

REMERCIEMENTS	3
LISTE DES ABREVIATIONS	7
LISTE DES FIGURES	10
LISTES DES TABLES	11
1 INTRODUCTION	12
1.1 Pathologies cardiovasculaires	12
1.2 Effets bénéfiques de l'inhibition du récepteur minéralocorticoïde en clinique	13
1.2.1 Antagonisme du RM dans l'hypertension	13
1.2.2 Echappement de l'aldostérone	14
1.2.3 Antagonisme du RM dans l'insuffisance cardiaque	14
1.2.4 Antagonisme du RM dans l'infarctus du myocarde	16
1.2.5 Antagonisme du RM dans la fibrillation atriale	17
1.2.6 Effets bénéfiques de l'antagonisme du RM : quels mécanismes ?	17
1.3 Le Récepteur Minéralocorticoïde	17
1.3.1 Structure du RM	17
1.3.2 Ligands endogènes du RM	20
1.3.3 Antagonistes pharmacologiques du RM	22
1.3.4 Mécanismes d'actions du RM	24
1.3.5 Expression et rôle physiopathologique du RM dans les systèmes cardiovasculaire et rénal	25
1.3.6 Le récepteur minéralocorticoïde dans les cellules de l'immunité	34
1.4 Lcn2, nouvelle cible du RM dans le système cardiovasculaire ?	35
1.4.1 Identification d'une nouvelle cible du RM dans le cœur	35
1.4.2 La famille des lipocalines	36
1.4.3 La lipocaline 2	38
1.5 Aldostérone, RM et lipocaline 2	50
1.6 Objectif de la thèse	51
2 MATERIELS ET METHODES	53
2.1 Modèles animaux	53
2.1.1 Inactivation constitutive du RM dans les cellules musculaires lisses	53
2.1.2 Inactivation constitutive de la lipocaline 2 (Souris KO Lcn2)	53
2.1.3 Modèle pharmacologique d'excès de minéralocorticoïdes (Traitement NAS)	54
2.1.4 Modèle pharmacologique de perfusion d'aldostérone	55
2.1.5 Mesures anatomiques et préparation des tissus	55
2.1.6 Prélèvement sanguin	56

2.2	Etudes fonctionnelles.....	56
2.2.1	Mesure de la pression artérielle chez la souris vigile.....	56
2.2.2	Fonction rénale et excrétion des ions	56
2.2.3	Réactivité Vasculaire <i>ex vivo</i>	57
2.3	Histologie.....	59
2.3.1	Coloration.....	59
2.3.2	Immunohistologie.....	60
2.4	Biologie moléculaire.....	60
2.4.1	Extraction des ARN totaux et retro-transcription	60
2.4.2	PCR quantitative en temps réel	60
2.5	Biochimie.....	62
2.5.1	Extraction et dosage des protéines	62
2.5.2	Western Blot.....	62
2.5.3	Dosage ELISA.....	63
2.6	Analyses statistiques	63
3	RESULTATS	65
3.1	Participation du RM des cellules musculaires lisses vasculaires à la réactivité vasculaire	
	65	
3.2	Protocole d'activation du RM <i>in vivo</i>	68
3.3	La lipocaline 2 est impliquée dans l'augmentation de la pression artérielle induite par le modèle NAS.....	71
3.3.1	L'inactivation de la lipocaline 2 prévient l'hypertension induite par le NAS.....	71
3.3.2	L'inactivation de la lipocaline 2 ne prévient pas l'hypertrophie cardiaque induite par le NAS.....	71
3.3.3	Lcn2 n'est pas impliquée dans la dysfonction vasculaire induite par le NAS 200 ..	73
3.3.4	Lipocaline 2 et fonction rénale dans le protocole NAS 200.....	76
3.3.5	Conclusion.....	77
3.4	Lipocaline 2 et remodelage de la matrice extracellulaire	78
3.4.1	L'inactivation de la lipocaline 2 prévient le développement de la fibrose cardiaque périvasculaire induite par le NAS	78
3.4.2	L'inactivation de la lipocaline 2 prévient la synthèse de collagène 1 dans le cœur et les vaisseaux	80
3.4.3	L'aldostérone seule n'induit pas de remodelage cardiovasculaire	81
3.4.4	Conclusion.....	84
3.5	L'inactivation de la lipocaline 2 prévient l'augmentation des marqueurs de l'inflammation induit par l'aldostérone	85

