibilité du NO en urémie, causée par la présence accrue d'inhibiteurs endogènes du NO tels que l'ADMA et d'inactivateurs du NO comme les espèces réactives de l'oxygène, pourrait expliquer l'inefficacité de ce mécanisme *in vivo*[83].

Enfin, tel qu'il a été démontré dans les études antérieures de notre laboratoire [63, 64, 67], le traitement des animaux urémiques avec l'rhEPO entraîne une aggravation de l'hypertension ainsi qu'une détérioration de la fonction rénale. L'rhEPO a également entraîné une augmentation de l'expression de l'ET-1 dans l'endothélium de l'aorte thoracique.

Dans ces conditions, la réponse à la NE est augmentée dans les vaisseaux des rats urémiques en absence d'endothélium et n'est pas affectée par le traitement à l'rhEPO. La contraction à l'ET-1 est toutefois atténuée dans les segments provenant d'animaux urémiques recevant l'rhEPO comparativement aux animaux Nx, et ce, aussi bien en

présence qu'en absence d'endothélium. La réponse vasodilatatrice observée en IRC ne semble donc pas être modulée par l'rhEPO. La diminution de la réponse à l'ET-1 peut être causée par l'expression accrue de l'ET-1 dans l'endothélium vasculaire tel qu'observé dans les vaisseaux de rats Nx recevant l'rhEPO. En effet, l'ET-1 se lie à son récepteur ET<sub>A</sub> de façon quasi irréversible pour causer une vasoconstriction prolongée *in vivo* [14]. Une plus grande occupation des récepteurs ET<sub>A</sub> sur les cellules musculaires lisses de la média suite à une augmentation de la production locale d'ET-1 peut donc bloquer l'action de l'ET-1 exogène sur les segments d'aorte isolée.

Par ailleurs, nous avons observé une altération de la réponse à l'ACh et au SNP dans les segments d'aorte des animaux urémiques traités à l'rhEPO. L'altération de la relaxation endothélium-dépendante montre une dysfonction endothéliale accrue suite au traitement à l'rhEPO. Pourtant, l'expression de la eNOS est accentuée dans l'endothélium vasculaire. Ces résultats s'accordent à ceux de l'équipe de Vaziri [68, 71] qui affirme que l'effet hypertenseur de l'rhEPO en IRC n'est pas attribuable à une déficience en NO, mais plutôt à une augmentation de sa production pour compenser l'augmentation de la résistance vasculaire au NO. L'inefficacité du NO à prévenir l'augmentation de la PA serait causée par une réduction plus marquée de la biodisponibilité du NO. En effet, il a été démontré que la concentration d'ADMA est augmentée suite au traitement à l'rhEPO en urémie [54]. L'aggravation de l'hypertension et de l'insuffisance rénale par l'rhEPO serait également accompagnée d'une augmentation de la production d'espèces réactives de l'oxygène par les vasopresseurs comme l'Ang II et l'ET-1, qui inactive le NO [68, 84]. La diminution de la concentration locale de NO pourrait alors constituer un signal permettant de stimuler l'expression de la eNOS [88].

En résumé, ces derniers résultats indiquent que le mécanisme vasodilatateur compensateur serait présent chez les animaux urémiques recevant l'rhEPO. Cependant, cet effet vasodilatateur serait insuffisant pour contrer la présence accrue d'agents vasoconstricteurs comme l'ET-1.

## **Conclusion**

En conclusion, les résultats présentés dans ce mémoire montrent que le traitement à l'rhEPO entraîne l'activation d'un mécanisme vasodilatateur de l'endothélium pouvant expliquer, du moins en partie, le maintien de la PA normale en condition rénale normale. Ce mécanisme impliquerait une augmentation de la relâche de NO suite à l'augmentation de l'expression de la eNOS. Ce mécanisme est également présent en IRC, mais n'est pas modulé par le traitement à l'rhEPO. De plus, il serait insuffisant en IRC pour contrer l'effet des agents vasoconstricteurs et empêcher le développement de l'hypertension artérielle.

