

ACADÉMIE D'AIX-MARSEILLE
UNIVERSITÉ D'AVIGNON ET DES PAYS DE VAUCLUSE

THÈSE

Présentée à l'Université d'Avignon et des Pays de Vaucluse

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR

SPÉCIALITÉ :

Sciences du Mouvement Humain

Par

Fayçal MEZIRI

**Influence de l'érythropoïétine recombinante humaine sur les fonctions
cardiovasculaire et rénale chez le rat présentant une dysfonction
endothéliale : effets des interactions avec l'exercice chronique**

Soutenue le 08 décembre 2011 devant le jury composé de :

M. LAURANT Pascal, PU, Université d'Avignon, France	Directeur de thèse
Mme TOUYZ Rhian M, PhD, MD, Université d'Ottawa, Canada	Co-directrice de thèse
M. CHALOPIN Jean-Marc, PU, PH, Université de Franche-Comté, France	Rapporteur
M. DAUZAT Michel, PU, PH, Université de Montpellier, France	Rapporteur
Mme RICHERT Lysiane, PU, Université de Franche-Comté, France	Examineur
M. JOVER Bernard, PhD, Université de Montpellier, France	Examineur
M. OBERT Philippe, PU, Université d'Avignon, France	Examineur

Remerciements

Ce travail a été réalisé au sein de deux équipes de recherche dans le cadre d'une collaboration de thèse. Une partie de mon projet a été réalisée au sein de l'équipe Optimisation Métabolique et Cellulaire (EA 3921) (devenue aujourd'hui 2SBP / EA 4267) à l'Université de Franche-Comté sous la direction du Pr Pascal LAURANT et au sein du Centre de recherche sur les maladies du rein (Kidney Research Centre) à l'Université d'Ottawa sous la direction du Dr Rhian M. TOUYZ.

Je tiens à remercier tout particulièrement le Professeur Pascal LAURANT, mon directeur de thèse, et à lui exprimer ma sincère gratitude pour son encadrement, sa disponibilité et ses encouragements. Vous m'avez fait confiance et j'espère que j'ai été à la hauteur de celle-ci. Merci beaucoup pour votre enseignement, votre soutien et pour m'avoir donné la chance de concrétiser mes projets. Ces années de travail avec vous m'ont ouvert pas mal de portes et d'opportunités.

Je tiens également à remercier Mme le Docteur Rhian M. TOUYZ, ma co-directrice de thèse pour m'avoir donné l'opportunité et le privilège de travailler avec elle au sein de son équipe. Cela a été pour moi une très belle expérience que ce soit sur le plan scientifique que sur le plan humain.

Je remercie le Professeur Jean-Marc CHALOPIN et le Professeur Michel DAUZAT qui m'ont fait l'honneur d'être les rapporteurs de cette thèse. Merci pour le temps que vous avez pris pour critiquer ce travail.

Remerciements

Je remercie aussi Mme le Professeur Lysiane RICHERT et le Docteur Bernard JOVER qui m'ont fait l'honneur d'accepter de faire partie du jury de cette thèse. Ainsi que le Professeur Philippe OBERT qui, en plus m'a accepté au sein de son équipe et m'a donné l'occasion de vivre de nouvelles expériences professionnelles et scientifiques.

Je tiens à remercier les membres de mon ancienne équipe du laboratoire de "Physiologie, Pharmacologie et Nutrition Préventive" à Besançon. Je remercie particulièrement le Professeur Alain BERTHELOT de m'avoir accepté au sein de son laboratoire. Merci à vous, Céline, Fatimata, Florent, Hervé, Isabelle, Justyna, Lucy, Maling, Manuel, Marcos, Maude, Sonia, Sylvie et Teddy pour les bons moments passé au laboratoire.

Je tiens à remercier également les membres du Kidney Research Centre à Ottawa. Merci à vous, Ana, Alvaro, Kaede, Mona, Nobuhiro, Ying et plus particulièrement Anthony, Bruno, Hiba, Guto, Pauline et Roya pour leur accueil chaleureux et leur précieuse aide lors de mon séjour au Canada.

Je remercie aussi les membres de ma nouvelle équipe au laboratoire de Pharm-Ecologie Cardiovasculaire à Avignon pour leur aide et leur accueil, Agnès, Amina, Charlotte, Claire, Cyril, David, Eddy, Grégory D, Grégory M, Guillaume, Sandrine Ga, Sandrine Gi, Stéphane N, Stéphane T et sans oublier Allal.

Je tiens à remercier toutes les personnes qui, de loin ou de près, m'ont aidé dans mon parcours et une mention particulière à mes amis, Abdelhak

Remerciements

Remita, Bruno Sontia, Damien Vitiello, Eddy Crendal, Idir Idirene, Maxime Pellegrin, Mohamed Lakehal, Najim Chernine, Rafik Nehal, Saber Touati et Tlili Barhoumi, votre soutien et votre aide ont été déterminants pendant ces dernières années.

Je n'oublierai pas de remercier mes très chers parents, Zohra et Hocine qui sans eux, je ne serais pas ce que je suis aujourd'hui et j'espère qu'ils sont fiers et satisfaits de moi. Des milliards de remerciements n'égalent jamais vos sacrifices, votre soutien et vos encouragements. Que Dieu vous garde. A mes frères et sœur, Farés, Farid et Yamina (un petit coucou à sa fille, ma première nièce Roa-Rochane et son père Fethi), merci pour votre soutien. Ainsi qu'à ma belle-famille, mes beaux-parents Mehdi et Fatima, sans oublier Nadjib et Randa.

Enfin, à celle qui partage mon quotidien et qui me soutient ma chère et tendre femme Asma. Merci pour ton amour qui me comble de bonheur.

Je dédie ce modeste travail à mes défunts grands-parents.

RÉSUMÉ

L'administration chronique de rHuEPO peut engendrer de graves effets secondaires. Une augmentation de l'hématocrite provoquée par la rHuEPO, en augmentant l'érythrocytose, la viscosité sanguine et les forces de cisaillement à la surface vasculaire, peut être responsable d'hypertension artérielle (HTA) et de thromboses artérielles. La présence d'une fonction endothéliale normale et de monoxyde d'azote (NO) peut contrer les effets délétères thrombogène et hypertenseur de l'EPO. Sur ces bases, nous avons étudié les effets cardiovasculaires d'une administration chronique de rHuEPO dans différentes situations : dans le cadre du dopage, chez des rats "sportifs" présentant une dysfonction endothéliale NO-dépendante induite par l'administration chronique de L-NAME et dans le cadre d'un traitement chez des rats urémiques développant une dysfonction endothéliale NO-dépendante résultante d'une néphrectomie de 5/6 de la masse rénale. Chez nos rats entraînés, dopés et traités au L-NAME, nous avons observé une altération de la performance physique avec une mortalité importante (51%). Une HTA sévère s'est développée chez ces rats, avec des valeurs de pression artérielle (> 220 mmHg) bien plus élevées que celles des rats recevant le L-NAME seul, associée à une altération de la vasorelaxation NO-dépendante aortique (< 60%). Les rats insuffisants rénaux (IRC) ont eux aussi montré une augmentation de la pression artérielle et une dysfonction endothéliale en réponse à l'acétylcholine au niveau de l'aorte et en réponse à une élévation du flux au niveau de l'artère mésentérique perfusée. Ces différents paramètres ont été améliorés par l'exercice. Les coupes de rein colorées au rouge Sirius ont montré une fibrose accentuée chez les rats CKD. La fibrose, la créatinémie et l'albuminurie ont été diminuées par l'exercice seul mais ont été aggravées chez les rats du groupe CKD+EPO+Ex. L'activité NADPH oxydase et l'expression des Nox4, p67phox et MAPK erk1/2 ont été augmentées chez les rats CKD. L'exercice ou la rHuEPO ont prévenu ces augmentations. Cependant, l'activité de la NAD(P)H oxydase et l'expression des MAPK erk1/2 sont restées élevées dans le rein des rats CKD+EPO+Ex. Nos données suggèrent que l'exercice seul a un effet protecteur contre les dysfonctions vasculaire et rénale et la fibrose rénale. Ces effets protecteurs sont associés à une inhibition de l'activité de la NADPH oxydase et des voies de signalisation MAPK erk1/2. Par contre, l'exercice combiné avec le traitement rHuEPO, a des effets délétères sur la structure et la fonction rénale des rats CKD. Ces effets nocifs semblent liés à la stimulation de la NADPH oxydase et des voies de signalisation MAPK erk1/2. Malgré les effets protecteurs cardiovasculaire et rénal de l'entraînement physique, ces résultats mettent en évidence que la fonction rénale peut être potentiellement endommagée ainsi que la structure du rein en combinant l'exercice avec le traitement rHuEPO dans l'insuffisance rénale. En conclusion, nous pouvons dire que la rHuEPO affecte gravement la fonction cardiovasculaire du rat entraîné présentant une dysfonction endothéliale. Ce risque étant fatal, beaucoup de sportifs, voulant augmenter leur performance, mettent leur vie en danger. Par ailleurs, ayant remarqué les effets délétères au niveau rénal, en associant exercice et traitement rHuEPO dans des conditions expérimentales sur un modèle d'insuffisance rénale, nous suggérons une investigation clinique afin de vérifier la transposition de nos résultats aux patients insuffisants rénaux.

Mots-clés : Erythropoïétine, Dysfonction endothéliale, Exercice, Dopage, Insuffisance rénale chronique, Stress oxydatif

ABSTRACT

The chronic administration of rHuEPO can engender side effects. An increase of the hematocrit induced by rHuEPO, by increasing the erythrocytosis, the blood viscosity and the shear stress on vascular surface, can be responsible of arterial high blood pressure and arterial thrombosis. The presence of a normal endothelial function and nitric oxide (NO) can counter the noxious effects of rHuEPO. On these bases, we studied the cardiovascular effects of a chronic administration of rHuEPO in various frames: within doping field, to trained rats with L-NAME-induced NO-dependent endothelial dysfunction and within the framework of a treatment, to chronic kidney disease (CKD) rats developing endothelial dysfunction caused by the "5/6 nephrectomy". In our doped rats, we observed an important mortality (51%). A severe arterial high blood pressure developed in these rats (> 220 mmHg) associated with an impairment of the NO-dependent vasorelaxation (< 60 %). CKD rats also showed an increase in blood pressure and an endothelial dysfunction, in response to acetylcholine in the aorta and in response to a rise in flow in perfused mesenteric artery. These parameters were improved by exercise. Kidney sections stained with Sirius red showed marked fibrosis in CKD rats. Fibrosis, creatinine and albumin were decreased by exercise alone but were increased in rats from the CKD + EPO + Ex group. NAD(P)H oxidase activity and the expression of Nox4, p67phox, and MAPK erk1/2 were increased in CKD rats. Exercise or rHuEPO prevented these increases. However, the NAD(P)H oxidase activity and the expression of MAPK erk1/2 remained high in the kidney of rats from the CKD+EPO+Ex group. Our data suggest that exercise alone has a protective effect against vascular and renal dysfunction and renal fibrosis. These protective effects are linked to the downregulation of the NADPH oxidase activity and MAPK erk1/2 signaling pathways. However, exercise combined with rHuEPO treatment has deleterious effects on kidney structure and function in CKD rats. These adverse effects appear to be related to the stimulation of NADPH oxidase and MAPK erk1/2 signaling pathways. Despite the cardiovascular and renal protective effects of physical training, these results highlight the potentially damaging renal function and structure by combining exercise with rHuEPO therapy in renal failure. In conclusion, we can say that the rHuEPO affects seriously cardiovascular function in trained rat with endothelial dysfunction. This risk being fatal, many sportsmen, looking to increase their performance, put their life in danger. Moreover, having noticed the deleterious effects in the kidney by combining exercise and rHuEPO therapy under experimental conditions on a model of renal failure, we suggest a clinical investigation to verify the transposition of our results to patients with renal failure.

Keywords: Erythropoietin, Endothelial dysfunction, Exercise, Doping, Chronic kidney disease, Oxidative stress

Tables des matières

POSITION DU PROBLÈME	14
REVUE GÉNÉRALE DE LITTÉRATURE	19
PREMIÈRE PARTIE : L'ÉRYTHROPOÏÉTINE.....	20
1. Présentation de l'érythropoïétine :	20
1.1. Synthèse de l'EPO :	20
1.2. Récepteurs et mécanismes d'action :	22
2. L'érythropoïétine recombinante humaine :	26
3. La rHuEPO dans le domaine sportif (dopage) :	27
4. Les effets de l'EPO (Bénéfices) :	29
5. Le risque cardiovasculaire de la rHuEPO :	30
DEUXIÈME PARTIE : L'INSUFFISANCE RÉNALE CHRONIQUE.....	33
1. Définition :	33
2. La dysfonction endothéliale dans l'IRC :	34
2.1. Généralités :	34
2.2. Dysfonction endothéliale et IRC :	38
3. Le stress oxydatif dans l'IRC :	41
3.1. Généralités :	41
3.1.1. Les radicaux libres :	42
3.1.2. Mécanismes de production des dérivés de l'oxygène :	43
3.1.3. Mécanismes de défense contre des dérivés de l'oxygène :	45

Table des matières

a. Le système antioxydant enzymatique :	46
b. Le système antioxydant non-enzymatique :	47
3.2. Stress oxydatif et IRC :	47
4. Les conséquences d'un traitement rHuEPO chez les patients IRC :	49
5. La rHuEPO et le stress oxydatif dans l'IRC:.....	50
TROISIÈME PARTIE : L'EXERCICE PHYSIQUE ET LES RISQUES CARDIOVASCULAIRE ET RÉNAL.....	52
1. Effet bénéfique sur la mortalité cardiovasculaire :	52
2. Effets bénéfiques sur les facteurs de risque cardiovasculaire :	53
3. Effets de l'exercice sur la fonction endothéliale :	54
4. Effets de l'exercice sur le stress oxydatif :	57
5. Effets de l'exercice sur l'IRC :	58
HYPOTHESES ET OBJECTIFS.....	61
Hypothèses générales :	62
Objectifs :	63
TRAVAUX EXPERIMENTAUX.....	65
PREMIÈRE PARTIE : L'EXERCICE AGGRAVE LES RISQUES CARDIOVASCULAIRES ET LA MORTALITÉ CHEZ LES RATS TRAITÉS À L'ÉRYTHROPOÏÉTINE RECOMBINANTE HUMAINE DONT LA VOIE NO SYNTHASE A ÉTÉ INHIBÉE	66
1. But de l'étude :	66

Table des matières

2. Méthodologie :	66
2.1. Animaux et traitements :	66
2.2. Traitements :	67
2.3. Le protocole d'exercice :	67
2.4. Les paramètres étudiées :	67
3. Résultats principaux :	68
3.1. Les effets du L-NAME seul :	68
3.2. Les effets de la rHuEPO :	68
3.3. Les effets de l'exercice :	68
4. Discussion et conclusion :	80

DEUXIÈME PARTIE : LES RISQUES CARDIOVASCULAIRE ET RÉNAL DES RATS IRC SONT PRÉVENUS PAR L'EXERCICE PHYSIQUE MAIS AGGRAVÉS QUAND LES RATS ENTRAÎNÉS SONT TRAITÉS À L'ÉRYTHROPOÏÉTINE RECOMBINANTE HUMAINE. IMPLICATION DE LA NAD(P)H OXYDASE ET LA VOIE DES MAPK ERK 1/2

1. But de l'étude :	84
2. Méthodologie :	84
2.1. Animaux :	84
2.2. Traitement et chirurgie :	85
2.3. Protocole d'exercice :	85
2.4. Les paramètres étudiés :	85
3. Résultats principaux :	86

Table des matières

3.1. Les effets de l'exercice chez le rat IRC :.....	86
3.2. Les effets du traitement rHuEPO chez le rat IRC :.....	87
3.3. Les effets de l'exercice combiné au traitement rHuEPO :	87
4. Discussion et conclusion :.....	132
DISCUSSION ET CONCLUSION GÉNÉRALES.....	136
RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	143
ANNEXES	175

ABBREVIATIONS

ADMA : asymmetric dimethylarginine (inhibiteur endogène de la NOS)

AMA : agence mondiale antidopage

Ang II: angiotensine II

ARNm: acide ribonucléique messenger

AVC : accidents vasculaires cérébraux

BFU-E : burst-forming unit-erythroid

BH4: tétrahydrobioptérine

BK: bradykinine

Ca²⁺: calcium

CERA : Continuous erythropoietin receptor activator

CFU-E : colony-forming unit-erythroid

CKD : chronic kidney disease

CRP : protéine C-réactive (C-reactive protein)

CSA : cross-sectional area

EDHF: facteur hyperpolarisant dérivé de l'endothélium (Endothelial derived hyperpolarizing factor)

EPO : érythropoïétine

Erk 1/2: extracellular signal-regulated kinase 1 et 2

ET-1: endothéline-1

FAD : flavine adénine dinucléotide

FMN : flavine mononucléotide

Abbréviations

- GMPc : guanosine monophosphate cyclique
- HDL : lipoprotéine de haute densité (High Density Lipoprotein)
- HIF-1 : facteur inductible par l'hypoxie (hypoxia-inducible factor)
- ICAM-1: molécule d'adhésion intracellulaire-1 (Intercellular adhesion molecule-1)
- IL-6: interleukine-6
- IP-3: Inositol triphosphate
- IR : Récepteur de l'insuline (Insulin receptor)
- IRC : insuffisance rénale chronique
- IRS-1: substrat du récepteur de l'insuline-1 (Insulin receptor substrate-1)
- JAK-2: Janus kinase 2
- L-NAME: N-nitro-L-arginine methyl ester
- LDL: lipoprotéine de basse densité (Low Density Lipoprotein)
- MAP kinase: Mitogen-activated protein kinase
- NADPH: nicotinamide adénine dinucléotide phosphate
- NESP: novel erythropoiesis stimulating protein
- NO: monoxyde d'azote (nitric oxide)
- NOS: NO synthase (nitric oxide synthase)
- Nox: NADPH oxydase
- PAI-1: Inhibiteur de l'activateur du plasminogène-1 (Plasminogen activator inhibitor-1)
- PGI2: prostacycline
- PI-3 kinase: phosphatidyl-inositol -3- Kinase (phosphatidylinositol 3-kinase)
- PKB/ Akt: Protéine kinase B
- PKC: protéine Kinase C

Abbreviations

PKG: protéine Kinase G

rHuEPO : érythropoïétine recombinante humaine (recombinant human erythropoietin)

ROS: Espèces réactives de l'oxygène (reactive oxygen species)

sGC: Guanylate cyclase soluble

Shear stress: forces de cisaillement

SNP: nitroprussiate de sodium (sodium nitroprusside)

SOD: superoxyde dismutase

SRA: système rénine-angiotensine

SRAA : système rénine-angiotensine-aldostérone

TBARS: thiobarbituric acid reactive substances

TNF- α : facteur de nécrose tumorale (Tumor necrosis factor- α)

tPA: activateur tissulaire du plasminogène (Tissue plasminogen activator)

TXA2: thromboxane A2

VCAM-1: molécule d'adhésion vasculaire-1 (Vascular cell adhesion molecule)

VEGF : facteur de croissance de l'endothélium vasculaire (Vascular endothelial growth factor)

POSITION DU PROBLÈME

Position du problème

L'érythropoïétine (EPO) a été le premier facteur de croissance hématopoïétique connu. Son existence a été démontrée par Carnot dès 1906. La synthèse rénale a été découverte en 1957 et le gène de la molécule identifié et cloné en 1985. L'introduction de l'érythropoïétine recombinante humaine (rHuEPO) en 1989, a marqué un progrès significatif dans le traitement de l'anémie chez les insuffisants rénaux chroniques (IRC) (Moreno et coll., 2000). A cette époque, les conséquences d'une augmentation de l'oxygénation du sang sont déjà bien connues.

L'EPO artificielle a été largement détournée de son usage initial pour offrir aux sportifs une endurance à toute épreuve et des performances accrues. Avec l'étrange augmentation des résultats de certains athlètes, la suspicion est générale. Plusieurs décès suspects surviennent durant les années 1980-1990, surtout dans le monde du cyclisme (Eichner, 2007). La rHuEPO, administrée à des doses excessives, peut engendrer de graves effets secondaires. Une augmentation de l'hématocrite provoquée par la rHuEPO, en augmentant l'érythrocytose, la viscosité sanguine et les forces de cisaillement à la surface vasculaire, peut être responsable d'hypertension artérielle (HTA) et de thromboses artérielles : facteurs de risques responsables de nombreuses complications cardio-vasculaires (Eschbach et coll., 1989 ; Abramowicz, 2001). L'effet hypertenseur de la rHuEPO serait dû à une altération de l'homéostasie cellulaire du calcium (Schiffl et Lang, 1997). Cette HTA, qui s'accompagne d'une augmentation intra-cellulaire du calcium et d'une résistance au NO, est indépendante du niveau de l'hématocrite (Ni et coll., 1998). Il est aussi reconnu que l'EPO active les plaquettes, stimule la production endothéliale de l'endothéline-1 (ET-1) et active la vasoconstriction des catécholamines et

Position du problème

de l'angiotensine II (Smith et coll., 2003). En clinique, la rHuEPO provoque une HTA chez 20 à 30 % des patients souffrant d'insuffisance rénale (Maschio, 1995). Par contre, il a été démontré que chez des souris transgéniques surexprimant l'EPO, la pression artérielle était maintenue normale, malgré une érythrocytose élevée, et ces souris ne présentaient aucune complication cardio-vasculaire. Cette protection est due, selon les auteurs, à une surproduction endothéliale de monoxyde d'azote (NO) (Ruschitzka et coll., 2000). Le NO contrôle la tonicité vasculaire (par son puissant effet vasodilatateur paracrine), inhibe l'adhésion des monocytes et des leucocytes à l'endothélium, inhibe l'agrégation plaquettaire, ce qui réduit le risque de thromboses. Grâce à ces actions, le NO est considéré comme une molécule anti-athérogène, anti-hypertensive et anti-thrombotique (Moncada et coll., 1991 ; Lloyd-Jones et Bloch, 1996). **En condition d'administration chronique de rHuEPO, la présence de NO pourrait contrer les effets délétères thrombogène et hypertenseur de l'EPO.**

L'insuffisance rénale chronique (IRC) est la résultante de la perte progressive des fonctions rénales. Elle se traduit aussi par un ensemble d'altérations biologiques vasculaires comme la dysfonction endothéliale, l'inflammation, la prolifération des cellules musculaires lisses, l'accumulation des lipides et l'activation des plaquettes. Ainsi l'IRC est souvent associée à une élévation du risque cardiovasculaire. L'HTA, l'athérosclérose et l'état urémique sont les trois principaux facteurs à l'origine de la plupart des décès chez les patients atteints d'IRC (Tedla et coll., 2011 ; Charney et coll., 1993). Les mécanismes moléculaires impliqués sont probablement une stimulation du stress oxydant avec une biodisponibilité accrue en radicaux libres oxygénés. La pratique

Position du problème

régulière d'une activité physique améliore la fonction endothéliale, exerce un effet anti-athérogène et, de ce fait, exerce un effet bénéfique de prévention primaire et secondaire du risque cardiovasculaire. Les bases moléculaires de la prévention par l'exercice ne sont pas connues mais quelques études suggèrent une atténuation du stress oxydant et une réduction des réponses vasculaires pro-inflammatoires. L'effet anti-inflammatoire de l'exercice a été attribué, en partie, à une baisse de la production des radicaux libres dérivés de l'activation de la NAD(P)H oxydase, à une baisse de l'activation de certains facteurs de transcription pro-inflammatoires (AP-1, NFκB) et de la production de certaines protéines impliquées dans le processus de l'inflammation (chémokines, molécules d'adhésion cellulaire "CAMs") ou de la signalisation comme les MAP kinases (ERK1/2, p38MAPK) et les tyrosine kinases (srt, Akt) (Adams et coll., 2005 ; De La Fuente et coll., 2005 ; Petersen et Pedersen, 2005). Des études fondamentales et cliniques ont démontré l'effet bénéfique de l'exercice physique sur la prévention et l'amélioration de la qualité de vie aussi bien chez des patients hémodialysés que chez l'animal en insuffisance rénale chronique (Goldberg et coll., 1986 ; Heifet et coll., 1987). **Par contre, peu de données sont disponibles pour expliquer le bénéfice moléculaire cardiovasculaire de l'exercice sur ce modèle pathologique.**

L'anémie est une conséquence inévitable de l'IRC. La rHuEPO est couramment employée dans le traitement de l'anémie associée à l'IRC. Parmi les effets secondaires liés à l'utilisation de la rHuEPO, l'hypertension est la plus fréquente. Celle-ci apparaît ou s'aggrave chez environ un tiers des patients (Smith et coll., 2003). **Là aussi, peu de données sont disponibles sur les conséquences biologiques cardiovasculaires et rénales d'une association exercice/rHuEPO chez l'insuffisant rénal.**

Position du problème

Les données scientifiques montrent, d'une part, que la rHuEPO pourrait exercer des effets délétères. D'autre part, ces derniers s'opposent aux effets du NO qui, en étant inhibé, pourrait accentuer encore plus les effets de la rHuEPO. Un endothélium dysfonctionnel réagirait moins bien à l'augmentation des forces de cisaillement (lors de l'exercice par exemple). La présence d'une dysfonction endothéliale provoquerait une vasoconstriction (déséquilibre entre la production du NO et de l'ET-1). De plus, une augmentation du statut oxydant, résultant ou étant la cause de la dysfonction endothéliale (Förstermann, 2010), augmenterait le risque vasculaire. **Donc, dans les conditions d'une combinaison d'une dysfonction endothéliale et d'un traitement rHuEPO, est-ce que l'exercice physique garderait les mêmes effets bénéfiques cardiovasculaires ?**

REVUE GÉNÉRALE DE LITTÉRATURE

PREMIÈRE PARTIE : L'ÉRYTHROPOÏÉTINE

1. Présentation de l'érythropoïétine :

1.1. Synthèse de l'EPO :

L'EPO est codée par un gène situé sur le chromosome 7 du génome humain. L'EPO contient 193 acides aminés où les 27 premiers sont clivés durant la sécrétion, l'hormone finale est une glycoprotéine de 34 kDa (figure 1). Au cours du développement fœtal et néonatal, l'EPO provient du foie (Dame et coll., 1998). Par contre, près de 90-95 % de l'EPO est produite dans la région corticale des reins chez l'adulte. Une faible quantité (5-10 %) est alors produite dans le foie et les macrophages. L'EPO est exprimée principalement dans les cellules interstitielles péri-tubulaires des reins (Fisher, 2003 ; Koury et coll., 1988). La sécrétion de cette hormone est influencée par les niveaux d'oxygénation. L'hypoxie cause une augmentation significative de la production de l'EPO suite à l'activation d'un facteur de transcription, le facteur inductible par l'hypoxie (HIF-1) (Gabrilove, 2000) (figure 2). La concentration plasmatique normale de l'EPO chez l'homme est de 5 à 30 mUI/ml (Erslev et coll., 1980).

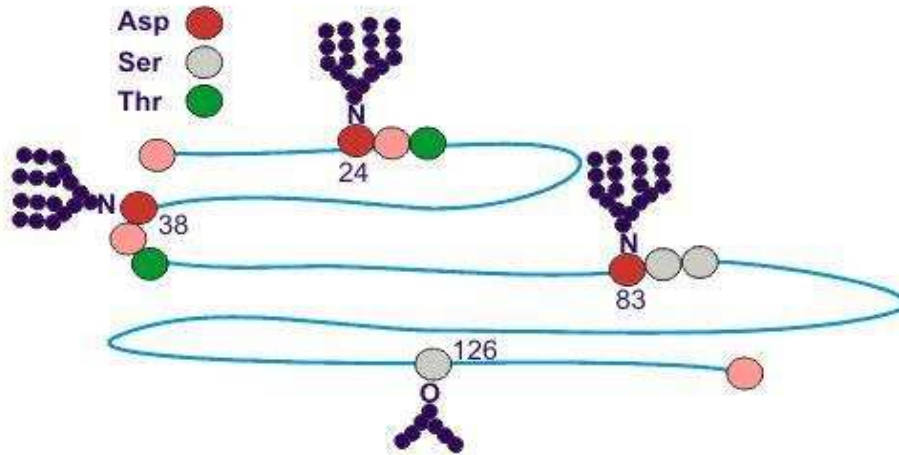


Figure 1 : Schéma de la chaîne polypeptidique de l'érythropoïétine

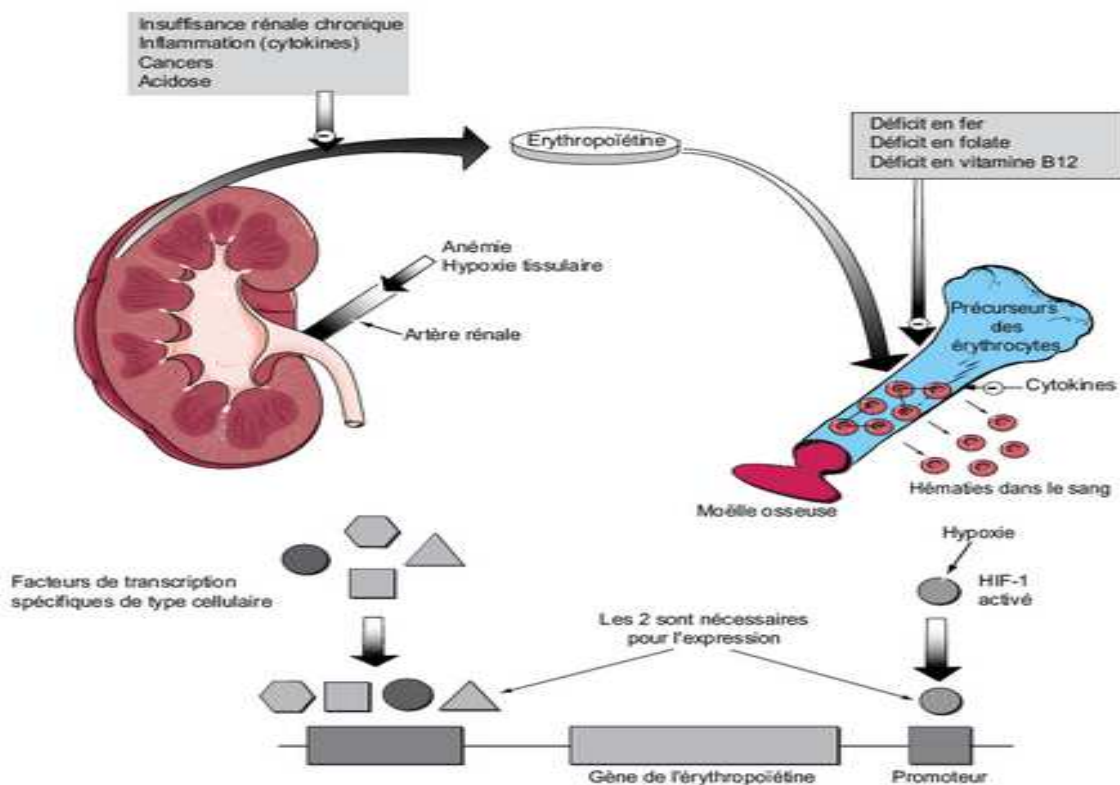


Figure 2 : Schéma du cycle de création de l'érythropoïétine. L'hypoxie cause une augmentation significative de la production de l'EPO suite à l'activation du facteur de transcription HIF-1. Au niveau du rein, l'IRC, l'inflammation, le cancer ou l'acidose peuvent inhiber la production de l'érythropoïétine. Au niveau de la moelle osseuse, les déficits en fer et vitamines B9 ou B12 peuvent inhiber la formation d'érythrocytes.

1.2. Récepteurs et mécanismes d'action :

Le récepteur à l'EPO appartient à la superfamille des récepteurs des tyrosines kinases. C'est une protéine transmembranaire de 59 kDa (Livnah et coll., 1999). Pour stimuler l'érythropoïèse, l'EPO produit un signal prolifératif sur les cellules précurseurs des globules rouges : les BFU-E (burst-forming unit-erythroid) et les CFU-E (colony-forming unit-erythroid) (figure 3) (Sawada et coll., 1990).

En se liant à son récepteur, l'EPO change la conformation du récepteur qui se dimérise entraînant l'activation et la phosphorylation de la protéine JAK-2 qui se lie au domaine intracellulaire du récepteur. Ensuite, JAK-2 phosphoryle le récepteur à l'EPO sur les résidus tyrosines du domaine intracellulaire ce qui permet à différentes molécules de signalisation de se lier sur ces sites tel que : STAT-5 (signal transducer and activator of transcription 5) et PI3-K (phosphatidyl-inositol 3-kinase). STAT-5 active la transcription de gènes-cibles tandis que PI3-K inhibe l'apoptose (un processus de mort cellulaire). Une action majeure de la liaison EPO-EPOR (récepteur à l'EPO) est l'augmentation des niveaux de calcium intracellulaire via IP3 (inositol 3-phosphate) (figure 4). Une fois que l'EPO est lié à son récepteur, 60% de l'EPO internalisée est relarguée tandis que 40% est dégradé au niveau intracellulaire. Par contre, il reste à découvrir, si *in vivo*, l'EPO resécritée est actif biologiquement (Gross et Lodish, 2006). Les BFU-E aboutissent à la formation terminale d'hématies en 10 à 20 jours, les CFU-E en 5 à 8 jours. Un Proérythroblaste, à la suite de 4 mitoses, donne en moyenne 16 hématies. L'érythroblaste acidophile qui expulse son noyau devient un réticulocyte. Le réticulocyte néoformé reste 48 heures dans la moelle osseuse puis traverse les sinusoides

médullaires, se retrouve dans le sang périphérique où il perd ses ribosomes en moins de 48 heures pour devenir une hématie mature. La synthèse d'hématies est continue et harmonieuse, elle est estimée à 200 milliards par jour, elle permet le maintien des normes physiologiques ($4 \text{ à } 5 \times 10^{12} /\text{l}$ chez la femme, $5 \text{ à } 6 \times 10^{12} /\text{l}$ chez l'homme). Les hématies ont une durée de vie moyenne de 120 jours (Gabrilove, 2000 ; Sawada et coll., 1990 ; Erslev et coll., 1980).

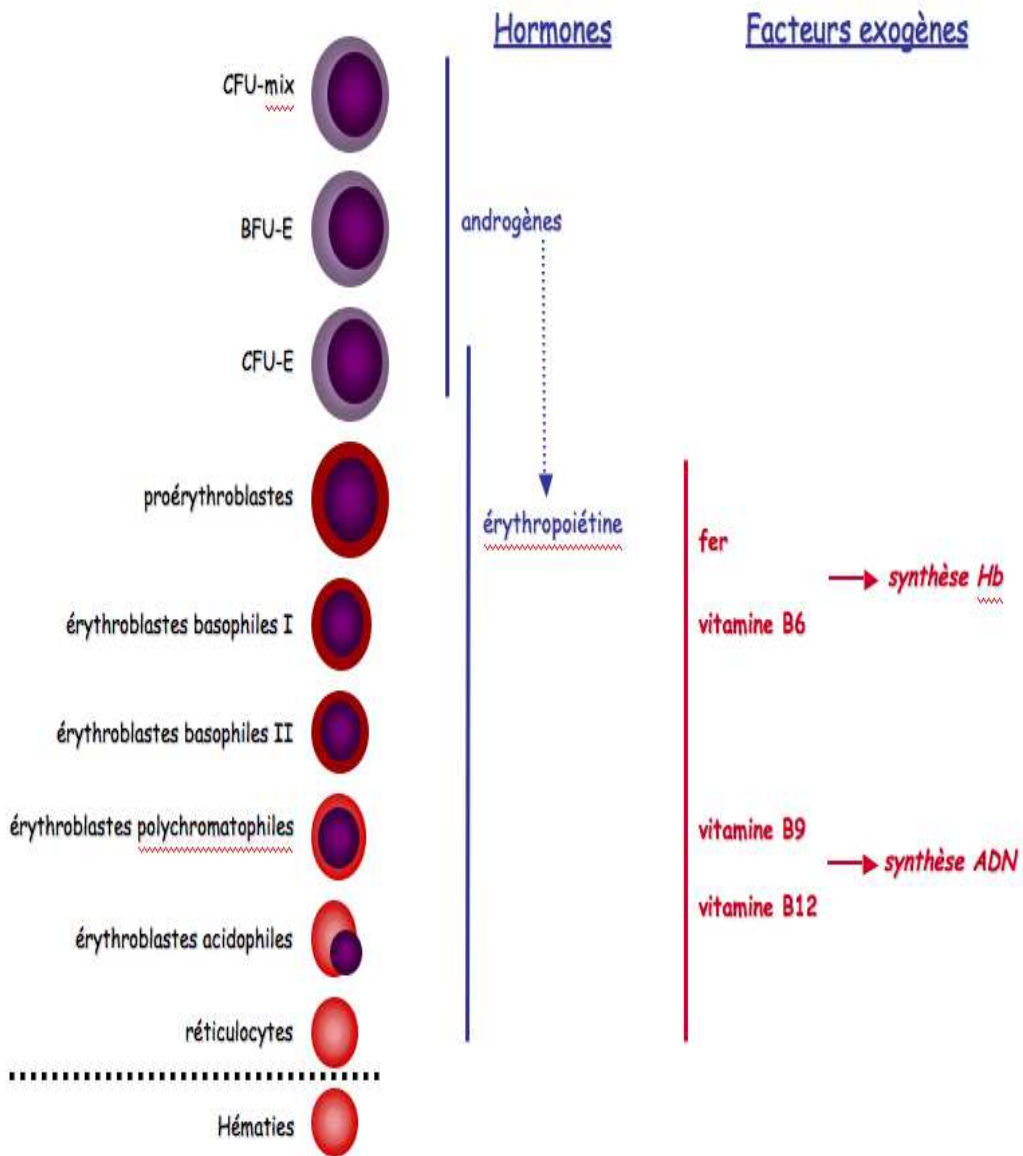


Figure 3 : Régulation de l'érythropoïèse par l'érythropoïétine (D'après Binet). Pour stimuler l'érythropoïèse, l'EPO produit un signal prolifératif sur les cellules précurseurs des globules rouges : CFU-E. Elle favorise notamment la transformation des CFU-E en proérythroblastes et la transformation de ces derniers en érythrocytes. De nombreux autres facteurs interviennent dans l'érythropoïèse. Parmi eux : les androgènes, le fer et la vitamine B6 (formation d'hémoglobine) et les vitamines B9 et B12 (formation d'ADN).