3.5.1	Lcn2 est impliquée dans l'augmentation des marqueurs inflammatoires induit par le traitement NAS	85
4	DISCUSSION	87
4.1	Inactivation du récepteur minéralocorticoïde dans la cellule musculaire lisse	87
4.2	Inactivation de la lipocaline 2 dans le modèle NAS.....	88
4.2.1	Validation et limite du modèle utilisé	89
4.2.2	La lipocaline 2 est impliquée dans l'augmentation de la pression artérielle induite par le modèle NAS.....	95
4.2.3	Lipocaline 2 participe au remodelage de la matrice extracellulaire dans le système cardiovasculaire	97
4.2.4	L'inactivation de la lipocaline 2 prévient l'augmentation des marqueurs de l'inflammation induit par l'aldostérone.	97
4.2.5	Mécanismes et cinétique	98
5	CONCLUSION ET PERSPECTIVES.....	100
	BIBLIOGRAPHIE	102
	ANNEXES	114

LISTE DES ABREVIATIONS

11- β HSD2 : 11 beta hydroxystéroïde déshydrogénase de type 2
24p3 : Oncogène 24p3
a.a : Acides aminés
Ach : Acétylcholine
ACTH : Adrénocorticotrophine ou hormone corticotrope
ADN : Acide désoxyribonucléique
ADNc : Acide désoxyribonucléique complémentaire
Aldo : Aldostérone
ANOVA : Analyse de la variance (*de l'anglais ANalysis Of VAriance*)
ANP : Peptide natriurétique atrial (*de l'anglais Atrial Natriuretic Peptide*)
ARN : Acide ribonucléique
BK_{Ca} : Canal potassique de grande conductance activé par le calcium (*de l'anglais Big potassium (K) channel Ca activated*)
BNP : Peptide cérébral natriurétique (*de l'anglais Brain Natriuretic Peptide*)
C57Bl6 : Lignée congénique de souris de laboratoire
CD : Cluster de Différentiation
CMLs : Cellules Musculaires Lisses
CRP : Protéine Réactive C (*de l'anglais C Reactive Protein*)
CTGF : Facteur de croissance du tissu conjonctif (*de l'anglais Connective Tissu Growth Factor*)
CV : Cardiovasculaire
DLA : Domaine de liaison à l'ADN
DLL : Domaine de liaison au ligand
DOCA : 11-deoxycorticostéron
ECA : Enzyme de Conversion de l'Angiotensine
ECL : Enhanced chemolumiscence
E.Coli : *Escherichia Coli*
EDHF : Facteur hyperpolarisant endothérial (*de l'anglais Endothelium-Derived Hyperpolarizing Factor*)
EGFR : Récepteur au facteur de croissance épithérial (*de l'anglais Epidermal Growth Factor Receptor*)
ELISA : Dosage immuno-enzymatique sur support solide (*de l'anglais Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*)
ENaC : Canal épithérial sodique sensible à l'amiloride (*de l'anglais Epithelial Sodium Channel*)
eNOS : Monoxyde d'azote synthase endothéliale (*de l'anglais endothelial Nitric Oxide Synthase*)
EOPS : Exempt d'Organismes Pathogènes Spécifiques
EROs : Espèces Réactives de l'Oxygène
ESM : Erreur Standard à la Moyenne
fMLF : tripeptide N-formyl-Méthionine-Leucine-Phenylalanine
g : Unité d'accélération (= 9,8 m.s⁻²)
G6PD : Glucose-6-phosphate déshydrogénase
GRE : Elément de réponse glucocorticoïde (*de l'anglais Glucocorticoid Response Element*)
HO1 : Hème Oxygénase de type 1
HRE : Elément de réponse hormonal (*de l'anglais Hormone Response Element*)
HSP90 : Protéine de choc thermique de 90 kilodalton (*de l'anglais Heat Shock Protein*)

IBTX : Ibériotoxine

IC : Insuffisance cardiaque

IEC : Inhibiteur de l'enzyme de conversion de l'angiotensine

IFN γ : Interféron gamma

IL : Interleukine

Kb : Kilobase

KCl : Chlorure de Potassium

KDa : Kilodalton

KO : Inactivation génique (*de l'anglais Knock Out*)

Lcn2/LCN2 : lipocaline 2

LPS : Lipopolysaccharide

μ g : microgramme

MCP1 : Protéine 1 chimiotactique pour les monocytes (*de l'anglais Monocyte Chemotactic Protein 1*)