## Bibliographie

1. McAlister, V.C. and K. Badovinac, *Transplantation in Canada: report of the Canadian Organ Replacement Register*. Transplant Proc, 2003. **35**(7): p. 2428-30.
2. Amann, K., C. Wanner, and E. Ritz, *Cross-Talk between the Kidney and the Cardiovascular System*. J Am Soc Nephrol, 2006. **17**(8): p. 2112-9.
3. Guyenet, P.G., *The sympathetic control of blood pressure*. Nat Rev Neurosci, 2006. **7**(5): p. 335-46.
4. de Champlain, J., et al., *The sympatho-adrenal tone and reactivity in human hypertension*. Clin Exp Hypertens A, 1989. **11 Suppl 1**: p. 159-71.
5. Tortora, G., Grabowski, SR, *Principes d'anatomie et de physiologie*. 2001.
6. Genest, J. and M. Cantin, *Atrial natriuretic factor*. Circulation, 1987. **75**(1 Pt 2): p. I118-24.
7. de Bold, A.J., et al., *A decade of atrial natriuretic factor research*. Can J Physiol Pharmacol, 1991. **69**(10): p. 1480-5.
8. Pinet, F., *Biologie et pathologie du coeur et des vaisseaux*. 2002.
9. Guyton, A., *Textbook of medical physiology*. 1986.
10. Marieb, E., Laurendeau, G, *Anatomie et Physiologie Humaines*. 1992.
11. Hamet, P., et al., *Hypertension: genes and environment*. J Hypertens, 1998. **16**(4): p. 397-418.
12. Silbernagl, L., *Color Atlas of Pathophysiology*. 2000.
13. *Rapport RCITO - Traitement du stade terminal de l'insuffisance organique au Canada, 2002/2003*. 2005. p. 113.
14. Yanagisawa, M., et al., *A novel potent vasoconstrictor peptide produced by vascular endothelial cells*. Nature, 1988. **332**(6163): p. 411-5.
15. King, A., *Endothelins: multifunctional peptides with potent vasoactive properties, in Hypertension: Pathophysiology, Diagnosis and Management*. 1995.
16. Arai, H., et al., *The human endothelin-B receptor gene. Structural organization and chromosomal assignment*. J Biol Chem, 1993. **268**(5): p. 3463-70.
17. Sakurai, T., et al., *Cloning of a cDNA encoding a non-isopeptide-selective subtype of the endothelin receptor*. Nature, 1990. **348**(6303): p. 732-5.
18. Hosoda, K., et al., *Organization, structure, chromosomal assignment, and expression of the gene encoding the human endothelin-A receptor*. J Biol Chem, 1992. **267**(26): p. 18797-804.
19. Hirata, Y., et al., *Endothelin receptor subtype B mediates synthesis of nitric oxide by cultured bovine endothelial cells*. J Clin Invest, 1993. **91**(4): p. 1367-73.
20. de Nucci, G., et al., *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**(24): p. 9797-800.
21. Wagner, O.F., et al., *Polar secretion of endothelin-1 by cultured endothelial cells*. J Biol Chem, 1992. **267**(23): p. 16066-8.
22. Fukuroda, T., et al., *Clearance of circulating endothelin-1 by ETB receptors in rats*. Biochem Biophys Res Commun, 1994. **199**(3): p. 1461-5.