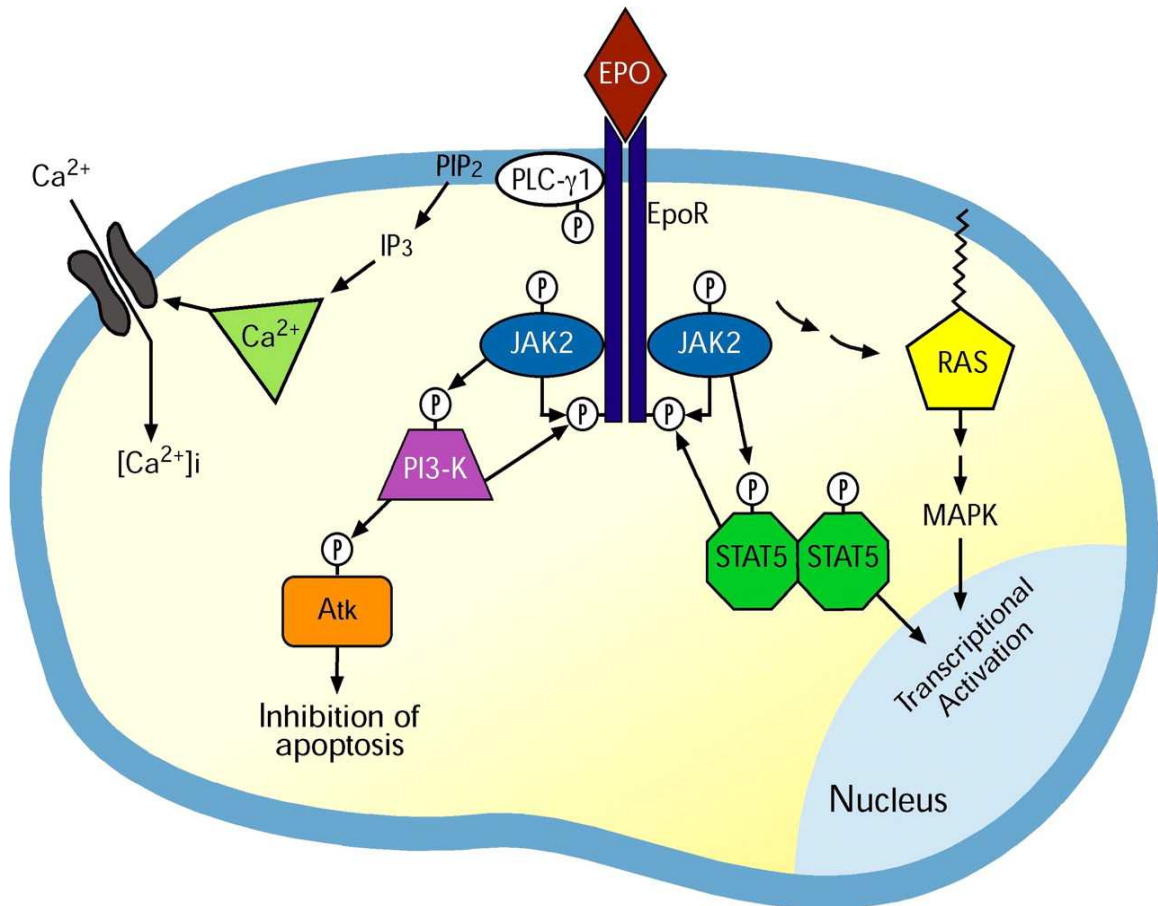


Figure 4 : Diagramme simplifié de la transduction du signal induit par l'EPO en se liant sur son récepteur EPOR (D'après Smith et coll., 2003)

2. L'érythropoïétine recombinante humaine :

L'utilisation de l'EPO recombinante humaine (rHuEPO) en thérapie, a révolutionné le traitement de l'anémie associée à l'insuffisance rénale chronique (Moreno et coll., 2000). De plus, l'EPO est utilisée dans le traitement de l'anémie associée à d'autres pathologies : l'infection au VIH, les patients en chimiothérapie traitant le cancer, ou encore pour réduire la transfusion sanguine en chirurgie.

Il existe de nos jours différentes formes de rHuEPO. Les époétines alpha et bêta, dites de 1ère génération (Eprex® : époétine alpha ; Neorecormon®, époétine bêta). Ces rHuEPO sont fabriquées à partir de cellules animales (ovaires de hamster chinois). Plus tard, une époétine delta (Dynepo®) sera commercialisée : c'est une rHuEPO issue des techniques recombinantes fabriquée à partir de cellules humaines tumorales (donc proche de l'EPO endogène). En 2001, apparaissent les rHuEPO de 2ème génération, les NESP (Novel Erythropoiesis Stimulating Protein) ou EPO retard. La NESP est considérée comme la rHuEPO la plus connue, et est connue aussi sous le nom de darbépoétine alpha (Aranesp®). Elle diffère de l'époétine par la substitution de cinq acides aminés permettant l'assemblage de cinq chaînes glycosylées au lieu de trois. Le CERA (Continuous erythropoietin receptor activator) est une molécule d'érythropoïétine à laquelle est insérée une longue chaîne protéique, doublant quasiment son poids. Sa demi-vie est très allongée, permettant une injection mensuelle. Il existe de nombreux autres types en cours de développement. Une classe particulière sont les peptides mimant l'érythropoïétine, dont la séquence d'acides aminés n'a rien à voir avec cette dernière, et qui agissent sur le récepteur de l'érythropoïétine. La première molécule de ce type, appelé

hématide, est un oligopeptide modifié, produit par une bactérie. Son utilisation est en cours de test (Reichel et Gmeiner, 2010).

L'administration de la rHuEPO se fait par deux voies : injection sous-cutanée et injection intraveineuse. Concernant les doses administrées, cela dépend du type de la rHuEPO, de l'âge et de l'état du patient et de la maladie concernée. Dans l'étude d'Eschbach et coll. (1989), des patients dialysés ont reçu différentes doses de 15 à 500 UI/kg de rHuEPO, trois fois par semaine. La réponse est plus rapide avec la plus haute dose (500 UI), mais une augmentation graduelle et adéquate de l'hématocrite est observée chez la plupart des patients prenant une dose de 50 UI/kg. Généralement, les praticiens sont d'accord sur une cible de 12 g/dl d'hémoglobine à atteindre.

3. La rHuEPO dans le domaine sportif (dopage) :

L'EPO artificielle a été largement détournée de son usage initial pour offrir aux sportifs une endurance à toute épreuve et des performances accrues. Avec l'étrange augmentation des résultats de certains athlètes, la suspicion est générale. Plusieurs décès suspects surviennent durant les années 1980-1990, surtout dans le monde du cyclisme (Eichner, 2007). Depuis, de nombreux exemples de dopage à l'EPO ont fait les gros titres. Nous pouvons citer l'affaire impliquant l'équipe Festina, lors du Tour de France 1998, qui a révélé un abus généralisé d'EPO dans le cyclisme et a conduit à un changement drastique dans l'approche du Comité Internationale Olympique (CIO) sur le dopage dans le sport. Ceci a finalement mené, à la création de l'Agence Mondiale Antidopage (AMA).

Le retrait de six athlètes chinoises aux Jeux olympiques de Sydney 2000 a

coïncidé avec l'introduction du premier test sanguin de détection de l'EPO, alimentant les soupçons d'abus d'EPO comme étant la cause de leurs précédentes performances exceptionnelles.

Les méthodes de détection du dopage à l'EPO comprennent la combinaison d'approches directes et indirectes (Delanghe et coll., 2008). La méthode directe, actuellement utilisée par les laboratoires antidopage accrédités par l'AMA, est basée sur des différences dans la structure et l'étendue de la glycosylation de la rHuEPO par rapport à la protéine endogène. Les différents arrangements des résidus de sucre présent dans les rHuEPO résultent des différences dans leurs points isoélectriques qui sont détectés par une méthode d'isoélectrophorèse (test IEF) (Jelkmann, 2007). Les méthodes indirectes incluent les changements des paramètres hématologiques de l'érythropoïèse, comme les taux d'hémoglobine, le pourcentage des réticulocytes et les concentrations sériques de l'EPO et de ces récepteurs de transfert solubles (Delanghe et coll., 2007). Une approche indirecte alternative est la mise en place de passeport hématologique de l'athlète. C'est l'établissement du profil hématologique en comparant les valeurs des paramètres sanguins mesurés et établir une référence historique de l'individu. L'Union Cycliste Internationale est devenue la première fédération sportive internationale à mettre en œuvre l'approche de passeport hématologique de l'athlète dans le cadre de ses programmes antidopages. L'application d'un profil longitudinale permettrait d'éliminer l'inter-variabilité observée dans la population, et pourrait aussi aider à éliminer les cas rapportés d'EPO indétectable qui ont été observés dans diverses situations. Ces cas pourraient avoir été causés par la manipulation de l'échantillon avec des protéases dégradant l'EPO.

4. Les effets de l'EPO (Bénéfices) :

Comme nous l'avons vu précédemment, la fonction principale de l'EPO est la production et la maturation des lignées cellulaires qui donnent les érythrocytes. Il existe aussi des récepteurs à l'EPO au niveau du système cardiovasculaire, notamment au niveau des cardiomyocytes, des cellules musculaires lisses vasculaires et des cellules endothéliales (Depping et coll., 2005). Chez l'insuffisant cardiaque, le bénéfice cardiaque d'un traitement par l'EPO semble important : diminution de l'hypertrophie ventriculaire avec augmentation de la fraction d'éjection systolique (Smith et coll., 2003). Un traitement à long terme à l'EPO pourrait avoir un effet anti-ischémique (Bullard et Yellon, 2005). Sur la cellule endothéliale, l'EPO exerce un effet anti-apoptotique et stimule l'angiogenèse (Jacquet et coll., 2002 ; Smith et coll., 2003). Par contre, les effets *in vitro* de l'EPO sur les cellules endothéliales en culture restent discutés. En effet, Banerjee et coll., (2000) ont observé que le traitement de cellules endothéliales avec l'EPO provoque une augmentation importante du taux de eNOS, contrairement à Wang et Vaziri (1999), qui démontrent que l'EPO inhibe directement l'expression et l'activité de la eNOS et abaisse la synthèse de NO. Bien que l'EPO et son récepteur (EPOR) ne soient pas constitutivement exprimés dans le cerveau adulte, leur expression est induite dans des conditions d'hypoxie. Plusieurs travaux ont mis en évidence une production autocrine d'EPO non seulement par les astrocytes mais également par les neurones (Bernaudin et coll., 2000). Les travaux de Bernaudin et coll. (2000) ont montré que le stress hypoxique augmente la production d'érythropoïétine par des cellules neuronales en culture. Il a été également rapporté que le prétraitement par l'EPO de neurones en culture peut

contrecarrer la mort cellulaire induite par le glutamate.

5. Le risque cardiovasculaire de la rHuEPO :

Les deux principaux effets secondaires d'une administration chronique de rHuEPO sont l'HTA et les risques de thromboses. Chez les sportifs, notamment les cyclistes, divers cas de mortalité suspecte sont apparus durant les années 1990. L'apparition ou l'aggravation d'une HTA est un effet secondaire constaté chez environ 30% des patients urémiques dialysés traités par rHuEPO (Eschbach et coll., 1989). Il a aussi été cliniquement observé que l'administration de darbepoétin alpha (rHuEPO) à des patients suivant une chimiothérapie, augmente les événements thrombotiques et les embolies pulmonaires. De plus, la darbepoétin augmente le risque d'infarctus du myocarde et d'attaque d'apoplexie, tout ceci associé à une élévation rapide et accentuée du taux d'hémoglobine dans le sang et de la viscosité sanguine (Abramowicz, 2001). Des études cliniques ont démontré que l'administration de rHuEPO chez des sujets sains volontaires augmente la production des protéines d'adhésion endothéliales (E-sélectine, ICAM-1, VCAM-1) (Stohlawetz et coll., 2000). Les conséquences de cette activation endothéliale par la rHuEPO ne sont pas connues, mais laissent entrevoir une activation de la thrombogénèse et de l'athérogénèse chez des sujets à risque.

Il est reconnu que l'EPO active les plaquettes, stimule la production endothéliale de l'ET-1 et active la vasoconstriction des catécholamines et de l'angiotensine II (Smith et coll., 2003). L'EPO possède donc un effet hypertenseur par augmentation du tonus vasculaire via un effet vasoconstricteur direct sur la cellule musculaire lisse en augmentant le calcium libre intracellulaire (Schiffl et Lang, 1997). Ruschitzka et coll.

(2000) ont produit récemment une lignée de souris transgéniques surexprimant l'EPO humaine avec une polyglobulie sévère. Malgré un hémocrite élevé (80%), ces souris ne développent pas d'HTA ou de foyers thromboemboliques. Par contre, lorsque ces souris sont traitées avec un inhibiteur de la NO-synthase (L-NAME), l'HTA se développe rapidement avec une élévation de la vasoconstriction des territoires artériolaires, se traduisant par une mortalité importante. L'ensemble de ces résultats suggèrent que l'élévation des forces de cisaillement induites par l'élévation de la viscosité chez ces souris stimule la production endothéliale de NO, celle-ci s'oppose à l'action vasoconstrictrice indirecte de l'EPO via divers facteurs (comme l'ET-1) et protège l'intégrité cardiovasculaire.

Lorsque la fonction rénale est normale, la production de NO semble être augmentée lors de l'administration de rHuEPO. Dans ce sens, Del Castillo et coll. (1995) ont démontré que la rHuEPO donnée à forte dose entraîne une augmentation de l'excrétion urinaire de nitrites/nitrates. Par contre, en condition d'IRC, l'administration de rHuEPO afin de corriger l'anémie est accompagnée d'une résistance au NO (augmentation des taux intracellulaires de Ca^{2+} et diminution de la biodisponibilité du NO) (Vaziri *et coll.*, 1996). La réponse hypotensive induite par un donneur de NO est altérée chez les rats traités avec la rHuEPO. Ni et coll. (1998) ont également démontré chez le rat urémique, que la production de NO est diminuée comparativement à celle des rats contrôles et que le traitement à la rHuEPO maintient ces niveaux bas. Chez ces mêmes animaux, le taux de NO est associé à une baisse de l'expression vasculaire et rénale de la eNOS. Dans le même ordre d'idée, la rHuEPO diminue la production de NO ainsi que la eNOS dans les cellules endothéliales en culture (Wang and Vaziri 1999 ; Scalera et coll.,

2005). En effet, la rHuEPO augmenterait l'ADMA (asymmetric dimethylarginine), un inhibiteur endogène de la NOS, résultant en une baisse de la synthèse de NO. L'augmentation d'ADMA est associée à une réduction de diméthylarginine diméthylaminohydrolase, l'enzyme responsable de la dégradation d'ADMA (Scalera et coll., 2005). Ces mécanismes peuvent expliquer en partie la résistance au NO observée lors de l'HTA induite par la rHuEPO en IRC. Toutefois, bien que la production de NO soit altérée dans ces conditions, elle demeure importante pour ralentir la progression de l'HTA. En effet, il a été démontré que l'inhibition chronique de synthèse du NO par le NG-nitro-L-arginine méthyl ester (L-NAME) entraîne une augmentation significative de la pression artérielle chez le rat urémique recevant également la rHuEPO comparativement à ceux recevant seulement le L-NAME ou la rHuEPO (Moreau *et coll.* 2000). Bien qu'il existe une résistance au NO dans l'HTA induite par la rHuEPO en urémie, l'effet vasodilatateur du NO semble essentiel pour s'opposer aux nombreux facteurs vasoconstricteurs (ET-1, TXA2) qui sont augmentés (Vanhoutte, 2003).

Lorsque le NO n'est plus sécrété, l'effet protecteur disparaît et la rHuEPO via son action hémodynamique directe (élévation de la viscosité) ou via son action vasoconstrictrice (entrée de Ca, activation de l'Ang II, production d'ET-1), pourrait exercer ses effets délétères sur la fonction vasculaire. C'est ce que laisse entrevoir les différents travaux exposés dans cette première partie. Les patients souffrant d'IRC présentant une dysfonction endothéliale et traités à la rHuEPO pourraient être le meilleur exemple de cette combinaison. La deuxième partie abordera ce sujet.

DEUXIÈME PARTIE : L'INSUFFISANCE RÉNALE CHRONIQUE

1. Définition :

L'IRC est la résultante de la perte progressive des fonctions rénales, c'est à dire la réduction de la capacité des reins à assurer la filtration, l'élimination des déchets métaboliques, le contrôle de l'homéostasie hydrosodée et de la régulation de la pression artérielle. L'IRC se caractérise par une baisse importante du nombre de néphrons fonctionnels que les reins essaient de compenser par une hyperfiltration dans les néphrons fonctionnels restants. Avec le temps, l'hyperfiltration cause davantage de perte fonctionnelle. Cette dernière se traduit par une augmentation de la pression intraglomérulaire (He et coll., 2011).

Suite à ces changements, la perméabilité de l'endothélium des capillaires glomérulaires est altérée, laissant passer les protéines plasmatiques. Une fois dans le tubule rénal, les protéines filtrées sont réabsorbées par les cellules épithéliales et dégradées par les lysosomes. Toutefois, cette augmentation anormale de protéines dans les cellules épithéliales induit la transcription de plusieurs gènes codant pour l'expression protéique de plusieurs molécules vasoactives et inflammatoires. Les molécules pro-inflammatoires (MCP-1, VCAM et ICAM-1) relâchées par les cellules tubulaires, mènent au recrutement interstitiel de cellules inflammatoires dont les macrophages et les lymphocytes T. La réponse inflammatoire est alors amplifiée, produisant davantage de molécules pro-inflammatoires capables de stimuler la prolifération et la migration des fibroblastes et l'augmentation du dépôt en matrice extracellulaire menant à la fibrose interstitielle (Fujiu et coll., 2011 ; Ochodnický et coll., 2006).

Comme nous l'avons dit précédemment, l'IRC était associée à un risque cardiovasculaire majeur, la dysfonction endothéliale. Dans le paragraphe suivant nous aborderons la relation entre l'IRC et la dysfonction endothéliale.

2. La dysfonction endothéliale dans l'IRC :

2.1. Généralités :

La dysfonction endothéliale est principalement caractérisée par une réduction de la biodisponibilité du NO, et survient souvent de façon précoce dans le développement de plusieurs pathologies cardiovasculaires (Raij et coll., 2006; Taddei et coll., 2003).

Les vaisseaux sanguins de l'organisme sont tapissés d'une seule couche de cellules endothéliales, qui forment l'endothélium vasculaire. Ce dernier constitue une couche semi-perméable entre les éléments circulant du sang et la paroi des vaisseaux sanguins. Il sécrète aussi des substances vasoactives (vasoconstrictrices et vasodilatatrices) qui permettent de maintenir un tonus vasculaire approprié. En condition physiologique normale, il existe un équilibre entre ces facteurs vasoactifs pour maintenir le tonus vasculaire. Parmi les substances vasoconstrictrices relâchées par l'endothélium, nous retrouvons ET-1, Ang II, le TXA2 et les radicaux libres oxygénés (ROS). Les substances vasodilatatrices sont représentées par le NO, la prostacycline (PGI₂), le facteur hyperpolarisant dérivé de l'endothélium (EDHF) et la bradykinine (BK). Parmi les substances citées ci-dessus, le NO représente la principale substance protectrice synthétisée par l'endothélium (Wheatcroft et coll., 2003). En effet, au niveau de la cellule endothéliale, le NO inhibe la production d'ET-1, l'oxydation des LDL, l'expression de

molécules d'adhésion et par conséquent, l'adhésion des leucocytes (Vanhoutte, 2003). Le NO exerce des effets paracrines, il favorise la relaxation des fibres musculaires lisses des vaisseaux, inhibe l'agrégation plaquettaire, empêche la prolifération des cellules musculaires lisses et exerce une action anti-inflammatoire et anti-oxydante (Boulanger, 1999 ; Kurowska, 2002; Shaul, 2002; Vanhoutte, 2003).

Le NO est un gaz liposoluble synthétisé par les NOS. En présence de NADPH, d'oxygène, de BH₄, de FAD et de FMN, les NOS catalysent dans une première étape l'oxydation de la L-arginine en N ω -hydroxy-L-arginine. Dans une deuxième étape, la N ω -hydroxy-L-arginine est transformée en L-citrulline et NO. Dans la paroi vasculaire, le NO diffuse de l'endothélium vers la cellule musculaire lisse en traversant librement les membranes cellulaires. Dans les cellules musculaires lisses, le NO se lie à la guanylate cyclase soluble (sGC) qui produit alors de grandes quantités de GMPc. La GMPc active la protéine kinase G (PKG) qui, à son tour, entraîne une diminution de la concentration intracellulaire en calcium, induisant la vasorelaxation.

Comme nous l'avons mentionné précédemment, le NO est produit par la famille des NOS. Cette dernière comprend trois isoformes : la NOS neuronale (nNOS), la NOS inducible (iNOS) et la NOS endothéliale (eNOS). L'eNOS représente le principal isoforme impliqué dans le maintien des fonctions vasculaires. L'activité de l'enzyme eNOS peut être régulée par différents facteurs, notamment par des changements de la concentration intracellulaire de Ca²⁺, ce qui affecte sa liaison avec la calmoduline (Domenico, 2004 ; Walford et Loscalzo, 2003). En effet, il a été démontré que certains agonistes, comme l'acétylcholine et la bradykinine, pouvaient stimuler l'eNOS en augmentant les concentrations de calcium cytosolique (figure 5). La liaison de ces

substances vasodilatatrices à leur récepteur a pour effet d'induire une augmentation de la production d'IP-3. En retour, cela entraîne une augmentation de la libération du Ca^{2+} , ainsi qu'une augmentation de sa liaison à la calmoduline. Le complexe ainsi formé peut se fixer à la protéine eNOS et ainsi augmenter son activité. D'autre part, la protéine eNOS peut aussi être activée par une autre voie indépendante au Ca^{2+} (figure 5). À cet égard, il a été rapporté que l'insuline pouvait agir au niveau de l'endothélium vasculaire, et induire la production de NO par un mécanisme indépendant du calcium (Vincent et coll., 2003 ; Montagnani et coll., 2001).

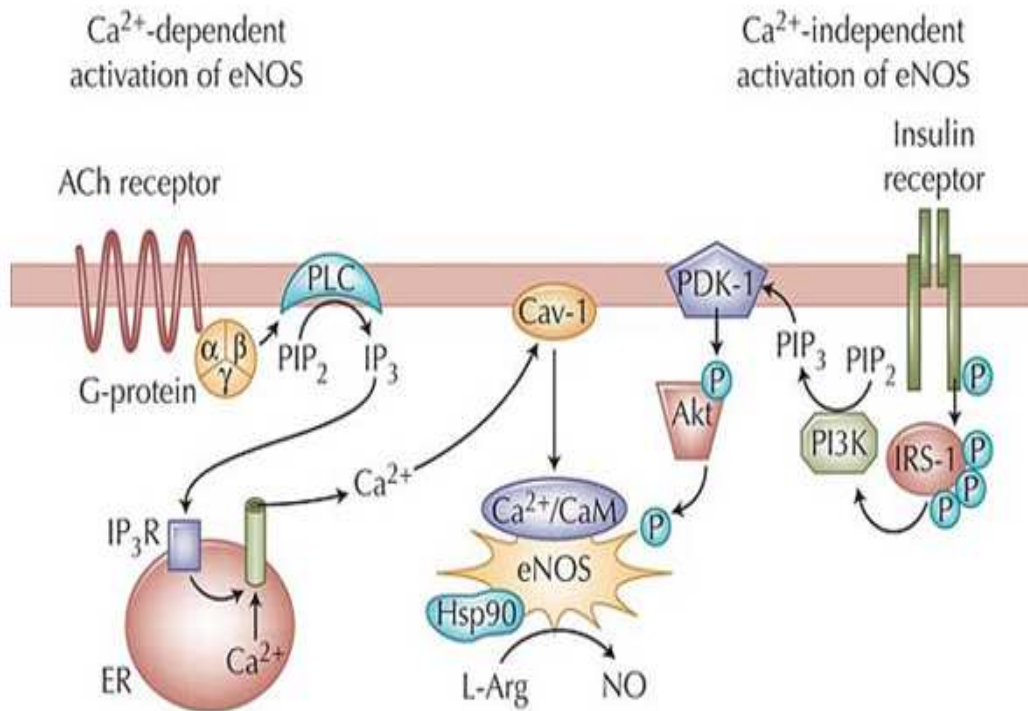


Figure 5 : Activation de la eNOS de façon classique (dépendante du Ca^{2+}) et par l'insuline (indépendante du Ca^{2+}) (D'après Vincent et coll., 2003)

L'activation de l'eNOS peut également se faire par des stimuli mécaniques, comme les forces de cisaillement (Shear stress), qu'exerce le déplacement du sang sur la surface des cellules endothéliales. Ces forces orientées longitudinalement varient avec le débit sanguin local et les conditions d'écoulement. Les contraintes de cisaillement stimulent des récepteurs membranaires sensibles à l'étirement de la cellule. Ces mécanosenseurs ainsi activés, déclenchent des cascades complexes d'événements biochimiques, qui conduisent à des changements fonctionnels dans la cellule comme par exemple une activation de la transcription du gène codant pour la eNOS. L'induction de l'ARNm de la eNOS est d'autant plus importante que les forces de cisaillement sont importantes. Les forces de cisaillement activent la eNOS par un mécanisme calcium-indépendant qui nécessite la phosphorylation de la eNOS (Corson et coll., 1996) (figure 6). Cette modification post-traductionnelle survient sur le résidu sérine 1177 de l'eNOS et est médiée par la phosphorylation de l'Akt sur le résidu sérine 473. Il est à noter que ce mécanisme occupe une place cruciale dans la régulation de l'eNOS par l'exercice physique (Lehoux et Tedgui, 2004).

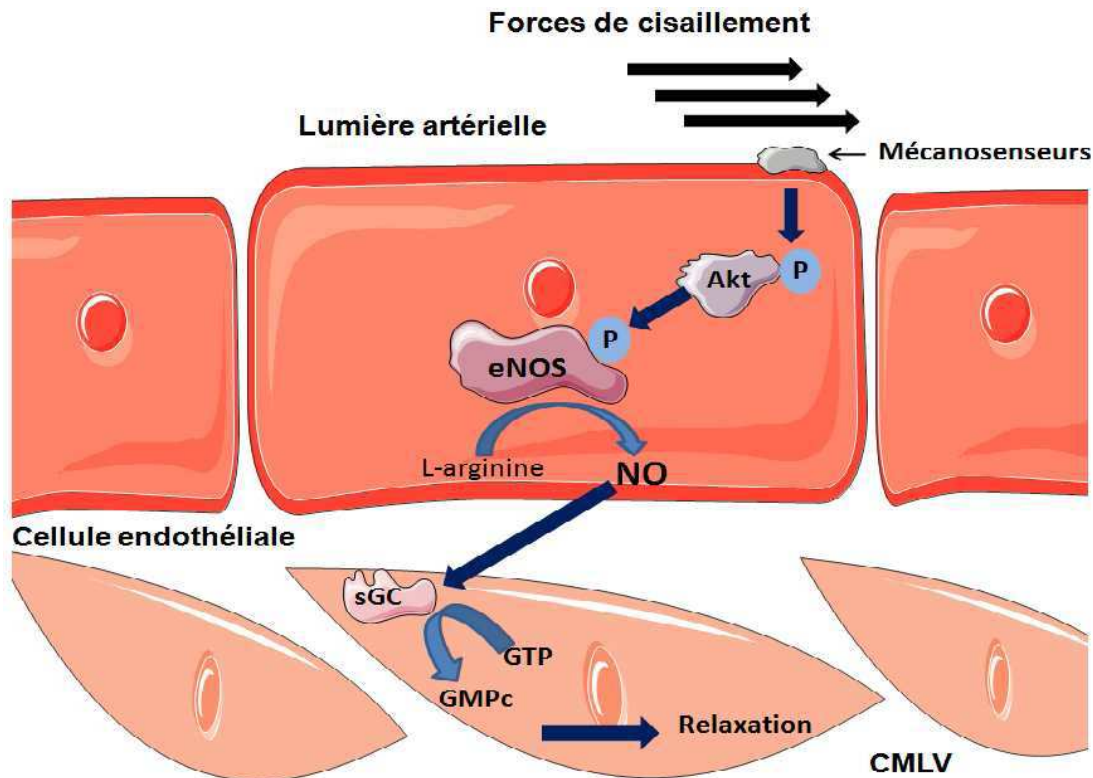


Figure 6 : Activation de la eNOS par les forces de cisaillement (shear stress)

2.2. Dysfonction endothéliale et IRC :

L'IRC se traduit aussi par des altérations biologiques vasculaires comme la dysfonction endothéliale. Ainsi l'IRC est souvent associée à une élévation du risque cardiovasculaire. Cette dysfonction endothéliale se caractérise par une réduction de la production de vasodilatateurs comme le NO et/ou par une production excessive de vasoconstricteurs.

La fonction endothéliale est altérée chez les patients souffrant d'IRC. Ceci a été démontré au niveau de la microcirculation (Demuth et coll., 1998), et des grosses artères (Joannides et coll., 1997). Au niveau de la microcirculation cutanée, Bradley et coll. (1988) ont démontré une vasodilatation post-ischémique réduite chez l'insuffisant rénal.

Ceci a été confirmé par Demuth et coll. (1998). Par ailleurs, il a été également démontré une réduction de la vasodilatation induite par la chaleur chez les patients atteints d'insuffisance rénale (Wilkinson et coll., 1989). Chez le patient IRC, l'altération de la fonction endothéliale touche également les grosses artères de conductance telle l'artère radiale (Joannides et coll., 1997). En utilisant les méthodes d'echotracking pour mesurer les changements de diamètre de l'artère radiale au cours d'une ischémie provoquée, ces auteurs ont démontré une diminution significative de la vasodilatation post-ischémique chez les sujets urémiques. De même, la réponse directe de l'artère radiale à l'injection locale d'acétylcholine est nettement diminuée, alors que la réponse à un donneur exogène de NO (administration sous-linguale de glycéryl-trinitrate) provoque une réponse normale (Joannides et coll., 1997). Les causes de l'altération de l'endothélium ne sont pas claires, mais semblent être liées à l'activation chronique des cellules endothéliales, aboutissant à leur dysfonctionnement. Ceci est objectivé au plan biologique par l'augmentation des concentrations sanguines des nombreux facteurs humoraux synthétisés et relargués par l'endothélium tels : l'ET-1, le type 1 de l'activateur du plasminogène ou encore, l'inhibiteur de l'activateur du plasminogène (Demuth et coll., 1998 ; Haaber et coll., 1995 ; Gris et coll., 1994). Les altérations de la vasodilatation postischémique semblent étroitement liées à l'augmentation des taux circulants d'ET-1, suggérant fortement un lien de causalité entre la souffrance endothéliale et les troubles vasomoteurs chez les patients urémiques (Demuth et coll., 1998).

Les études histologiques ont montré l'existence d'une micro-angiopathie des capillaires sous-épidermiques chez les patients insuffisants rénaux, caractérisée entre autre, par la présence d'une activation et d'une apoptose des cellules endothéliales

(Ichimaru et Horie, 1987). Une étude a démontré que les séances d'hémodialyse et la supplémentation des insuffisants rénaux par de la L-arginine améliorent la réponse vasculaire à l'acétylcholine, suggérant surtout la présence d'un inhibiteur de la synthèse du NO (Vallance et coll., 1992). Des taux élevés d'inhibiteurs de la NOS tels la méthylguanidine et l'ADMA sont présents chez l'insuffisant rénal, et leur épuration au cours de la séance de dialyse pourrait expliquer l'amélioration des fonctions endothéliales (Hand et coll., 1998). L'hyperhomocystéinémie observée chez le patient IRC pourrait aussi être une cause des altérations endothéliales. L'hyperhomocystéinémie exerce un effet « toxique » sur l'endothélium par la génération de radicaux oxygénés (Welch et Loscalzo, 1998). Néanmoins, Van Guldener et coll. (1998) n'ont pas pu démontrer, chez des patients en dialyse péritonéale, de lien direct entre les altérations de la vasodilatation endothélium-dépendante et les taux circulants d'homocystéine. Les anomalies de la vasodilatation endothéliale peuvent être améliorées par l'administration d'antioxydants (Levine et coll., 1996) et la diminution d'activité des systèmes anti-oxydants pourrait, chez l'insuffisant rénal, expliquer en partie la perte de fonction endothéliale. D'autre part, il a été observé que le sérum de sujets urémiques induisait des troubles de l'adhérence des cellules endothéliales à leur matrice extracellulaire, les rendant plus sensibles aux forces de friction entretenues par l'augmentation des flux sanguins caractéristique de l'IRC (Aznar-Salati et coll., 1995).

Enfin, la perte des capacités fonctionnelles de l'endothélium s'accompagne de la perte de protection vis-a-vis des mécanismes biologiques inducteurs de l'athérosclérose et de son «accélération» si couramment observée chez les patients dialysés (London et Drüeke, 1995). Plus récemment, London et coll. (2004) ont montré que, sur une cohorte

de 78 patients insuffisants rénaux en hémodialyse suivie en moyenne pendant 60 ± 27 mois, la diminution de la réponse vasodilatatrice à une ischémie de 5 minutes était associée à la mortalité globale, et ceci indépendamment de la présence de facteurs confondants comme l'hypertrophie ventriculaire gauche (HVG), l'épaisseur de l'intima-média carotidienne ou les marqueurs de l'inflammation (protéine C-réactive (CRP) ou hypoalbuminémie) qui lui sont associés. Enfin, il avait été montré que les microparticules circulantes, prélevées chez des patients coronariens, provenant de fragments de cellules altérées apoptotiques ou activées, pouvaient jouer un rôle dans la dysfonction endothéliale. Chez les patients IRC, les microparticules d'origine endothéliale, plaquettaire, érythrocytaire sont élevées (Amabile et coll., 2005). Le taux de microparticules circulantes d'origine endothéliale est corrélé à la mauvaise réponse vasodilatatrice constatée chez ces patients. Cet effet semble confirmé *in vitro* par la mauvaise relaxation de l'aorte de rat en réponse à l'addition d'acétylcholine en présence de microparticules isolées provenant de patients IRC (Amabile et coll., 2005).

La dysfonction endothéliale est une conséquence d'une augmentation du stress oxydant (Thomas et coll., 2003). Ce dernier, apparaît comme étant aussi une cause majeure des risques vasculaires chez le patient IRC. Le paragraphe suivant traitera de la relation entre l'IRC et le stress oxydatif.

3. Le stress oxydatif dans l'IRC :

3.1. Généralités :

Dans les systèmes biologiques, le stress oxydatif se définit comme un déséquilibre

de la balance oxydants/antioxydants en faveur des oxydants, entraînant des dommages cellulaires (Atamer et coll., 2008). Il se développe lorsque les radicaux libres (molécules oxydantes) sont produits plus rapidement qu'ils ne peuvent être neutralisés par les systèmes de défense antioxydants. Ce déséquilibre peut avoir diverses origines, telles que la surproduction endogène d'agents pro-oxydants d'origine inflammatoire (Picchi et coll., 2006), un déficit nutritionnel en antioxydants ou même une exposition environnementale à des facteurs prooxydants (tabac, alcool, médicaments, rayons gamma, rayons ultraviolets, pollution atmosphérique, métaux toxiques) (Moller et coll., 1996 ; Valko et coll., 2006; Valko et coll., 2005).

3.1.1. Les radicaux libres :

Les radicaux libres sont des espèces chimiques (atomes ou molécules) possédant au moins un électron célibataire (ou non apparié) sur leur couche externe. Ils sont en général très réactifs et instables (Gilbert, 2000). Les radicaux libres impliquant un ou plusieurs atomes d'oxygène se nomment espèces réactives de l'oxygène (ROS). L'anion superoxyde ($O_2^{\cdot-}$) est la forme primaire des ROS, et est formé par l'addition d'un électron à l'oxygène moléculaire (O_2). L'anion superoxyde peut ensuite être converti en ROS secondaires tels que le radical hydroxyle ($\cdot OH$), le radical peroxyde ($ROO\cdot$) ou le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2). Ce dernier n'étant pas un radical libre puisqu'il ne contient pas d'électrons non appariés, mais se révèle tout de même réactif. Les radicaux libres impliquant plutôt un atome d'azote se nomment espèces réactives de l'azote (RNS). Parmi ces molécules, il y a le monoxyde d'azote ($NO\cdot$) et le peroxyde d'azote ($ONOO^-$) (Tremellen, 2008). Les radicaux libres jouent un rôle essentiel dans certaines fonctions biologiques

telles la phagocytose, la régulation de la croissance cellulaire et des signaux intercellulaires et la synthèse d'importants composés organiques (Fridovich, 1999 ; Ignarro, 2002 ; Lander, 1997). Cependant, en concentrations élevées, ils deviennent hautement cytotoxiques en engendrant diverses altérations biochimiques intracellulaires telles que l'oxydation de l'ADN (Dalle-Donne et coll., 2006 ; Loft et coll., 2008), des protéines (Davies, 2003 ; Refsgaard et coll., 2000), ou encore la peroxydation des lipides (Dalle-Donne et coll., 2006; Spitteller et coll., 2007).

3.1.2. Mécanismes de production des dérivés de l'oxygène :

Dans la cellule, l'anion superoxyde peut être formé par différentes enzymes telles que la NADPH oxydase, la xanthine oxydase, les cyclooxygénases, les lipoxygénases, l'enzyme eNOS, le cytochrome P450 et les enzymes de la chaîne respiratoire mitochondriale (Cai et Harrison, 2000; Wassmann et coll., 2004). La contribution relative de chacune de ces sources au cours d'un stress oxydatif n'est pas encore tout à fait élucidée. Cependant, dans un contexte de maladies vasculaires, plusieurs études expérimentales et cliniques ont révélé que l'enzyme NADPH oxydase représente la principale source de production de l'anion superoxyde au niveau vasculaire, intervenant dans plusieurs pathologies associées à la dysfonction endothéliale comme l'athérosclérose, l'HTA, le diabète, l'obésité ou encore l'hypercholestérolémie (Hwang et coll., 2003 ; Laight et coll., 2000 ; Pierce et coll., 2009 ; Thomas et coll., 2003).

La NADPH oxydase est un complexe enzymatique multiprotéique constituant une famille d'enzymes comptant 7 membres (Nox1, Nox2, Nox3, Nox4, Nox5, Duox 1 et 2) (Bedard et Krause, 2007). Elles transfèrent successivement des électrons du NADPH

jusqu'à l'accepteur final O₂, pour générer des anions superoxydes. Parmi les membres de cette famille, la gp91phox (phagocyte oxydase) ou Nox2 est la mieux caractérisée. Cette protéine a été clonée en 1986 (gène CYBB sur le chromosome X, locus Xp21.1), et elle est fonctionnelle sous forme de complexe assemblé suite à un stimulus. Ce complexe comprend un coeur catalytique membranaire (gp91phox et p22phox, formant le cytochrome b558) et des protéines cytosoliques (p40phox, p47phox, p67phox et Rac) (figure 7). Désassemblée quand elle est inactive au repos, la NADPH oxydase devient active à la suite de la translocation des facteurs cytosoliques à la membrane, formant ainsi un complexe enzymatique fonctionnel. En fait, l'activation de la NADPH oxydase implique deux types de phénomènes: la phosphorylation et la translocation à la membrane des sous-unités cytosoliques (Touyz et coll., 2003). En effet, suite à l'activation de la cellule, les composantes cytosoliques p40phox, p47phox, p67phox deviennent phosphorylées et vont migrer à la membrane pour s'associer aux facteurs membranaires gp91phox et de p22 phox. Parallèlement, la molécule Rac va échanger son GDP avec un GTP, se dissocier de son inhibiteur Rho-GDI, et migrer de façon indépendante à la membrane. Le cytochrome b558 est ensuite activé par la p67phox, par l'intermédiaire de son domaine d'activation (figure 7). La NADPH oxydase ainsi activée va utiliser la NADPH cytosolique pour réduire l'oxygène et produire de l'anion superoxyde (Pacllet et coll., 2000).