MEC : Matrice extracellulaire

MMP : Métalloprotéinase de la matrice

mN : millinewton

NaCl : Chlorure de Sodium

NADPH oxydase : Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate hydroxyde oxydase

NAS : Néphrectomie-Aldostérone-Sel

NF κ B : Facteur nucléaire *kappa* B (*de l'anglais Nuclear Factor Kappa B*)

NGAL : Lipocaline des neutrophiles associée à la gélatinase (*de l'anglais Neutrophil Gelatinase Associated Lipocalin*)

NHE3 : Echangeur Sodium-Hydrogène 3 (*de l'anglais Na⁺/H⁺ Exchanger 3*)

NO : Monoxyde d'azote (*de l'anglais Nitric Oxide*)

OPN : Ostéopontine

p22phox : Sous-unité de la NADPH oxydase

PAI-1 : Inhibiteur de l'activateur du plasminogène 1 (*de l'anglais Plasminogen Activator Inhibitor 1*)

PAS : Pression artérielle systolique

PBS : Tampon phosphate salin (*de l'anglais Phosphate Buffer Saline*)

PFA : Paraformaldéhyde

Phe : Phényléphrine

PINP : Peptide N-terminal du pro-collagène de type 1 (*de l'anglais Procollagen type I N-terminal Peptide*)

PSS : Solution saline physiologique (*de l'anglais Physiologic Saline Solution*)

qPCR : Réaction de polymérisation en chaîne quantitative (*de l'anglais quantitative Polymerase Chain Reaction*)

RG : Récepteur Glucocorticoïde

RM : Récepteur Minéralocorticoïde

RNT : Région N-terminale

Rpm : Tours par minutes (*de l'anglais Revolutions Per Minute*)

SGK1: Kinase régulée par le sérum et les glucocorticoïdes (*de l'anglais Serum and Glucocorticoid-regulated kinase-1*)

SHR : Modèle expérimental de rat spontanément hypertendus (*de l'anglais Spontaneously Hypertensive Rat*)

SK3: Canal potassique 3 de faible conductance activé par le calcium (*de l'anglais Small conductance calcium-activated potassium channel 3*)

SNP : Nitroprussiate de sodium (*de l'anglais Sodium Nitroprusside*)

SRAA : Système Rénine Angiotensine Aldostérone

TGF β : Facteur transformant de type beta (*de l'anglais Transforming Growth Factor type β*)

TIMP: Inhibiteur tissulaire des métalloprotéinases de la matrice (*de l'anglais Tissue Inhibitor of Metalloproteinase*)

TNF α : Facteur de nécrose tumorale alpha (*de l'anglais Tumor Necrosis Factor α*)

U46619 : agoniste synthétique du récepteur au thromboxane A₂

V: Volt

VEGFR : Récepteur au facteur de croissance de l'endothélium vasculaire (*de l'anglais Vascular Endothelium Growth Factor Receptor*)