23. Dupuis, J., C.A. Goresky, and A. Fournier, *Pulmonary clearance of circulating endothelin-1 in dogs in vivo: exclusive role of ETB receptors*. J Appl Physiol, 1996. **81**(4): p. 1510-5.
24. Lariviere, R. and M. Lebel, *Endothelin-1 in chronic renal failure and hypertension*. Can J Physiol Pharmacol, 2003. **81**(6): p. 607-21.
25. Hocher, B., et al., *Impaired sodium excretion, decreased glomerular filtration rate and elevated blood pressure in endothelin receptor type B deficient rats*. J Mol Med, 2001. **78**(11): p. 633-41.
26. Haynes, W.G. and D.J. Webb, *Endothelin as a regulator of cardiovascular function in health and disease*. J Hypertens, 1998. **16**(8): p. 1081-98.
27. Dhaun, N., J. Goddard, and D.J. Webb, *The endothelin system and its antagonism in chronic kidney disease*. J Am Soc Nephrol, 2006. **17**(4): p. 943-55.
28. Brochu, E., et al., *Endothelin ET(A) receptor blockade prevents the progression of renal failure and hypertension in uraemic rats*. Nephrol Dial Transplant, 1999. **14**(8): p. 1881-8.
29. Lariviere, R., et al., *Increased immunoreactive endothelin-1 levels in blood vessels and glomeruli of rats with reduced renal mass*. Kidney Blood Press Res, 1997. **20**(6): p. 372-80.
30. Lebel, M., et al., *Plasma endothelin levels and blood pressure in hemodialysis and in CAPD patients. Effect of subcutaneous erythropoietin replacement therapy*. Clin Exp Hypertens, 1994. **16**(5): p. 565-75.
31. Morris, S.T., et al., *Impaired endothelial function in isolated human uremic resistance arteries*. Kidney Int, 2001. **60**(3): p. 1077-82.
32. Furchgott, R.F. and J.V. Zawadzki, *The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine*. Nature, 1980. **288**(5789): p. 373-6.
33. Palmer, R.M., D.S. Ashton, and S. Moncada, *Vascular endothelial cells synthesize nitric oxide from L-arginine*. Nature, 1988. **333**(6174): p. 664-6.
34. Papapetropoulos, A., R.D. Rudic, and W.C. Sessa, *Molecular control of nitric oxide synthases in the cardiovascular system*. Cardiovasc Res, 1999. **43**(3): p. 509-20.
35. Romero, J.C., et al., *Role of the endothelium-dependent relaxing factor nitric oxide on renal function*. J Am Soc Nephrol, 1992. **2**(9): p. 1371-87.
36. Umans, J.G. and R. Levi, *Nitric oxide in the regulation of blood flow and arterial pressure*. Annu Rev Physiol, 1995. **57**: p. 771-90.
37. Ribeiro, M.O., et al., *Chronic inhibition of nitric oxide synthesis. A new model of arterial hypertension*. Hypertension, 1992. **20**(3): p. 298-303.
38. Shesely, E.G., et al., *Elevated blood pressures in mice lacking endothelial nitric oxide synthase*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1996. **93**(23): p. 13176-81.
39. Li, H. and U. Forstermann, *Nitric oxide in the pathogenesis of vascular disease*. J Pathol, 2000. **190**(3): p. 244-54.
40. Endemann, D.H. and E.L. Schiffrin, *Endothelial dysfunction*. J Am Soc Nephrol, 2004. **15**(8): p. 1983-92.
41. Boger, R.H., et al., *Asymmetric dimethylarginine (ADMA): a novel risk factor for endothelial dysfunction: its role in hypercholesterolemia*. Circulation, 1998. **98**(18): p. 1842-7.