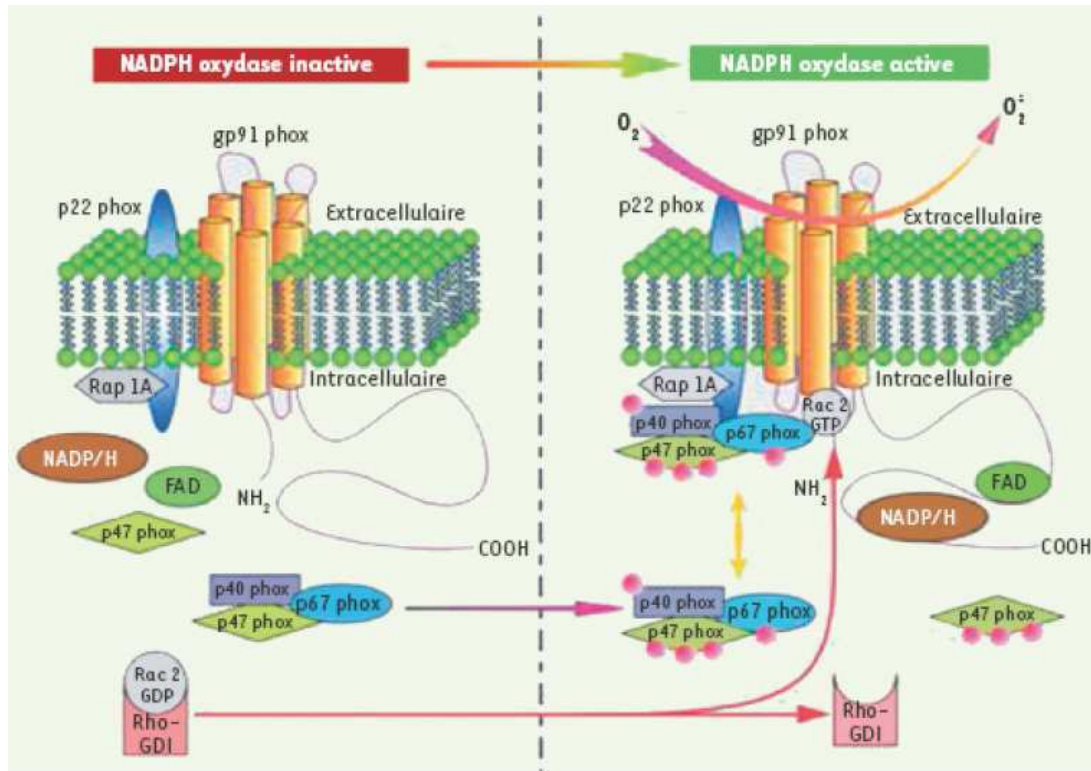


Figure 7 : Activation de la NAD(P)H oxydase (D'après De Leo et Quinn 1996)

3.1.3. Mécanismes de défense contre des dérivés de l'oxygène :

Les radicaux libres sont produits spontanément et de manière continue au sein de notre organisme. Le maintien d'un niveau non cytotoxique de ROS est assuré par des systèmes antioxydants, dont le rôle principal est de neutraliser et de dégrader les radicaux libres. Un déficit ou un dysfonctionnement de ces systèmes engendre une augmentation des dommages tissulaires. Les antioxydants peuvent être divisés en deux groupes selon leur mode d'action : les antioxydants enzymatiques et les antioxydants non-enzymatiques.

a. Le système antioxydant enzymatique :

Ce système est principalement composé des superoxydes dismutases (SOD), des catalases (CAT), des glutathions peroxydases (GPx) et des thiorédoxines (Higashi et coll., 2009 ; Wood et coll., 2003).

Parmi ces enzymes, les superoxydes dismutases (SOD) représentent la première ligne de défense pour contrer les ROS. Ce sont les enzymes antioxydantes les plus importantes au niveau vasculaire (Higashi et coll., 2009; Wassmann et coll., 2004). Les SOD sont des métalloenzymes qui catalysent la dismutation des ions superoxydes en peroxyde d'hydrogène et d'oxygène. Chez les mammifères, la SOD existe sous trois isoformes qui se différencient par leur localisation cellulaire et par leur cofacteur métallique : une forme cytosolique associée aux ions cuivre et zinc (Cu/Zn-SOD), une forme mitochondriale associée au manganèse (Mn-SOD) et une forme extracellulaire (EC-SOD). La Mn-SOD semble indispensable à la vie puisque sa mutation est non viable : l'espérance de vie maximale pour des souris Mn-SOD^{-/-} n'est que de 22 jours pour certains types de mutations (Huang et coll., 2001). Ceci n'est pas le cas pour la forme cytosolique, bien que l'espérance de vie chez des souris transgéniques Cu/Zn-SOD^{-/-} soit plus faible que celle de souris Cu/Zn-SOD^{+/+} (130 semaines vs 180 semaines) (Sentman et coll., 2006). D'autre part, il a été rapporté que la Cu/Zn-SOD joue un rôle important dans la régulation de la biodisponibilité du NO et de la fonction endothéliale. À ce sujet, Lynch et coll., (1997) ont montré que l'inhibition de la Cu/Zn-SOD induit une dysfonction endothéliale chez des rats normaux.

b. Le système antioxydant non-enzymatique :

Contrairement aux enzymes antioxydants, la plupart des antioxydants non-enzymatiques ne sont pas synthétisés par l'organisme et doivent être apportés par l'alimentation. Dans cette catégorie, nous retrouvons les oligoéléments (le cuivre, le fer, le manganèse, le sélénium et le zinc), le glutathion réduit (GSH), l'ubiquinone (CoQ10), l'acide ascorbique (vitamine C), l'alpha tocophérol (vitamine E) et les caroténoïdes (Vertuani et coll., 2004).

3.2. Stress oxydatif et IRC :

Les patients atteints d'IRC et leurs modèles expérimentaux, montrent un stress oxydatif vasculaire, rénal et systémique. Même les défaillances mineures, comme une légère réduction du taux de filtration glomérulaire ou une microalbuminurie, peuvent être associées à une augmentation du stress oxydant menant à une dysfonction endothéliale (Vaziri et coll., 1998). Les mécanismes moléculaires responsables de cette dysfonction restent mal connus. Plusieurs approches ont été suggérées afin de réduire le stress oxydant chez les patients atteints d'IRC. Des approches pharmacologiques comme les anti-hypertenseurs, les vitamines, les statines, l'aspirine, les agonistes de PPAR (peroxisome proliferator-activated receptor). Des approches non-pharmacologiques comme la perte de poids, les régimes et l'exercice ont été utilisées pour améliorer la fonction endothéliale dans les maladies rénales (Tomayko et coll., 2011).

Un ensemble de travaux récents suggère que les patients atteints d'IRC subissent des modifications délétères de la structure des protéines et des lipides secondaires à la

perte des défenses antioxydantes, à l'augmentation du stress oxydant ou à d'autres modifications post-synthétiques de la structure des protéines médiées par la glycation ou la carbamylation. L'insuffisance rénale réduit l'activité antioxydante du plasma (Martin-Mateo et coll., 1998 ; Mimic-oka et coll., 1995 ; Mimic-oka et coll., 1999). L'augmentation du stress oxydant est attestée par l'augmentation du malondialdéhyde (MDA) dans les membranes des érythrocytes et par la diminution des formes réduites du glutathion. L'activité de la glutathion peroxydase plasmatique est également réduite dans l'IRC (Yochimura et coll., 1996). Les activités de la superoxyde dismutase et de la glutathion peroxydase sont diminuées tant dans le plasma que dans les érythrocytes. Un déficit en agents réducteurs (ascorbate, sélénium et zinc) jouerait un rôle additionnel à l'origine du stress oxydant (Loughrey et coll., 1994 ; Tsukamoto et coll., 1980). Il existe également une déplétion en vitamine E (Paul et coll., 1991).

L'augmentation du stress oxydant apparaît bien avant que le patient ne soit dialysé. Une fois que la dialyse de suppléance est commencée, l'altération oxydative des éléments du sang circulant apparaît (Hashimoto et coll., 1996 ; Schettler et coll., 1998). L'hémodialyse ne réduit pas le stress oxydant mais, au contraire, l'accroît (Toborek et coll., 1992 ; Lin et coll., 1996). Ceci est dû à l'activation des leucocytes neutrophiles polymorphonucléaires (PMNL) par le contact du sang avec les membranes de dialyse (Westhuyzen et coll., 1995). Les PMNL activés sont capables de modifier la peroxydation lipidique au niveau des érythrocytes (Eschbach et coll., 1990).

L'augmentation du stress oxydant conduit à la peroxydation lipidique (Paul et coll., 1993) et à l'altération oxydative des lipoprotéines. Les membranes cellulaires sont également une cible pour l'atteinte oxydative. Stenwinkel et coll. (1998) ont montré que

la diminution des phospholipides érythrocytaires, chez les insuffisants rénaux non encore dialysés, était la plus forte chez ceux atteints de malnutrition, la dialyse corrigeant partiellement l'anomalie. Ces observations ne permettent pas de distinguer clairement si l'altération oxydative est la conséquence de causes nutritionnelles ou de l'inflammation, mais elles suggèrent certainement qu'il existe une relation entre inflammation et stress oxydant.

4. Les conséquences d'un traitement rHuEPO chez les patients IRC :

L'anémie est une conséquence inévitable de l'IRC. La forme recombinante d'EPO humaine est couramment employée dans le traitement à long terme de l'anémie associée à l'IRC. Cependant, on a remarqué que l'HTA systémique se développait, ou empirait, chez 20-30% des patients traités avec la rHuEPO (Eschbach et coll., 1989). Il y a plusieurs mécanismes potentiels par lesquels la rHuEPO peut augmenter la pression artérielle chez les patients hémodialysés : la viscosité sanguine élevée, la perte de la vasodilatation hypoxique, l'activation des systèmes neurohumoraux (catécholamines, système rénine-angiotensine), et particulièrement un effet vasoconstricteur accentué. Ce dernier mécanisme impliquerait plusieurs facteurs : une élévation du taux de calcium intracellulaire, un déséquilibre des agents vasoactifs locaux avec une plus grande synthèse du puissant vasoconstricteur l'endothéline-1 (ET-1), un effet mitogène (cellules musculaires lisses vasculaires) avec remodelage vasculaire et un mécanisme plaquette-dépendant (Maschio, 1995).

Jusqu'à présent, l'utilisation de la rHuEPO chez les patients IRC a été faite seulement dans le souci de corriger l'anémie et les altérations du tissu rénal dues à

l'hypoxie, résultante de l'anémie (Rossert et Foissard, 2006). Des études ont suggéré que la correction de l'anémie avec la rHuEPO pouvait ralentir la progression de l'IRC (Gouva et coll., 2006 ; Kuriyama et coll., 1997). Par contre, des données publiées récemment à partir d'essais plus larges chez des patient IRC, n'ont révélé aucun effet bénéfique (Drüeke et coll., 2006 ; Singh et coll., 2006). Cependant dans ces études, de hautes doses de rHuEPO ont été utilisées en quelques semaines et une soudaine élévation de l'hématocrite chez des patients avec de sérieux problèmes vasculaires pourrait atténuer les effets bénéfiques putative de la rHuEPO, particulièrement si on assume que des doses plus petites seraient plus adéquates pour la protection tissulaire (Fliser, 2010). Bahlmann et coll. (2004) ont utilisé des petites doses de darbépoétine alpha qui n'affectaient pas les taux d'hématocrite chez le modèle de rat néphrectomisé (ablation de 5/6 des reins). Ils ont pu démontrer qu'un traitement chronique à la darbépoétine protège le tissu vasculaire rénal et préserve la fonction rénale. Dans cette même étude, il a été observé une activation persistante de la voie Akt au niveau des cellules endothéliales et épithéliales glomérulaires et une réduction de l'apoptose au niveau du tissu rénal. D'un autre côté, l'utilisation de plus fortes doses de darbepoetin pouvait atténuer ces effets protecteurs et même aggraver les dommages microvasculaires rénaux (Fliser et coll., 2006). Les auteurs ont ainsi suggéré que l'établissement d'une dose minimale efficace dans les futures études permettrait de mieux comprendre, comment l'administration de la rHuEPO serait bénéfique dans le cadre de l'IRC.

5. La rHuEPO et le stress oxydatif dans l'IRC:

Les niveaux des produits plasmatiques résultant de la peroxydation lipidique sont

corrélés avec la gravité de l'anémie rénale. La correction de l'anémie par la rHuEPO diminue les niveaux de malondialdéhyde (MDA) et par conséquent la peroxydation lipidique. De plus, la biodisponibilité des défenses antioxydantes (représentées par une amélioration de l'activité de la superoxyde dismutase et la glutathione peroxydase) est augmentée après la correction de l'anémie (Canestrari et coll., 1995).

La peroxydation lipidique au niveau des membranes des érythrocytes, pourrait être le résultat d'une résistance à l'EPO due à une augmentation de l'hémolyse causée par le stress oxydatif. Le traitement à la rHuEPO est à l'origine d'un rajeunissement des érythrocytes. Cependant, il n'y a pas d'amélioration au niveau de la sensibilité oxydative des érythrocytes suite au traitement (Zachée et coll., 1993).

Il a été aussi démontré que la rHuEPO normalisait la fonction endothéliale, l'inflammation vasculaire et le stress oxydatif chez le rat avec une ablation rénale. De plus, ces effets vasoprotecteurs sont observés même avec une dysfonction rénale détériorée (Toba et coll., 2010). Les propriétés antioxydantes de la rHuEPO passeraient par l'inhibition de l'activité et l'expression de la NAD(P)H oxydase. Il faut noter le rôle de l'augmentation de l'expression de la eNOS, due à l'activation de la voie de l'Akt, dans cette amélioration (Toba et coll., 2009).

TROISIÈME PARTIE : L'EXERCICE PHYSIQUE ET LES RISQUES CARDIOVASCULAIRE ET RÉNAL

Parmi les approches non-pharmacologiques utilisées dans le traitement des maladies chroniques, l'exercice reste l'un des meilleurs moyens utilisés. L'exercice physique, qui a un certain potentiel pour améliorer les désordres cardiovasculaires et métaboliques, est salubre dans le traitement de beaucoup de maladies chroniques telle que l'HTA (Mc Mahon et Palmer, 1985). Il a aussi été démontré qu'il pouvait influencer la progression de la maladie rénale chronique chez l'homme et les animaux (Goldberg et coll., 1986 ; Heifets et coll., 1987).

1. Effet bénéfique sur la mortalité cardiovasculaire :

Actuellement, il est unanimement admis que l'activité physique modérée réduit le risque de survenue d'évènement cardiovasculaire, tant en prévention primaire qu'en prévention secondaire. L'exercice diminue le risque d'évènement coronariens, et ce indépendamment d'une réduction de la corpulence et du niveau de l'obésité abdominale (Wessel et coll., 2004). Une autre étude portant sur 14101 femmes de plus de 50 ans, suivies pendant 10 ans, a montré une relation inverse entre le taux de mortalité provoqué par un accident vasculaire cérébrale et le niveau d'activité physique (Ellekjaer et coll., 2000). D'autre part, Hu et coll., (2004) ont mis en évidence que la pratique hebdomadaire de 3 à 4 h d'exercice physique réduit le risque de mortalité de 31 à 50% chez les patients diabétiques de type 2. L'effet protecteur de l'exercice sur la mortalité cardiovasculaire a également été observé dans différents modèles animaux à risque cardiovasculaire. Chicco

et coll., (2008) ont rapporté que l'exercice aérobie modéré retarde considérablement la mortalité cardiaque chez la rate sévèrement hypertendue. D'autre part, l'exercice physique est utilisé comme un moyen de réhabilitation et de réadaptation en tant que prévention secondaire chez les patients ayant eu un événement cardiovasculaire. Dans ce contexte, il a été estimé que l'exercice physique réduirait le taux de mortalité de 33 à 44% dans les 5 ans suivant l'arrêt du protocole chez les patients coronariens par rapport aux sédentaires (Adams et coll., 2008). D'autres travaux ont montré que l'exercice améliore la capacité physique et la qualité de vie des patients insuffisants cardiaques. Par exemple, la comparaison réalisée par Silva et coll., (2002), entre un groupe soumis à un programme d'entraînement pendant 3 mois et un groupe témoin, met en évidence une amélioration significative de la distance parcourue sur 6min (+355m) dans le groupe «intervention».

2. Effets bénéfiques sur les facteurs de risque cardiovasculaire :

Plusieurs études cliniques et expérimentales ont démontré que la pratique d'activité physique est associée à une réduction des facteurs de risques cardiovasculaires. Il a été rapporté que l'exercice réduit l'accumulation du tissu adipeux viscéral chez l'animal et l'homme obèse (Dantas et coll., 2010 ; Irving et coll., 2008), abaisse la pression artérielle chez l'animal et l'homme hypertendu (Horta et coll., 2005 ; Fagard, 2006), améliore le profil lipidique chez l'animal et l'homme avec une hypercholestérolémie (Napoli et coll., 2004 ; Varady et coll., 2005) ou encore améliore la sensibilité à l'insuline chez l'animal et l'homme diabétique (de Lemos et coll., 2007 ; de Filippis et coll., 2006). Récemment, nous avons démontré dans notre équipe que

l'exercice, indépendamment de la diète, corrigeait la dysfonction endothéliale, le stress oxydatif et l'inflammation chez le rat rendu obèse par une alimentation riche en gras (Touati et coll., 2011).

3. Effets de l'exercice sur la fonction endothéliale :

Connaisant le rôle majeur de la dysfonction endothéliale dans l'IRC, nous pouvons la considérer comme la cible préventive et thérapeutique majeure. L'amélioration de la fonction endothéliale, en réponse à l'exercice, serait l'un des mécanismes responsable de la diminution de la mortalité cardiovasculaire.

Plusieurs études expérimentales et cliniques ont mis en évidence que la pratique de l'exercice physique est associée à une amélioration de la fonction endothéliale. De Filippis et coll., (2006) ont démontré que 8 semaines d'exercice aérobie (4 fois/semaine, 45min à 70% de la VO₂ max/séance) améliore la relaxation endothélium-dépendante au niveau de l'artère brachiale chez des sujets obèses et insulino-résistants. De même, il a été rapporté que l'exercice physique, pratiqué pendant 3 mois, améliore la dysfonction endothéliale chez des sujets diabétiques type 2, et que cet effet bénéfique persiste jusqu'à 24 mois après l'arrêt du protocole d'entraînement (Okada et coll., 2010). D'autres études expérimentales ont démontré également que l'exercice préserve la fonction endothéliale NO-dépendante dans le modèle du porc hypercholéstolémiant au niveau des artères brachiales (Woodman et coll., 2003), fémorales (Woodman et coll., 2006) ou encore coronaires (Thompson et coll., 2004). De plus, Moien-Afshari et coll., (2008) ont observé que, chez la souris obèse et diabétique de type 2, l'exercice corrige les effets délétères du diabète sur la fonction endothéliale (mesurée au niveau aortique), et ce indépendamment

de la réduction du poids.

Les mécanismes moléculaires par lesquels l'exercice améliore la fonction endothéliale passent par :

- Surexpression de la eNOS

Plusieurs études suggèrent que les effets protecteurs de l'exercice sur la dysfonction endothéliale passent soit par une augmentation de production du NO, soit par une diminution de sa dégradation. En effet, il semble que l'exercice physique, à travers l'augmentation des forces de cisaillement, est capable d'activer la voie de l'eNOS. L'effet des forces de cisaillement sur l'activité transcriptionnelle du gène de la eNOS a été démontré pour la première fois par Uematsu et ses collaborateurs en 1995. Les auteurs de cette étude ont observé que l'application *in-vitro* de forces de cisaillement à des cellules endothéliales bovines ou humaines en culture augmente le taux d'ARNm de la eNOS. Depuis ces observations, d'autres études sur l'animal et l'humain ont été menées. Parmi celles-ci, on peut citer Laufs et coll., (2005) qui ont démontré que chez la souris, l'exercice physique volontaire augmente l'expression de l'ARNm-eNOS au niveau aortique par rapport aux souris inactives. De même, Hambrecht et coll., (2003) ont confirmé ces résultats chez l'homme, puisqu'ils ont observé que les taux des ARNm-eNOS au niveau de l'artère mammaire interne étaient significativement supérieurs chez des patients coronariens entraînés par rapport aux patients sédentaires. De plus, il a été rapporté que l'élévation de l'expression du gène codant la eNOS était associée à une augmentation de l'expression de la protéine (Hambrecht et coll., 2003 ; Moien-Afshari et coll., 2008). Les forces de cisaillement semblent activer la eNOS via l'activation de

l'Akt. Hambrecht et coll., (2003), après avoir mené un programme d'entraînement de 4 semaines chez des patients coronariens, ont observé une augmentation de la forme phosphorylée de l'Akt sur la sérine 473, et de la eNOS sur la sérine 1777 au niveau de l'artère mammaire interne, en comparaison avec les patients sédentaires. Des résultats similaires ont été rapportés également chez la souris obèse et diabétiques (Moien-Afshari et coll., 2008).

- Diminution de la dégradation du NO

Des études récentes ont démontré chez des patients coronariens, que l'exercice physique améliorait la dysfonction endothéliale via la réduction de l'expression vasculaire des sous-unités de la NAD(P)H oxydase (Adams et coll., 2005). Pour diminuer la dégradation du NO, il faut diminuer le stress oxydatif. Nous traiterons de l'effet de l'exercice sur le stress oxydatif dans la partie suivante.

- Système rénine-angiotensine (SRA)

Des études récentes ont démontré chez des patients coronariens, que l'exercice physique améliorait la dysfonction endothéliale via la réduction de l'expression des récepteurs Ang II/AT1R (Adams et coll., 2005). L'angiotensine II (Ang II) représente le principal effecteur du SRA, jouant un rôle primordial dans la régulation de la pression artérielle et le tonus des cellules musculaires lisses (Billet et coll., 2008). En effet, la fixation de l'Ang II sur son récepteur AT₁ entraîne une vasoconstriction (Billet et coll., 2008). Ainsi, l'activation chronique du SRA est impliqué dans de nombreuses pathologies cardiovasculaires telle que l'HTA, l'infarctus de myocarde, les maladies rénales chroniques, l'athérosclérose ou encore le diabète (Billet et coll., 2008). Il a été

rapporté que l'exercice physique peut diminuer de 49% la vasoconstriction de l'artère mammaire en réponse à l'Ang II (Adams et coll., 2005). Cet effet protecteur de l'exercice a été associé à une diminution de l'expression des récepteurs AT₁ de l'Ang II. Ainsi, ces observations suggèrent une implication possible de l'Ang II et de son récepteur AT₁ dans les mécanismes vasculo-protecteurs de l'exercice.

4. Effets de l'exercice sur le stress oxydatif :

L'exercice peut aussi améliorer le statut oxydatif cardiovasculaire et rénal par la régulation des systèmes antioxydants. Il semble que l'exercice physique stimule les défenses antioxydantes enzymatiques de l'organisme. Par exemple, il a été observé que l'exercice augmente l'expression de la Cu/Zn SOD au niveau aortique et mésentérique dans différents modèles d'animaux avec des facteurs de risques cardiovasculaires. Ainsi, cette augmentation de taux protéiques de la Cu/Zn SOD est accompagnée d'une amélioration de la fonction endothéliale (De Moraes et coll., 2008 ; Moien-Afshari et coll., 2008 ; Rush et coll., 2003).

Toutefois, le rôle antioxydant de l'exercice régulier ne se limite pas à la stimulation des enzymes antioxydantes, mais entraîne également une diminution des enzymes pro-oxydants. Durrant et coll., (2009) ont ainsi mis en évidence que l'exercice volontaire chez la souris âgée diminue l'expression de la sous-unité cytosolique p67^{phox} de la NADPH oxydase au niveau aortique. De plus, Adams et coll. (2005) ont démontré, chez des patients coronariens, qu'un programme d'exercice pendant 4 semaines induit une diminution significative de l'expression des sous-unités membranaires gp91^{phox} et p22^{phox} de la NADPH oxydase, par rapport aux patients sédentaires. Il faut noter ici que

l'effet anti-inflammatoire de l'exercice semble associé en partie à l'inhibition des dérivés ROS provenant de l'activation de la NAD(P)H oxydase avec la diminution conséquente des facteurs de transcription pro-inflammatoires (NFκB et AP-1), une réduction de la production de protéines pro-inflammatoires incluant les chémokines, les molécules d'adhésion cellulaires, certaines cytokines, certains facteurs de croissance et substances pro-thrombogéniques ainsi que la régulation négative des voies signalétiques fibrogéniques comme celles des MAP kinases (ERK1/2, p38MAPK) et des tyrosines kinases (Src, Akt) (Petersen et Pedersen, 2005).

Après avoir vu les effets de l'exercice sur la dysfonction endothéliale et sur le stress oxydatif, et sachant que l'IRC présente ces risques cardiovasculaires, quels sont les effets de l'exercice sur l'IRC ?

5. Effets de l'exercice sur l'IRC :

L'utilisation de programmes d'exercice physique chez les patients IRC a été introduite à la fin des années 1970. Et malgré le fait que ces programmes ne soient pas utilisés largement, ils ont prouvé leur efficacité dans la gestion et l'amélioration de la qualité de vie des patients IRC.

Chez des patients dialysés, l'exercice physique, qu'il soit d'endurance (aérobie) ou de résistance, montre des effets bénéfiques significatifs (Cheema et Singh, 2005). Il a été démontré que l'exercice en aérobie mène à une augmentation de la capacité d'exercice et de sa durée chez des patient IRC (Konstantinidou et coll., 2002). Dans une revue de 29 essais cliniques, il a été montré que la condition physique était significativement améliorée à la suite d'un entraînement en aérobie (Cheema et Singh, 2005). De plus,

l'entraînement en résistance augmente la force et la capacité fonctionnelle chez les patient IRC (Headley et coll., 2002). Il a été aussi observé une hypertrophie des muscles squelettiques et une réduction des fibres musculaires atrophiées (Kouidi et coll., 1998), une amélioration significative de la force musculaire, de la puissance et de la fatigabilité (Storer et coll., 2005).

Au niveau cardiaque, Il a été observé, après six mois d'entraînement en aérobie, une augmentation de la fraction d'éjection systolique (14%), de l'index du volume systolique (14%) et de l'index du débit cardiaque (73%) chez des patients IRC (Deligiannis et coll., 1999). De plus, l'exercice a provoqué chez ces derniers, des adaptations fonctionnelles bénéfiques au niveau du ventricule gauche, une augmentation de l'activité vagale, une diminution de la suractivité sympathique au repos et une réduction de l'incidence des arythmies cardiaques (Kouidi, 2001).

Concernant la pression artérielle, plusieurs études ont démontré l'effet hypotenseur de l'exercice chez des patients IRC (Pechter et coll., 2003 ; Painter et coll., 1986). Chez des hémodialysés, les pressions systolique et diastolique ont été réduites à la suite d'un programme d'exercice aérobie (Anderson et coll., 2004). Avec le même type d'exercice, il a été observé les mêmes résultats significatifs après quatre mois d'entraînement chez des pré-dialysés. Ces effets positifs disparaissent complètement après 2 mois d'arrêt du programme (Boyce et coll., 1997). La réduction de la pression artérielle peut engendrer une réduction de la prescription de médicaments hypertenseurs à raison de 885 dollars américain par patient et par année (Miller et coll., 2002).

Chez l'animal, pour déterminer l'effet de l'exercice physique sur la fonction rénale,

des rats ont subi une ablation rénale de 75% et furent soumis à un entraînement pendant deux mois. Le taux de filtration glomérulaire était sensiblement plus élevé chez les rats entraînés que chez les rats sédentaires. La protéinurie a été réduite chez les rats entraînés comparés aux animaux sédentaires. Le degré de glomérulosclérose était beaucoup moins élevé chez les animaux entraînés. Le plasma, le niveau des LDL-cholestérol et les triglycérides totaux ont été réduits chez les rats entraînés comparés aux rats sédentaires. Cette étude suggère que l'exercice physique chronique améliore la progression de la maladie rénale et améliore le taux plasmatique des lipides chez les rats atteints d'insuffisance rénale modérée. Le mécanisme de l'amélioration de la fonction rénale semble être indépendant de l'influence de la pression artérielle systémique dans cette étude (Heifets et coll., 1987). En 2001, les résultats de Kohzuki et coll., ont suggéré que l'exercice n'altérait pas la fonction rénale et possédait des effets réno-protecteurs chez les rats hypertendus spontanés. Adams et coll., (2005) ont démontré que les rats, chez lesquels on provoquait une IRC, s'exerçaient volontairement au même degré que les animaux sham. L'IRC induit une diminution de la concentration en hémoglobine qui a été corrigée par l'exercice. Kanazawa et coll., (2006) suggèrent que l'exercice possède des effets réno-protecteurs chez le rat nephrectomisé. Leurs résultats suggèrent également que la combinaison de l'exercice modéré et de l'Enalapril (inhibiteur de l'enzyme de conversion de l'angiotensine II) avait de plus grands effets réno-protecteurs qu'avec l'Enalapril seul, et que l'exercice modéré + l'Enalapril avaient eu quelques effets secondaires sans aucune complication dans ce modèle de rat.

Hypothèses et objectifs

Hypothèse générale :

L'EPO est utilisée dans le monde sportif comme agent dopant et améliore grandement les performances physiques grâce à son action stimulante sur l'érythropoïèse. L'utilisation de sa forme recombinante dans le traitement et la correction de l'anémie est indispensable notamment chez les patients IRC. Cependant, la revue de littérature nous a montré que la rHuEPO présente des effets secondaires (HTA et thromboses) qui peuvent être très dangereux surtout dans le domaine du dopage sportif où son utilisation ne rentre plus dans le but de pallier un manque mais plutôt d'augmenter un taux normal d'hématocrite. D'autre part, l'exercice physique est de plus en plus utilisé comme moyen préventif et thérapeutique dans le traitement de nombreuses pathologies chroniques. Il a un rôle bénéfique sur les facteurs de risque cardiovasculaire notamment l'HTA et la dysfonction endothéliale. Les programmes d'entraînement des patients IRC ont montré leur efficacité, que ce soit sur l'amélioration de la qualité de vie des patients ou sur les paramètres physio-pathologiques de la maladie. L'exercice physique aigu entraîne aussi une augmentation de la pression artérielle, pour répondre aux besoins métaboliques périphériques accrus. Mais l'organisme sain s'adapte en synthétisant assez de NO pour réguler les tensions au niveau artériel et par conséquent, réguler la pression artérielle. Une dysfonction endothéliale induirait un manque de biodisponibilité de NO ce qui engendrerait un manque d'adaptation à l'exercice.

A partir de ces données, il est suggéré qu'une administration chronique de rHuEPO à des rats entraînés et traités avec un inhibiteur de la eNOS (L-NAME), en

levant l'effet vasculaire protecteur du NO, aggraverait le risque cardiovasculaire induit par le L-NAME et entraînerait des répercussions négatives sur la performance sportive. D'autre part, en présence d'une dysfonction endothéliale NO-dépendante induite par l'IRC, le rat entraîné et traité à la rHuEPO pourrait présenter les mêmes risques. La rHuEPO altérerait l'effet bénéfique de l'exercice physique. Par conséquent, on pourrait constater une aggravation des fonctions rénale et vasculaire.

La revue de littérature nous a aussi montré le rôle du stress oxydatif dans l'établissement de la dysfonction endothéliale. Donc nous suggérons que les mécanismes moléculaires de l'amélioration ou de la détérioration des fonctions vasculaire et rénale d'un traitement rHuEPO combiné à l'exercice passerait par une influence sur le statut oxydant notamment sur l'activité enzymatique de la NAD(P)H oxydase.

Objectifs :

L'objectif principal de notre travail est de démontrer l'effet nocif d'une utilisation chronique de rHuEPO en présence d'une dysfonction endothéliale chez le rat entraînés. Il sera aussi question de proposer un mécanisme moléculaire par lequel l'exercice et la rHuEPO améliorent ou détériorent les fonctions vasculaire et rénale du rat dans le cadre du dopage ou du rat atteint d'IRC.

Dans nos études expérimentales nous essayerons de montrer que la rHuEPO augmente le risque cardiovasculaire chez le rat entraîné dont la synthèse endothéliale de NO est inhibée par le L-NAME. Le risque cardiovasculaire sera évalué par la mesure de la pression artérielle et de la fonction vasculaire endothéliale NO-dépendante.

Dans un premier temps nous étudierons les effets de l'exercice, associé ou non au

Hypothèses et objectifs

traitement rHuEPO, dans la prévention et la correction des aspects physiologiques de la fonction cardiovasculaire notamment la pression artérielle et la dysfonction endothéliale. Nous étudierons aussi les effets de la rHuEPO sur la performance des rats "dopés".

Dans un deuxième temps, nous chercherons à savoir si l'exercice est un bénéfice ou un risque pour le rat IRC (après ablation des 5/6 de la masse rénale) en présence d'un traitement rHuEPO thérapeutique. Nous approfondirons notre étude sur les mécanismes moléculaires qui seraient éventuellement impliqués. D'après la revue de la littérature, nos efforts porteront vers l'influence de l'exercice et de la rHuEPO sur l'activation et l'expression des sous-unités de la NAD(P)H oxydase rénale et vasculaire, la production des radicaux libres oxygénés et la réponse pro-inflammatoire rénale et vasculaire. Enfin nous chercherons à savoir si l'exercice et/ou la rHuEPO sont capables de moduler le statut oxydant de l'IRC en stimulant les systèmes antioxydants tels que la superoxyde dismutase (SOD) ou la thioredoxine et d'améliorer la biodisponibilité tissulaire en NO.

Travaux expérimentaux

PREMIÈRE PARTIE : L'EXERCICE AGGRAVE LES RISQUES CARDIOVASCULAIRES ET LA MORTALITÉ CHEZ LES RATS TRAITÉS À L'ÉRYTHROPOÏÉTINE RECOMBINANTE HUMAINE DONT LA VOIE NO SYNTHASE A ÉTÉ INHIBÉE

Fayçal Meziri, Delphine Binda, Sabeur Touati, Maxime Pellegrin, Alain Berthelot,

Rhian M. Touyz, Pascal Laurant

Publication acceptée dans *European Journal of Applied Physiology*

1. But de l'étude :

Il s'agit de déterminer les conséquences cardiovasculaires d'un traitement rHuEPO, chez des rats entraînés, ayant un risque cardiovasculaire induit par l'inhibition de la voie de production du NO, par l'administration de L-NAME.

Nous supposons qu'un traitement chronique rHuEPO peut contre-balancer les effets cardiovasculaires bénéfiques de l'exercice et même les aggraver en absence de NO endogène.

2. Méthodologie :

2.1. Animaux et traitements :

Rat mâles Wistar âgés de 8 semaines divisé en 8 groupes : 1/Contrôle, 2/Contrôle+exercice, 3/rHuEPO, 4/rHuEPO+exercice, 5/L-NAME, 6/L-NAME+exercice, 7/L-NAME+rHuEPO, 8/L-NAME+rHuEPO+exercice.

2.2. Traitements :

Les rats traités à la rHuEPO ont reçu une injection sous-cutanée de 100 UI/kg, 2 fois par semaine. Le L-NAME a été ajouté à l'eau de boisson en raison de 10 mg/kg/jour.

2.3. Le protocole d'exercice :

Les rats des groupes exercice ont subi un protocole d'entraînement (course) sur tapis roulant pendant 6 semaines, 60 minutes par jour, 5 fois par semaine avec une pente de 10°.

2.4. Les paramètres étudiés :

-L'évolution de la pression artérielle systolique a été mesurée chaque semaine par plethysmographie indirecte au niveau de l'artère caudale.

- L'évaluation *ex vivo* de la fonction endothéliale a été faite sur l'aorte thoracique et sur les petites artères mésentériques en chambre d'organe. Étude *ex-vivo* de la vasorelaxation dépendante et indépendante de l'endothélium, en réponse à l'acétylcholine et au nitroprussiate de sodium respectivement. De plus, les paramètres morphologiques des petites artères mésentériques isolées, perfusées et pressurisées ont été évalués.

- Paramètres biochimiques : l'hématocrite et les taux d'hémoglobine ont été mesurés par les méthodes classiques. L'activité enzymatique de la citrate synthase a été mesurée au niveau du muscle soléaire afin de confirmer l'efficacité de l'entraînement. L'ET-1 a été mesurée par test ELISA au niveau du muscle soléaire.

3. Résultats principaux :

3.1. Les effets du L-NAME seul :

- Augmente la pression artérielle systolique.
- Induit une dysfonction endothéliale.
- Induit le remodelage des petites artères mésentériques.
- Provoque 20% de mortalité chez les rats entraînés.

3.2. Les effets de la rHuEPO :

-N'a pas d'effet sur la pression artérielle systolique du rat sédentaire et du rat entraîné. Cependant, à la dernière semaine de l'étude, la pression artérielle systolique augmente chez le rat entraîné.

- Améliore la performance des rats sédentaires.
- Augmente la production d'ET-1 aortique chez les rats entraînés.

3.3. Les effets de l'exercice :

- Ralentit le développement de l'HTA du rat L-NAME.
- Aggrave l'HTA des rats sujets au traitement combiné L-NAME/rHuEPO.
- Prévient l'altération de la fonction endothéliale NO-dépendante du rat L-NAME
- Aggrave la dysfonction endothéliale des rats sujets au traitement combiné L-NAME/rHuEPO.

Travaux expérimentaux

-Provoque une mortalité élevée (51%) des rats sujets au traitement combiné L-NAME/rHuEPO.

Exercise aggravates cardiovascular risks and mortality in rats with disrupted nitric oxide pathway and treated with recombinant human erythropoietin

Fayçal Meziri · Delphine Binda · Sabeur Touati ·
Maxime Pellegrin · Alain Berthelot ·
Rhian M. Touyz · Pascal Laurant

Received: 19 May 2010 / Accepted: 5 January 2011 / Published online: 20 January 2011
© Springer-Verlag 2011

Abstract Chronic administration of recombinant human erythropoietin (rHuEPO) can generate serious cardiovascular side effects such as arterial hypertension (HTA) in clinical and sport fields. It is hypothesized that nitric oxide (NO) can protect from noxious cardiovascular effects induced by chronic administration of rHuEPO. On this base, we studied the cardiovascular effects of chronic administration of rHuEPO in exercise-trained rats treated with an inhibitor of NO synthesis (L-NAME). Rats were treated or not with rHuEPO and/or L-NAME during 6 weeks. During the same period, rats were subjected to treadmill exercise. The blood pressure was measured weekly. Endothelial function of isolated aorta and small mesenteric arteries were studied and the morphology of the latter was investigated. L-NAME induced hypertension (197 ± 6 mmHg, at the end of the protocol). Exercise prevented the rise in blood pressure induced by L-NAME (170 ± 5 mmHg). However, exercise-trained rats treated

with both rHuEPO and L-NAME developed severe hypertension (228 ± 9 mmHg). Furthermore, in these exercise-trained rats treated with rHuEPO/L-NAME, the acetylcholine-induced relaxation was markedly impaired in isolated aorta (60% of maximal relaxation) and small mesenteric arteries (53%). L-NAME hypertension induced an internal remodeling of small mesenteric arteries that was not modified by exercise, rHuEPO or both. Vascular ET-1 production was not increased in rHuEPO/L-NAME/training hypertensive rats. Furthermore, we observed that rHuEPO/L-NAME/training hypertensive rats died during the exercise or the recovery period (mortality 51%). Our findings suggest that the use of rHuEPO in sport, in order to improve physical performance, represents a high and fatal risk factor, especially with pre-existing cardiovascular risk.

Keywords Hypertension · Exercise · Doping · Endothelial dysfunction

Communicated by Keith Phillip George.

F. Meziri · S. Touati · P. Laurant
EA4278 Physiology and Physiopathology of Cardiovascular
Adaptations to Exercise, Faculty of Sciences,
University of Avignon, Avignon, France

D. Binda · M. Pellegrin · A. Berthelot
EA4267 2SBP, UFR SMP, Besançon, France

R. M. Touyz
Kidney Research Centre, Ottawa Health Research Institute,
University of Ottawa, Ottawa, Canada

F. Meziri (✉)
EA4278 Physiologie et Physiopathologie des Adaptations
Cardiovasculaires et à l'Exercice, Pôle Sportif et de Recherche
Universitaire, 15 Boulevard Lambert, 84000 Avignon, France
e-mail: meziri_faycal@yahoo.fr

Introduction

The use of recombinant human erythropoietin (rHuEPO) was a significant progress in the treatment of anemia (Moreno et al. 2000). Although rHuEPO effectively abolishes symptoms of anemia, it has side effects (Maschio 1995). In the field of sport, the misuse of rHuEPO to improve aerobic oxidation and athletic performance (by increasing oxygen-carrying capacity of the blood), is nowadays a major concern in endurance sports, and the prevention of such abuse poses a real challenge. 20 years ago, suspicion was raised that use of EPO might have been involved in the death of cyclists (Ramotar 1990).