LISTE DES FIGURES

Figure 1 Système Rénine Angiotensine Aldostérone.....	13
Figure 2. Etude RALES : Probabilité de survie chez les patients insuffisants cardiaques sévères	16
Figure 3. Structure du récepteur minéralocorticoïde humain	19
Figure 4. Liaison des hormones corticostéroïdes sur leurs récepteurs.....	20
Figure 5. Mécanisme d'action du RM.....	25
Figure 6. Effet du RM sur l'épithélium du néphron distal	26
Figure 7. Lcn2 est induite par le RM dans le système cardiovasculaire.....	36
Figure 8. Structure générale des lipocalines.....	37
Figure 9. Hypothèse de la thèse.	52
Figure 10. Modèle murin transgénique d'inactivation globale et constitutive de Lcn 2	54
Figure 11. Protocole néphrectomie-aldostérone-sel (NAS)	55
Figure 12. Réponses vasculaires aux agents vasoconstricteurs des souris inactivées pour le RM dans les CMLs et leurs contrôles.....	66
Figure 13. Réponses vasculaires aux agents relaxants des souris inactivées pour le RM dans les CMLs et leurs contrôles	67
Figure 14. Expression de la lipocaline 2 aux niveaux cardiovasculaire et rénal dans le traitement NAS	70
Figure 15. Effet de l'inactivation de le Lcn2 sur la pression artérielle systolique	71
Figure 16. Conséquences de l'inactivation de Lcn2 sur l'expression de gènes impliqués dans le remodelage cardiaque : NAS200.....	72
Figure 17. Conséquences de l'inactivation de Lcn2 sur l'expression de gènes impliqués dans le remodelage cardiaque : NAS60.....	73
Figure 18. Effet du traitement NAS sur la réactivité vasculaire aortique : NAS 200	75
Figure 19. Fonction rénale du protocole NAS 200	76
Figure 20.Effet du protocole NAS 200 sur les gènes impliqués dans l'homéostasie sodique	77
Figure 21. Effet de l'inactivation de la lipocaline 2 sur l'expression d'un marqueur plasmatique de synthèse du collagène 1 dans le protocole NAS 200 : Pro-peptide N-terminal du pro-collagène 1.....	78
Figure 22. Effet de l'inactivation de la lipocaline 2 sur le remodelage de la matrice extracellulaire induite par le NAS 200 au niveau cardiovasculaire.	79
Figure 23. Effet de l'inactivation de la lipocaline 2 sur le remodelage de la matrice au niveau cardiovasculaire dans le protocole NAS 60.	80
Figure 24. Conséquences de la perfusion de d'aldostérone sur la pression artérielle systolique et sur le PINP plasmatique dans le protocole ALDO1000.....	82
Figure 25. Effets du protocole Aldo 1000 sur le remodelage de la matrice extracellulaire au niveau cardiaque.....	83
Figure 26. Effets du protocole Aldo 1000 sur le remodelage de la matrice extracellulaire au niveau aortique	84
Figure 27. Effets de l'inactivation de la lipocaline 2 sur l'expression de marqueurs de l'inflammation	85

LISTES DES TABLES

Table 1. Séquences des amorces utilisées en qPCR	61
Table 2. Liste des anticorps utilisés	63
Table 3. Paramètres physiologiques de la série NAS 200	69
Table 4. Paramètres physiologiques de la série NAS 60	69
Table 5. Paramètres physiologiques de la série Aldo 1000	81

1 INTRODUCTION

1.1 Pathologies cardiovasculaires

Les pathologies cardiovasculaires (CV) sont un ensemble de troubles affectant le cœur et les vaisseaux. Elles représentent un problème de santé majeur dans le monde et représentent à elles seules environ 30% de la mortalité mondiale totale. L'augmentation de la prévalence des pathologies CVs ne se limite pas aux pays développés puisqu'elles font aussi partie des causes de mortalité les plus importantes dans les pays en développement. Les projections de l'Organisation Mondiale de la Santé prévoient une augmentation de l'incidence des pathologies CVs d'ici 2030, plus particulièrement dans les pays en voie de développement, liée en partie à la modification des modes de vie [1, 2]. Comprendre et soigner ces pathologies sont donc des enjeux importants en termes de santé publique et de dépenses économiques au niveau mondial.

Les principales atteintes CVs en termes de prévalences sont : les cardiopathies coronariennes, les maladies cérébrovasculaires et les artériopathies périphériques. Les principaux facteurs de risques impliqués dans ces pathologies sont multiples, comme le tabac, l'hypertension artérielle, l'obésité ou encore le diabète. Une complication possible suite à ces atteintes est l'évolution vers un stade d'insuffisance cardiaque (IC). L'IC se définit comme étant l'incapacité de la pompe cardiaque à assurer un débit sanguin suffisant aux besoins métaboliques et fonctionnels des différents organes. Durant ces pathologies CVs se mettent en place des mécanismes participant au développement et au maintien de ces atteintes, comme le remodelage matriciel et électrique du myocarde, la dysfonction vasculaire, l'hypertension ou encore la mise en place d'une inflammation [3]. Parmi ces différents éléments figure aussi l'activation de systèmes hormonaux et notamment de la cascade minéralocorticoïde impliquant son récepteur, le récepteur minéralocorticoïde (RM).

Le RM est l'un des acteurs terminaux du système hormonal rénine-angiotensine-aldostérone (SRAA) (Fig.1). Le RM est décrit depuis une cinquantaine d'années comme étant responsable de l'homéostasie sodique au niveau rénal et du contrôle de la volémie. Par conséquent, il joue un rôle primordial dans la régulation de la pression artérielle et dans l'hémodynamique. La surexpression du RM est observée dans certaines atteintes CVs [4-8], et l'utilisation d'antagonistes pharmacologiques du RM a montré des effets bénéfiques dans

certaines pathologies cardiaques, notamment l'infarctus du myocarde et l'IC, dans lesquelles ses mécanismes d'action ne sont pas encore totalement élucidés.