42. Boger, R.H., *Asymmetric dimethylarginine, an endogenous inhibitor of nitric oxide synthase, explains the "L-arginine paradox" and acts as a novel cardiovascular risk factor.* J Nutr, 2004. **134**(10 Suppl): p. 2842S-2847S; discussion 2853S.
43. Tost, H., et al., *Effect of nitric oxide synthase inhibition on renal circulation and excretory function in anaesthetized rats.* Exp Physiol, 2000. **85**(6): p. 791-800.
44. Baylis, C., B. Mitruka, and A. Deng, *Chronic blockade of nitric oxide synthesis in the rat produces systemic hypertension and glomerular damage.* J Clin Invest, 1992. **90**(1): p. 278-81.
45. Sigmon, D.H., O.A. Carretero, and W.H. Beierwaltes, *Endothelium-derived relaxing factor regulates renin release in vivo.* Am J Physiol, 1992. **263**(2 Pt 2): p. F256-61.
46. Wilcox, C.S., et al., *Nitric oxide synthase in macula densa regulates glomerular capillary pressure.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1992. **89**(24): p. 11993-7.
47. Vaziri, N.D., Z. Ni, and F. Oveisi, *Upregulation of renal and vascular nitric oxide synthase in young spontaneously hypertensive rats.* Hypertension, 1998. **31**(6): p. 1248-54.
48. Vaziri, N.D., et al., *Downregulation of nitric oxide synthase in chronic renal insufficiency: role of excess PTH.* Am J Physiol, 1998. **274**(4 Pt 2): p. F642-9.
49. Dumont, Y., et al., *Blood pressure-independent effect of angiotensin AT1 receptor blockade on renal endothelin-1 production in hypertensive uremic rats.* J Hypertens, 2001. **19**(8): p. 1479-87.
50. Aiello, S., et al., *Renal and systemic nitric oxide synthesis in rats with renal mass reduction.* Kidney Int, 1997. **52**(1): p. 171-81.
51. Passauer, J., et al., *Reduced agonist-induced endothelium-dependent vasodilation in uremia is attributable to an impairment of vascular nitric oxide.* J Am Soc Nephrol, 2005. **16**(4): p. 959-65.
52. Farkas, K., et al., *Impairment of skin microvascular reactivity in hypertension and uraemia.* Nephrol Dial Transplant, 2005. **20**(9): p. 1821-7.
53. Vallance, P., et al., *Accumulation of an endogenous inhibitor of nitric oxide synthesis in chronic renal failure.* Lancet, 1992. **339**(8793): p. 572-5.
54. Xiao, S., et al., *Circulating endothelial nitric oxide synthase inhibitory factor in some patients with chronic renal disease.* Kidney Int, 2001. **59**(4): p. 1466-72.
55. Eckardt, K.U., *Anaemia in end-stage renal disease: pathophysiological considerations.* Nephrol Dial Transplant, 2001. **16 Suppl 7**: p. 2-8.
56. Krantz, S.B., *Erythropoietin.* Blood, 1991. **77**(3): p. 419-34.
57. Fisher, J.W., *Erythropoietin: physiology and pharmacology update.* Exp Biol Med (Maywood), 2003. **228**(1): p. 1-14.
58. Anagnostou, A., et al., *Erythropoietin receptor mRNA expression in human endothelial cells.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1994. **91**(9): p. 3974-8.
59. Beleslin-Cokic, B.B., et al., *Erythropoietin and hypoxia stimulate erythropoietin receptor and nitric oxide production by endothelial cells.* Blood, 2004. **104**(7): p. 2073-80.
60. Cheung, J.Y. and B.A. Miller, *Molecular mechanisms of erythropoietin signaling.* Nephron, 2001. **87**(3): p. 215-22.
61. Smith, K.J., et al., *The cardiovascular effects of erythropoietin.* Cardiovasc Res, 2003. **59**(3): p. 538-48.