The rheologic, hemodynamic and metabolic modifications induced by rHuEPO are likely to play a key role in the

occurrence of cardiovascular events observed in professional as well as in recreational sportsmen. Aerobic exercise is associated with systemic changes in heart rate, cardiac output, systolic and pulse pressure, which generate hemodynamic shear stress that may induce acute vascular functional adaptations (Kemi and Wisloff 2010). Such adaptive responses are mainly mediated by an efficient endothelium- and NO-dependent vasodilation in response to increased blood flow and shear stress induced by aerobic exercise in order to protect blood vessels, decrease peripheral resistance and favor O₂ delivery to muscles in activity (Maiorana et al. 2003). Among the potential mechanisms by which rHuEPO therapy may increase blood pressure, erythrocyte mass and blood viscosity have been listed as the main candidates (Smith et al. 2003). However, the presence of EPO receptors on endothelial and vascular smooth muscle cells strongly indicates a direct effect of EPO on the vessel wall (Anagnostou et al. 1994). In vitro studies on smooth muscle cells have shown that EPO increases cellular calcium concentration. It stimulates endothelial expression and/or production of vasoconstrictor endothelin-1 (ET-1) (Carlini et al. 1993; Nagai et al. 1995; Kato et al. 1994). It decreases basal and acetylcholine-stimulated NO production, and depresses endothelial NO synthase (eNOS) expression in cultured human endothelial cells (Wang and Vaziri 1999). EPO induces the production of plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1), E-selectin and VCAM-1 indicating that EPO directly participates to thrombogenicity and atherogenicity (Smith et al. 2003). However, all these effects of rHuEPO do not seem to be sufficient to explain the establishment of hypertension, since healthy volunteers and normal rats receiving rHuEPO remain normotensive (Berglund and Ekblom 1991; Lacasse et al. 1997).

Recent evidence suggests that rHuEPO accentuates a pre-existing endothelial dysfunction. Transgenic mice overexpressing human EPO did not develop hypertension and thromboembolic disorders despite a severe polyglobulia and a high hematocrit (>80%) (Ruschitzka et al. 2000). However, in the presence of L-NAME (an inhibitor of NO synthesis), these mice quickly developed hypertension (much greater than this observed in wild-type mice treated with L-NAME), with severe arteriolar vasoconstriction and exhibited an increased mortality in a few days. However, decreased NO biosynthesis does not seem sufficient to explain the observed vasoconstriction and related severe hypertension in these L-NAME-treated transgenic mice. Maybe, L-NAME contributes to imbalance the regulatory role of endothelium in favor of vasoconstrictor-derived factors, such as ET-1, leading to elevated vascular tone and consequently increasing blood pressure level (Quasching et al. 2002).

We hypothesize that existing alterations in the NO pathway may have deleterious effects on hemodynamic changes

induced by exercise. Cardiovascular consequences of chronic administration of rHuEPO may be serious and overlooked in exercise-trained rats with altered NO production. The goal of this study was to determine the cardiovascular consequences of rHuEPO in exercise-trained rats with disrupted NO pathway by L-NAME administration.

Materials and methods

Animals and treatments

8-week-old male Wistar rats were purchased from Charles River (L'Arbresle, France). Animals were kept in a temperature-controlled room (22 ± 2°C), at 50–60% humidity, with a reversed 12:12 h light–dark cycle. Food and distilled water were given ad libitum. The housing and care of the animals and all experimental procedures were conducted in compliance with the European convention for the protection of vertebrates animals used for experimental and other scientific purposes (European Union Directive 86/609EEC, 1986).

Rats were divided into eight groups ($n = 8–13$): 1/Control, 2/Control + exercise, 3/rHuEPO, 4/rHuEPO + exercise, 5/L-NAME, 6/L-NAME + exercise, 7/L-NAME + rHuEPO, and 8/L-NAME + rHuEPO + exercise. rHuEPO groups received 100 U/kg rHuEPO (Epoetin beta, NeoRecormon[®], Roche, Rosny-sous-Bois, France) twice a week by subcutaneous injections. The control groups received the vehicle (saline 0.9%). L-NAME was added to the drinking water at 10 mg kg⁻¹ day⁻¹ (Sigma-Aldrich, Saint Quentin Fallavier, France).

Exercise protocol

The exercise-training protocol was adapted from a previous procedure (Yang et al. 2002). Rats were trained on a motor treadmill (Columbus Instruments, Columbus, OH, USA) at a speed of 20 m/min with 10° inclination for 60 min (5 days per week) during 6 weeks. At the end of the protocol, an effort test was made, which consisted of making the rats run, starting at 10 m/min and increasing the speed (4 m/min every 2 min) until exhaustion. We considered the rats exhausted, when they stopped running three times for 10 s.

Blood pressure measurements

Systolic blood pressure (SBP) was measured every week in conscious rats after warming and slight restriction, by the indirect plethysmographic tail-cuff method using an automatic BP monitoring system (BP 2000, Visitech System, Apex, NC, USA). The average of 8–10 readings was used for analysis.

Biochemical analysis

After 6 weeks, the rats were anesthetized with pentobarbital (intra-peritoneal injection, 50 mg/kg), blood samples were drawn from the abdominal aorta and collected in tubes containing EDTA for measurement of hematocrit and hemoglobin rates by classical methods (ADVIA[®] 60 Bayer). Soleus muscle, heart and aorta were excised, washed, blotted, and weighed. Tissues were frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C . ET-1 was measured in aorta using the ELISA method (R&D Systems, Abingdon, UK). The exercise-training effect is commonly confirmed by an increase in muscular citrate synthase activity. Enzyme activity was measured on homogenized soleus muscle samples by spectrophotometric method (Srere 1969).

Isolated aorta studies

After killing, the descending thoracic aorta was rapidly dissected, cleaned from loose connective tissue and immersed in physiological salt solution (PSS) composed of (mM): NaCl 118, KCl 4.7, NaHCO_3 25, CaCl_2 2.5, MgSO_4 1.2, KH_2PO_4 1.2 and glucose 11; bubbled with a mixture of 95% O_2 and 5% CO_2 at pH of 7.4. Two aortic rings (2–3 mm long) per rat were studied in parallel (one for each drug is studied as described below). The rings were then suspended horizontally between two L-shaped stainless steel hooks in organ chambers which contained 10 ml of Krebs maintained at 37°C . Isometric tension was measured using a force displacement transducer (EMKA Technologies, Falls Church, VA, USA) connected to the upper hook. During an equilibration period of 60 min, aortic rings were progressively stretched to their optimal passive tension (2 g) as assessed by the response to 100 mM KCl. The rings were then exposed to norepinephrine (10^{-7} M) (Sigma-Aldrich, Saint Quentin Fallavier, France). Endothelial integrity was confirmed before the experiment by testing relaxation induced by acetylcholine (10^{-6} M) (Sigma-Aldrich) under norepinephrine (10^{-7} M) pre-contracted conditions. After this procedure, the rings were washed and allowed to re-equilibrate to baseline tension for 60 min. Endothelium-dependent relaxation was assessed by cumulative concentration–response curves to acetylcholine (10^{-10} – 10^{-5} M). Endothelium-independent relaxation was evaluated by cumulative concentration–response curves to sodium nitroprusside (10^{-10} – 10^{-5} M) (Sigma-Aldrich).

Isolated and perfused mesenteric resistance arteries studies

The preparation and monitoring of isolated and perfused mesenteric resistance arteries have been described in detail previously (Laurant et al. 1997). A third-order branch of

the mesenteric artery was carefully dissected and mounted in a pressure myograph chamber (Living System Instrumentation Inc, Burlington, VT, USA) containing PSS bubbled with 95% O_2 –5% CO_2 and maintained at 37°C . The artery was bathed in a 10 ml organ bath containing PSS. The bath solution was changed continuously at a rate of 10 ml/min. The arterial segments were then equilibrated for 1 h under a pressure of 60 mmHg. The viability of each artery was tested before the experimental protocol. Arterial segments were considered viable and used in the study if they fully constricted in response to high-potassium PSS (120 mmol/L NaCl replaced by an equimolar amount of KCl), containing 10 mmol/L norepinephrine in PSS. The integrity of the endothelium was confirmed if norepinephrine-precontracted segments dilated in response to 10 mmol/L acetylcholine in PSS. After the arterial segments were equilibrated and activated, media thickness and lumen diameter were then measured with a microcomputer-based video-imaging system. Cumulative concentration–response curves to acetylcholine and sodium nitroprusside (10^{-8} – 10^{-4} M) were then performed on norepinephrine-precontracted arterial segments.

Statistical analysis

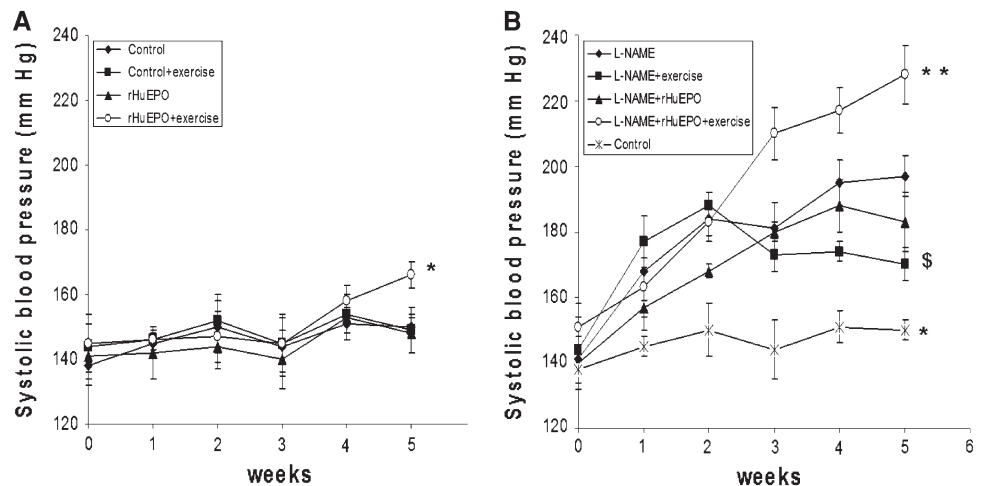
All values are expressed as the mean \pm SEM. Statistical comparisons between groups were made by analysis of variance (one-way or two-way ANOVA) followed by Student–Newman–Keuls test for multiple comparisons using the Prism program (version 4, GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA). Significance was considered present when probability values were <0.05 .

Results

Systolic blood pressure

rHuEPO did not modify blood pressure until the fifth week. At week 5, systolic blood pressure had significantly increased in rHuEPO-treated rats in comparison to control rats ($p < 0.05$) (Fig. 1a). As expected, L-NAME treatment induced hypertension (Fig. 1b). rHuEPO had no significant effect on blood pressure in L-NAME-treated rats. Interestingly, however, while exercise training induced a significant decrease in systolic blood pressure in L-NAME-treated rats after the second week ($p < 0.05$), it accelerated the development of hypertension when L-NAME treatment was associated with rHuEPO ($p < 0.01$). Systolic blood pressure levels were significantly higher in L-NAME/rHuEPO/training rats (~ 220 mmHg at the fifth week) than those observed in L-NAME hypertensive rats.

Fig. 1 Evolution of systolic blood pressure during the weeks of the protocol. **a** Groups without L-NAME treatment. **b** Groups with L-NAME treatment and Control. Data represent the mean \pm SEM ($n = 8$ – 13). * $p < 0.05$ versus other groups, ** $p < 0.01$ versus other groups, § $p < 0.05$ versus control, L-NAME, L-NAME + EPO + exercise



Survival rate

In the absence of exercise, rHuEPO and/or L-NAME did not affect the survival rate of rats. L-NAME/training association induced 20% of mortality which has been recorded at the beginning of the experimental protocol. Exercise was more fatal in L-NAME/rHuEPO-treated rats, since we recorded 51% of mortality, which occurred at the end of the experimental protocol (fifth to sixth weeks). In this group, the death occurred during the treadmill exercise or the recovery period.

Effort test

rHuEPO treatment significantly improved the performance of sedentary rats ($p < 0.05$) (Table 1). Rats of trained groups showed a better performance during the effort test than sedentary rats ($p < 0.05$). rHuEPO did not ameliorate performance of exercise-trained rats. In contrast, physical performance was significantly lower in exercise-trained rats treated with L-NAME/rHuEPO than rats in the other trained groups ($p < 0.05$).

Morphological and biochemical parameters

At the end of the study, body weight was significantly lower in all trained groups than in sedentary groups ($p < 0.001$) (Table 1). L-NAME and/or rHuEPO did not modify heart weight/body weight ratio in sedentary rats. Exercise induced cardiac hypertrophy in control rats and L-NAME-treated rats ($p < 0.05$). However, exercise did not induce cardiac hypertrophy in rHuEPO-treated and L-NAME/rHuEPO-treated rats (Table 1).

rHuEPO treatment significantly increased blood hematocrit and hemoglobin level only in the sedentary control group ($p < 0.05$) as compared with the other sedentary and trained groups (Table 1).

Citrate synthase enzyme activity was higher in the soleus muscle from trained groups than from sedentary groups. L-NAME and/or rHuEPO did not affect citrate synthase activity (Table 1).

Endothelial function in isolated aorta

In normotensive rats (untreated with L-NAME), training and/or rHuEPO did not affect the acetylcholine-induced relaxation (Fig. 2a). After 6 weeks, L-NAME treatment significantly decreased the acetylcholine-induced relaxation ($p < 0.05$). However, this altered response was significantly exacerbated when trained and L-NAME-treated hypertensive rats were also treated with rHuEPO ($p < 0.05$) (Fig. 2b). Only training and rHuEPO treatment did not modify the vasorelaxation to acetylcholine in L-NAME-treated rats. The endothelium-independent relaxation to sodium nitroprusside was similar between all the different groups (data not shown).

Endothelial function and arterial morphology in isolated and perfused mesenteric arteries

In normotensive rats (untreated with L-NAME), training and/or rHuEPO did not affect the acetylcholine-induced dilation (Fig. 3a). The vasodilatory response to acetylcholine was significantly lower in L-NAME-treated hypertensive rats than in normotensive control rats ($p < 0.05$). rHuEPO did not change the vascular response to acetylcholine. Exercise training, however, significantly corrected the acetylcholine-induced dilation as compared with L-NAME-treated hypertensive rats ($p < 0.05$) (Fig. 3b). As in the aorta, the response to acetylcholine was markedly more impaired in perfused mesenteric arteries from trained hypertensive L-NAME/rHuEPO-treated rats than in those from hypertensive L-NAME-treated rats. The endothelium-independent vasodilation in response to sodium

Table 1 Different physiological, biochemical and morphological parameters

	Control	Control + exercise	rHuEPO	rHuEPO + exercise	L-NAME	L-NAME + exercise	L-NAME + rHuEPO	L-NAME + rHuEPO + exercise
Body weight (g)	410 ± 9	357 ± 9*	386 ± 8	372 ± 3*	411 ± 13	337 ± 8*	424 ± 8	354 ± 7*
Heart weight/body weight ratio (%)	0.22 ± 0.01	0.27 ± 0.01 [§]	0.23 ± 0.01	0.23 ± 0.01	0.23 ± 0.01	0.26 ± 0.01 [§]	0.24 ± 0.01	0.24 ± 0.01
Hematocrit (%)	49.0 ± 1.1	47.8 ± 1.1	64.1 ± 3.0 [§]	54.7 ± 3.1	46.0 ± 0.8	46.3 ± 2.5	46.5 ± 3.8	50.7 ± 2.7
Hemoglobin (g/dl)	15.5 ± 0.2	15.7 ± 0.5	19.8 ± 0.4 [§]	17.8 ± 0.9	14.9 ± 0.1	14.9 ± 0.7	15.3 ± 1.2	17.0 ± 1.0
Endurance test (min)	12.4 ± 0.4	18.9 ± 0.8 [§]	14.0 ± 0.4 [¶]	16.9 ± 0.6 [°]	11.1 ± 0.4	16.1 ± 0.1 [°]	11.5 ± 0.4	14.5 ± 0.7 [¶]
Mortality <i>n</i> dead/ <i>n</i> total	0/8	0/8	0/8	0/13	0/8	2/10	0/10	7/13
Citrate synthase activity in soleus muscle	55.7 ± 3.2	93.0 ± 4.3**	66.9 ± 1.9	81.3 ± 5.1**	56.3 ± 3.7	88.7 ± 4.0**	69.5 ± 2.7	92.7 ± 6.0**

Data are the mean ± SEM

* *p* < 0.05 versus all sedentary groups

** *p* < 0.001 versus all sedentary groups

[§] *p* < 0.05 versus all other groups

[§] *p* < 0.05 Control, rHuEPO, rHuEPO + exercise and L-NAME

[°] *p* < 0.05 versus sedentary groups and L-NAME + rHuEPO + exercise

[¶] *p* < 0.05 versus control, L-NAME and L-NAME + rHuEPO (*n* = 8–13)

Fig. 2 Cumulative concentration–response curves to acetylcholine on norepinephrine-pre-contracted isolated aorta rings. **a** Groups without L-NAME treatment. **b** Groups with L-NAME treatment and control. Data represent the mean ± SEM (*n* = 8–13). **p* < 0.05 versus other groups

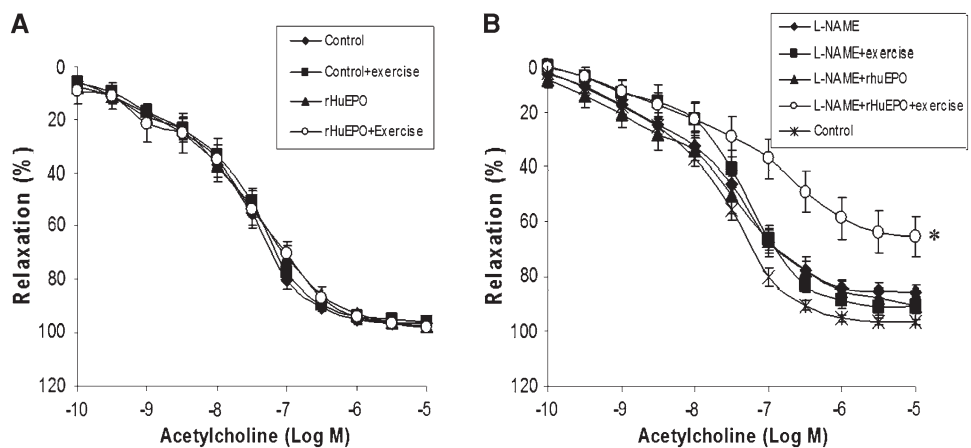
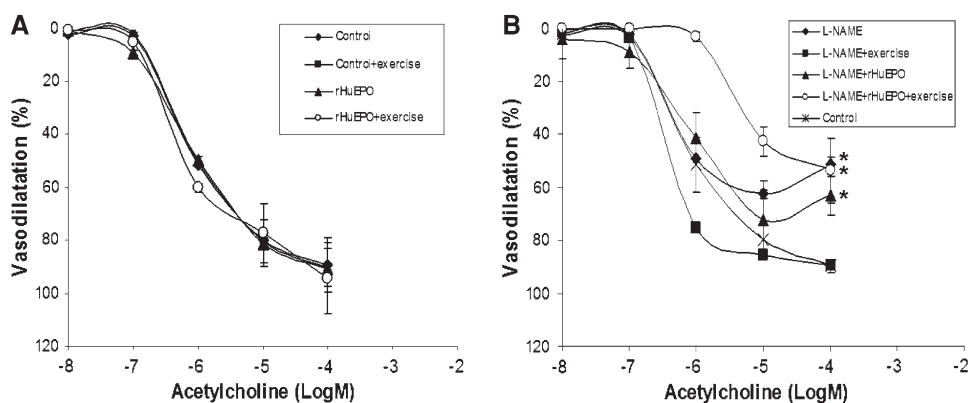


Fig. 3 Cumulative concentration–response curves to acetylcholine on norepinephrine-precontracted perfused mesenteric resistance arteries segments. **a** Groups without L-NAME treatment. **b** Groups with L-NAME treatment and control. Data represent mean ± SEM (*n* = 8–13). **p* < 0.05 versus control and L-NAME + exercise



nitroprusside was similar between all the different groups (data not shown).

Media thickness and media-to-lumen ratio were significantly greater, and lumen diameter was significantly lower in isolated small mesenteric arteries obtained from the different groups treated with L-NAME than in the groups untreated with L-NAME ($p < 0.05$) (Table 2). Media cross-sectional area was greater only in mesenteric arteries from hypertensive sedentary rats treated with L-NAME ($p < 0.05$). Although training associated with L-NAME/rHuEPO treatment induced severe hypertension, there were no structural modifications in mesenteric arteries of these rats compared with the hypertensive L-NAME-treated sedentary rats.

ET-1 production in aorta

Aorta ET-1 levels were significantly increased only in trained rHuEPO-treated rats ($p < 0.05$) (Fig. 4). L-NAME treatment or combined L-NAME/rHuEPO/training treatment did not change vascular ET-1 production.

Discussion

In the present study, exercise accentuated cardiovascular risk induced by L-NAME when rats were chronically treated with rHuEPO. L-NAME/rHuEPO/training combination leads to severe arterial hypertension, a deep altered acetylcholine-induced relaxation in large and small arteries, and a high rate of mortality (51%). It was also interesting to note that the death of rats occurred during the exercise or the recovery period. Furthermore, physical performance, normally enhanced by training, was reduced in these rats.

It is well-known that chronic administration of rHuEPO can lead to the development of hypertension and aggravates pre-existing hypertension, which occurs in approximately 20–35% of hemodialysis patients (Eschbach et al. 1989; Maschio 1995). In our study, rHuEPO treatment in sedentary rats did not change the blood pressure level despite increased hematocrit and hemoglobin levels, confirming previous studies on healthy volunteers and normotensive animals (Berglund and Ekblom 1991; Lacasse et al. 1997). We showed elsewhere that rHuEPO did not aggravate hypertension provoked by L-NAME treatment. These findings also suggest that a disrupted NO pathway is not a prerequisite for rHuEPO-induced hypertension. Previous findings have shown that rHuEPO exacerbates L-NAME-induced hypertension in transgenic mice over-expressing human EPO, and this effect has been attributed to the excessive erythrocytosis and blood hyperviscosity (Ruschitzka et al. 2000). In our study, L-NAME treatment

Table 2 The morphological characteristics of mesenteric resistance arteries at an intraluminal pressure of 60 mmHg

	Control	Control + exercise	rHuEPO	rHuEPO + exercise	L-NAME	L-NAME + exercise	L-NAME + rHuEPO	L-NAME + exercise	L-NAME + rHuEPO + exercise
Lumen diameter (μm)	312 \pm 8	302 \pm 6	305 \pm 6	328 \pm 10	281 \pm 5*	276 \pm 9*	286 \pm 7*	277 \pm 6*	277 \pm 6*
Media thickness (μm)	12.0 \pm 0.7	12.4 \pm 0.5	11.1 \pm 0.7	11.1 \pm 0.3	16.1 \pm 0.7*	14.2 \pm 0.8*	14.1 \pm 0.7*	15.1 \pm 0.6*	15.1 \pm 0.6*
Media/lumen ratio (%)	3.8 \pm 0.2	4.1 \pm 0.2	3.8 \pm 0.4	3.4 \pm 0.2	5.8 \pm 0.2*	5.2 \pm 0.2*	4.9 \pm 0.3*	5.6 \pm 0.5*	5.6 \pm 0.5*
External diameter (μm)	335 \pm 9	326 \pm 6	327 \pm 6	351 \pm 10	313 \pm 6	304 \pm 9	314 \pm 6	307 \pm 6	307 \pm 6
Media CSA (μm^2)	12,297 \pm 955	12,202 \pm 504	11,055 \pm 267	11,867 \pm 463	15,039 \pm 766*	12,860 \pm 772	13,276 \pm 663	13,920 \pm 350	13,920 \pm 350

Data are the mean \pm SEM

* $p < 0.05$ vs. four groups without L-NAME treatment

CSA media cross-sectional area

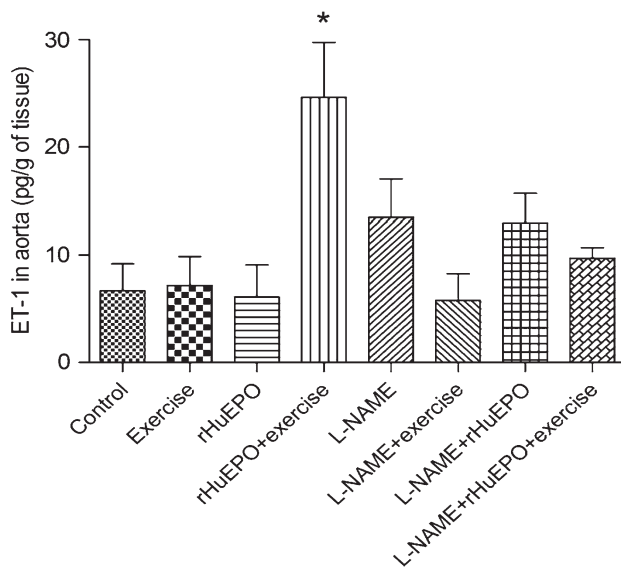


Fig. 4 Effect of different treatments on ET-1 tissue production in aorta. ET-1 was assessed by ELISA test. Data represent the mean \pm SEM ($n = 4-6$). * $p < 0.05$ versus other seven groups

inhibited the increase of hematocrit and hemoglobin levels induced by r-HuEPO. The reasons for this are not known. Although early studies have shown that NO can modulate erythropoiesis and EPO gene expression (Tsukahara et al. 1997; Todorov et al. 2000), it remains unclear whether NO (or NO synthesis inhibition by L-NAME) significantly modifies the effect of exogenous EPO on heme synthesis and erythropoiesis. Nevertheless, our findings suggest that the absence of significant blood hyperviscosity in L-NAME/rHuEPO-treated rats could prevent the appearance of an exaggerated hypertension as it has been reported (Ruschitzka et al. 2000).

It has been clearly demonstrated that exercise decreases elevated blood pressure and prevents hypertension in the most experimental models of hypertension such as L-NAME-induced hypertension (Kuru et al. 2009). Accordingly, we showed that regular physical training prevented the rise in blood pressure in L-NAME-treated rats. However, it is noteworthy that the presence of rHuEPO, not only blunted the well-known anti-hypertensive effects of exercise, but also induced a severe hypertensive state.

Modification of vascular morphology in small arteries could potentially explain the accentuation of hypertension by the L-NAME/rHuEPO/training combination. L-NAME induced the narrowing of lumen diameter, thickening of the media, and enlargement of the media CSA with increased media/lumen ratio in the small mesenteric arteries, indicating that L-NAME-induced hypertension is associated with inward hypertrophic remodeling (Mulvany 1999). However, the combined L-NAME/rHuEPO/training

treatment did not change the arterial morphology as expected (i.e., narrowing of lumen diameter and/or enlargement of the media CSA). Thus, the severity of the hypertension induced by the L-NAME/rHuEPO/training combination was not linked to such altered arterial structure.

The deleterious cardiovascular effects of the combined L-NAME/rHuEPO/training treatment may be related to alterations in vascular function. In small mesenteric arteries, L-NAME impaired the endothelium-dependent vasodilation in response to acetylcholine, whereas the endothelium-independent response to sodium nitroprusside was not modified suggesting a functional alteration of the endothelium, rather than a functional alteration of the vascular smooth muscle. The endothelial dysfunction was prevented when L-NAME-treated rats were subjected to training. Accordingly, numerous data reveal that training decreases blood pressure level, and improves the NO-dependent endothelial function in hypertensive patients as well as hypertensive animals such as L-NAME hypertensive rats (Hambrecht et al. 1998; Walsh et al. 2003, Kuru et al. 2009), suggesting a beneficial effect of exercise on peripheral vascular resistance and systemic vascular tone. In contrast, exercise exacerbated the altered endothelium-dependent vasodilation to acetylcholine in mesenteric arteries taken from L-NAME hypertensive rats treated with rHuEPO. rHuEPO did not seem to be implicated in the altered endothelium-dependent vasodilation, since vascular response to acetylcholine was similar between untrained L-NAME- and untrained L-NAME/rHuEPO-treated rats. The same observations have also been made in the aorta. Endothelial dysfunction in aorta is considered as an experimental and pharmacological vascular indicator of cardiovascular risk (Heylen et al. 2008; De Moraes et al. 2008). Therefore, our findings strongly suggest that the combined rHuEPO/training treatment in presence of a disrupted NO pathway seems to be a high risk for the vascular function. However, the study has limitations. One of them is that it was not conducted in arteries taken from skeletal muscle where peripheral resistance plays a key role in the regulation of blood pressure level during exercise. It is well established that vessels taken from different anatomical locations show differences in endothelial and smooth muscle expression of enzymes, receptors and channels, and thus differently respond to exercise (Leung et al. 2008). Unfortunately, it is not demonstrated in the present study which can be the deleterious impact of L-NAME/rHuEPO/training combination on skeletal resistance arteries. The present study did not demonstrate either that these supposed vascular alterations can participate to the development of hypertension and lower performance, as it is observed in rats treated with L-NAME/rHuEPO/training combination. Indeed, the effort test demonstrated a

significant lower performance in rats treated with combined L-NAME/rHuEPO/training, in comparison with those from the other trained groups. Endothelial function and NO play a pivotal adaptative role during exercise. In response to increased exercise-induced shear stress, NO synthesis and release are increased in order to raise the arterial blood flow, and consequently the perfusion flow in skeletal muscle (Franke et al. 1998; Jasperse and Laughlin 2006). Recently, it has been shown that L-NAME-induced hypertension in rat is associated with a dramatic impairment of NO-induced vasorelaxation and flow-mediated dilation of gastrocnemius feed arteries, whose functions are greatly improved by exercise training (Kuru et al. 2009). Although, the effects of L-NAME/rHuEPO/training combination in arteries taken from skeletal muscles were not tested in the present study, it is speculated that the NO-dependent vasodilation was also altered in skeletal muscle to explain the lower performance of rat treated with the combined L-NAME/rHuEPO/training treatment. We have also shown that cardiac hypertrophy, which normally occurs as a physiological adaptation of the heart in response to training (El-Sayed et al. 2005), was absent in rats with the combined L-NAME/rHuEPO/training treatment. Thus, the impaired performance of these rats was probably reflected in the severe hypertension with an impaired coronary vasodilation and/or lack of cardiac adaptation during exercise. The adaptive responses of coronary arteries during exercise strongly depend on the NO signaling pathway (Duncker and Bache 2008). An impaired coronary NO-dependent endothelial function contributes to decrease physical performance in patients (Schächinger et al. 2000). Although coronary NO-dependent vasodilation was not assessed in our study, it is likely that the latter was also altered by the combined L-NAME/rHuEPO/training treatment. Further studies are needed to check these hypotheses.

The severe hypertensive state induced by L-NAME/rHuEPO/training treatment may be due to a potentiation of vasoconstrictor activity. The presence of EPO receptors on vascular cells (endothelial and smooth muscle cells) indicates that EPO has a direct vascular effect on vessels (Depping et al. 2005). EPO increases vascular tone by increasing intracellular calcium content (Schiffli and Lang 1997). Several studies have shown that EPO can stimulate the release of ET-1, a powerful endothelial vasoconstrictor (Smith et al. 2003). In transgenic mice overexpressing EPO, hypertension and associated peripheral arteriolar vasoconstriction occur when NO synthesis was blocked by L-NAME (Ruschitzka et al. 2000). L-NAME treatment activates ET-1 system by increasing ET-1 promoter activity, ET-1 tissue levels and ET_{A/B} subtype receptors in these transgenic mice (Quasching et al. 2002). In our study, rHuEPO did not aggravate L-NAME-induced hypertension

and did not increase vascular ET-1 production. Thus, it is unlikely that rHuEPO exerts a dominating vasoconstrictor effect via the stimulation of vascular ET-1 production in the presence of L-NAME. The discrepancy between the present and previous studies (Quasching et al. 2002) is not known. ET-1 release can be stimulated by mechanical shear stress on endothelial cells (Kuchan and Frangos 1993). Hyperviscosity in mice overexpressing human EPO, and the consequent shear stress on vascular wall induced by hyperviscosity, contribute to increased endothelial ET-1 production and vasoconstrictor response in the presence of L-NAME (Quasching et al. 2002). In the present study, hematocrit and hemoglobin rates were not modified in L-NAME/rHuEPO-treated rats. It is suggested that in the absence of stimulated shear stress (caused by high viscosity), ET-1 production did not increase. However, it is interesting to note that vascular ET-1 production was increased in trained rHuEPO-treated rats. These findings confirm that rHuEPO is able to stimulate vascular ET-1 production in the presence of a stimulated vascular mechanical stress (induced by exercise). Furthermore, it is shown in the present study that stimulated ET-1 production coincided with a slight, but significant increase in blood pressure at the fifth week of the experimental protocol, suggesting that hypertension induced by combined rHuEPO/exercise may find its origin in the stimulation of the vascular ET-1 pathway. Unfortunately, rats submitted to L-NAME/rHuEPO/training treatment did not exhibit increased aortic ET-1 production in spite of stimulated shearing forces on vascular wall due to regular exercise. Although the reasons are not known, changes in vascular ET-1 production did not seem to be involved in explaining the hypertensive effects of the combined L-NAME/rHuEPO/training treatment. Further studies are needed to understand how exercise exacerbates the deleterious cardiovascular effects of rHuEPO in circumstances where the NO pathway is disrupted.

One of the main findings of the present study was the high mortality (51%) which occurred in the group of hypertensive rats treated with the combined L-NAME/rHuEPO/training treatment. It was noteworthy that mortality occurred at the end of the experimental protocol when rats were hypertensive and during the treadmill exercise or the recovery period just after exercise. These experimental findings suggest that misusing rHuEPO, to improve aerobic physical activity, may be a health risk for athletes. The exact causes of death were not known. Unfortunately, no data in the literature is available to explain direct causes of death in EPO-doping athletes. And even though the use of animals is, of course, a limitation for a human model, our results give a trail to the origin of death in those sportsmen. It is nonetheless well-established that high blood viscosity puts the cardiovascular system at

hemodynamic risk that might lead to death (Ramotar 1990). However, hematocrit and hemoglobin rates were not increased in trained rat with L-NAME/rHuEPO treatment as mentioned above. Since L-NAME treatment was also responsible of 20% of mortality in exercise-trained rats untreated with rHuEPO (despite an observed antihypertensive effect of exercise), it is suggested that NO pathway disruption may be linked to death. The use of total L-NAME blockade versus varying degrees of endothelial dysfunction is also a big issue and in the future, using eNOS knockout mice could give interesting details.

In conclusion, chronic use of rHuEPO can severely affect the cardiovascular system in exercise-trained rats. rHuEPO contributes to the aggravation of cardiovascular risks associated with disrupted NO pathway in exercise-trained rats. The L-NAME/rHuEPO/training combination leads to a severe arterial hypertension, a highly altered vascular endothelial function, and consequently a high rate of mortality. All these findings suggest that the misuse of rHuEPO in the sports field constitutes a high and fatal risk-factor, especially with a pre-existing cardiovascular risk.

Acknowledgments The authors thank Isabelle Jallat and Manuel Gil for technical assistance.

Conflict of interest The other authors report no conflicts.

References

- Anagnostou A, Liu Z, Steiner M, Chin K, Lee ES, Kessimian N, Noguchi CT (1994) Erythropoietin receptor mRNA expression in human endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 91:3974–3978
- Berglund B, Ekblom B (1991) Effect of recombinant human erythropoietin treatment on blood pressure and some haematological parameters in healthy men. *J Intern Med* 229:125–130
- Carlini RG, Dusso AS, Obialo CI, Alvarez UM, Rothstein M (1993) Recombinant human erythropoietin (rHuEPO) increases endothelin-1 release by endothelial cells. *Kidney Int* 43:1010–1014
- De Moraes C, Davel AP, Rossoni LV, Antunes E, Zanesco A (2008) Exercise training improves relaxation response and SOD-1 expression in aortic and mesenteric rings from high caloric diet-fed rats. *BMC Physiol* 29(8):12
- Depping R, Kawakami K, Ocker H, Wagner JM, Heringlake M, Noetzdold A, Sievers HH, Wagner KF (2005) Expression of the erythropoietin receptor in human heart. *J Thorax Cardiovasc Surg* 130:872–877
- Duncker DJ, Bache RJ (2008) Regulation of coronary blood flow during exercise. *Physiol Rev* 88:1009–1086
- El-Sayed MS, Ali N, El-Sayed Ali Z (2005) Haemorheology in exercise and training. *Sports Med* 35:649–670
- Eschbach JW, Downing MR, Egrie JC, Browne JK, Adamson JW (1989) USA multicenter clinical trial with recombinant human erythropoietin (Amgen). Results in hemodialysis patients. *Contrib Nephrol* 76:160–165
- Franke WD, Stephens GM, Schmid PG (1998) Effect of intense exercise training on endothelium-dependent exercise induced vasodilatation. *Clin Physiol* 18:521–528
- Hambrecht R, Fiehn E, Weigl C, Gielen S, Hamann C, Kaiser R, Yu J, Adams V, Niebauer J, Schuler G (1998) Regular physical exercise correct endothelial dysfunction and improves exercise capacity in patients with chronic heart failure. *Circulation* 98:2709–2715
- Heylen E, Guerrero F, Mansourati J, Theron M, Thioub S, Saïag B (2008) Effect of training frequency on endothelium-dependent vasorelaxation in rats. *Eur J Cardiovasc Prev Rehabil* 15(1): 52–58
- Jaspere JL, Laughlin MH (2006) Endothelial function and exercise training: evidence from studies using animal models. *Med Sci Sports Exerc* 38:445–454
- Katoh K, Mizuno K, Hashimoto S, Okasaki K, Asahi K, Kuriki M, Yamada D, Fukuchi S (1994) Direct evidence for erythropoietin-induced release of endothelin from peripheral vascular tissue. *Life Sci* 54:253–259
- Kemi OJ, Wisloff U (2010) High-intensity aerobic exercise training improves the heart in health and disease. *J Cardiopulm Rehabil Prev* 30(1):2–11
- Kuchan MJ, Frangos JA (1993) Shear stress regulates endothelin-1 release via protein kinase C and cGMP in cultured endothelial cells. *Am J Physiol* 264:H150–H156
- Kuru O, Sentürk UK, Koçer G, Ozdem S, Başkurt OK, Cetin A, Yeşilkaya A, Gündüz F (2009) Effect of exercise training on resistance arteries in rats with chronic NOS inhibition. *J Appl Physiol* 107(3):896–902
- Lacasse MS, Kingma I, Larivière R, Grose JH, Lebel M (1997) Uremia enhances the blood pressure response to erythropoietin. *Clin Exp Hypertens* 19:389–401
- Laurant P, Touyz RM, Schiffrin EL (1997) Effect of pressurization on mechanical properties of mesenteric small arteries from spontaneously hypertensive rats. *J Vasc Res* 34(2):117–125
- Leung FP, Yung LM, Laher I, Yao X, Chen ZY, Huang Y (2008) Exercise, vascular wall and cardiovascular diseases: an update (part 1). *Sports Med* 38(12):1009–1024
- Maiorana A, O'Driscoll G, Taylor R, Green D (2003) Exercise and the nitric oxide vasodilator system. *Sports Med* 33:1013–1035
- Maschio G (1995) Erythropoietin and systemic hypertension. *Nephrol Dial Transplant* 10:74–79
- Moreno F, Sanz-Guajardo D, Lopez-Gomez JM, Jofre R, Valderrabano F (2000) Increasing the hematocrit has a beneficial effect on quality of life and is safe in selected hemodialysis patients. Spanish Cooperative Renal Patients Quality of Life Study Group of the Spanish Society of Nephrology. *J Am Soc Nephrol* 11:335–342
- Mulvany MJ (1999) Vascular remodelling of resistance vessels: can we define this? *Cardiovasc Res* 41:9–13
- Nagai T, Akizawa T, Nakashima Y, Kohjiro S, Nabeshima K, Kanamori N, Takayama K, Kinugasa E, Koshikawa S (1995) Effects of rHuEPO on cellular proliferation and endothelin-1 production in cultured endothelial cells. *Nephrol Dial Transplant* 10:1814–1819
- Quasching T, Ruschitzka F, Stallmach T, Shaw S, Morawietz H, Goettsch W, Hermann M, Slowinski T, Theuring F, Hoher B, Lüscher TF, Gassman M (2002) Erythropoietin-induced excessive erythrocytosis activates the tissue endothelin system in mice. *FASEB J* 97:11609–11613
- Ramotar JE (1990) Cyclists' deaths linked to erythropoietin? *Phys Sportsmed* 18:48–50
- Ruschitzka FT, Wenger RH, Stallmach T, Quaschnig T, de Wit C, Wagner K, Labugger R, Kelm M, Noll G, Rulicke T, Shaw S, Lindberg RL, Rodenwaldt B, Lutz H, Bauer C, Luscher TF, Gassmann M (2000) Nitric oxide prevents cardiovascular disease and determines survival in polyglobulic mice overexpressing erythropoietin. *Proc Natl Acad Sci USA* 97:11609–11613

- Schächinger V, Britten MB, Zeiher AM (2000) Prognostic impact of coronary vasodilator dysfunction on adverse long-term outcome of coronary heart disease. *Circulation* 101(16):1899–1906
- Schiff H, Lang SM (1997) Hypertension induced by recombinant human erythropoietin (rHuEPO) can be prevented by indomethacin. Pathogenetic role of cytosolic calcium. *Eur J Med Research* 2:97–100
- Smith KJ, Bleyer AJ, Little WC, Sane DC (2003) The cardiovascular effects of erythropoietin. *Cardiovasc Res* 59:538–548
- Srere PA (1969) Citrate synthase. *Methods Enzymol* 13:3–5
- Todorov V, Gess B, Gödecke A, Wagner C, Schröder J, Kurtz A (2000) Endogenous nitric oxide attenuates erythropoietin gene expression in vivo. *Pflüg Arch* 439:445–448
- Tsukahara H, Hori C, Hiraoka M, Mayumi M, Okada T, Gejyo F (1997) Nitric oxide modulation of erythropoiesis in rats. *Blood* 90:473–474
- Walsh JH, Bilsborough W, Maiorana A, Best M, O'Driscoll GJ, Taylor RR, Green DJ (2003) Exercise training improves conduit vessel function in patients with coronary artery disease. *J Appl Physiol* 285:20–25
- Wang XQ, Vaziri ND (1999) Erythropoietin depresses nitric oxide synthase expression by human endothelial cells. *Hypertension* 33:894–899
- Yang HT, Ren J, Laughlin MH, Terjung RL (2002) Prior exercise training produces NO-dependent increases in collateral blood flow after acute arterial occlusion. *Am J Physiol* 282:301–310

4. Discussion et conclusion :

Dans cette étude, l'exercice a accentué le risque cardiovasculaire induit par le L-NAME quand les rats ont été traités avec la rHuEPO. La combinaison L-NAME/rHuEPO/exercice mène à une HTA sévère, une profonde altération de la relaxation en réponse à l'acétylcholine au niveau des grosses et petites artères et un taux élevé de mortalité (51%) pendant l'exercice ou la période qui suit l'exercice.

L'excès de rHuEPO peut affecter gravement la fonction cardiovasculaire. Nous montrons que ce risque peut être d'autant plus grave sur un modèle expérimental possédant déjà un facteur de risque, la dysfonction endothéliale NO-dépendante. En inhibant la formation de NO, via l'inhibition de la eNOS, l'organisme perd un précieux régulateur des effets délétères cardio-vasculaires induits par un traitement chronique à la rHuEPO. Ce travail ne fait que confirmer de nombreuses études fondamentales et cliniques sur le risque cardio-vasculaire provoqué par un traitement chronique à la rHuEPO.

Selon nos résultats et les données de la littérature, l'association combinée d'une absence d'adaptation cardiaque et vasculaire induite par l'inhibition du L-NAME et la présence d'une HTA avec probablement une vasoconstriction des territoires artériolaires serait à l'origine de l'altération de la performance. De plus, il est reconnu que le L-NAME en inhibant la synthèse du NO, affecte l'angiogenèse au niveau du muscle squelettique (Gavin et coll., 2000 ; Hudlicka et coll., 2000). Connaissant le rôle important du NO dans l'angiogenèse, en plus de son rôle vasorelaxant, son inhibition, aurait des conséquences néfastes sur l'adaptation vasculaires et le développement des capillaires au niveau des

muscles sollicités par l'exercice, et par conséquent sur la performance. Il serait intéressant d'étudier la capillarisation au niveau des muscles et de voir les effets de la combinaison L-NAME/rHuEPO sur le rat entraîné.

Nous pouvons cependant suggérer que l'exercice physique chez les rats L-NAME/rHuEPO, en augmentant le travail cardiaque, en présence d'une vasoconstriction artériolaire provoquée par le rHuEPO, accentue l'élévation de la pression artérielle jusqu'à l'établissement d'une HTA chronique, d'autant plus que l'adaptation vasculaire endothélium- et NO-dépendante est altérée. De plus, pendant l'exercice, les muscles (squelettiques, cardiaques) et les organes vitaux sollicités (cœur, cerveau, poumons) ont besoin de plus en plus d'oxygène et la vasoconstriction artériolaire engendrée par le rHuEPO pourrait diminuer cet apport (El-Sayed et coll., 2005), provoquer des ischémies et souffrances tissulaires (cardiaques, cérébrales) pouvant être à l'origine de la mort de ces animaux pendant l'exercice ou la phase de récupération comme nous l'avons observé. Nous suggérons que la vasodilatation NO-dépendante a été aussi altérée au niveau de ces muscles afin d'expliquer la diminution de la performance chez les rats L-NAME/rHuEPO/exercice. Il serait intéressant d'étudier l'impact de la combinaison L-NAME/rHuEPO/exercice sur la vasodilatation NO-dépendante au niveau des artères du muscle squelettique. De plus, les réponses adaptatives des artères coronaires dépendent fortement de la voie signalétique du NO (Duncker et Bache, 2008). Il a été démontré qu'une altération de la fonction endothéliale NO-dépendante au niveau des artères coronaires a contribué à diminuer la performance chez des patients (Schächinger et coll., 2000). Par conséquent, l'étude de la fonction endothéliale au niveau des coronaires serait

aussi très intéressante.

La cause exacte du grand taux de mortalité (51%) chez le groupe L-NAME/rHuEPO/exercice n'a pas pu être identifiée. Et malheureusement, nous n'avons pas de données disponibles dans la littérature pour l'expliquer. Puisque le L-NAME a été responsable de 20% de mortalité chez les rats entraînés (malgré l'observation d'un effet anti-hypertensif de l'exercice dans ce groupe), il est suggéré que l'inhibition de la production de NO serait liée à la mort de ces rats. Afin d'approfondir l'investigation sur les causes de la mortalité, il serait intéressant à l'avenir, de faire une étude histologique sur différents tissus à partir des rats morts pendant l'exercice. Des coupes au niveau du cerveau, des poumons, du cœur pourraient nous informer sur d'éventuelles ischémies et thromboses qui pourraient être les causes directes de la mort de nos rats.

En conclusion, l'administration chronique de rHuEPO peut sévèrement affecter le système cardiovasculaire chez les rats entraînés. La combinaison L-NAME/rHuEPO/exercice mène à une sévère hypertension, une grande altération de la fonction endothéliale et, par conséquent, un taux élevé de mortalité. Ces résultats suggèrent que l'utilisation abusive de rHuEPO dans le domaine sportif constitue un grand facteur de risque, pouvant être fatal, surtout en présence d'un risque cardiovasculaire pré-existant.

Ces résultats nous laissent penser que l'utilisation de la rHuEPO en clinique chez des patients présentant une dysfonction endothéliale, pourrait développer les mêmes risques et les mêmes altérations que les rats traités au L-NAME de cette étude. Comme nous l'avons dit précédemment, l'utilisation de la rHuEPO pour traiter l'anémie chez les

patients IRC, induit l'apparition d'HTA chez environ 30% de ces patients (Eschbach et coll., 1989, Maschio, 1995). De plus, l'utilisation de l'exercice comme moyen non-pharmacologique pour prévenir et améliorer l'état de santé des patients atteints de maladies chroniques est de plus en plus d'actualité. Diverses études ont démontré que l'exercice avait des effets bénéfiques aussi bien sur les patients IRC que chez le modèle animal (Goldberg et coll., 1986 ; Heifets et coll., 1987 ; Lu et *al.*, 2009). Ce qui nous mène à nous demander quelles seraient les conséquences d'un traitement rHuEPO chez des patients IRC suivant un protocole d'exercice, connaissant les effets d'une combinaison : dysfonction endothéliale + traitement rHuEPO + exercice. Pour essayer d'avoir des réponses, nous avons mené l'étude qui suit sur des rats IRC traités à la rHuEPO et soumis à un protocole d'exercice.

DEUXIÈME PARTIE : LES RISQUES CARDIOVASCULAIRE ET RÉNAL DES RATS IRC SONT PRÉVENUS PAR L'EXERCICE PHYSIQUE MAIS AGGRAVÉS QUAND LES RATS ENTRAÎNÉS SONT TRAITÉS À L'ÉRYTHROPOÏÉTINE RECOMBINANTE HUMAINE. IMPLICATION DE LA NAD(P)H OXYDASE ET LA VOIE DES MAPK ERK 1/2

Fayçal MEZIRI, Sabeur TOUATI, Tlili BARHOUMI, Alain BERTHELOT,

Rhian M TOUYZ, Pascal LAURANT

Publication soumise à Hypertension

1. But de l'étude :

Au vu des résultats de l'étude précédente et, puisque l'IRC est associée à une dysfonction endothéliale et à des risques cardiovasculaires, il nous semblait intéressant d'étudier l'impact de la combinaison rHuEPO/exercice sur les fonctions cardiovasculaire et rénale du rat IRC. Un de nos objectifs a été ensuite de rechercher les possibles mécanismes moléculaires impliqués dans l'apparition des risques cardiovasculaires chez le rat IRC et comment et par quelles voies l'exercice modulerait ces risques, combiné ou non avec un traitement rHuEPO.

2. Méthodologie :

2.1. Animaux :

Rats Wistar mâles âgés de 7 semaines divisés en 5 groupes : 1/Sham (groupe contrôle), 2/CKD (néphrectomie de 5/6 des reins), 3/CKD+Ex (exercice), 4/CKD+EPO (traitement rHuEPO), 5/CKD+EPO+Ex.

2.2. Traitement et chirurgie :

Les rats CKD ont subi une intervention chirurgicale (5/6 nephrectomy) qui consiste à prélever les 2/3 du rein gauche suivi d'une ablation totale du rein droit afin de produire des rats IRC. Les rats des groupes EPO ont reçu la rHuEPO 2 fois par semaines, à raison de 100 UI/Kg injectées par voie sous-cutanée.

2.3. Protocole d'exercice :

Les rats des groupes exercice ont été sujet à un protocole d'entraînement (course) sur tapis roulant pendant 7 semaines, 60 minutes par jour, 5 fois par semaine.

2.4. Les paramètres étudiés :

-L'évolution de la pression artérielle systolique a été mesurée chaque semaine par plethysmographie indirecte au niveau de l'artère caudale.

- L'évaluation de la fonction endothéliale a été faite sur l'aorte thoracique isolée en chambre d'organe. Étude *ex-vivo* de la vasorelaxation dépendante et indépendante de l'endothélium, en réponse à l'acétylcholine et au nitroprussiate de sodium respectivement. La vasodilatation endothélium-dépendante en réponse à l'augmentation du flux intravasculaire a été évaluée au niveau des petites artères mésentériques isolée, perfusée et pressurisées. De plus, les paramètres morphologiques de ces dernières ont été mesurés.

-L'expression et la phosphorylation de la eNOS ont été évaluées par Western blotting au niveau de l'aorte et du rein.

Travaux expérimentaux

-Les paramètres biochimiques de l'IRC ont été mesurés au niveau sanguin et urinaire : hémocrite, hémoglobine, créatinémie/urie, urémie, albuminurie, TBARS.

-La fibrose a été évaluée au niveau de coupes histologiques du rein et par la mesure de l'expression de la voie fibrogénique via les MAPK erk 1/2.

-L'évaluation du stress oxydant a été faite par la mesure de l'activité et l'expression de la NAD(P)H oxydase et des ses sous-unités (p67phox et les Nox2 et Nox4) au niveau de l'aorte et du rein.

- L'évaluation du statut anti-oxydant a été faite par la mesure de l'expression de la thioredoxine et la SOD-1 au niveau de l'aorte et du rein.

3. Résultats principaux :

3.1. Les effets de l'exercice chez le rat IRC :

-Prévient le développement de l'HTA chez le rat IRC.

-Améliore la performance des rats IRC.

-Protège la fonction endothéliale au niveau de l'aorte et des petites artères mésentériques.

-Améliore les paramètres et les marqueurs de la fonction rénale (Clairance de la créatinine, créatinémie et albuminurie).

- Empêche la fibrose rénale en diminuant le dépôt de collagène au niveau rénal et abaisse l'expression rénale des MAPK erk 1/2.

-Améliore le statut oxydant au niveau du rein en diminuant l'activité de la NAD(P)H oxydase et l'expression de la p67phox et de la Nox4.

-Augmente la phosphorylation de la protéine eNOS au niveau de l'aorte.

3.2. Les effets du traitement rHuEPO chez le rat IRC :

-Altère la fonction endothéliale au niveau de l'aorte et de manière plus prononcée au niveau des petites artères mésentériques.

-Augmente l'hématocrite et le taux d'hémoglobine.

-Améliore le stress oxydatif systémique via la diminution du taux des TBARS aussi bien dans le plasma que dans les urines.

-Augmente la phosphorylation de la eNOS et diminue l'expression des MAPK erk 1/2.

3.3. Les effets de l'exercice combiné au traitement rHuEPO :

-Prévient l'élévation de la pression artérielle chez les rats IRC.

-Améliore encore plus la performance des rats IRC par rapport à ce que peut améliorer l'exercice seul.

-Altère la fonction endothéliale au niveau des petites artères mésentériques par rapport à l'exercice seul.

-L'effet bénéfique de l'exercice sur la créatinémie et la clairance de la créatinine est altéré par le traitement rHuEPO.

Travaux expérimentaux

-Aggrave la dysfonction rénale, avec une augmentation excessive de l'albuminurie.

-Aggrave la fibrose et augmente l'expression des MAPK erk 1/2 au niveau rénal (contrairement à l'effet séparé de l'exercice ou du la rHuEPO sur cette protéine).

-Augmente l'activité de la NAD(P)H oxydase au niveau rénal (contrairement à l'effet séparé de l'exercice ou du la rHuEPO sur cette activité).

Cardiovascular and renal risks in rats with chronic kidney disease
are prevented by exercise training but are aggravated when trained
rats are treated with recombinant human erythropoietin.
Implication of NAD(P)H oxidase and MAPK erk1/2 signaling
pathways

Fayçal MEZIRI^{1,3}, Sabeur TOUATI^{1,3}, Tlili BARHOUMI¹, Alain BERTHELOT²,
Rhian M TOUYZ³, Pascal LAURANT¹,

¹EA₄₂₇₈ Laboratoire de Pharm-Ecologie Cardiovasculaire, Faculty of Sciences, University
of Avignon, Avignon, France. ²EA₄₂₆₇ 2SBP, UFR SMP, Besançon, France. ³Kidney
Research Centre, Ottawa Health Research Institute, University of Ottawa, Canada

Corresponding author:

Fayçal MEZIRI

EA₄₂₇₈ Laboratoire de Pharm-Ecologie Cardiovasculaire, Pôle Sportif et de Recherche
Universitaire, 15 Boulevard Limbert, 84000 Avignon, France

Phone number: +33 (0)490162934

Fax number: +33 (0)490162901

E-mail: meziri_faycal@yahoo.fr

Running title: Exercise and rHuEPO treatment effects in CKD rats

Abstract

Chronic kidney disease (CKD) is associated with endothelial dysfunction accompanied by pathogenetic factors which contribute to arterial hypertension (HT) and coronary artery disease. CKD is classically treated with recombinant human erythropoietin (rHuEPO) which can also induce HT and aggravate cardiovascular morbidity. Increasing evidence indicates that exercise has cardiovascular protective properties. Here we questioned whether physical training prevents development of HT and vascular and renal injury induced by CKD in rats treated with rHuEPO. Rats with 5/6 renal mass ablation were submitted to treadmill exercise for 7 weeks. Rats were treated (CKD+EPO) or not with rHuEPO (100 IU/kg). Blood pressure was measured weekly. Aortic vasorelaxation to acetylcholine and vasodilatory response to increased intravascular flow of isolated perfused mesenteric small arteries were assessed. Blood pressure increased significantly in CKD and CKD+EPO rats. HT was prevented in CKD+Ex and CKD+EPO+Ex rats. Aortic vasorelaxation was significantly impaired in CKD and CKD+EPO rats. Exercise improved vasorelaxation in CKD, with lesser effects in CKD+EPO+Ex rats. Impaired mesenteric vasodilatation in response to increase intravascular flow in the CKD rats was also significantly improved by exercise. Sirius red staining showed marked renal fibrosis in CKD rats. Fibrosis, creatinemia and albuminuria were reduced by exercise alone but were aggravated in CKD+EPO+Ex rats. NAD(P)H oxidase activity and Nox4, p67phox, and MAPK erk1/2 expression were increased in kidneys from CKD rats. Exercise or rHuEPO prevented these increases. However, NADPH oxidase activity and MAPK erk1/2 expression remained elevated in kidney of CKD+EPO+Ex rats. Our data suggest that exercise alone has a protective effect against vascular and renal dysfunction and renal fibrosis. These protective effects are related to an inhibition of NAD(P)H oxidase activity and MAPK erk1/2 signaling pathways. However, exercise combined with rHuEPO treatment has deleterious effects on renal function and structure in CKD rats. These noxious effects seem related to stimulated NAD(P)H oxidase and MAPK erk1/2 signaling pathways. Despite cardiovascular and renal protective effects of exercise training, these findings highlight potentially damaging effects in renal function and structure by combining exercise with rHuEPO treatment in CKD.

Keywords: rHuEPO, Endothelial dysfunction, 5/6 nephrectomy, Exercise, Hypertension, NAD(P)H oxidase

Introduction

Chronic kidney disease (CKD) is a progressive loss of kidney function. The kidneys attempt to compensate for renal damage by hyperfiltration within the remaining functional nephrons. Over time, hyperfiltration causes further loss of function. Cardiovascular complications are at the origin of most half of deaths in CKD patients. Arterial hypertension (HT), atherosclerosis and uremic state are the three major factors that lead to heart attacks. The majority of CKD patients present HT (Tedla et al., 2011). Many uremic state factors amplified the risk of HT: anemia, impaired phospho-calcic balance, rise in endothelin-1 and inhibition of nitric oxide (NO) synthesis in the kidney (Bai et al., 2006). Endothelial dysfunction seems to be a crucial mediator of increased cardiovascular risk observed among patients with CKD (Malyszko, 2010). Close association between microalbuminuria and systemic endothelial dysfunction renders renal vascular function an important marker for the severity of cardiovascular damage (Ochodnický et al., 2006). Furthermore, changes in renal endothelial function, associated with exacerbated stress oxidative and inflammatory process might be involved in the progression of renal end-organ damage (Ochodnický et al., 2006). CKD patients show vascular, renal and systemic oxidative stress. Even a minor impairment such a slight decrease glomerular filtration may be associated to an increase of oxidative stress leading to an endothelial dysfunction (Vaziri et coll., 1998).

It has been reported that exercise may influence the progression of chronic renal disease in both man and animals (Goldberg et al., 1986 ; Heifet et al., 1987). Exercise training, which has some potential for improving cardiovascular and metabolic disorders,

is beneficial in the treatment of many chronic disease states including HT (Mc Mahon and Palmer, 1985), and atherosclerosis (Pellegrin *et al.*, 2009). Increasing evidence suggests that exercise may improve endothelial function, ameliorate vascular injury and protect against cardiovascular disease in patients with CKD by attenuating oxidative stress. The anti-oxidant and anti-inflammatory effects of exercise have been attributed, in part, to inhibition of NAD(P)H oxidase-derived reactive oxygen species production (ROS) (Adams *et al.*, 2005; Petersen and Pedersen, 2005). Oxidative stress is mainly caused by an imbalance between the activity of endogenous pro-oxidative enzymes (such as NADPH oxidase) and antioxidant enzymes (such as superoxide dismutase and thioredoxin peroxidase/peroxiredoxin) (Förstermann, 2008). The main objective of the present study was to determine the possible molecular mechanisms through which exercise improved cardiovascular risks and renal function in CKD rats.

Another part of our study concerns the influence of recombinant human erythropoietin (rHuEPO) on beneficial effect of exercise training. RhuEPO has been widely used for long-term treatment of anemia that is associated with chronic renal failure (Goodnough *et al.*, 2000). Although rHuEPO effectively abolishes symptoms of anemia, it has side-effects (Maschio 1995). The rheologic, hemodynamic and metabolic modifications induced by rHuEPO are likely to play a key role in the occurrence of cardiovascular events: rHuEPO therapy may increase blood pressure, erythrocyte mass and blood viscosity (Smith *et al.* 2003). Recent evidence suggests that rHuEPO accentuates a pre-existing endothelial dysfunction. Transgenic mice overexpressing human EPO did not develop HT and thromboembolic disorders despite a severe polyglobulia and a high hematocrit (>80%). But when NO synthesis was inhibited, it was

observed a high rate of mortality (Ruschitzka et al. 2000). Recently, we have reported the cardiovascular effects of chronic administration of rHuEPO in exercise-trained rats treated with an inhibitor of NO synthesis (L-NAME) (Meziri et al., 2011). In these conditions, rats quickly develop high blood pressure, a markedly impaired endothelial function and defective endothelium-dependent vasodilatation in both isolated aorta and isolated perfused mesenteric arteries, and half of them died during exercise and recovery period. Since chronic renal disease is associated with an endothelial dysfunction and cardiovascular risks and towards these preliminary data, it seems of interest to study the impact of the combined exercise/rHuEPO treatment on the cardiovascular and renal risks of the CKD rats.

Methods

Animals and treatments

Seven week-old male Wistar rats were purchased from Charles River (L'Arbresle, France). Animals were kept in a temperature-controlled room ($22 \pm 2^\circ\text{C}$), at 50–60% humidity, with a reversed 12:12-h light–dark cycle. Food and distilled water were given ad libitum. The housing and care of the animals and all experimental procedures were conducted in compliance with the european convention for the protection of vertebrates animals used for experimental and other scientific purposes (European Union Directive 86/609EEC, 1986). Animals were randomly assigned to the CKD and sham-operated control groups.

Animals assigned to the CKD groups underwent five-sixths nephrectomy. Under general anesthesia (pentobarbital sodium, 50 mg/kg ip), the animals were subjected to a two-thirds left nephrectomy followed by a right nephrectomy to produce CKD.

Rats were divided into five groups: 1/ Sham (control group), 2/ CKD (5/6 nephrectomy), 3/ CKD+Ex (CKD + exercise), 4/ CKD+EPO (CKD + rHuEPO treatment), and 5/ CKD+EPO+Ex. EPO groups received 100 UI/kg rHuEPO (Epoietin beta, NeoRecormon[®], Roche, Rosny-sous-Bois, France) twice a week by subcutaneous injections. The control groups received the vehicle (saline 0.9%).

Exercise protocol

The exercise training protocol was adapted from a previous procedure with modifications (Yang et al., 2002). One week after the surgery, rats were trained on a motor treadmill (Columbus Instruments, Columbus, OH, USA) at a speed of 20 m/min for 60 min (5 days per week) during 7 weeks. At the end of the protocol, an effort test was made, which consisted of making the rats run, starting at 10 m/min and increasing the speed (4 m/min every 2 minutes) until exhaustion. We considered the rats exhausted when they stopped running 3 times for 10 seconds.

Blood Pressure measurements

Systolic blood pressure (SBP) was measured in conscious rats after warming and slight restriction, by the indirect plethysmographic tail-cuff method using an automatic BP

monitoring system (BP 2000, Visitech System, Apex NC, USA). The average of 8-10 readings was used for analysis.

Isolated aorta studies

After sacrifice, the descending thoracic aorta was rapidly dissected, cleaned from loose connective tissue and immersed in physiological salt solution (PSS) composed of (mM): NaCl 118, KCl 4.7, NaHCO₃ 25, CaCl₂ 2.5, MgSO₄ 1.2, KH₂PO₄ 1.2 and glucose 11; bubbled with a mixture of 95% O₂ and 5% CO₂ at pH of 7.4. Two aortic rings (2-3mm long) per rat were studied in parallel (one for each drug studied as described below). The rings were then suspended horizontally between two L-shaped stainless steel hooks in organ chambers which contained 10 ml of PSS maintained at 37°C. Isometric tension was measured using a force displacement transducer (EMKA Technologies, Falls Church, VA, USA) connected to the upper hook. During an equilibration period of 60 min, aortic rings were progressively stretched to their optimal passive tension (2g) as assessed by the response to 100 mM KCl. The rings were then exposed to norepinephrine (10⁻⁷ M) (Sigma Aldrich, Saint Quentin Fallavier, France). Endothelial integrity was confirmed before the experiment by testing relaxation induced by acetylcholine (10⁻⁶ M) (Sigma Aldrich) under norepinephrine (10⁻⁷ M) pre-contracted conditions. After this procedure, the rings were washed and allowed to re-equilibrate to baseline tension for 60 min. Endothelium-dependent relaxation was assessed by cumulative concentration–response curves to acetylcholine (10⁻¹⁰ to 10⁻⁴ M). Endothelium-independent relaxation was evaluated by cumulative concentration–response curves to sodium nitroprusside (10

¹⁰ to 10⁻⁴ M) (Sigma Aldrich).

Isolated and perfused mesenteric resistance arteries studies

The preparation and monitoring of isolated and perfused mesenteric resistance arteries have been described in detail previously (Laurant *et al.*, 1997). A third-order branch of the mesenteric artery was carefully dissected and mounted in a pressure myograph chamber (Living System Instrumentation Inc, Burlington, VT, U.S.A.) containing PSS bubbled with 95% O₂ – 5% CO₂ and maintained at 37°C. The artery was bathed in a 10-ml organ bath containing a cold PSS. The bath solution was changed continuously at a rate of 10 ml/min. The pressure at both ends of the artery was monitored by pressure transducers. Intravascular flow and pressure were adjusted by means of a pressure-servo system (Living System Instrumentation Inc). After intravascular pressure and flow were established, the arterial segments were checked for leaks, which were identified by a reduction in the preset intraluminal pressure. The arterial segments were then equilibrated for 1h under a pressure of 60 mmHg (preliminary studies have shown that vessels developed an optimal level of myogenic tone under this pressure value).

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

in PSS.

After a 30 min equilibration, media thickness and lumen diameter were measured with a microcomputer-based video-imaging system. Flow-induced vasodilatation was expressed as an increase in equilibrium internal diameter when intravascular flow was increased in steps of $10 \mu\text{l}\cdot\text{min}^{-1}$ from 0 to $100 \mu\text{l}\cdot\text{min}^{-1}$ in vessels subjected to 60 mmHg.

Histological analysis

Kidney tissues were fixed in 4% formaldehyde solution for 24 hours at 4°C , dehydrated, embedded in paraffin, and sectioned transversely ($4 \mu\text{m}$). Sections were stained with hematoxylin and Sirius red and scored for vascular damage and collagen deposition. Collagen content was assessed qualitatively according to the intensity of staining (see table 1 for scores).

Biochemical analysis

After 7 weeks, the animals were placed in metabolic cages for a 24-h urine collection. The rats were then anesthetized with pentobarbital ($50\text{mg}/\text{kg}$), blood samples were drawn from the abdominal aorta and collected in tubes containing EDTA for measurement of hematocrit and hemoglobin rates by classical methods (ADVIA[®]60 Bayer). Heart and aorta were excised, washed, blotted, and weighed. Tissues were frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C .

Plasma and urine levels of thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) were measured by a colorimetric method. Briefly, plasma was mixed with 2% butylated

hydroxytoluene and quintanilla reagent (26 mmol/L of thiobarbituric acid and 15% trichloroacetic acid). The mixture reaction was boiled for 15 minutes. Thereafter, the reaction mixture was cooled and centrifuged at 3000g for 10 minutes. The soluble phase was measured with a spectrophotometer at a wavelength of 535 nm. In parallel, malondialdehyde standards were diluted in the range of 0 to 4 $\mu\text{mol/L}$. TBARS values were expressed in nanomoles per milliliter of malondialdehyde equivalents. Uremia, serum and urine creatinine and albuminuria were measured by automated methods at the hospital laboratory.

NAD(P)H oxidase activity by enhanced lucigenin chemiluminescence

The lucigenin-derived chemiluminescence assay was used to determine NAD(P)H oxidase activity in renal and aorta tissues homogenates 10% (wt/vol) prepared in phosphate buffer (20 mmol/L of KH_2PO_4 , 1 mmol/L of EGTA, and protease inhibitors [pH 7.4]) with a glass-to-glass homogenizer. The reaction was started by the addition of NAD(P)H (0.1 mmol/L) to the suspension (250 μL of final volume) containing sample (50 μL), lucigenin (5 $\mu\text{mol/L}$), and assay buffer (50 mmol/L of KH_2PO_4 , 1 mmol/L of EGTA, and 150 mmol/L of sucrose [pH 7.4]). Luminescence was measured every 1.8 seconds for 3 minutes in a luminometer (Orion Luminometer, Berthold detection systems). Buffer blank was subtracted from each reading. Activity was expressed as arbitrary units per milligram of protein. Protein concentrations were determined with protein assay reagent (Bio-Rad Laboratories).

Western blotting

Renal and aorta tissues were used as follows. Frozen tissue was homogenized in lysis buffer A (50 mmol/L of Tris/HCl [pH 7.4], 5 mmol/L of EGTA, 2 mmol/L of EDTA, 0.1 mmol/L of PMSF, 1 mmol/L of pepstatin A, 1 mmol/L of leupeptin, and 1 mmol/L of aprotinin). Half of the homogenate was used for total fraction protein analysis. Total proteins were separated by electrophoresis on a 10% polyacrylamide gel and transferred onto a nitrocellulose membrane. Nonspecific binding sites were blocked with 5% skim milk in Tris-buffered saline solution with Tween for 1 hour at 24°C. Membranes were then incubated with specific antibodies overnight at 4°C. Phosphoantibodies were as follows: Anti-p-eNOS (Ser1177) diluted 1:200 (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA). The respective nonphospho-antibodies (1:2000) were also used: anti-Nox2, anti-Nox4 and anti-p67phox (Santa Cruz Biotechnology) and against ERK1/2 (Cell Signaling) and against total endothelial nitric oxide synthase (eNOS) diluted 1:200 (Santa Cruz Biotechnology) and against Cu/Zn Superoxide Dismutase "SOD-1" (Biovision) and against thioredoxin (Abcam). After incubation with secondary antibodies, signals were revealed with chemiluminescence, visualized by autoradiography, and quantified densitometrically. GAPDH was used as housekeeping proteins.

Statistical analysis

All values are expressed as the mean \pm SEM. Statistical comparisons between groups were made by analysis of variance (one-way ANOVA) followed by Student-Newman-Keuls test for multiple comparisons using the Prism program (version 5, GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA). Significance was considered present

when probability values were <0.05 .

Results

Systolic blood pressure

At the end of the protocol, the systolic blood pressure was significantly greater in CKD and CKD+EPO rats as compared to Sham rats ($p<0.05$). Exercise alone or combined to rHuEPO treatment prevented the rise in blood pressure ($p<0.05$) (Table 1).

Endurance test

Exercise training significantly improved the performance of CKD ($p<0.05$) as compared to sedentary (sham and CKD) rats. Furthermore, the performance was significantly greater in CKD+EPO+Ex rats ($p<0.05$). In sedentary CKD rats, rHuEPO had no effect (Table1).

Blood and urine parameters

rHuEPO treatment significantly increased hematocrit and hemoglobin levels in sedentary and trained CKD rats ($p<0.05$) (Table 1). Concerning renal function markers, blood urea concentration was greater in CKD groups as compared to sham group ($p<0.05$). Neither exercise or rHuEPO treatment modified the uremia. Serum creatinine concentration was significantly greater in CKD groups as compared to sham group ($p<0.05$). RhuEPO treatment did not modify creatinemia. Exercise diminished its level in CKD rats only when they were untreated with rHuEPO ($p<0.05$). Creatinine clearance

was significantly lower in CKD rats treated or not with rHuEPO as compared to the sham rats ($p<0.05$). Exercise significantly prevented the decrease in creatinine clearance in the CKD rats ($p<0.05$), but not when exercise was combined with rHuEPO treatment.

Albuminuria level was significantly greater in CKD rats as compared to sham rats ($p<0.05$) but this increase was much higher when CKD rats were treated with rHuEPO combined to exercise as compared to sham and CKD+Ex rats ($p<0.01$) (Table 1). On the contrary, exercise alone prevented the rise in albuminuria in CKD rats.

Plasma and urine TBARS (systemic oxidative stress)

In both plasma and urine, TBARS level increased markedly in CKD rats as compared to sham rats ($p<0.05$). Exercise did not modify TBARS levels. However, rHuEPO treatment, alone or combined to exercise, significantly corrected lipid peroxidation ($p<0.05$) (Table 1).

Endothelial function in isolated aorta and isolated and perfused mesenteric arteries

Acetylcholine-induced relaxation of aorta was altered in CKD rats as compared to sham rats ($p<0.05$). Exercise corrected this alteration in both CKD+EX and CKD+EPO+EX groups. rHuEPO treatment slightly and significantly improved the acetylcholine-induced relaxation without corrected it entirely (Fig. 1a). Endothelium-independent relaxation to sodium nitroprusside was similar between all groups (data not shown).

In response to increased intravascular flow rate, vasodilatation of mesenteric arteries was markedly impaired in CKD rats as compared to sham rats ($p<0.05$) (Fig. 1b).

rHuEPO treatment aggravated the impaired vasodilation in CKD rats ($p < 0.05$). Exercise significantly improved flow-induced vasodilation in CKD rats, as well as CKD rats treated with rHuEPO ($p < 0.05$).

Arterial morphology of isolated and perfused mesenteric arteries

Media thickness, media/lumen ratio and media cross-sectional area of mesenteric arteries were significantly greater in CKD rats than those in sham rats ($p < 0.05$). Lumen and external diameters did not change (Table 2). rHuEPO did not modify all the morphological parameters of mesenteric arteries. Media thickness, media/lumen ratio and media cross-sectional area were significantly lower in CKD+Ex than in CKD rats ($p < 0.05$). In CKD+EPO+Ex rats, lumen diameter of arteries was greater than in others groups ($p < 0.05$). Although media thickness and media/lumen ratio were lower in CKD+EPO+Ex rats versus CKD+EPO rats, media cross-sectional area was not changed.

Kidney fibrosis

Histological slides of kidney stained with red Sirius showed collagen deposition in CKD rats as compared to sham rats. There was less collagen deposition in kidney tissue of CKD+Ex rats than CKD control rats. rHuEPO treatment did not have effect on renal fibrosis of CKD rats. However, when these latter were submitted to the combination exercise training and rHuEPO treatment, collagen deposition was aggravated in kidney tissue (Fig. 2 and Table 1).

NAD(P)H oxidase activity, and p67phox, Nox4 and Nox2 expression in kidney and

aorta

There was no significant differences in aortic NAD(P)H oxidase activity between all groups (Fig. 3A). NAD(P)H oxidase activity was higher in kidney of the CKD rats as compared to sham rats ($p<0.05$) (Fig. 3D). NAD(P)H oxidase activity was significantly diminished in CKD+EPO and CKD+Ex rats ($p<0.05$). However, when exercise and rHuEPO treatment were combined, NAD(P)H oxidase activity remained as higher as in CKD control rats.

To assess the expression of NAD(P)H oxidase, we assessed expression of p67phox, Nox4 and Nox2 subunits. The p67phox and Nox4 expression were significantly greater in kidney of CKD rats as compared to sham rats ($p<0.05$). Exercise training and rHuEPO treatment, alone or combined, significantly decreased kidney expression of p67phox ($p<0.05$). Nox4 expression was decreased by exercise alone or combined with rHuEPO treatment ($p<0.05$) (Fig. 2E-F). Nox2 expression was not modified in kidney (data not shown).

Neither CKD, exercise nor rHuEPO changed p67phox, Nox2 (data not shown) and Nox4 expression in aorta (Fig. 3B and 3C).

eNOS expression and phosphorylation in kidney and aorta

In kidney, eNOS phosphorylation was no different between all groups. eNOS expression was lower in the kidney of CKD, CKD+EPO and CKD+Ex rats as compared to sham rats ($p<0.05$) (Fig. 4C and 4D). However, the combination of exercise and rHuEPO treatment significantly increased eNOS expression to sham levels ($p<0.05$).

In aorta, eNOS phosphorylation was not different between sham and CKD rats. eNOS

phosphorylation was significantly higher in aorta of CKD+EPO and CKD+Ex rats than in CKD rats, but not in CKD+EPO+Ex rats. eNOS expression was not different between all groups (Fig. 4A and 4B).

SOD-1 and thioredoxin expression in kidney and aorta

In kidney, SOD-1 and thioredoxin expression was significantly lower in CKD, CKD+EPO, CKD+Ex and CKD+EPO+Ex rats as compared to sham rats ($p<0.05$). Exercise and/or rHuEPO did not modify their expression (Fig. 5C and 5D).

Erk1/2 in kidney

To check kidney fibrosis, fibrogenic signaling pathway erk1/2 expression was assessed. Kidneys of CKD rats showed a significant increase in erk1/2 expression as compared to sham rats ($p<0.05$). Expressions of erk1/2 were significantly decreased in kidney of CKD+EPO and CKD+Ex rats as compared to CKD control rats ($p<0.05$) (Fig. 6). However, erk1/2 expression remained significantly higher when CKD rats were submitted to both exercise training and rHuEPO treatment ($p<0.05$).

Discussion

The present study shows that exercise training prevents blood pressure elevation, endothelial and renal dysfunction and exerts renal anti-oxidant and anti-proliferative effects in CKD rats. However, when exercise was combined with rHuEPO treatment, some training benefits were blunted: rHuEPO treatment aggravated renal function and

fibrosis.

Renal dysfunction in CKD rats is associated with cardiovascular risk factors such as impaired endothelium- and NO-dependent vasorelaxation (Annuk *et al.*, 2005). Kidney function in CKD rats is also markedly altered with increased uremia, creatinemia and albuminuria, and increased collagen deposition (Muller *et al.*, 2010). All these findings are consistent with the development of HT in this experimental model (Cho *et al.*, 2009). As it is shown in the present study and others, these functional alterations are associated with an increased systemic and renal oxidative stress (Thomas *et al.*, 2003), characterized by an increased urine TBARS production, stimulated NAD(P)H oxidase signalling pathway and reduced antioxidant defences SOD-1 and thioredoxin in kidney.

It is well-established that exercise training has beneficial effects on cardiovascular status (Jasperse and Laughlin, 2006). Exercise decreases elevated blood pressure and prevents rise in blood pressure in the most experimental models of HT such as spontaneously hypertensive rats, L-NAME hypertensive rats and 5/6 nephrectomy hypertensive rats (Agarwal *et al.*, 2011 ; Meziri *et al.*, 2011 ; Lu *et al.*, 2009). In the present study, exercise training prevents the rise in blood pressure of CKD rats, as expected. This beneficial effect is associated with improved arterial morphology and functional properties. CKD induced the thickening of the media, enlargement of the media CSA with increased media/lumen ratio in the small mesenteric arteries without change of lumen diameter. These morphological changes indicate that CKD-induced HT is associated with an hypertrophic remodelling (Mulvany, 1999). Exercise training however diminishes media thickness, media/lumen ratio and media CSA of mesenteric arteries of CKD rats, suggesting that the anti-hypertensive effect of exercise training is

accompanied by beneficial structural changes of the media of small arteries that contribute to limit vascular tone elevation.