62. Abraham, P.A. and M.G. Macres, *Blood pressure in hemodialysis patients during amelioration of anemia with erythropoietin*. J Am Soc Nephrol, 1991. **2**(4): p. 927-36.
63. Lebel, M., et al., *Effect of recombinant human erythropoietin therapy on ambulatory blood pressure in normotensive and in untreated borderline hypertensive hemodialysis patients*. Am J Hypertens, 1995. **8**(6): p. 545-51.
64. Lebel, M., et al., *Hemodynamic and hormonal changes during erythropoietin therapy in hemodialysis patients*. J Am Soc Nephrol, 1998. **9**(1): p. 97-104.
65. Berglund, B. and B. Ekblom, *Effect of recombinant human erythropoietin treatment on blood pressure and some haematological parameters in healthy men*. J Intern Med, 1991. **229**(2): p. 125-30.
66. Muntzel, M., et al., *Effect of erythropoietin on hematocrit and blood pressure in normotensive and hypertensive rats*. J Am Soc Nephrol, 1992. **3**(2): p. 182-7.
67. Lacasse, M.S., et al., *Uremia enhances the blood pressure response to erythropoietin*. Clin Exp Hypertens, 1997. **19**(4): p. 389-401.
68. Vaziri, N.D., *Mechanism of erythropoietin-induced hypertension*. Am J Kidney Dis, 1999. **33**(5): p. 821-8.
69. Kaupke, C.J., S. Kim, and N.D. Vaziri, *Effect of erythrocyte mass on arterial blood pressure in dialysis patients receiving maintenance erythropoietin therapy*. J Am Soc Nephrol, 1994. **4**(11): p. 1874-8.
70. Heidenreich, S., K.H. Rahn, and W. Zidek, *Direct vasopressor effect of recombinant human erythropoietin on renal resistance vessels*. Kidney Int, 1991. **39**(2): p. 259-65.
71. Vaziri, N.D., *Cardiovascular effects of erythropoietin and anemia correction*. Curr Opin Nephrol Hypertens, 2001. **10**(5): p. 633-7.
72. Kanagy, N.L., et al., *Erythropoietin administration in vivo increases vascular nitric oxide synthase expression*. J Cardiovasc Pharmacol, 2003. **42**(4): p. 527-33.
73. Bode-Boger, S.M., et al., *Endothelin release and shift in prostaglandin balance are involved in the modulation of vascular tone by recombinant erythropoietin*. J Cardiovasc Pharmacol, 1992. **20 Suppl 12**: p. S25-8.
74. Carlini, R.G., et al., *Recombinant human erythropoietin (rHuEPO) increases endothelin-1 release by endothelial cells*. Kidney Int, 1993. **43**(5): p. 1010-4.
75. Vogel, V., et al., *Effects of erythropoietin on endothelin-1 synthesis and the cellular calcium messenger system in vascular endothelial cells*. Am J Hypertens, 1997. **10**(3): p. 289-96.
76. Lebel, M., et al., *Plasma and blood vessel endothelin-1 concentrations in hypertensive uremic rats treated with erythropoietin*. Clin Exp Hypertens, 1998. **20**(8): p. 939-51.
77. Carlini, R., C.I. Obialo, and M. Rothstein, *Intravenous erythropoietin (rHuEPO) administration increases plasma endothelin and blood pressure in hemodialysis patients*. Am J Hypertens, 1993. **6**(2): p. 103-7.
78. del Castillo, D., et al., *The pressor effect of recombinant human erythropoietin is not due to decreased activity of the endogenous nitric oxide system*. Nephrol Dial Transplant, 1995. **10**(4): p. 505-8.

79. Tsukahara, H., et al., *Molecular and functional characterization of the non-isopeptide-selective ETB receptor in endothelial cells. Receptor coupling to nitric oxide synthase.* J Biol Chem, 1994. **269**(34): p. 21778-85.
80. Moreau, C., et al., *Chronic nitric oxide inhibition aggravates hypertension in erythropoietin-treated renal failure rats.* Clin Exp Hypertens, 2000. **22**(7-8): p. 663-74.
81. Banerjee, D., et al., *Exposure of endothelial cells to recombinant human erythropoietin induces nitric oxide synthase activity.* Kidney Int, 2000. **57**(5): p. 1895-904.
82. Wu, X.C., E.J. Johns, and N.T. Richards, *Relationship between erythropoietin and nitric oxide in the contraction of rat renal arcuate arteries and human umbilical vein endothelial cells.* Clin Sci (Lond), 1999. **97**(4): p. 413-9.
83. Scalera, F., et al., *Erythropoietin increases asymmetric dimethylarginine in endothelial cells: role of dimethylarginine dimethylaminohydrolase.* J Am Soc Nephrol, 2005. **16**(4): p. 892-8.
84. Vaziri, N.D. and A. Ateshkadi, *Effects of epoetin on vascular biology.* Nephrol Dial Transplant, 1999. **14 Suppl 2**: p. 46-9.
85. Hand, M.F., et al., *Erythropoietin enhances vascular responsiveness to norepinephrine in renal failure.* Kidney Int, 1995. **48**(3): p. 806-13.
86. Leineweber, K., et al., *Cardiac beta-adrenoceptor desensitization due to increased beta-adrenoceptor kinase activity in chronic uremia.* J Am Soc Nephrol, 2002. **13**(1): p. 117-24.
87. Dhein, S., et al., *Cardiac beta-adrenoceptors in chronic uremia: studies in humans and rats.* J Am Coll Cardiol, 2000. **36**(2): p. 608-17.
88. Govers, R. and T.J. Rabelink, *Cellular regulation of endothelial nitric oxide synthase.* Am J Physiol Renal Physiol, 2001. **280**(2): p. F193-206.