It is also demonstrated that exercise training improves the endothelium- and NO-dependent relaxation in both aorta and small mesenteric arteries and prevents renal dysfunction of CKD rats, as it has been previously reported in the same experimental model and in patients suffering of kidney disease (Boyce et al., 1997; Pechter et al., 2003; Anderson et al., 2004). These beneficial vascular and renal effects probably contribute to prevent the rise in blood pressure, the development of HT, and to limit the risk of cardiovascular diseases and renal damage. Alteration in endothelial- and NO-dependent vasorelaxation is totally prevented when isolated aorta from CKD rats submitted with exercise was stimulated by a pharmacological agent acetylcholine. On the other hand, when physiologically stimulated by increased vascular flow, endothelial and NO-dependent vasodilatation of mesenteric arteries was partially corrected. The discrepancy is not clear. However, it may be related to the stimulated level of released endothelial NO which may be greater with pharmacological stimulus such as acetylcholine than with physiological stimulus such as intravascular flow and mechanical shear stress. eNOS/NO signaling plays a critical role in vasorelaxation, and its attenuation can result in dysfunctional vasorelaxation. Although eNOS expression and eNOS phosphorylation were not altered in aorta from CKD rats, exercise training is able to increase eNOS phosphorylation at Ser¹¹⁷⁷, confirming the well-known stimulating effect of exercise on vascular function through increased eNOS activity (Jenkins et al., 2011). The fact that exercise corrects endothelial dysfunction suggest that exercise prevented the cardiovascular risk via the improvement of vascular oxidative status (De Moraes et al.,

2008 ; Mayhan *et al.*, 2010 ; Dal-Ros *et al.*, 2011). In our study, systemic oxidative stress is elevated in CKD rats. Several enzymes can produce ROS such as NAD(P)H oxidase. This enzyme is the major source of ROS in cardiovascular system, with increased activity in the vessel wall of hypertensive animals (Zalba *et al.*, 2000 ; Beswick *et al.*, 2001 ; Hayashi *et al.*, 2005). However, in our study, NAD(P)H oxidase activity and expression of subunits p67, Nox2 and Nox4, and expression of the antioxidative proteins SOD-1 and thioredoxin remain as the sham levels in aorta of CKD rats. Furthermore, exercise training does not change expression and activity of all these enzymes. Taken together, these data indicate that endothelial dysfunction in aorta from CKD rats seems related to others signaling pathway alterations. Xanthine oxidase and eNOS uncoupling can also produce ROS and decrease NO biodisponibility as it has been previously observed (Montezano and Touyz, 2011). It is also suggested in the present study that the beneficial effect of exercise may be linked in part, to the increased release of NO by vascular endothelium via an increased eNOS activity. Further studies are however needed to understand the beneficial effects of exercise on endothelial dysfunction in CKD rats.

The most important effect of the exercise training was observed at the level of the kidney of CKD rats. Renal dysfunction and damage in CKD rats are associated with an elevated oxidative stress in kidney tissues (Coelho *et al.*, 2005). Renal eNOS expression was down-regulated, as well as expression of the antioxidant enzymes SOD-1 and thioredoxin. Renal dysfunction was accompanied by elevated NAD(P)H oxidase activity with up-regulation of the isoform Nox4 (but not Nox2) and the cytosolic subunit p67 phox. Exercise training restored renal function and limit collagen deposition and fibrosis in kidney of CKD rats. However, few experimental studies are available regarding the

influence of exercise on the progression of renal disease. Most of them report a decrease in serum creatinine level, an increase in glomerular filtration rate, and a reduction of renal fibrosis and glomerulosclerosis (Lu et al., 2009 ; Kanazawa et al., 2006 ; kohzuki et al.,2001 Osato et al 1990 ; Heifets et al., 1987), but not all (Bergamaschi et al., 1997). The mechanism underlying the renal protective effect of exercise is not known. The present study suggest that it may be related to reduced NAD(P)H oxidase activation and corrected p67phox and Nox4 expressions, without significant change in the antioxidant defences. Several reports have shown a reduced activity and expression of NAD(P)H oxidase in cardiovascular tissues (heart and blood vessels) of most experimental hypertensive models such as nephrectomized hypertensive rats (Bai et al., 2009) and high fat diet-induced obese and hypertensive rats (Touati et al., 2011). NAD(P)H oxidase plays an important role in kidney tissue. Its expression and activity are regulated by several factors such as mechanical stress, hypoxia, and inflammatory cytokines which are markedly affected during renal insufficiency (Griendling et al., 2000). Thus, increased NAD(P)H oxidase-derived ROS production by kidney tissues can contributes to renal inflammation, injury and dysfunction by altering structural and functional molecules and by activating redox-sensitive signal transduction pathways (Touyz et coll., 2004). Thus, it is conceivable to suggest that exercise protects kidney function and structure by its well-established anti-inflammatory and anti-oxidant properties (Szostak and Laurant, 2011) via a reduction in activity and expression of the NAD(P)H oxidase signaling pathway.

rHuEPO is known to stimulate erythropoiesis and to treat anemia associated with chronic renal failure (Moreno et al., 2000). Its chronic use is often associated with HT and thromboembolism, causing a high rate of cardiovascular mortality in renal failure

patients (Raine, 1988). In the present study, r-HuEPO treatment did not exert significant unfavorable effects in CKD hypertensive rats, some of them being protective. R-HuEPO did not change high blood pressure level, collagen deposition in kidney, albuminuria and creatinemia of CKD rats. However, it slightly improved the endothelium- and NO-dependent vasorelaxation in aorta which may be related to the increased eNOS activation and phosphorylation at Ser¹¹⁷⁷. Furthermore, rHuEPO reduced systemic oxidative stress by reducing plasma and urinary TBARS and reduced NAD(P)H oxidase activity and p67phox and Nox4 subunits expression to the sham levels. Several studies have shown that rHuEPO have a protective effect against lipid peroxidation and oxidative stress and stimulates endothelial eNOS/NO signaling pathway (Bahcekapili et al., 2007; Kasap et al., 2008, Banerjee et al., 2000). These findings are in favour of rHuEPO treatment against cardiovascular morbidity and mortality in patients with CKD (Besarab and Soman, 2005).

It is demonstrated for the first time that the combined exercise/rHuEPO treatment exerts deleterious and side-effects in CKD rats. Despite an increased endurance performance, a reduced systemic oxidative stress, an antihypertensive effect and a complete improvement of endothelium- and NO-dependent vasorelaxation in aorta of CKD, as did exercise training, it is shown that the recovery of the flow- and NO-dependent vasodilatation in small mesenteric arteries was blunted when trained CKD rats were concomitantly treated with rHuEPO. These findings suggest that rHuEPO opposes the beneficial effect of exercise in small arteries. However, the deleterious effects of the combination were more predominant on renal function and structure. exercise training combined with rHuEPO treatment did not correct creatinemia and

creatinine clearance, as did exercise training alone. Moreover, the combination exercise/rHuEPO markedly aggravated albuminuria and renal fibrosis, while exercise alone had opposite effects. Interstitial extracellular matrix expansion is the classical histological hallmark of chronic kidney injury and is usually the best structural correlate of the degree of renal functional loss and a strong predictor of progression risk (Risdon *et al.*, 1968). The reason of a stimulated renal fibrosis induced by exercise/rHuEPO treatment in CKD rats is not known. However, it is probably related to the enhanced NAD(P)H oxidase activity, suggesting stimulated ROS release by kidney tissues. It may be also related to the expression of the MAPK erk1/2 which remained elevated when trained CKD rats were treated by rHuEPO, while exercise training or rHuEPO treatment alone down-regulated it. The fibrogenic signaling erk1/2 pathway is implicated in extracellular proliferation modulated by oxidative stress (Liu *et al.*, 2010). Exercise and physical activity are well recognized and advised in the prevention of cardiovascular risk and recovery of physical performance in patients suffering of chronic renal failure (Kosmadakis *et al.*, 2011). However, some clinical studies have previously reported unfavourable effect of exercise in patients with chronic renal failure (Clapp *et al.*, 2011) and noxious cardiovascular effects in patients treated with rHuEPO (Annuk *et al.*, 2006 ; Scalera *et al.*, 2005). The present experimental findings highlight potentially damaging renal function and structure in combining exercise with rHuEPO treatment in CKD.

In conclusion, exercise prevents HT, endothelial and renal dysfunctions in CKD rats by stimulating vascular eNOS activity and diminishing renal NAD(P)H oxidase activity and Nox4 and p67phox expressions. Some beneficial effects of exercise are

blunted by rHuEPO treatment, particularly the kidney function aggravated by an excessive fibrosis and a stimulated NAD(P)H oxydase and MAPK erk1/2 signaling pathways.

References

Adams V, Linke A, Krankel N, Erbs S, Gielen S, Möbius-Winkler S, Gummert JF, Mohr FW, Schuler G, Hambrecht R. Impact of regular physical activity on the NADPH oxidase and angiotensin receptor system in patient with coronary artery disease. *Circulation*.111:555-562 (2005).

Agarwal D, Elks CM, Reed SD, Mariappan N, Majid DS, Francis J. Chronic Exercise Preserves Renal Structure and Hemodynamics in Spontaneously Hypertensive Rats. *Antioxid Redox Signal*. Sep 6. [Epub ahead of print] (2011).

Anderson JE, Boivin MR Jr, Hatchett L: Effect of exercise training on interdialytic ambulatory and treatment-related blood pressure in hemodialysis patients. *Ren Fail*,26:539–544 (2004).

Annuk M, Linde T, Lind L, Fellstrom B: Erythropoietin impairs endothelial vasodilatory function in patients with renal anemia and in healthy subjects. *Nephron Clin Pract* 102: c30–4 (2006).

Annuk M, Soveri I, Zilmer M, Lind L, Hulthe J, Fellström B. Endothelial function, CRP and oxidative stress in chronic kidney disease. *Journal of Nephrology*. 18(6):721–726 (2005).

Bai Y, Sigala W, Adams GR, Vaziri ND. Effect of exercise on cardiac tissue oxidative and inflammatory mediators in chronic kidney disease. *Am J Nephrol*. 29(3):213-21 (2009).

Bai Y, Ye S, Mortazavi R, Campese VM, Vaziri ND. Effect of renal injury-induced neurogenic hypertension on NO synthase, caveolin-1, akt, calmodulin and soluble guanylate cyclase expressions in the kidney. *Am J Physiol Renal Physiol*. 292(3):F974-80 (2006).

Bahcekapili N, Uzüm G, Gökkusu C, Kuru A, Ziylan YZ. The relationship between erythropoietin pretreatment with blood-brain barrier and lipid peroxidation after ischemia/reperfusion in rats. *Life Sci*. 80(14):1245-51 (2007).

Banerjee D, Rodriguez M, Nag M, Adamson JW. Exposure of endothelial cells to recombinant human erythropoietin induces nitric oxide synthase activity. *Kidney Int*. 57:1895-904 (2000).

Bergamaschi CT, Boim MA, Moura LA, Piçarro IC, Schor N. Effects of long-term training on the progression of chronic renal failure in rats. *Med Sci Sports Exerc.* Feb;29(2):169-74 (1997).

Beswick RA, Dorrance AM, Leite R, Webb RC. NADH/NADPH oxidase and enhanced superoxide production in the mineralocorticoid hypertensive rat. *Hypertension.* Nov;38(5):1107-11 (2001).

Besarab A, Soman S. Anemia management in chronic heart failure: lessons learnt from chronic kidney disease. *Kidney Blood Press Res.* 28(5-6):363-71 (2005).

Boyce ML, Robergs RA, Avasthi PS. Exercise training by individuals with predialysis renal failure: cardiorespiratory endurance, hypertension, and renal function. *Am J Kidney Dis,* 30:180–192 (1997).

Cho KH, Kim HJ, Rodriguez-Iturbe B, Vaziri ND. Niacin ameliorates oxidative stress, inflammation, proteinuria, and hypertension in rats with chronic renal failure. *Am J Physiol Renal Physiol.* Jul;297(1):F106-13 (2009).

Clapp EL, Bevington A. Exercise-induced biochemical modifications in muscle in chronic kidney disease: occult acidosis as a potential factor limiting the anabolic effect of exercise. *J Ren Nutr.* Jan;21(1):57-60 (2011).

Coelho BL, Rocha LG, Scarabelot KS, Scheffer DL, Ronsani MM, Silveira PC, Silva LA, Souza CT, Pinho RA. Physical exercise prevents the exacerbation of oxidative stress parameters in chronic kidney disease. *J Ren Nutr.* May;20(3):169-75 (2010).

Dal-Ros S, Zoll J, Lang AL, Auger C, Keller N, Bronner C, Geny B, Schini-Kerth VB. Chronic intake of red wine polyphenols by young rats prevents aging-induced endothelial dysfunction and decline in physical performance: Role of NADPH oxidase. *Biochem Biophys Res Commun,* 14;404(2):743-9 (2011).

De Moraes C, Davel AP, Rossoni LV, Antunes E, Zanesco A. Exercise training improves relaxation response and SOD-1 expression in aortic and mesenteric rings from high caloric diet-fed rats. *BMC Physiol* 29(8):12 (2008).

Förstermann U. Oxidative stress in vascular disease: causes, defense mechanisms and potential therapies. *Nat Clin Pract Cardiovasc Med* 5:338–349 (2008).

Goldberg AP, Geltman EM, Gavin JR: Exercise training reduces coronary risk and effectively rehabilitates hemodialysis patients. *Nephron.* 42:311–315 (1986).

Goodnough LT, Skikne B, Brugnara C. Erythropoietin, iron, and erythropoiesis. *Blood.* 96(3):823-33 (2000) .

Griendling KK, Sorescu D, Ushio-Fukai M. NAD(P)H oxidase: role in cardiovascular biology and disease. *Circ Res.* Mar 17;86(5):494-501 (2000).

Hayashi T, Juliet PA, Kano-Hayashi H, Tsunekawa T, Dingqunfang D, Sumi D, Matsui-Hirai H, Fukatsu A, Iguchi A. NADPH oxidase inhibitor, apocynin, restores the impaired endothelial-dependent and -independent responses and scavenges superoxide anion in rats with type 2 diabetes complicated by NO dysfunction. *Diabetes Obes Metab.* Jul;7(4):334-43 (2005).

Heifets M, Davis TA, Tegtmeyer E, Klahr S: Exercise training ameliorates progressive renal disease in rats with subtotal nephrectomy. *Kidney Int.* 32:815– 820 (1987).

Hostetter, T. H., Olson, J. L., Rennke, H. G., Venkatachalam, M. A. and Brenner, B. M.: Hyperfiltration in remnant nephrons: a potentially adverse response to renal ablation. *J. Am. Soc. Nephrol.*, 12: 1315–1325 (2001).

Jasperse JL, Laughlin MH (2006) Endothelial function and exercise training; evidence from studies using animal models. *Med Sci Sports Exerc* 38:445–454.

Jenkins NT, Landers RQ, Prior SJ, Soni N, Spangenburg EE, Hagberg JM. Effects of acute and chronic endurance exercise on intracellular nitric oxide and superoxide in

circulating CD34+ and CD34- cells. *J Appl Physiol*. Sep;111(3):929-37 (2011).

Kanazawa M, Kawamura T, Li L, Sasaki Y, Matsumoto K, Kataoka H, Ito O, Minami N, Sato T, Ootaka T, Kohzuki M. Combination of exercise and enalapril enhances renoprotective and peripheral effects in rats with renal ablation. *Am J Hypertens*. Jan;19(1):80-6 (2006).

Kasap B, Soylu A, Kuralay F, Sarioglu S, Kiray M, Tuğyan K, Türkmen M, Kavukcu S. Protective effect of Epo on oxidative renal injury in rats with cyclosporine nephrotoxicity. *Pediatr Nephrol*. 23(11):1991-9 (2008).

Kohzuki M, Kamimoto M, Wu XM, Xu HL, Kawamura T, Mori N, Nagasaka M, Kurosawa H, Minami N, Kanazawa M, Saito T, Yoshida K. Renal protective effects of chronic exercise and antihypertensive therapy in hypertensive rats with chronic renal failure. *J Hypertens*. Oct;19(10):1877-82 (2001).

Kosmadakis GC, John SG, Clapp EL, Viana JL, Smith AC, Bishop NC, Bevington A, Owen PJ, McIntyre CW, Feehally J. Benefits of regular walking exercise in advanced pre-dialysis chronic kidney disease. *Nephrol Dial Transplant*. 2011 Jul 27. [Epub ahead of print].

Laurant P, Touyz RM, Schiffrin EL. Effect of pressurization on mechanical properties of mesenteric small arteries from spontaneously hypertensive rats. *J Vasc Res* 34(2):117-25 (1997).

Liu H, Lu Q, Huang K. Selenium suppressed hydrogen peroxide-induced vascular smooth muscle cells calcification through inhibiting oxidative stress and ERK activation. *J Cell Biochem*. Dec 15;111(6):1556-64 (2010).

Lu H, Kanazawa M, Ishida A, Tufescu A, Sasaki Y, Ito O, Kurosawa H, Sato T, Ootaka T, Kohzuki M. Combination of chronic exercise and antihypertensive therapy enhances renoprotective effects in rats with renal ablation. *Am J Hypertens*. 22(10):1101-6, (2009).

Maschio G. Erythropoietin and systemic hypertension. *Nephrol Dial Transplant* 10:74–79 (1995).

Malyszko J. Mechanism of endothelial dysfunction in chronic kidney disease. *Clinica Chimica Acta*. 411(19-20):1412–1420 (2010).

Mayhan WG, Arrick DM, Sun H, Patel KP. Exercise training restores impaired dilator responses of cerebral arterioles during chronic exposure to nicotine. *J Appl Physiol*. 2010 Oct;109(4):1109-14.

Meziri F, Binda D, Touati S, Pellegrin M, Berthelot A, Touyz RM, Laurant P. Exercise aggravates cardiovascular risks and mortality in rats with disrupted nitric oxide pathway and treated with recombinant human erythropoietin. *Eur J Appl Physiol.* Aug;111(8):1929-38 (2011).

Mc Mahon M, Palmer RM. Exercise and hypertension. *Med Clin North Am.* 69(1):57-70 (1985).

Montezano AC, Touyz RM. Reactive Oxygen Species and Endothelial Function - Role of NOS Uncoupling and Nox Family NADPH Oxidases. *Basic Clin Pharmacol Toxicol.* 2011 Aug 22. [Epub ahead of print].

Moreno F, Sanz-Guajardo D, Lopez-Gomez JM, Jofre R, Valderrabano F. Increasing the hematocrit has a beneficial effect on quality of life and is safe in selected hemodialysis patients. Spanish Cooperative Renal Patients Quality of Life Study Group of the Spanish Society of Nephrology. *J Am Soc Nephrol.* 11:335-342 (2000).

Muller V, Tain YL, Croker B, Baylis C. Chronic nitric oxide deficiency and progression of kidney disease after renal mass reduction in the C57B16 mouse. *Am J Nephrol.* 32(6):575-80 (2010).

Mulvany MJ. Vascular remodelling of resistance vessels: can we define this? *Cardiovasc Res* 41:9–13 (1999).

Ochodnický P, Vettoretti S, Henning RH, Buikema H, Van Dokkum RP, de Zeeuw D. Endothelial dysfunction in chronic kidney disease: determinant of susceptibility to end-organ damage and therapeutic response. *Journal of nephrology*. 19(3):246–258 (2006).

Osato S, Onoyama K, Okuda S, Sanai T, Hori K, Fujishima M. Effect of swimming exercise on the progress of renal dysfunction in rat with focal glomerulosclerosis. *Nephron*. 55(3):306-11 (1990).

Pechter U, Ots M, Mesikepp S, Zilmer K, Kullisaar T, Vihalemm T, Zilmer M, Maaros, J: Beneficial effects of water-based exercise in patients with chronic kidney disease. *Int J Rehab Res*. 26:153–156, (2003).

Pellegrin M, Miguet-Alfonsi C, Bouzourene K, Aubert JF, Deckert V, Berthelot A, Mazzolai L, Laurant P. Long-term exercise stabilizes atherosclerotic plaque in ApoE knockout mice. *Med Sci Sports Exerc*. Dec;41(12):2128-35 (2009).

Petersen AMW, Pedersen BK. The anti-inflammatory effect of exercise *J Appl Physiol*.

98: 1154-1162 (2005).

Raine AE. Hypertension, blood viscosity, and cardiovascular morbidity in renal failure: implications of erythropoietin therapy. *Lancet*. Jan 16;1(8577):97-100 (1988).

Risdon RA, Sloper JC, de Vardener HE. Relationship between renal function and histologic changes found in renal biopsy specimens from patients with persistent glomerulonephritis. *Lancet*. 2:363–366 (1968).

Ruschitzka FT, Wenger RH, Stallmach T, Quaschnig T, de Wit C, Wagner K, Labugger R, Kelm M, Noll G, Rulicke T, Shaw S, Lindberg RL, Rodenwaldt B, Lutz H, Bauer C, Luscher TF, Gassmann M. Nitric oxide prevents cardiovascular disease and determines survival in polyglobulic mice overexpressing erythropoietin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97:11609-11613 (2000).

Scalera F, Kielstein JT, Martens-Lobenhoffer J, Postel SC, Tager M, Bode-Boger SM. Erythropoietin increases asymmetric dimethylarginine in endothelial cells: Role of dimethylarginine dimethylaminohydrolase. *J Am Soc Nephrol* 16: 892–898 (2005).

Smith KJ, Bleyer AJ, Little WC, Sane DC. The cardiovascular effects of erythropoietin. *Cardiovasc Res* 59: 538-548 (2003).

Szostak J, Laurant P. The forgotten face of regular physical exercise: a 'natural' anti-atherogenic activity. *Clin Sci (Lond)*. Aug 1;121(3):91-106 (2011).

Tedla FM, Brar A, Browne R, Brown C. Hypertension in chronic kidney disease: navigating the evidence. *Int J Hypertens*. 2011:132405 (2011).

Thomas, S.R., Chen, K. & Keaney, J.F. Oxidative stress and endothelial nitric oxide bioactivity. *Antioxid. Redox Signal* 5, 181-194 (2003).

Touati S, Meziri F, Devaux S, Berthelot A, Touyz RM, Laurant P. Exercise reverses metabolic syndrome in high-fat diet-induced obese rats. *Med Sci Sports Exerc*. Mar;43(3):398-407 (2011).

Touyz RM, Yao G, Viel E, Amiri F, Schiffrin EL. Angiotensin II and endothelin-1 regulate MAP kinases through different redox-dependent mechanisms in human vascular smooth muscle cells. *J Hypertens*. Jun;22(6):1141-9 (2004).

Vaziri ND, Ni Z, Zhang YP, Ruzics EP, Maleki P, Ding Y. Depressed renal and vascular nitric oxide synthase expression in cyclosporine-induced hypertension. *Kidney Int*. Aug;54(2):482-91 (1998).

Zalba G, Beaumont FJ, San José G, Fortuño A, Fortuño MA, Etayo JC, Díez J. Vascular NADH/NADPH oxidase is involved in enhanced superoxide production in spontaneously hypertensive rats. *Hypertension*. May;35(5):1055-61 (2000).

Sources of funding

This study was supported by grants from the Canadian Institutes of Health Research (R.M.T). R.M.T. is funded by a Canada Research Chair of the Canadian Institutes of Health Research and through the Canadian Foundation for Innovation. F.M. received a fellowship from Fondation Transplantation, France.

Disclosures

None.

Table 1. Different physiological, biochemical and morphological parameters.

	Sham	CKD	CKD+Ex	CKD+EPO	CKD+EPO+Ex
Body weight (g)	502 ± 10	496 ± 10	447 ± 6 *\$¶	490 ± 14	428 ± 10 *\$¶
Systolic blood pressure (mmHg)	142 ± 3	168 ± 4 *	150 ± 3 *\$¶	170 ± 4 *	152 ± 3 *\$¶
Endurance test (min)	12.0 ± 0.5	11.2 ± 0.5	16.6 ± 0.2 *\$¶£	13.0 ± 0.4	20.0 ± 0.5 *\$¶
Hematocrit (%)	45.3 ± 0.7	45.4 ± 0.7	43.9 ± 1.1	60.3 ± 2.5 *\$§	61.2 ± 1.8 *\$§
Hemoglobin (g/dl)	15.0 ± 0.2	15.1 ± 0.2	14.8 ± 0.4	19.5 ± 0.9 *\$§	20.3 ± 0.8 *\$§
Blood urea (mmol/l)	6.53 ± 0.35	9.21 ± 0.35 *	8.68 ± 0.28 *	8.37 ± 0.40 *	8.40 ± 0.31 *
Serum creatinine (µmol/l)	45.7 ± 2.8	65.1 ± 3.2 *	55.4 ± 3.0 *\$¶£	68.4 ± 3.8 *	63.9 ± 5.3 *
Creatinine clearance (ml/min)	1.69 ± 0.19	1.11 ± 0.09 *	1.49 ± 0.10 *\$¶£	1.12 ± 0.11 *	0.99 ± 0.06 *
Albuminuria (albumin/creatinine ratio)	3.2 ± 0.5	7.1 ± 1.3 *	4.3 ± 0.8 *\$¶£	7.8 ± 2.4 *	15.1 ± 3.9 *\$¶
Plasma TBARS (nmol/ml)	2.0 ± 0.4	4.1 ± 0.4 *	4.1 ± 1.6 *	2.1 ± 1.2 *\$§	2.9 ± 1.0 *\$§
Urine TBARS (nmol/ml)	17.4 ± 1.5	27.7 ± 2.0 *	28.7 ± 3.4 *	18.7 ± 0.9 *\$§	18.1 ± 1.8 *\$§
Collagen deposition in kidney	-	++	+	++	+++

* $p < 0.05$ vs Sham, \$ $p < 0.05$ vs CKD, § $p < 0.05$ vs CKD+Ex, ¶ $p < 0.05$ vs CKD+EPO, £ $p < 0.05$ vs CKD+EPO+Ex (n= 8-12)

Collagen content was assessed qualitatively according to the intensity of staining with a scale of - (no staining) to +++ (heavy staining). Grading of staining: -no change, +mild, ++ moderate, +++ severe

Table 2. The morphological characteristics of mesenteric resistance arteries at an intraluminal pressure of 60 mmHg.

	Sham	CKD	CKD+Ex	CKD+EPO	CKD+EPO+Ex
Lumen diameter(μm)	267 \pm 4	273 \pm 19	275 \pm 15	276 \pm 13	303 \pm 9 #
Media thickness(μm)	9.8 \pm 0.3	14.4 \pm 0.4 #	12.1 \pm 0.5 #	15.4 \pm 0.2 #	12.3 \pm 0.9 # \$
Media / lumen ratio (%)	3.7 \pm 0.1	5.6 \pm 0.6 #	4.5 \pm 0.4 #	5.7 \pm 0.3 #	4.1 \pm 0.1 # \$
External diameter(μm)	287 \pm 5	301 \pm 19	299 \pm 14	307 \pm 13	328 \pm 8 # \$
Media CSA (μm^2)	8578 \pm 344	12 983 \pm 993 #	10 796 \pm 619 #	14 398 \pm 796 #	12 102 \pm 743 #

Data are the mean \pm SEM. * $p < 0.05$ vs Sham, § $p < 0.05$ vs CKD+Ex, \$ $p < 0.05$ vs CKD and CKD+EPO, # $p < 0.05$ vs other groups

CSA, media cross-sectional area, n = 6

Legends

Figure 1. (A) Cumulative concentration–response curves to acetylcholine on norepinephrine-precontracted isolated aortic rings. Data represent the mean \pm SEM (n=8 to 12). * $p<0.05$ versus Sham, CKD+Ex and CKD+EPO+Ex. (B) Lumen diameter difference in response to increased flow rate on norepinephrine-precontracted perfused segments of mesenteric resistance arteries. Data represent mean \pm SEM (n=8 to 12). * $p<0.05$ versus Sham and CKD+Ex, § $p<0.05$ versus Sham, § $p<0.05$ versus other groups.

Figure 2. Renal collagen deposition in the 5 groups. Renal sections were stained with Sirius red, and collagen content was assessed using a standard grading scheme (Table 1). Images are representative of 4 rats in each group. Magnification: x100.

Figure 3. NAD(P)H oxidase activity in aorta (A) and kidney (D) homogenates assessed by lucigenin-derived chemiluminescence. p67 phox expression in aorta (B) and kidney (E) tissues, Nox4 expression in aorta (C) and kidney (F) tissues and representative Western blots. Data represent the mean \pm SEM (n=4 to 6). (E) * $p<0.05$ versus other groups. (F) * $p<0.05$ versus Sham, CKD+Ex and CKD+EPO+Ex.

Figure 4. eNOS phosphorylation in aorta (A) and kidney (C) tissues, eNOS expression in aorta (B) and kidney (D) tissues and representative Western blots. Data represent the mean \pm SEM (n=4 to 6). (A) * $p<0.05$ Sham and CKD, (D) * $p<0.05$ Sham and CKD+EPO+Ex.

Figure 5. SOD-1 expression in aorta (A) and kidney (C) tissues, thioredoxin expression in aorta (B) and kidney (D) tissues and representative Western blots. Data represent the mean \pm SEM (n=4 to 6). * $p<0.05$ Sham.

Figure 6. erk 1/2 expression in kidney tissue and representative Western blots. Data represent the mean \pm SEM (n=4 to 6). * $p<0.05$ versus Sham, CKD+Ex and CKD+EPO, § $p<0.05$ Sham.

Figure 1

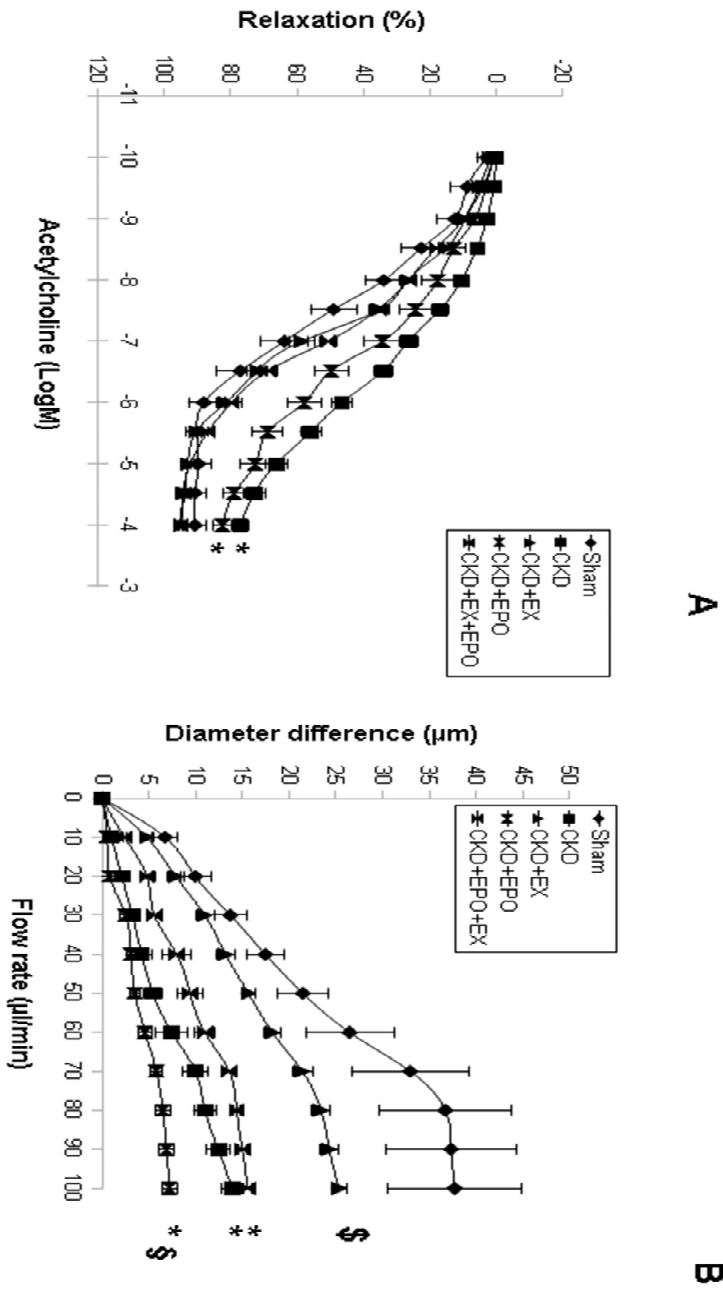


Figure 2

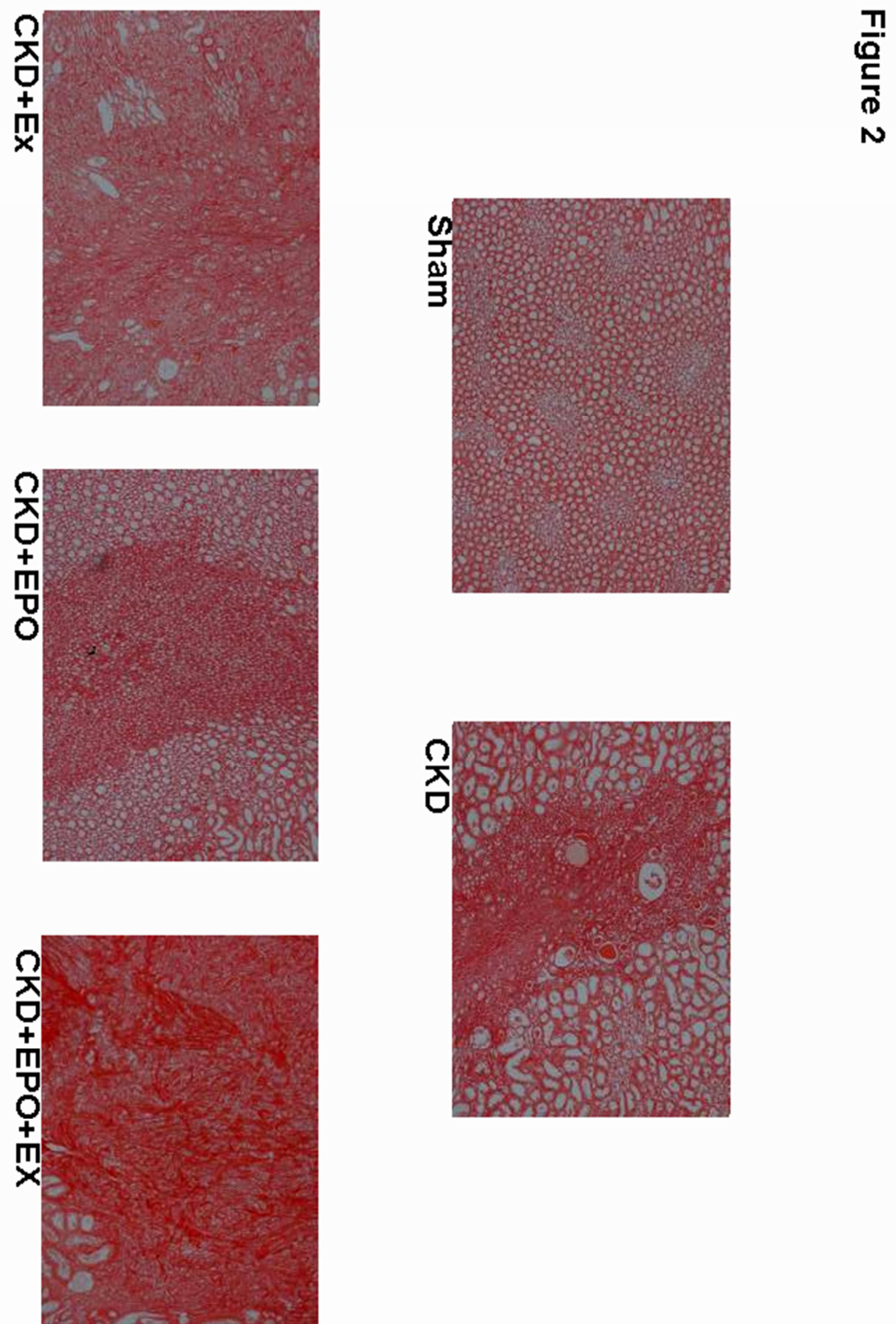


Figure 3

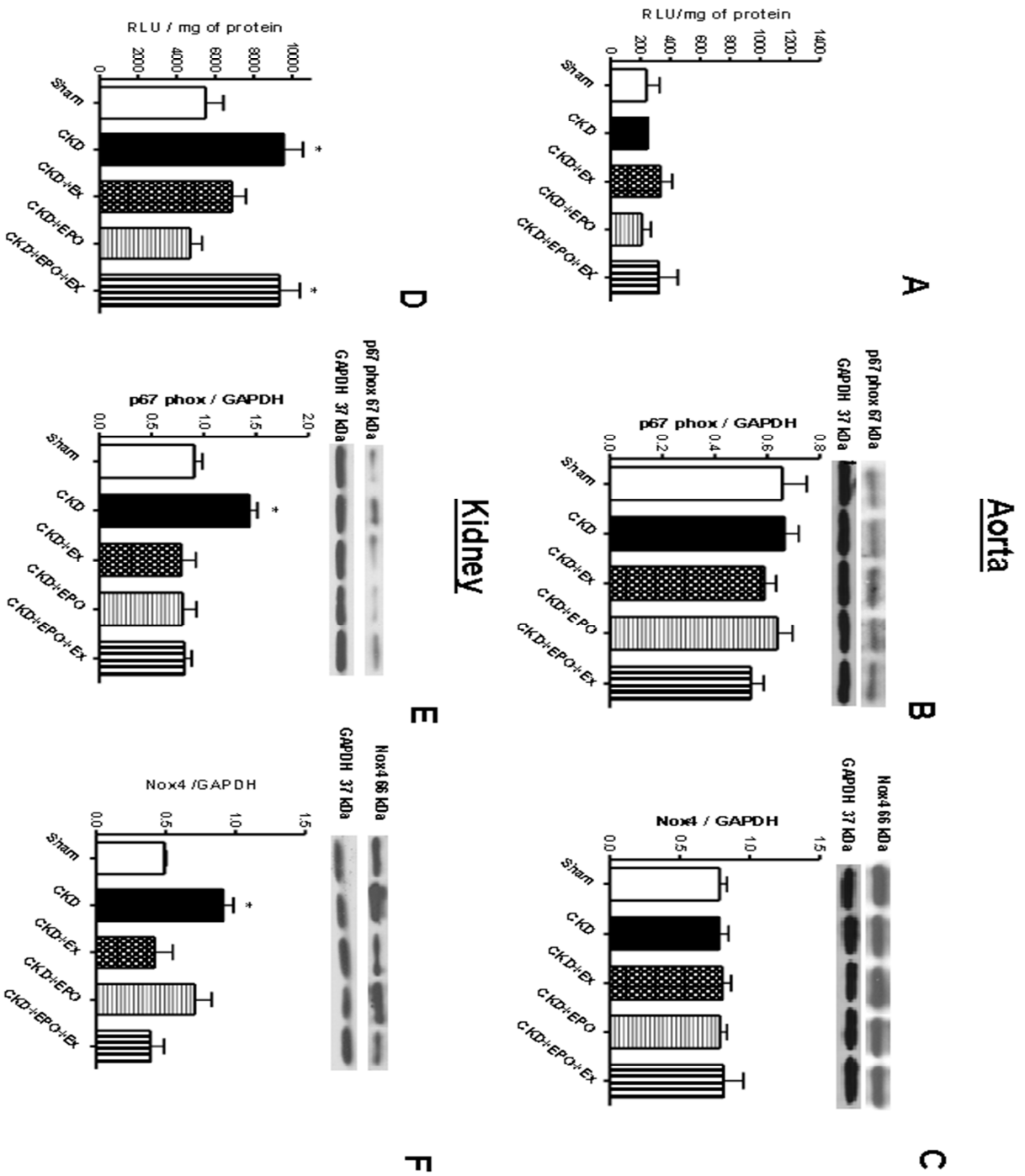


Figure 4

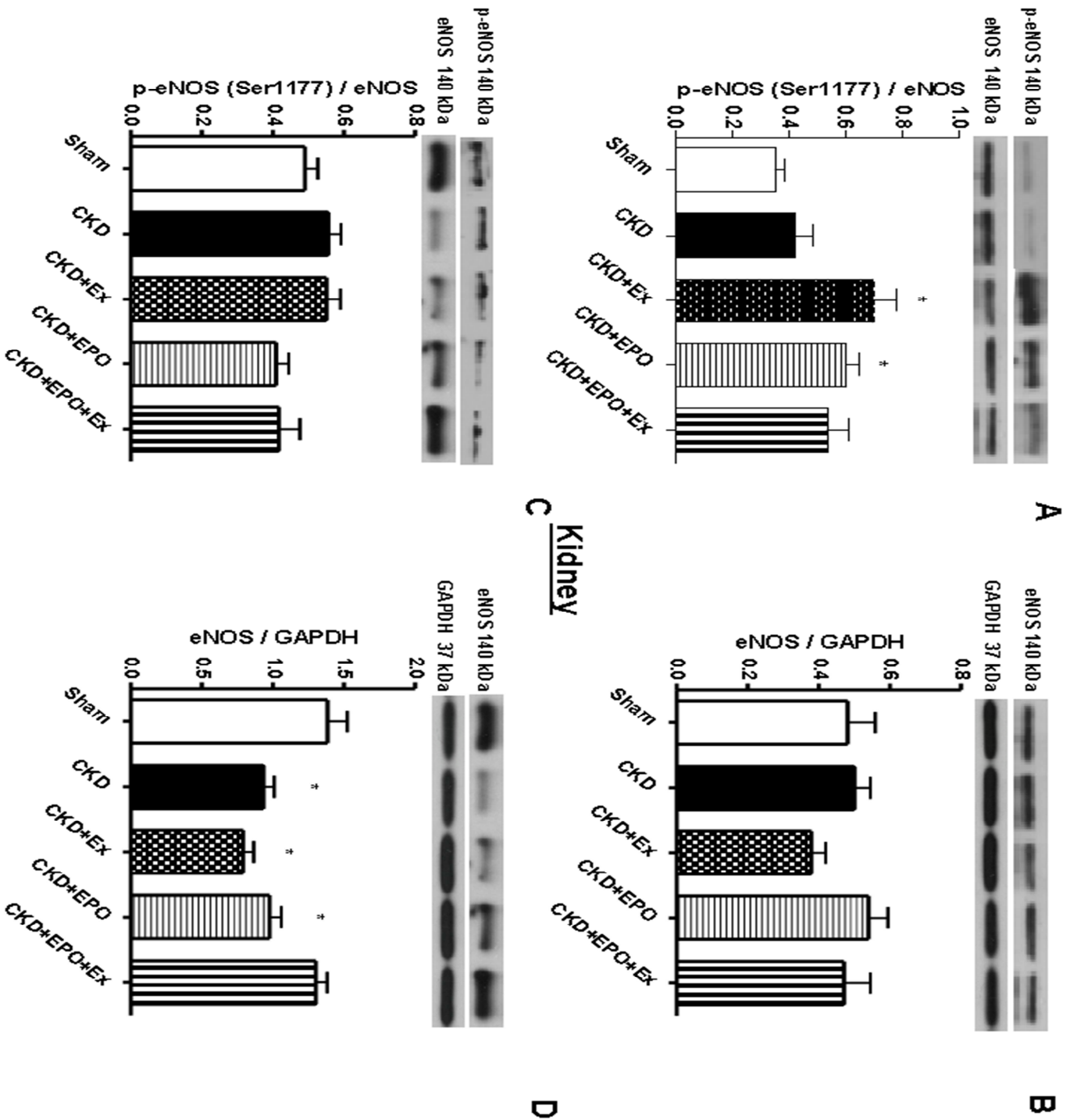


Figure 5

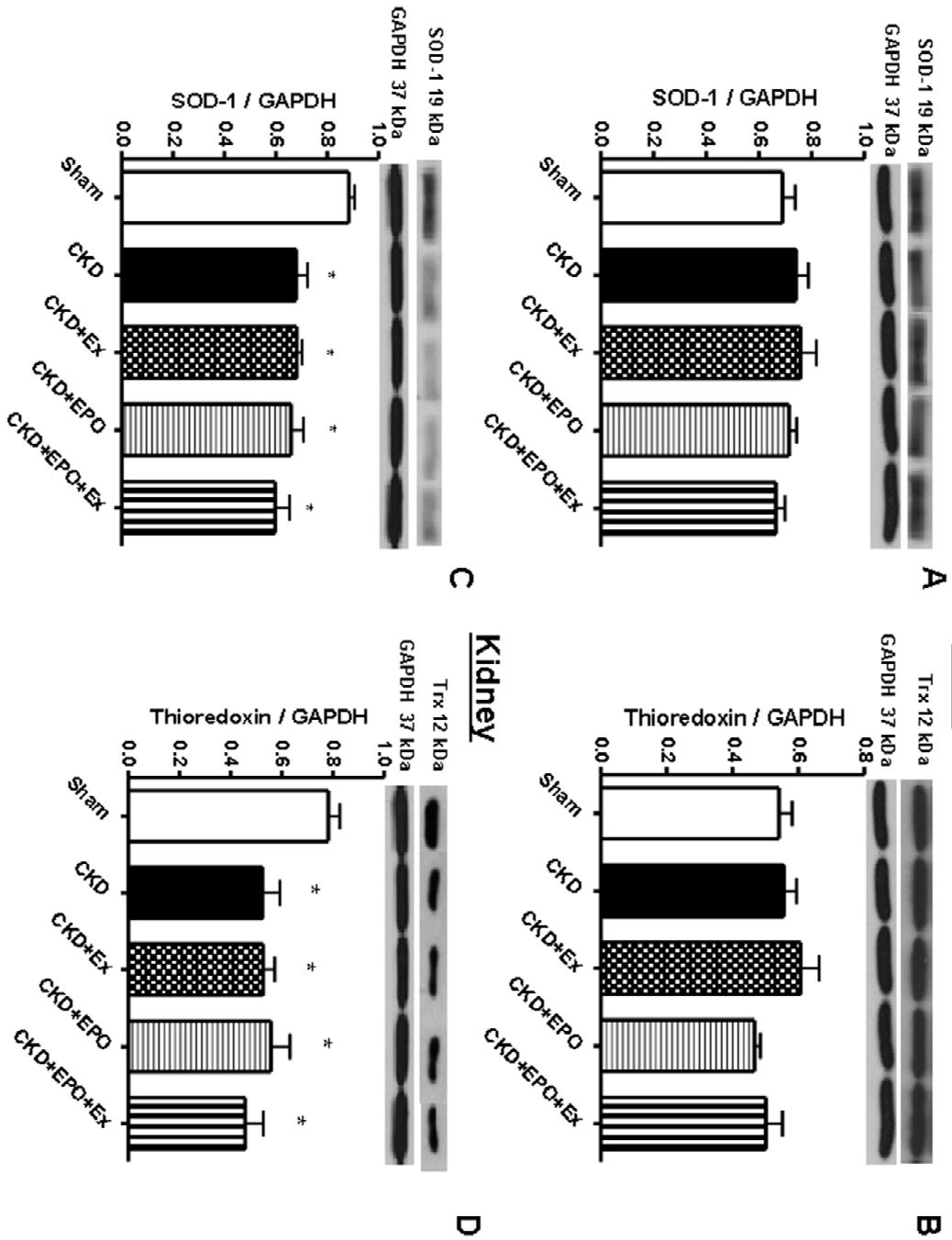
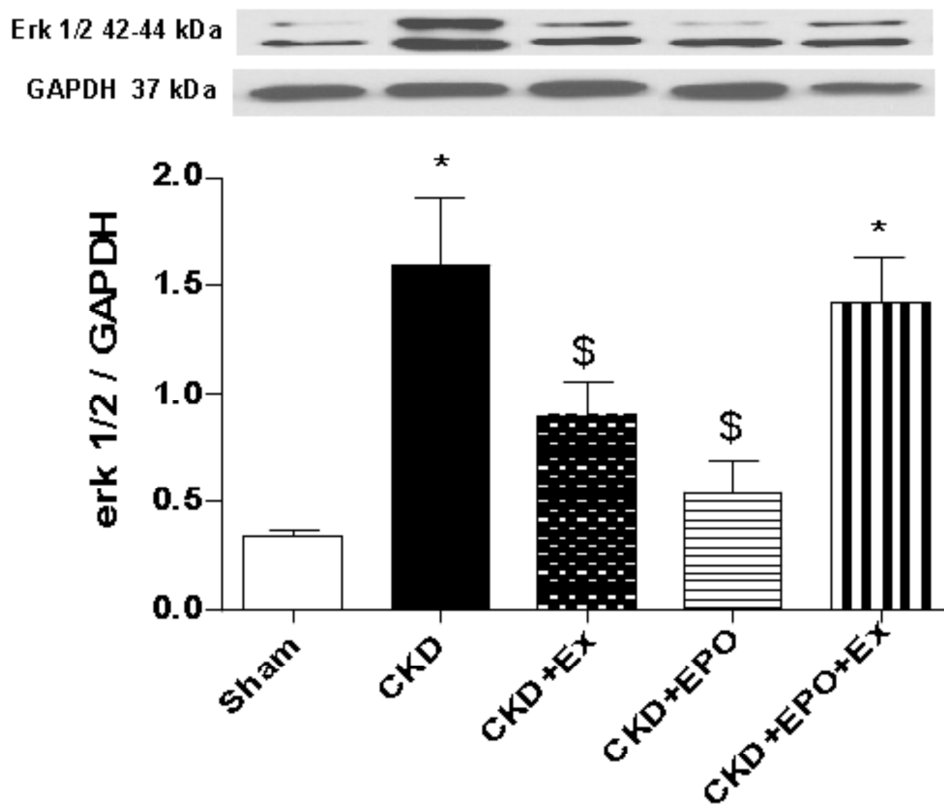


Figure 6



4. Discussion et conclusion :

Notre étude montre que l'exercice physique prévient l'élévation de la pression artérielle, les dysfonctions endothéliale et rénale chez le rat IRC. De plus, il exerce aussi un effet antioxydant et antiprolifératif. Par contre, quand l'exercice est combiné à un traitement rHuEPO, les effets bénéfiques de l'entraînement sont altérés : la combinaison aggrave la dysfonction et la fibrose rénale des rats IRC.

Nous avons montré dans cette étude que les altérations fonctionnelles (dysfonction endothéliale NO-dépendante et dysfonction rénale) liées à l'IRC, étaient associées à une augmentation du stress oxydatif systémique et rénal. Cette dernière est caractérisée par une augmentation de la production des TBARS urinaires et plasmatiques, une stimulation de l'activité de la NAD(P)H oxydase, de l'expression de ses sous-unités p67phox et Nox4 et une réduction des défenses antioxydantes, thiorédoxine et SOD-1, au niveau rénal.

L'effet bénéfique de l'exercice dans cette étude est associé à une amélioration de la morphologie des petites artères. L'IRC a induit un épaississement de la média, un élargissement de la surface de la média (media CSA) au niveau des petites artères mésentériques. Cependant, l'exercice a eu un effet protecteur, en diminuant le diamètre de la média, de sa surface et du rapport média/lumière chez les rats IRC. Ceci suggère donc que l'effet anti-hypertenseur de l'exercice s'accompagne de changements structurels bénéfiques au niveau des petites artères. Les raisons de cette protection ne sont pas connues mais il est probable, que la prévention d'une élévation de la pression artérielle par l'entraînement et donc, d'une moins forte contrainte mécanique tangentielle sur la

paroi artérielle, contribue à prévenir un remodelage artérielle caractéristique de l'HTA au niveau des petites artères (Kuru et coll., 2009).

Il a été aussi démontré dans cette étude, une prévention de la dysfonction endothéliale par l'exercice au niveau de l'aorte et des petites artères mésentériques, ainsi qu'une prévention de la dysfonction rénale. Ces effets bénéfiques ont probablement contribué à la prévention de l'apparition et l'aggravation de l'HTA et les dommages au niveau rénal. Au niveau de l'aorte, où la fonction endothéliale a été complètement restaurée par l'exercice, nous avons observé une augmentation de la phosphorylation de la eNOS (Ser1177). Par contre, au niveau mésentérique, la réponse NO-dépendante au flux intravasculaire n'a pas été totalement corrigée. Ceci pourrait être expliqué par le fait que la réponse NO-dépendante et la production de NO est plus sensible à la stimulation pharmacologique par l'acétylcholine (aorte) qu'à la stimulation mécanique et physiologique en réponse aux forces de cisaillement (petites artères mésentériques). Par ailleurs, l'influence des petites artères, comme les petites artères mésentérique, sur le contrôle des résistances périphériques vasculaires et, conséquemment, l'apparition de l'HTA est plus grande que les changements fonctionnels au niveau de l'aorte qui est une artère de conduction avec des résistances à l'écoulement sanguin pratiquement nulles (Christensen et Buus, 2011). Nous n'avons pas mesuré au niveau du lit artériel mésentérique, l'activité et l'expression de la eNOS. Ces mesures, effectivement, nous auraient permis de vérifier si l'état de phosphorylation et l'expression de la eNOS corroborait le niveau de vasodilatation flux- et endothélium-dépendant enregistré au niveau de l'artère mésentérique du rat IRC avec ou sans entraînement.

Les effets néfastes de l'IRC ont été beaucoup plus importants au niveau rénal qu'au niveau vasculaire. En effet, au niveau de l'aorte, nous n'avons pas observé de changements dans les statuts oxydant et antioxydants. L'activité NAD(P)H oxydase n'a pas été augmenté chez les rats IRC, ni diminuée par l'exercice. Différents travaux, montre le contraire, l'activité NAD(P)H oxydase est augmentée au niveau de l'aorte chez le rat néphrectomisé (5/6) (Vaziri et coll., 2010 ; Namikoshi et coll., 2009). Il se pourrait que dans notre étude, l'installation et l'accentuation d'un stress oxydant significatif au niveau de l'aorte auraient demandé plus de temps pour des raisons qui restent à déterminer.

Une autre importante observation dans cette étude, est l'effet bénéfique de l'exercice qui passe par l'amélioration du statut oxydant sans pour autant améliorer les défenses antioxydantes. En effet, l'exercice a diminué l'activité de la NAD(P)H oxydase et de l'expression de la p67phox et de la Nox4 au niveau rénal. Par contre, l'expression de la SOD-1 et de la thiorédoxine n'a pas été modulée par l'exercice. Ce qui suggère un effet direct de l'exercice sur la diminution de la production des ROS au niveau rénal.

Dans notre première étude, le L-NAME inhibe la eNOS en continue et en absence de NO, un effet vasoconstricteur semble perdurer avec la rHuEPO (lié à une production excessive d'ET-1 peut-être). Par contre, chez les rats IRC, l'exercice est soumis en même temps que l'IRC. Donc la dysfonction endothéliale n'est pas installée et l'exercice ne fait que prévenir ou ralentir son apparition. Pour cette raison, il serait bon de refaire cette étude en démarrant le protocole d'exercice et le traitement rHuEPO quelques semaines après l'ablation de la masse rénale et lorsque la dysfonction endothéliale est installée. En plus, dans ce cadre là, nous pourrions étudier les effets thérapeutiques de l'exercice et/ou

du traitement rHuEPO et non leurs effets préventifs.

Nous montrons que le traitement rHuEPO supprime les effets bénéfiques de l'exercice sur la fonction rénale. L'exercice combiné à un traitement rHuEPO n'a plus l'effet protecteur sur les niveaux de la créatinémie, de la clairance de la créatinine et l'expression des MAPK erk 1/2. De plus, cette dysfonction rénale a été aggravée. Nous avons observé une nette augmentation de l'albuminurie (à un niveau deux fois supérieur à celui des rats IRC), un plus fort dépôt de collagène au niveau du tissu rénal et par conséquent, une fibrose plus prononcée. Ce qui nous ramène aux résultats de notre première étude et démontre encore une fois que l'exercice combiné à un traitement rHuEPO peut avoir de graves conséquences sur les fonctions physiologiques, telle que la fonction rénale et sa structure.

En conclusion, nous avons démontré que l'exercice prévenait l'HTA, les dysfonctions endothéliale et rénale chez le rat IRC, en stimulant l'activité de la eNOS et en diminuant l'activité de la NAD(P)H oxydase rénale et l'expression de la p67phox et de la Nox4. Les effets bénéfiques de l'exercice sont altérés par le traitement rHuEPO notamment au niveau rénal. La dysfonction rénale est aggravée par une fibrose excessive et une stimulation de l'activité de la NAD(P)H oxydase et de la voie des MAPK erk 1/2.

DISCUSSION ET CONCLUSION
GÉNÉRALES

L'érythropoïétine recombinante humaine est indispensable dans le traitement des anémies, notamment chez les patients IRC. Son utilisation clinique a été largement déviée et nombreux sont les sportifs à l'avoir utilisé comme moyen de dopage afin d'augmenter leur capacités d'oxygénation, notamment dans les sports d'endurance (cyclisme, marathon...). Malgré les risques connus et malgré les morts suspectes depuis les années 90, son utilisation abusive dans le monde du sport reste d'actualité.

Dans nos études, le traitement rHuEPO combiné à un entraînement induit de graves conséquences sur la fonction cardiovasculaire chez le rat "dopé" possédant une dysfonction endothéliale (induite par le L-NAME) et de graves conséquences sur la fonction rénale chez les rat IRC. Cette aggravation n'est pas observée chez les mêmes rats sédentaires (L-NAME+rHuEPO et CKD+EPO). L'exercice, connu pour ces effets bénéfiques, a donc été un facteur déterminant dans l'accentuation du risque vasculaire et rénal chez le rat traité à la rHuEPO. La présence d'une dysfonction endothéliale et, par conséquent, la diminution de la production de NO, semblent donc déterminantes dans l'absence de protection cardiovasculaire. De plus l'augmentation du stress oxydatif au niveau rénal chez les rats IRC, serait à la fois, à l'origine de la dysfonction endothéliale et la conséquence de cette dernière selon la littérature (Förstermann, 2010).

Les effets délétères connus de la rHuEPO semblent être accentués en présence d'une dysfonction endothéliale lors d'un exercice. Les voies de risques que nous

Discussion et conclusion générales

suggérons sont la diminution de la biodisponibilité de NO et malgré le taux inchangé d'ET-1 chez les rats L-NAME-rHuEPO-exercice, le déséquilibre aurait été en faveur de l'ET-1, dont les effets favorisant la vasoconstriction et la prolifération tissulaire pourraient expliquer l'HTA sévère des rats L-NAME sportifs, via une élévation des forces de cisaillement lors de l'exercice (Barhoumi et coll., 2011). Donc, il y a une augmentation de l'action vasoconstrictrice résultante de l'inhibition de la eNOS, de l'exercice physique et du traitement rHuEPO. De plus, il a été démontré que le déclin de la production de NO peut aussi, en plus de stimuler la production d'ET-1, induire la production de taux élevés de cytokines pro-inflammatoires dans un contexte urémique (Gunthner et coll., 2009) (figures 8 et 9).

Il faut noter l'absence d'effet permissif néfaste de la combinaison rHuEPO/exercice chez les rats IRC, comme on a pu l'observer dans la première étude avec le L-NAME. En effet, contrairement à la première étude, l'exercice a pu corriger la pression artérielle chez le rat IRC malgré la présence d'une dysfonction endothéliale (figure 9). Cela pourrait être dû au fait que le L-NAME agit de façon plus efficace sur l'inhibition de la eNOS et que chez le rat IRC, on peut suggérer que la production de NO (non-mesurée) reste suffisante pour contrer les effets de la combinaison rHuEPO-exercice. De plus, le L-NAME n'est pas spécifique à la eNOS, c'est un inhibiteur total des différentes NOS (nNOS et iNOS). Il aurait été intéressant de refaire la première étude en utilisant des souris transgéniques déficientes n'exprimant pas la eNOS.

Il ne faut pas oublier l'importance du rein dans la régulation de la pression artérielle via le système rénine-angiotensine-aldostérone (SRAA). Ce qui nous mène à

nous demander comment, malgré la dysfonction rénale aggravée, la pression artérielle a été corrigée chez les rats IRC entraînés et traités à la rHuEPO ? On peut suggérer un effet compensatoire vasculaire systémique par l'amélioration de la dysfonction endothéliale. De plus, il a été démontré que l'exercice diminuait l'expression des récepteurs AT1 de l'Ang II et, de ce fait, diminuait largement la vasoconstriction (Adams et coll., 2005).

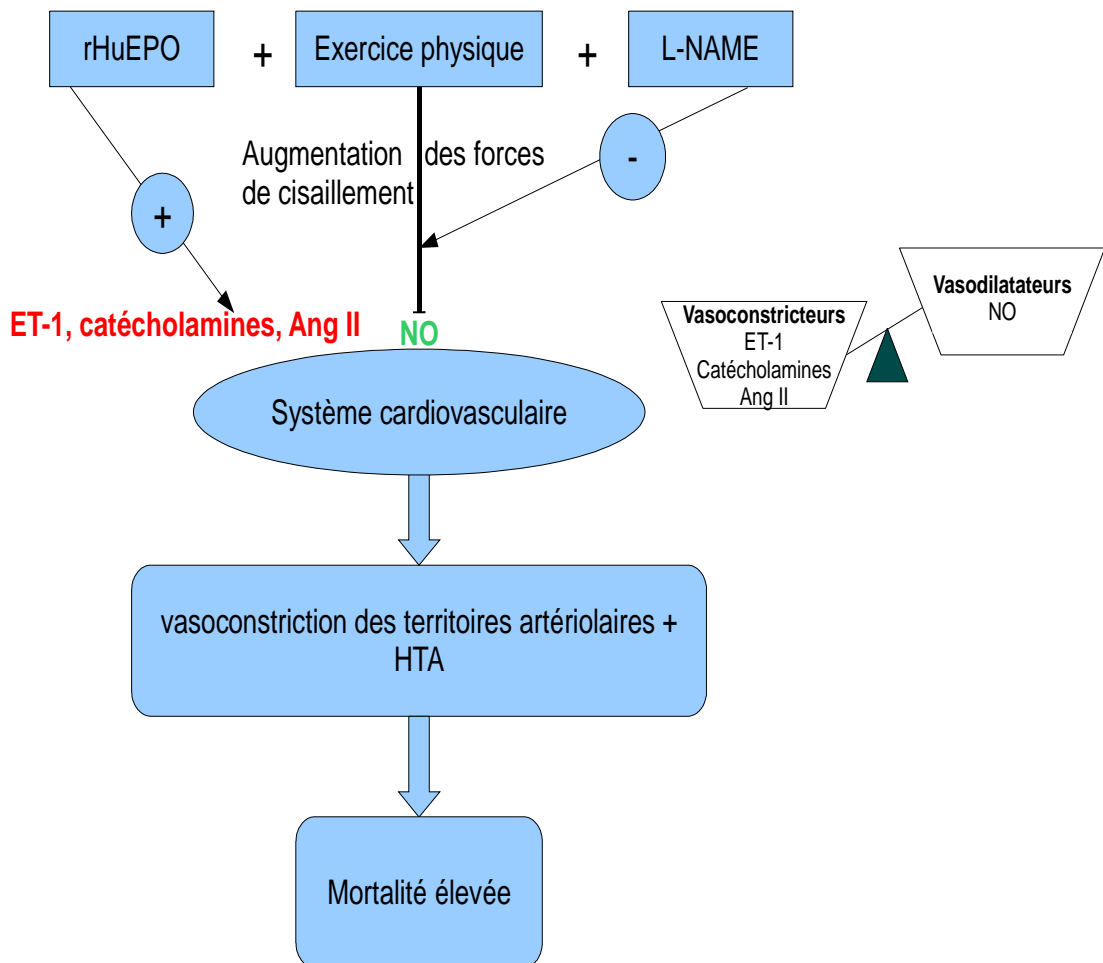


Figure 8 : Schéma représentant les effets proposés de la combinaison L-NAME+rHuEPO+exercice. L'exercice augmente les forces de cisaillement sur la paroi vasculaire, ce qui provoque la stimulation de la production de NO. D'un autre côté, le L-NAME inhibe la production de NO et la rHuEPO stimule la production et l'activité de vasoconstricteurs comme l'ET-1, les catécholamines et l'Ang II. Un déséquilibre entre la balance des vasoconstricteurs et vasodilatateurs s'installe en faveur des premiers. En absence de NO, la vasoconstriction est accentuée, l'HTA est augmentée et cet état mène à une mortalité élevée.

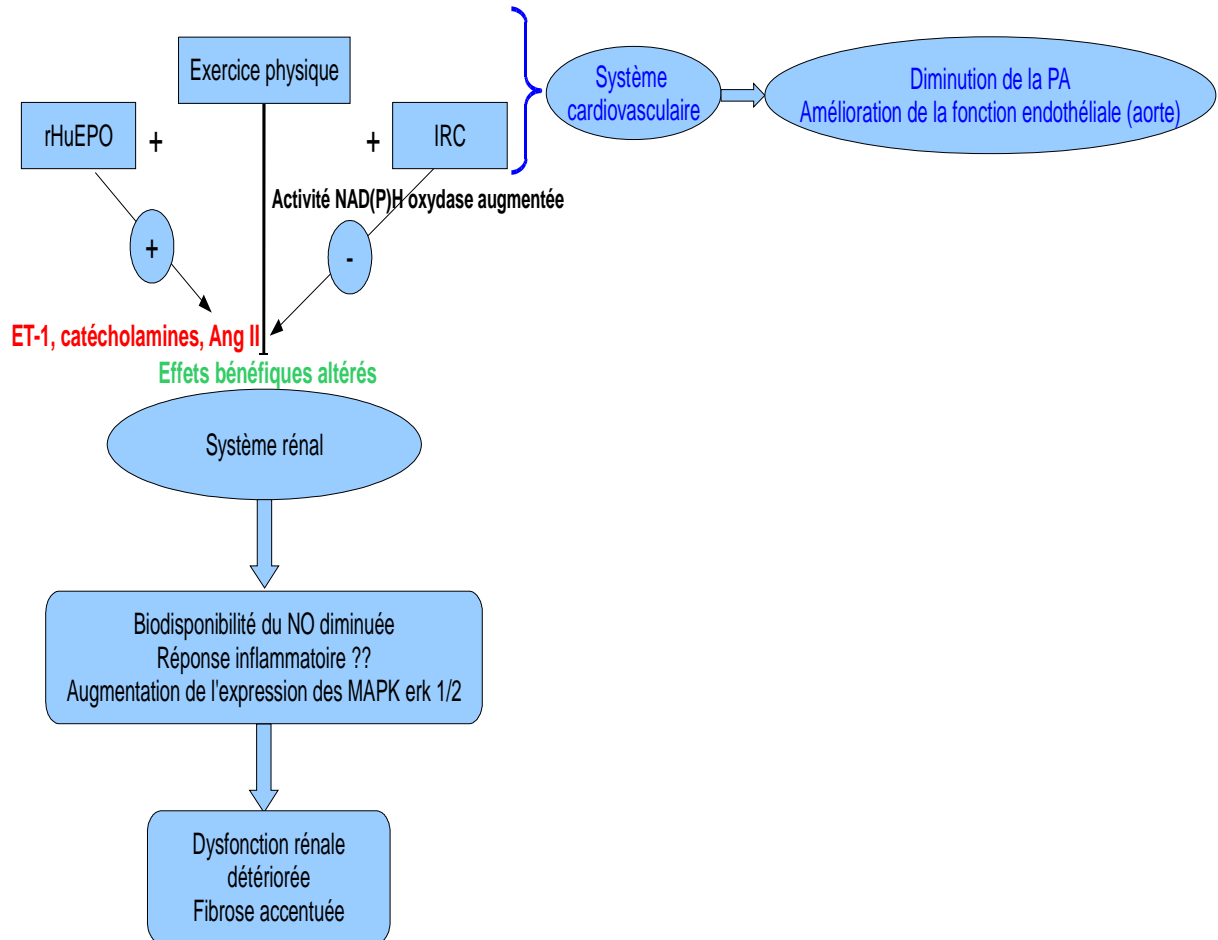


Figure 9 : Schéma représentant les effets proposés de la combinaison IRC+rHuEPO+exercice. L'exercice qui a montré des effets bénéfiques au niveau rénal (augmentation de la clairance de la créatinine, diminution de l'albuminurie, diminution de l'expression des erk 1/2) montre un effet inverse quand il est combiné à la rHuEPO chez le rat IRC. L'IRC, via une augmentation de l'activité de la NAD(P)H oxydase augmente le stress oxydant (qui contribuerait à la dysfonction endothéliale) et de son côté la rHuEPO stimule la production et l'activité de vasoconstricteurs comme l'ET-1, les catécholamines et l'Ang II. Le rein présenterait une réponse inflammatoire, une augmentation de l'expression des MAPK, un recrutement de cellules inflammatoires et de macrophages. Il s'ensuit une prolifération et une migration de fibroblastes qui aboutit finalement à la fibrose interstitielle. Ces altérations détériorent encore plus la fonction rénale (cf. Revue de littérature). Par contre, la combinaison rHuEPO+exercice diminue la pression artérielle chez le rat IRC et prévient la dysfonction endothéliale au niveau de l'aorte.

Discussion et conclusion générales

Les bénéfices de l'exercice seul chez le rat IRC semblent, dans notre étude, passer par l'amélioration du statut oxydant. En effet, l'activité de la NAD(P)H oxydase est diminuée par l'exercice au niveau rénal. Néanmoins, comme les défenses antioxydantes ne sont pas améliorées par l'exercice, nous suggérons que l'effet de ce dernier passe par la diminution de la production des ROS et par conséquent, une protection de la fonction endothéliale et une meilleure biodisponibilité du NO.

Par contre, l'effet bénéfique sur l'HTA quand l'exercice est combiné au traitement rHuEPO, ne semble pas passer directement par l'amélioration du stress oxydant au niveau rénal. En effet, l'activité de la NAD(P)H oxydase reste élevée lorsque l'exercice est combiné à la rHuEPO chez le rat IRC. Comme nous l'avions signalé plus haut, nous suggérons un effet vasculaire direct (balance entre vasodilatateurs (ex : NO) et vasoconstricteurs (ex : ET-1) en faveur des premiers) et/ou une diminution de la vasoconstriction liée à une diminution de l'expression des récepteurs AT1 de l'Ang II (Adams et coll., 2005).

Dans les perspectives, il serait intéressant d'approfondir les investigations sur les différentes voies signalétiques et les mécanismes moléculaires impliquées dans l'aggravation de la dysfonction rénale. L'étude du rôle de l'inflammation en dosant les marqueurs tels : IL-1, IL-6, IL-10, MCP-1, VCAM et ICAM et les facteurs de transcriptions tels que NF κ B et AP-1. Sans oublier l'étude du SRAA qui semble être un agent non négligeable dans l'apparition et l'aggravation de l'hypertension chez les patients IRC (Billet et coll., 2008). D'autre part, transposer la 2^{ème} étude sur l'homme donnerait de meilleures indications cliniques. On pourrait étudier les effets d'un

Discussion et conclusion générales

programme d'exercice, chez des patients IRC traités à la rHuEPO, sur les différents marqueurs de l'IRC, du stress oxydant, de l'inflammation et de la fonction endothéliale.

En conclusion, l'exercice physique, combiné à un traitement à la rHuEPO, semble avoir un effet inverse que celui attendu. Il est capable d'aggraver les risques cardiovasculaires surtout en présence d'une dysfonction endothéliale. L'altération de la fonction endothéliale apparaît comme un risque qui élimine un agent protecteur majeur qu'est le NO. Les effets nocifs semblent passer par l'augmentation des effets vasoconstricteurs. De plus, le traitement à la rHuEPO chez le rat IRC détériore encore plus la fonction et la structure rénales quand il est combiné à l'exercice (alors que l'exercice ou la rHuEPO, quand ils sont utilisés seuls chez le rat IRC, ont des effets bénéfiques). L'effet protecteur de l'exercice sur le rein du rat IRC, semble s'exercer via la modulation de l'activité de la NAD(P)H oxydase sans pour autant moduler l'activité des défenses antioxydantes, elles-mêmes altérées par l'IRC. L'effet protecteur de l'exercice semble lié à une augmentation de la production/biodisponibilité du NO au niveau vasculaire (aorte). Ainsi, le traitement à la rHuEPO, malgré ses effets bénéfiques et indispensables en cas d'anémie, associé un programme d'entraînement, devrait être considéré comme un traitement risqué, à la fois dans les domaines sportif et clinique. Il est donc primordial d'une part, de sensibiliser de plus en plus les sportifs et ça dès le plus jeune âge aux dangers du dopage et d'autre part, de prendre toutes les précautions nécessaires chez les patients IRC traités à la rHuEPO et soumis à un programme d'exercice physique. Mais il ne faut surtout pas oublier que l'exercice physique reste l'un des meilleurs moyens pharm-écologiques de prévention et de traitement des maladies chroniques.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Références bibliographiques

Adams, B.J., Carr, J.G., Ozonoff, A., Lauer, M.S. & Balady, G.J. Effect of exercise training in supervised cardiac rehabilitation programs on prognostic variables from the exercise tolerance test. *Am. J. Cardiol* 101, 1403-1407 (2008).

Adams V, Linke A, Kränkel N, Erbs S, Gielen S, Möbius-Winkler S, Gummert JF, Mohr FW, Schuler G, Hambrecht R.. Impact of regular physical activity on the NAD(P)H oxidase and angiotensin receptor system in patients with coronary artery disease. *Circulation* 111, 555-562 (2005).

Abramowicz M. Darbepoetin (Aranesp)- A long-acting erythropoietin. *Med Lett.* 43:109-110 (2001).

Amabile N, Guérin AP, Leroyer A, Mallat Z, Nguyen C, Boddaert J, London GM, Tedgui A, Boulanger CM. Circulating endothelial microparticles are associated with vascular dysfunction in patients with end-stage renal failure. *J Am Soc Nephrol.* 16, 3381-3388 (2005).

Anderson JE, Boivin MR Jr, Hatchett L. Effect of exercise training on interdialytic ambulatory and treatment-related blood pressure in hemodialysis patients. *Ren Fail.* 26: 539-544 (2004).

Atamer A, Bilici A, Yenice N, Selek S, Ilhan N, Atamer Y. The importance of

Références bibliographiques

paraoxonase 1 activity, nitric oxide and lipid peroxidation in hepatosteatosis. *J. Int. Med. Res* 36, 771-776 (2008).

Aznar-salatti J, Escolar G, Cases A, Gómez-Ortiz G, Anton P, Castillo R, Revert L, Ordinas A. Uraemic medium causes endothelial cell dysfunction characterized by an alteration of the properties of its subendothelial matrix. *Nephrol Dial Transplant*. 10, 2199-2204 (1995).

Banerjee D, Rodriguez M, Nag M, Adamson JW. Exposure of endothelial cells to recombinant human erythropoietin induces nitric oxide synthase activity. *Kidney Int*. 57:1895-904 (2000).

Barhoumi T, Jallat I, Berthelot A, Laurant P. Human recombinant erythropoietin alters the flow-dependent vasodilatation of in vitro perfused rat mesenteric arteries with unbalanced endothelial endothelin-1 / nitric oxide ratio. *Can J Physiol Pharmacol*. Jun;89(6):435-43 (2011).

Bedard K & Krause K. The NOX family of ROS-generating NADPH oxidases: physiology and pathophysiology. *Physiol. Rev* 87, 245-313 (2007).

Bernaudin M, Bellail A, Marti HH, Yvon A, Vivien D, Duchatelle I, Mackenzie ET, Petit E. Neurons and astrocytes express EPO mRNA: oxygen-sensing mechanisms that involve

Références bibliographiques

the redox-state of the brain. *Glia*. May;30(3):271-8 (2000).

Billet S, Aguilar F, Baudry C, Clauser E. Role of angiotensin II AT1 receptor activation in cardiovascular diseases. *Kidney Int*. Dec;74(11):1379-84 (2008).

Binet C. Site internet de la faculté de médecine de Tours. Nov 2009. <http://fmc.med.univ-tours.fr/Pages/Hemato/DES/A12-Erythropoiese.htm>

Boyce ML, Robergs RA, Avasthi PS. Exercise training by individuals with predialysis renal failure: cardiorespiratory endurance, hypertension, and renal function. *Am J Kidney Dis*. 30: 180–192 (1997).

Bradley JR, Evans DB, Cowley AJ. Abnormalities in the peripheral circulation in patients with chronic renal failure. *Nephrol Dial Transplant*. 3, 412-416 (1988).

Bullard AJ, Yellon DM. Chronic erythropoietin treatment limits infarct-size in the myocardium in vitro. *Cardiovasc Drugs Therapy*. 19:333-336 (2005).

Cai, H. & Harrison, D.G. Endothelial dysfunction in cardiovascular diseases: the role of oxidant stress. *Circ. Res* 87, 840-844 (2000).

Canestrari F, Buoncristiani U, Galli F, Giorgini A, Albertini MC, Carobi C, Pascucci M,

Références bibliographiques

Bossù M. Redox state, antioxidative activity and lipid peroxidation in erythrocytes and plasma of chronic ambulatory peritoneal dialysis patients. *Clin Chim Acta*. Jan 31;234(1-2):127-36 (1995).

Charney DI, Walton DF, Cheung AK. Atherosclerosis in chronic renal failure. *Curr Opin Nephrol Hypertens*. Nov;2(6):876-82 (1993).

Cheema BSB, Fiatarone Singh MA. Exercise training in patients receiving maintenance hemodialysis: a systematic review of clinical trials. *Am J Nephrol*. 25: 352–364 (2005).

Chicco AJ, Chicco AJ, McCune SA, Emter CA, Sparagna GC, Rees ML, Bolden DA, Marshall KD, Murphy RC, Moore RL. Low-intensity exercise training delays heart failure and improves survival in female hypertensive heart failure rats. *Hypertension* 51, 1096-1102 (2008).

Christensen KL, Buus NH. Dissociation of Blood Pressure and Resistance Artery Structure: Potential Clinical Implications. *Basic Clin Pharmacol Toxicol*. 2011 Sep 15. doi: 10.1111/j.1742-7843.2011.00799.x. [Epub ahead of print]

Corson MA, James NL, Latta SE, Nerem RM, Berk BC, Harrison DG. Phosphorylation of endothelial nitric oxide synthase in response to fluid shear stress. *Circ. Res* 79, 984-991 (1996).

Références bibliographiques

Dalle-Donne I, Rossi R., Colombo R., Giustarini D, Milzani A. Biomarkers of oxidative damage in human disease. *Clin. Chem* 52, 601-623 (2006).

Dame C, Fahnenstich H, Freitag P, Hofmann D, Abdul-Nour T, Bartmann P, Fandrey J. Erythropoietin mRNA expression in human fetal and neonatal tissue. *Blood*. 92(9): p. 3218-25 (1998).

Dantas EM, Pimentel EB, Gonçalves CP, Lunz W, Rodrigues SL, Mill JG. Effects of chronic treadmill training on body mass gain and visceral fat accumulation in overfed rats. *Braz. J. Med. Biol. Res* 43, 515-521 (2010).

Davies MJ. Singlet oxygen-mediated damage to proteins and its consequences. *Biochem. Biophys. Res. Commun* 305, 761-770 (2003).

De Filippis E, Cusi K, Ocampo G, Berria R, Buck S, Consoli A, Mandarino LJ. Exercise-induced improvement in vasodilatory function accompanies increased insulin sensitivity in obesity and type 2 diabetes mellitus. *J. Clin. Endocrinol. Metab* 91, 4903-4910 (2006).

De La Fuente, Hernanz A, Vallejo MC. The immune system in the oxidative stress conditions of aging and hypertension: favourable effects of antioxidants and physical exercise. *Antioxid Redox Sig.* 7:1356-1366 (2005).

Références bibliographiques

Delanghe JR, Bollen M, Beullens M. Testing for recombinant erythropoietin. *Am J Hematol.* 83: 237–41 (2008).

Del Castillo D, Raij L, Shultz PJ, Tolins JP. The pressor effect of recombinant human erythropoietin is not due to decreased activity of the endogenous nitric oxide system. *Nephrol Dial Transplant* 10(4): 505-8 (1995).

De Lemos ET, Reis F, Baptista S, Pinto R, Sepodes B, Vala H, Rocha-Pereira P, Silva AS, Teixeira F. Exercise training is associated with improved levels of C-reactive protein and adiponectin in ZDF (type 2) diabetic rats. *Med. Sci. Monit* 13, BR168-174 (2007).

De Leo FR & Quinn MT. Assembly of the phagocyte NADPH oxidase: molecular interaction of oxidase proteins. *J. Leukoc. Biol* 60, 677-691 (1996).

Deligiannis A, Kouidi E, Tassoulas E, Gigis P, Tourkantonis A, Coats A. Cardiac effects of exercise rehabilitation in hemodialysis patients. *Int J Cardiol.* 70: 253–266 (1999).

De Moraes C, Davel AP, Rossoni LV, Antunes E, Zanesco A. Exercise training improves relaxation response and SOD-1 expression in aortic and mesenteric rings from high caloric diet-fed rats. *BMC Physiol* 29(8):12 (2008).

Demuth K, Blacher J, Guerin AP, Benoit MO, Moatti N, Safar ME, London GM. Endothelin and cardiovascular remodelling in end-stage renal disease. *Nephrol Dial*

Références bibliographiques

Transplant. 13, 375-383 (1998).

Depping R, Kawakami K, Ocker H, Wagner JM, Heringlake M, Noetzold A, Sievers HH and Wagner KF. Expression of the erythropoietin receptor in human heart. *J Thorax Cardiovasc Surg.* 130:877-2 (2005).

Drüeke TB, Locatelli F, Clyne N, Eckardt KU, Macdougall IC, Tsakiris D, Burger HU, Scherhag A. Normalization of hemoglobin level in patients with chronic kidney disease and anemia. *N Engl J Med.* 355:2071-2084 (2006).

Duncker DJ, Bache RJ. Regulation of coronary blood flow during exercise. *Physiol Rev* 88:1009–1086 (2008).

Durrant JR, Seals DR, Connell ML, Russell MJ, Lawson BR, Folian BJ, Donato AJ, Lesniewski LA. Voluntary wheel running restores endothelial function in conduit arteries of old mice: direct evidence for reduced oxidative stress, increased superoxide dismutase activity and down-regulation of NADPH oxidase. *J. Physiol. (Lond.)* **587**, 3271- 3285 (2009).

Eichner ER. Blood doping: infusions, erythropoietin and artificial blood. *Sports Med.* 37: 389–91 (2007).

Ellekjaer H, Holmen J, Ellekjaer E, Vatten L. Physical activity and stroke mortality in

Références bibliographiques

women. Ten-year follow-up of the Nord-Trondelag health survey, 1984-1986. *Stroke* 31, 14-18 (2000).

El-Sayed MS, Ali N, El-Sayed Ali Z. Haemorheology in exercise and training. *Sports Med* 35:649-670 (2005).

Erslev AJ, Caro J, Miller O, Silver R. Plasma erythropoietin in health and disease. *Ann Clin Lab Sci.* 10:250-257 (1980).

Eschbach JW, Haley NR, Adamson JW. The anemia of chronic renal failure: pathophysiology and effects of recombinant erythropoietin. *Contrib Nephrol.* 78: 24-37 (1990).

Eschbach JW, Downing MR, Egrie JC, Browne JK, Adamson JW. USA multicenter clinical trial with recombinant human erythropoietin (Amgen). Results in hemodialysis patients. *Contrib Nephrol.* 76:160-5 (1989).

Fagard RH. Exercise is good for your blood pressure: effects of endurance training and resistance training. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol* 33, 853-856 (2006).

Fisher JW. Erythropoietin: physiology and pharmacology update. *Exp Biol Med* (Maywood). 228(1): p. 1-14 (2003).

Références bibliographiques

Fliser D. Perspectives in renal disease progression: the endothelium as a treatment target in chronic kidney disease. *JNephrol.* 23(04):369-376 (2010).

Förstermann U. Nitric oxide and oxidative stress in vascular disease. *Pflugers Arch.* May;459(6):923-39 (2010).

Franke WD, Stephens GM, Schmid PG. Effect of intense exercise training on endothelium-dependent exercise induced vasodilatation. *Clin Physiol* 18:521–528 (1998).

Fridovich I. Fundamental aspects of reactive oxygen species, or what's the matter with oxygen? *Ann. N. Y. Acad. Sci* 893, 13-18 (1999).

Fujiu K, Manabe I, Nagai R. Renal collecting duct epithelial cells regulate inflammation in tubulointerstitial damage in mice. *J Clin Invest.* Sep 1;121(9):3425-41 (2011).

Gabrilove J. Overview: erythropoiesis, anemia, and the impact of erythropoietin. *Semin Hematol.* 37(4 Suppl 6): p. 1-3 (2000).

Gavin TP, Spector DA, Wagner H, Breen EC, Wagner PD. Nitric oxide synthase inhibition attenuates the skeletal muscle VEGF mRNA response to exercise. *J Appl Physiol.* 88:1192-98 (2000).

Références bibliographiques

Goldberg AP, Geltman EM, Gavin JR 3rd, Carney RM, Hagberg JM, Delmez JA, Naumovich A, Oldfield MH, Harter HR. Exercise training reduces coronary risk and effectively rehabilitates hemodialysis patients. *Nephron*. 42(4):311-6 (1986).

Gouva C, Nikolopoulos P, Ioannidis JP, Siamopoulos KC. Treating anemia early in renal failure patients slows the decline of renal function: a randomized controlled trial. *Kidney Int*. 66:753-760 (2004).

Gris JC, Branger B, Vécina F, al Sabadani B, Fourcade J, Schved JF. Increased cardiovascular risk factors and features of endothelial activation and dysfunction in dialyzed uremic patients. *Kidney Int*. 46, 807-813 (1994).

Gross, A.W. and H.F. Lodish, Cellular trafficking and degradation of erythropoietin and novel erythropoiesis stimulating protein (NESP). *J Biol Chem*. 281(4): p. 2024-32 (2006).

Günthner T, Jankowski V, Kretschmer A, Nierhaus M, van der Giet M, Zidek W, Jankowski J. Endothelium and vascular smooth muscle cells in the context of uremia. *Seminars in Dialysis*. 2009;22(4):428–432.

Haaber AB, Eidemak I, Jensen T, Feldt-Rasmussen B, Strandgaard S. Vascular endothelial cell function and cardiovascular risk factors in patients with chronic renal failure. *J Am Soc Nephrol*. 5, 1581-1584 (1995).

Références bibliographiques

Hambrecht R, Adams V, Erbs S, Linke A, Kränkel N, Shu Y, Baither Y, Gielen S, Thiele H, Gummert JF, Mohr FW, Schuler G. Regular physical activity improves endothelial function in patients with coronary artery disease by increasing phosphorylation of endothelial nitric oxide synthase. *Circulation* **107**, 3152-3158 (2003).

Hambrecht R, Fiehn E, Weigl C, Gielen S, Hamann C, Kaiser R, Yu J, Adams V, Niebauer J, Schuler G. Regular physical exercise correct endothelial dysfunction and improves exercise capacity in patients with chronic heart failure. *Circulation* 98:2709–2715 (1998).

Hand MF, Haynes WG, Webb DJ. Hemodialysis and L-arginine, but not D-arginine, correct renal failure-associated endothelial dysfunction. *Kidney Int.* 53, 1068-1077 (1998).

Hashimoto H, Mio T, Sumino K. Lipid abnormalities of erythrocyte membranes in hemodialysis patients with chronic renal failure. *Clin Chim Acta.* 252, 137-145 (1996).

He JC, Chuang PY, Ma'ayan A, Iyengar R. Systems biology of kidney diseases. *Kidney Int.* 2011 Aug 31. doi: 10.1038/ki.2011.314. [Epub ahead of print]

Headley S, Germain M, Mailloux P. Resistance training improves strength and functional measures in patients with end-stage renal disease. *Am J Kidney Dis.* 40: 355–364 (2002).

Références bibliographiques

Heifets M, Davis TA, Tegtmeyer E, Klahr S. Exercise training ameliorates progressive renal disease in rats with subtotal nephrectomy. *Kidney Int.* 32:815– 820 (1987).

Heylen E, Guerrero F, Mansourati J, Theron M, Thioub S, Saïag B. Effect of training frequency on endothelium-dependent vasorelaxation in rats. *Eur J Cardiovasc Prev Rehabil* 15(1): 52–58 (2008).

Higashi Y, Noma K, Yoshizumi M, Kihara Y. Endothelial function and oxidative stress in cardiovascular diseases. *Circ. J* 73, 411-418 (2009).

Horta PP, de Carvalho JJ, Mandarim-de-Lacerda CA. Exercise training attenuates blood pressure elevation and adverse remodeling in the aorta of spontaneously hypertensive rats. *Life Sci* 77, 3336-3343 (2005).

Hu G, Eriksson J, Barengo NC, Lakka TA, Valle TT, Nissinen A, Jousilahti P, Tuomilehto J. Occupational, commuting, and leisure-time physical activity in relation to total and cardiovascular mortality among Finnish subjects with type 2 diabetes. *Circulation* 110, 666-673 (2004).

Huang TT, Carlson EJ, Kozy HM, Mantha S, Goodman SI, Ursell PC, Epstein CJ. Genetic modification of prenatal lethality and dilated cardiomyopathy in Mn superoxide dismutase mutant mice. *Free Radic. Biol. Med* 31, 1101-1110 (2001).

Références bibliographiques

Hudlicka O, Brown MD, Silgram H. Inhibition of capillary growth in chronically stimulated rat muscles by N-nitro-L-arginine (L-NNA), nitric oxide synthase inhibitor. *Microvasc Res.* 59:45-51 (2000).

Hwang J, Ing MH, Salazar A, Lassègue B, Griendling K, Navab M, Sevanian A, Hsiai TK. Pulsatile versus oscillatory shear stress regulates NADPH oxidase subunit expression: implication for native LDL oxidation. *Circ. Res* 93, 1225-1232 (2003).

Ichimaru K, Horie A. Microangiopathic changes of subepidermal capillaries in end-stage renal failure. *Nephron.* 46, 144-149 (1987).

Ignarro LJ. Nitric oxide as a unique signaling molecule in the vascular system: a historical overview. *J. Physiol. Pharmacol* 53, 503-514 (2002).

Irving BA, Davis CK, Brock DW, Weltman JY, Swift D, Barrett EJ, Gaesser GA, Weltman A. Effect of exercise training intensity on abdominal visceral fat and body composition. *Med Sci Sports Exerc* 40, 1863-1872 (2008).

Jacquet K, Krause K, Tawakol-Khodai M, Geidel S, Kuck KH. Erythropoietin and VEGF exhibit equal angiogenic potential. *Microvasc Res.* 64:326-333 (2002).

Jasperse JL, Laughlin MH. Endothelial function and exercise training; evidence from

Références bibliographiques

studies using animal models. *Med Sci Sports Exerc* 38:445–454 (2006).

Joannides R, Bakkali EH, Le Roy F, Rivault O, Godin M, Moore N, Fillastre JP, Thuillez C. Altered flow-dependent vasodilatation of conduit arteries in maintenance haemodialysis. *Nephrol Dial Transplant*. 12, 2623-2628 (1997).

Konstantinidou E, Koukouvou G, Kouidi E, Deligiannis A, Tourkantonis A. Exercise training in patients with end-stage renal disease on hemodialysis: comparison of three rehabilitation programs. *J Rehabil Med*. 34: 40–45 (2002).

Kouidi EJ. Central and peripheral adaptations to physical training in patients with end-stage renal disease. *Sports Med*. 31: 651–665 (2001).

Kouidi E, Albani M, Natsis K. The effects of exercise training on muscle atrophy in haemodialysis patients. *Nephrol Dial Transplant*. 13: 685–699 (1998).

Koury, S.T., M.C. Bondurant, and MJ. Koury, Localization of erythropoietin synthesizing cells in murine kidneys by in situ hybridization. *Blood*. 71(2): p.524-7 (1988).

Kuriyama S, Tomonari H, Yoshida H, Hashimoto T, Kawaguchi Y, Sakai O. Reversal of anemia by erythropoietin therapy retards the progression of chronic renal failure, especially in nondiabetic patients. *Nephron*. 77:176-185 (1997).

Références bibliographiques

Kuru O, Sentürk UK, Koçer G, Ozdem S, Başkurt OK, Cetin A, Yeşilkaya A, Gündüz F. Effect of exercise training on resistance arteries in rats with chronic NOS inhibition. *J Appl Physiol* 107(3):896–902 (2009).

Laight DW, Carrier M.J, Anggård EE. Antioxidants, diabetes and endothelial dysfunction. *Cardiovasc. Res* 47, 457-464 (2000).

Lander HM. An essential role for free radicals and derived species in signal transduction. *FASEB J* 11, 118-124 (1997).

Laufs U, Wassmann S, Czech T, Münzel T, Eisenhauer M, Böhm M, Nickenig G. Physical inactivity increases oxidative stress, endothelial dysfunction, and atherosclerosis. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 25(4):809-814 (2005).

Lehoux S, Tedgui A. [Shear and signal transduction in the endothelial cell]. *Med Sci (Paris)*. 20, 551-556 (2004).

Levine GN, Frei B, Koulouris SN, Gerhard MD, Keaney JF Jr, Vita JA. Ascorbic acid reverses endothelial vasomotor dysfunction in patients with coronary artery disease. *Circulation*. 93, 1107-1113 (1996).

Lin TH, Chen JG, Liaw JM, Juang JG. Trace elements and lipid peroxidation in uremic

Références bibliographiques

patients on hemodialysis. *Biol Trace Elem Res.* 51, 277-283 (1996).

Livnah O, Stura EA, Middleton SA, Johnson DL, Jolliffe LK, Wilson IA. Crystallographic evidence for preformed dimers of erythropoietin receptor before ligand activation. *Science* 283 (5404): 987-90 (1999).

Loft S, Møller P, Cooke MS, Rozalski R, Olinski R. Antioxidant vitamins and cancer risk: is oxidative damage to DNA a relevant biomarker? *Eur J Nutr* 47 Suppl 2, 19-28 (2008).

Lloyd-Jones DM, Bloch KD. The vascular biology of nitric oxide and its role in atherogenesis. *Ann Rev Med.* 47:365-375 (1996).

London GM, Drüeke TB. Atherosclerosis and arteriosclerosis in chronic renal failure. *Kidney Int.* 51, 1678-1695 (1997).

London GM, Pannier B, Agharazii M, Guerin AP, Verbeke FH, Marchais SJ. Forearm reactive hyperemia and mortality in endstage renal disease. *Kidney Int.* 65, 700-704 (2004).

Loughrey CM, Young IS, Lightbody JH, McMaster D, McNamee PT, Trimble ER. Oxidative stress in haemodialysis. *Q J Med.* 87, 679-683 (1994).

Références bibliographiques

Lu H, Kanazawa M, Ishida A, Tufescu A, Sasaki Y, Ito O, Kurosawa H, Sato T, Ootaka T, Kohzuki M. Combination of chronic exercise and antihypertensive therapy enhances renoprotective effects in rats with renal ablation. *Am J Hypertens.* 22(10):1101-6 (2009).

Lynch SM, Frei B, Morrow JD, Roberts LJ 2nd, Xu A, Jackson T, Reyna R, Klevay LM, Vita JA, Keaney JF Jr. Vascular superoxide dismutase deficiency impairs endothelial vasodilator function through direct inactivation of nitric oxide and increased lipid peroxidation. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol* 17, 2975-2981 (1997).

Martin-Mateo MC, Del Canto-Jafiez E, Barrero-Martinez MJ. Oxidative stress and enzyme activity in ambulatory renal patients undergoing continuous peritoneal dialysis. *Ren Fail.* 20, 117-124 (1998).

Maschio G. Erythropoietin and systemic hypertension. *Nephrol Dial Transplant.* 10:74-79 (1995).

Mc Mahon M, Palmer RM. Exercise and hypertension. *Med Clin North Am.* 69(1):57-70 (1985).

Miller BW, Cress CL, Johnson ME, Nichols DH, Schnitzler MA. Exercise during hemodialysis decreases the use of antihypertensive medications. *Am J Kidney Dis.* 39: 828-833 (2002).

Références bibliographiques

Mimić-Oka J, Simić T, Djukanović L, Reljić Z, Davicević Z. Alteration in plasma antioxidant capacity in various degrees of chronic renal failure. *Clin Nephrol.* 51, 233-241 (1999).

Mimic-Oka J, Simic T, Ekmescic V, Dragicevic P. Erythrocyte glutathione peroxidase and superoxide dismutase activities in different stages of chronic renal failure. *Clin Nephrol.* 44, 44-48 (1995).

Moien-Afshari F, Ghosh S, Elmi S, Rahman MM, Sallam N, Khazaei M, Kieffer TJ, Brownsey RW, Laher I. Exercise restores endothelial function independently of weight loss or hyperglycaemic status in db/db mice. *Diabetologia* **51**, 1327-1337 (2008).

Møller P, Wallin H, Knudsen LE. Oxidative stress associated with exercise, psychological stress and life-style factors. *Chem. Biol. Interact* 102, 17-36 (1996).

Moncada S, Palmer RM, Higgs EA. Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. *Pharmacol Rev.* 43:109-142 (1991).

Montagnani M, Chen H, Barr VA, Quon MJ. Insulin-stimulated activation of eNOS is independent of Ca²⁺ but requires phosphorylation by Akt at Ser(1179). *J. Biol. Chem* 276, 30392-30398 (2001).

Moreau C, Larivière R, Kingma I, Grose JH, Lebel M. Chronic nitric oxide inhibition

Références bibliographiques

aggravates hypertension in erythropoietin-treated renal failure rats. *Clin Exp Hypertens.* 22(7-8): p. 663-74 (2000).

Moreno F, Sanz-Guajardo D, Lopez-Gomez JM, Jofre R, Valderrabano F. Increasing the hematocrit has a beneficial effect on quality of life and is safe in selected hemodialysis patients. Spanish Cooperative Renal Patients Quality of Life Study Group of the Spanish Society of Nephrology. *J Am Soc Nephrol.* 11:335-342 (2000).

Mulvany MJ. Vascular remodelling of resistance vessels: can we define this? *Cardiovasc Res* 41:9–13 (1999).

Namikoshi T, Tomita N, Satoh M, Sakuta T, Kuwabara A, Kobayashi S, Higuchi Y, Nishijima F, Kashihara N. Oral adsorbent AST-120 ameliorates endothelial dysfunction independent of renal function in rats with subtotal nephrectomy. *Hypertens Res.* Mar;32(3):194-200 (2009).

Napoli C, Williams-Ignarro S, De Nigris F, Lerman LO, Rossi L, Guarino C, Mansueto G, Di Tuoro F, Pignalosa O, De Rosa G, Sica V, Ignarro LJ.. Long-term combined beneficial effects of physical training and metabolic treatment on atherosclerosis in hypercholesterolemic mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 101, 8797-8802 (2004).

Ni Z, Wang XQ, Vaziri ND. "Nitric oxide metabolism in erythropoietin-induced

Références bibliographiques

hypertension: effect of calcium channel blockade." *Hypertension* 32(4): 724-9 (1998).

Ochodnický P, Vettoretti S, Henning RH, Buikema H, Van Dokkum RP, de Zeeuw D. Endothelial dysfunction in chronic kidney disease: determinant of susceptibility to end-organ damage and therapeutic response. *Journal of nephrology*. 19(3):246–258 (2006).

Okada S, Hiuge A, Makino H, Nagumo A, Takaki H, Konishi H, Goto Y, Yoshimasa Y, Miyamoto Y. Effect of exercise intervention on endothelial function and incidence of cardiovascular disease in patients with type 2 diabetes. *J. Atheroscler. Thromb* 17, 828-833 (2010).

Paclet MH, Coleman AW, Vergnaud S, Morel F. P67-phox-mediated NADPH oxidase assembly: imaging of cytochrome b558 liposomes by atomic force microscopy. *Biochemistry* 39, 9302-9310 (2000).

Painter PL, Nelson-Worel JN, Hill MM, Thornbery DR, Shelp WR, Harrington AR, Weinstein AB. Effects of exercise training during hemodialysis. *Nephron*. 43: 87–92 (1986).

Paul JL, Sall ND, Soni T, Poignet JL, Lindenbaum A, Man NK, Moatti N, Raichvarg D. Lipid peroxidation abnormalities in hemodialyzed patients. *Nephron*. 64, 106-109 (1993).

Paul JL, Man NK, Moatti N, Raichvarg D. Membrane phospholipid peroxidation in renal

Références bibliographiques

insufficiency and chronic hemodialysis. *Nephrologie*. 12, 4-7 (1991).

Pechter U, Ots M, Mesikepp S, Zilmer K, Kullissaar T, Vihalemm T, Zilmer M, Maarros J. Beneficial effects of water-based exercise in patients with chronic kidney disease. *Int J Rehab Res*. 26: 153–156 (2003).

Petersen AM, Pedersen BK. The anti-inflammatory effect of exercise. *J Appl Physiol*. Apr;98(4):1154-62 (2005).

Picchi, A. et al. Tumor necrosis factor-alpha induces endothelial dysfunction in the prediabetic metabolic syndrome. *Circ. Res* 99, 69-77 (2006).

Pierce, G.L., Lesniewski, L.A., Lawson, B.R., Beske, S.D. & Seals, D.R. Nuclear factor- κ B activation contributes to vascular endothelial dysfunction via oxidative stress in overweight/obese middle-aged and older humans. *Circulation* 119, 1284-1292 (2009).

Quasching T, Ruschitzka F, Stallmach T, Shaw S, Morawietz H, Goettsch W, Hermann M, Slowinski T, Theuring F, Hocher B, Lu'scher TF, Gassman M. Erythropoietin-induced excessive erythrocytosis activates the tissue endothelin system in mice. *FASEB J* 97:11609–11613 (2002).

Rajj, L. Nitric oxide in the pathogenesis of cardiac disease. *J Clin Hypertens (Greenwich)* 8, 30-39 (2006).

Références bibliographiques

Reichel C, Gmeiner G. Erythropoietin and analogs. *Handb Exp Pharmacol.* 2010;(195):251-94.

Refsgaard, H.H., Tsai, L. & Stadtman, E.R. Modifications of proteins by polyunsaturated fatty acid peroxidation products. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 97, 611-616 (2000).

Rossert J, Froissart M. Role of anemia in progression of chronic kidney disease. *Semin Nephrol.* 26:283-289 (2006).

Ruschitzka FT, Wenger RH, Stallmach T, Quaschnig T, de Wit C, Wagner K, Labugger R, Kelm M, Noll G, Rulicke T, Shaw S, Lindberg RL, Rodenwaldt B, Lutz H, Bauer C, Luscher TF, Gassmann M. Nitric oxide prevents cardiovascular disease and determines survival in polyglobulic mice overexpressing erythropoietin. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 97:11609-11613 (2000).

Rush JWE, Turk JR, Laughlin MH. Exercise training regulates SOD-1 and oxidative stress in porcine aortic endothelium. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol* **284**, H1378-1387 (2003).

Sawada K, Krantz SB, Dai CH, Koury ST, Horn ST, Glick AD, Civin CI. Purification of human blood burst-forming units-erythroid and demonstration of the evolution of erythropoietin receptors. *J Cell Physiol.* Feb;142(2):219-30 (1990).

Références bibliographiques

Scalera F, Kielstein JT, Martens-Lobenhoffer J, Postel SC, Tager M, Bode-Boger SM. Erythropoietin increases asymmetric dimethylarginine in endothelial cells: rôle of dimethylarginine dimethylaminohydrolase. *J Am Soc Nephrol.* 16:892-8 (2005).

Schächinger V, Britten MB, Zeiher AM. Prognostic impact of coronary vasodilator dysfunction on adverse long-term outcome of coronary heart disease. *Circulation* 101(16):1899–1906 (2000).

Schettler V, Wieland E, Methe H et al. Oxidative stress during dialysis : effect on free radical scavenging enzyme (FRSE) activities and glutathione (GSH) concentration in granulocytes. *Nephrol Dial Transplant.* 13, 2588-2593 (1998).

Schiffli H, Lang SM. Hypertension induced by recombinant human erythropoietin (rHuEPO) can be prevented by indomethacin. Pathogenetic role of cytosolic calcium. *Eur J Med Research.* 2:97-100 (1997).

Sentman, M. et al. Phenotypes of mice lacking extracellular superoxide dismutase and copper- and zinc-containing superoxide dismutase. *J. Biol. Chem* 281, 6904-6909 (2006).

Silva, M.S.V.D. et al. Benefits of exercise training in the treatment of heart failure: study with a control group. *Arq. Bras. Cardiol* 79, 351-362 (2002).

Références bibliographiques

Singh AK, Szczech L, Tang KL, et al. Correction of anemia with epoetin alfa in chronic kidney disease. *N Engl J Med.* 355:2085-2098 (2006).

Smith KL, Bleyer AJ, Little WC, Sane DC. The cardiovascular effects of erythropoietin. *Cardiovasc. Res.* 59:538-548 (2003).

Spiteller, G. The important role of lipid peroxidation processes in aging and age dependent diseases. *Mol. Biotechnol.* 37, 5-12 (2007).

Stenvinkel P, Holmberg I, Heimbürger O, Diczfalussy U. A study of plasmalogen as an index of oxidative stress in patients with chronic renal failure. Evidence of increased oxidative stress in malnourished patients. *Nephrol Dial Transplant.* 13, 2594-2600 (1998).

Stohlawetz PJ, Dzirilo L, Hergovich N, Lackner E, Mensik C, Eichler HG, Kabrna E, Geissler K, Jilma B. Effects of erythropoietin on platelet reactivity and thrombopoiesis in humans. *Blood.* May 1;95(9):2983-9 (2000).

Storer TW, Casaburi R, Sawelson S, Kopple JD. Endurance exercise training during haemodialysis improves strength, power, fatigability and physical performance in maintenance haemodialysis patients. *Nephrol Dial Transplant.* 20: 1429–1437 (2005).

Taddei S, Ghiadoni L, Virdis A, Versari D, Salvetti A. Mechanisms of endothelial

Références bibliographiques

dysfunction: clinical significance and preventive non-pharmacological therapeutic strategies. *Curr. Pharm. Des* 9, 2385-2402 (2003).

Tedla FM, Brar A, Browne R, Brown C. Hypertension in chronic kidney disease: navigating the evidence. *Int J Hypertens*. 2011:132405 (2011).

Thomas SR, Chen K, Keaney JF. Oxidative stress and endothelial nitric oxide bioactivity. *Antioxid. Redox Signal* 5, 181-194 (2003).

Thompson MA, Henderson KK, Woodman CR, Turk JR, Rush JW, Price E, Laughlin MH. Exercise preserves endothelium-dependent relaxation in coronary arteries of hypercholesterolemic male pigs. *J. Appl. Physiol* 96, 1114-1126 (2004).

Toba H, Nakashima K, Oshima Y, Kojima Y, Tojo C, Nakano A, Wang J, Kobara M, Nakata T. Erythropoietin prevents vascular inflammation and oxidative stress in subtotal nephrectomized rat aorta beyond haematopoiesis. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. Dec; 37(12):1139-46 (2010).

Toba H, Sawai N, Morishita M, Murata S, Yoshida M, Nakashima K, Morita Y, Kobara M, Nakata T. Chronic treatment with recombinant human erythropoietin exerts renoprotective effects beyond hematopoiesis in streptozotocin-induced diabetic rat. *Eur J Pharmacol*. Jun 10;612(1-3):106-14 (2009).

Références bibliographiques

Toborek M, Wasik T, Drozd M et al. Effect of hemodialysis on lipid peroxidation and antioxidant system in patients with chronic renal failure. *Metabolism*. 41, 1229-1232 (1992).

Todorov V, Gess B, Gödecke A, Wagner C, Schröder J, Kurtz A. Endogenous nitric oxide attenuates erythropoietin gene expression in vivo. *Pflug Arch* 439:445–448 (2000).

Tomayko EJ, Chung HR, Wilund KR. Soy protein diet and exercise training increase relative bone volume and enhance bone microarchitecture in a mouse model of uremia. *J Bone Miner Metab*. 2011 Jun 3. [Epub ahead of print]

Touati S, Meziri F, Devaux S, Berthelot A, Touyz RM, Laurant P. Exercise reverses metabolic syndrome in high-fat diet-induced obese rats. *Med Sci Sports Exerc*. Mar;43(3):398-407 (2011).

Touyz RM, Yao G, Quinn MT, Pagano PJ, Schiffrin EL. p47phox associates with the cytoskeleton through cortactin in human vascular smooth muscle cells: role in NAD(P)H oxidase regulation by angiotensin II. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. Mar;25(3):512-8 (2005).

Touyz RM, Yao G, Viel E, Amiri F, Schiffrin EL. Angiotensin II and endothelin-1 regulate MAP kinases through different redox-dependent mechanisms in human vascular smooth muscle cells. *J Hypertens*. Jun;22(6):1141-9 (2004).

Références bibliographiques

Touyz, R.M., Yao, G. & Schiffrin, E.L. c-Src induces phosphorylation and translocation of p47phox: role in superoxide generation by angiotensin II in human vascular smooth muscle cells. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol* 23, 981-987 (2003).

Tsukahara H, Hori C, Hiraoka M, Mayumi M, Okada T, Gejyo F. Nitric oxide modulation of erythropoiesis in rats. *Blood* 90:473-474 (1997).

Tsukamoto Y, Iwanami S, Marumo F. Disturbances of trace element concentrations in plasma of patients with chronic renal failure. *Nephron*. 26, 174-179 (1980).

Uematsu M, et al. Regulation of endothelial cell nitric oxide synthase mRNA expression by shear stress. *Am. J. Physiol* **269**, C1371-1378 (1995).

Vallance P, Leone A, Calver A et al. Accumulation of an endogenous inhibitor of nitric oxide synthesis in chronic renal failure. *Lancet*. 39, 572-575 (1992).

Valko, M., Morris, H. & Cronin, M.T.D. Metals, toxicity and oxidative stress. *Curr. Med. Chem* 12, 1161-1208 (2005).

Valko, M., Rhodes, C.J., Moncol, J., Izakovic, M. & Mazur, M. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chem. Biol. Interact* 160, 1-40 (2006).

Références bibliographiques

Van Guldener C, Janssen MJF, Lambert J et al. Endothelium-dependent vasodilatation is impaired in peritoneal dialysis patients. *Nephrol Dial Transplant*. 13, 1782-1786 (1998).

Vanhoutte PM. Endothelial control of vasomotor function: from health to coronary disease. *Circ J*. Jul;67(7):572-5 (2003).

Varady, K.A., St-Pierre, A.C., Lamarche, B. & Jones, P.J.H. Effect of plant sterols and endurance training on LDL particle size and distribution in previously sedentary hypercholesterolemic adults. *Eur J Clin Nutr* 59, 518-525 (2005).

Vaziri ND, Bai Y, Yuan J, Said HL, Sigala W, Ni Z. ApoA-1 mimetic peptide reverses uremia-induced upregulation of pro-atherogenic pathways in the aorta. *Am J Nephrol*. 32(3):201-11 (2010).

Vaziri ND, Ni Z, Zhang YP, Ruzics EP, Maleki P, Ding Y. Depressed renal and vascular nitric oxide synthase expression in cyclosporine-induced hypertension. *Kidney Int*. Aug;54(2):482-91 (1998).

Vaziri ND, Zhou XJ, Naqvi F, Smith J, Oveisi F, Wang ZQ, Purdy RE. Role of nitric oxide resistance in erythropoietin-induced hypertension in rats with chronic renal failure. *Am J Physiol*. 271:E113-22 (1996).

Références bibliographiques

Vertuani S, Angusti A, Manfredini S. The antioxidants and pro-antioxidants network: an overview. *Curr Pharm Des.* 10(14):1677-94 (2004).

Vincent, M.A., Montagnani, M. & Quon, M.J. Molecular and physiologic actions of insulin related to production of nitric oxide in vascular endothelium. *Curr. Diab. Rep* 3, 279-288 (2003).

Walsh JH, Bilsborough W, Maiorana A, Best M, O'Driscoll GJ, Taylor RR, Green DJ. Exercise training improves conduit vessel function in patients with coronary artery disease. *J Appl Physiol.* 285:20–25 (2003).

Wang XQ, Vaziri ND. Erythropoietin depresses nitric oxide synthase expression by human endothelial cell. *Hypertension.* 33:894-899 (1999).

Wassmann, S., Wassmann, K. & Nickenig, G. Modulation of oxidant and antioxidant enzyme expression and function in vascular cells. *Hypertension* 44, 381-386 (2004).

Welch GN, Loscalzo J. Homocysteine and atherothrombosis. *N Engl J Med.* 338, 1042-1050 (1998).

Wessel, T.R. et al. Relationship of physical fitness vs body mass index with coronary artery disease and cardiovascular events in women. *JAMA* 292, 1179-1187 (2004).

Références bibliographiques

Westhuyzen J, Adams CE, Fleming SJ. Evidence for oxidative stress during in vitro dialysis. *Nephron*. 70: 49-54 (1995).

Wheatcroft, S.B., Williams, I.L., Shah, A.M. & Kearney, M.T. Pathophysiological implications of insulin resistance on vascular endothelial function. *Diabet. Med* 20, 255-268 (2003).

Wilkinson SP, Spence VA, Stewart WK. Arterial stiffening and reduced cutaneous hyperaemic response in patients with end-stage renal failure. *Nephron*. 52, 149-153 (1989).

Woodman, C.R., Ingram, D., Bonagura, J. & Laughlin, M.H. Exercise training improves femoral artery blood flow responses to endothelium-dependent dilators in hypercholesterolemic pigs. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol* **290**, H2362-2368 (2006).

Woodman, C.R., Turk, J.R., Williams, D.P. & Laughlin, M.H. Exercise training preserves endothelium-dependent relaxation in brachial arteries from hyperlipidemic pigs. *J. Appl. Physiol* 94, 2017-2026 (2003).

Yoshimura S, Suemizu H, Nomoto Y et al. Plasma glutathione peroxidase deficiency caused by renal dysfunction. *Nephron*. 73, 207-211 (1996).

Zachée P, Ferrant A, Daelemans R, Coolen L, Goossens W, Lins RL, Couttenye M, De
173

Références bibliographiques

Broe ME, Boogaerts MA. Oxidative injury to erythrocytes, cell rigidity and splenic hemolysis in hemodialyzed patients before and during erythropoietin treatment. *Nephron*. 65(2):288-93 (1993).

ANNEXES

Publications scientifiques :

- 2011 **Fayçal Meziri**, Delphine Binda, Sabeur Touati, Maxime Pellegrin, Alain Berthelot, Rhian M Touyz, Pascal Laurant. Exercise aggravates cardiovascular risks and mortality in rats with disrupted nitric oxide pathway and treated with recombinant human erythropoietin. *Eur J Appl Physiol*. 2011 Aug;111(8):1929-38.
- 2011 **Fayçal Meziri**, Sabeur Touati, Tlili Barhoumi, Alain Berthelot, Rhian M Touyz, Pascal Laurant. Cardiovascular and renal risks of rats with chronic kidney disease are prevented by exercise training but are aggravated when trained rats are treated with recombinant human erythropoietin. Implication of NAD(P)H oxidase and MAPK erk1/2 signaling pathways. (Soumis à Hypertension).
- 2011 Sabeur Touati, **Fayçal Meziri**, Sylvie Devaux, Alain Berthelot, Rhian M. Touyz, Pascal Laurant. Exercise reverses metabolic syndrome in high fat diet-induced obese rats. *Med Sci Sports Exerc*. 2011 Mar;43(3):398-407.
- 2011 Sabeur Touati, Augusto C.I. Montezano, **Fayçal Meziri**, Ying He, Isabelle Jallat-Dalloz, Tlili Barhoumi, Alain Berthelot, Rhian M Touyz, Pascal Laurant. Exercise reverses endothelial dysfunction and NADPH-dependent oxidative stress in high-fat diet-induced obese rats (En préparation).

Communications :

- 2010 Communication affichée : **Meziri F**, Touati S, Barhoumi T, Simões M, Berthelot A, Touyz RM and Laurant P. "Prevention of the cardiovascular risk by exercise training in rats with chronic kidney disease treated with recombinant human erythropoietin" – Printemps de la cardiologie 2010 – Nantes, France
- 2010 Communication affichée : Touati S, **Meziri F**, He Y, Montezano A, Barhoumi T, Berthelot A, Touyz RM, Laurant P. "Effect of exercise with and without diet modification on endothelial function and oxidative stress in obese rats" – Printemps de la cardiologie 2010 – Nantes, France
- 2010 Communication orale : **Meziri F**, Touati S, Barhoumi T, Simões M, Berthelot A, Touyz RM and Laurant P. "Exercise training effects on vascular and renal functions in rats with chronic kidney disease treated with recombinant human erythropoietin" – Congrès de Physiologie, pharmacologie et thérapeutique – Bordeaux, France
- 2010 Communication orale : Touati S, **Meziri F**, He Y, Montezano A, Barhoumi T, Berthelot A, Touyz RM, Laurant P. "L'exercice physique corrige la dysfonction endothéliale, le stress oxydatif et l'inflammation chez le rat obèse" – Congrès de

Physiologie, pharmacologie et thérapeutique – Bordeaux, France

- 2009 Communication orale : **Meziri F**, Simões M, Touati S, Barhoumi T, Berthelot A, Touyz RM and Laurant P. “Exercise training and recombinant human erythropoietin effects on blood pressure, vascular function and kidney status in rats with chronic kidney disease” – 20th Ontario Hypertension Society Annual Spring Meeting – Peterborough, Canada
- 2009 Communication affichée : Touati S, **Meziri F**, Devaux S, Barhoumi T, Regnard J, Berthelot A, Touyz RM, Laurant P. «Exercise prevents development of metabolic syndrome in a rat model of diet-induced obesity» – 20th Ontario Hypertension Society Annual Spring Meeting – Peterborough, Canada
- 2009 Communication affichée : Touati S, He Y, Montezano A, **Meziri F**, Laurant P, Touyz RM. “ Low-fat diet and exercise improve vascular function and oxidative stress in obese rats without effect on NADPH oxidase activity ” – 63rd High Blood Pressure Research Conference, Chicago - USA
- 2008 Communication orale : **Meziri F**, Simões M, Touati S, Barhoumi T, Berthelot A, Touyz RM and Laurant P. “Exercise training prevents development of hypertension and improves vascular function in rats with chronic kidney disease treated with recombinant human erythropoietin” – Annual Cardiovascular Canadian Congress – Toronto, Canada
- 2008 Communication affichée : **Meziri F**, Simões M, Touati S, Barhoumi T, Berthelot A, Touyz RM and Laurant P. “Exercise training prevents the cardiovascular risk induced by chronic kidney disease in rats treated with recombinant human erythropoietin” - 13th Annual Congress of The European College of Sport Science – Estoril, Portugal
- 2008 Communication affichée : Touati S, **Meziri F**, Devaux S, Barhoumi T, Regnard J, Berthelot A, Touyz RM, Laurant P. “Effect of exercise and diet modification intervention on endothelial dysfunction and insulin resistance in a rat model of diet-induced obesity” - 13th Annual Congress of The European College of Sport Science – Estoril, Portugal
- 2007 Communication affichée : **Meziri F**, Pellegrin M, Binda D, Jacqueson A, Berthelot A and Laurant P. “Recombinant human erythropoietin affects the physical performance and cardiovascular adaptative function in trained rats with endothelial NO synthase blockade” - 5th European Sport Medicine Congress – Prague, République tchèque

- 2007 Communication affichée : Meziri F, Pellegrin M, Binda D, Jacqueson A, Berthelot A and Laurant P. “Cardiovascular risk of recombinant human erythropoietin appears in trained rats with endothelial NO synthase inhibition” - 12th Annual Congress of The European College of Sport Science – Jyväskylä, Finland
- 2007 Communication affichée: **Meziri F**, Pellegrin M, Binda D, Jacqueson A, Berthelot A et Laurant P. “Le risque cardiovasculaire de l'érythropoïétine (rHuEPO) recombinante humaine chez le rat entraîné dont la NO synthase endothéliale a été inhibée” - Forum Des Jeunes Chercheurs – Dijon, France
- 2007 Communication orale : **Meziri F**, Pellegrin M, Binda D, Jacqueson A, Berthelot A et Laurant P. “Effets de l'érythropoïétine recombinante humaine sur la fonction cardiovasculaire et la performance physique des rats entraînés présentant un risque cardiovasculaire” - 6^{ème} Colloque «Biologie de l'Exercice Musculaire» Clermont-Ferrand, France
- 2007 Communication orale : **Meziri F**, Binda D, Pellegrin M, Berthelot A and Laurant P. «Cardiovascular risk of recombinant human erythropoietin in trained rats with endothelial NO synthase inhibition» - Congrès de Physiologie, pharmacologie et thérapeutique – Toulouse, France
- 2006 Communication orale : Pellegrin M, **Meziri F**, Binda D, Berthelot A, Jacqueson A, Laurant P. “Cardiovascular (CV) effect of recombinant human erythropoietin administration in trained rats with CV risk factor” - 11th Annual Congress of The European College of Sport Science - Lausanne, Suisse