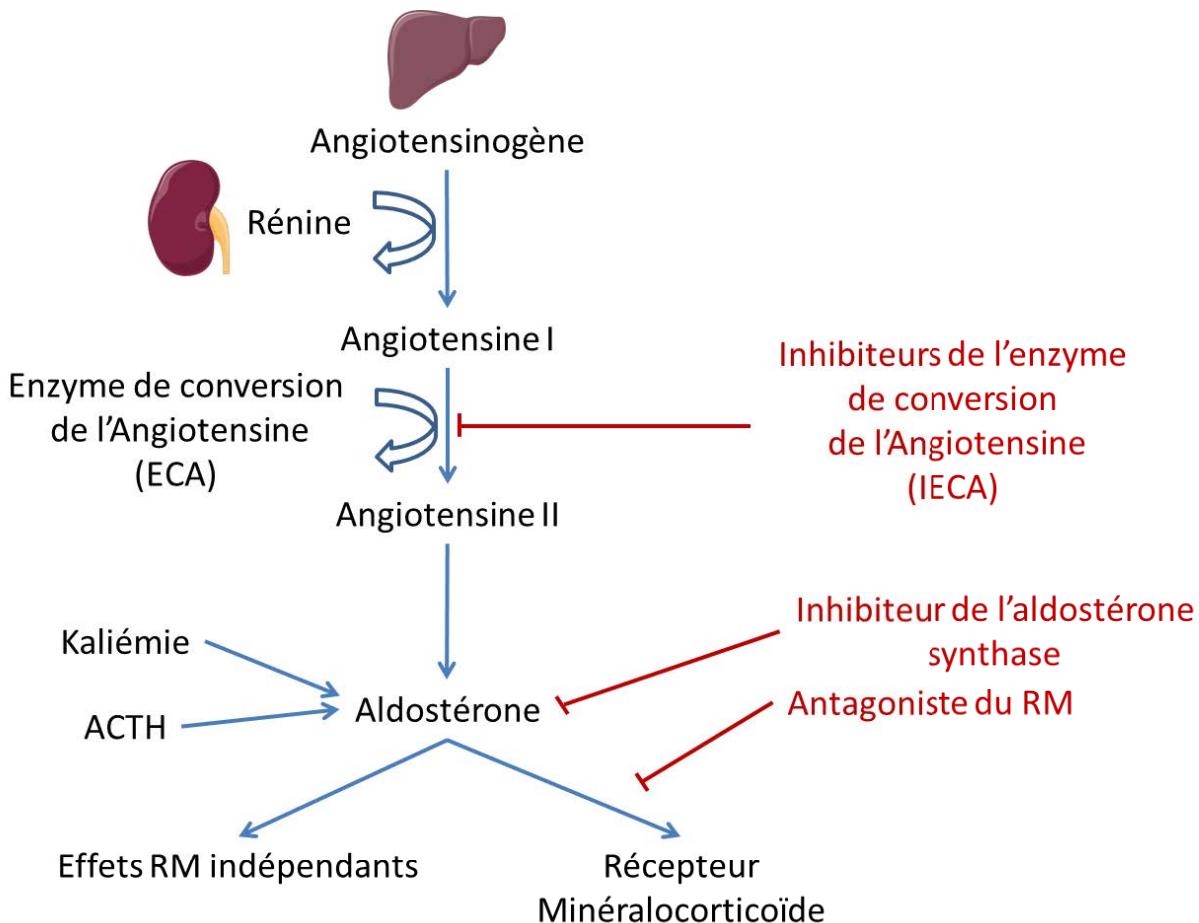


Figure 1 Système Rénine Angiotensine Aldostérone. L'angiotensinogène est synthétisé au niveau du foie. Il est clivé par la rénine (secrétée au niveau rénal) pour donner l'angiotensine I. L'angiotensine I est clivée à son tour par l'enzyme de conversion de l'Angiotensine (ECA) pour donner l'angiotensine II. L'angiotensine II, un vasoconstricteur puissant, va stimuler la synthèse d'aldostérone en se liant à ses récepteurs dans la glande surrénale. L'aldostérone va pouvoir se lier sur le récepteur minéralocorticoïde.

1.2 Effets bénéfiques de l'inhibition du récepteur minéralocorticoïde en clinique

1.2.1 Antagonisme du RM dans l'hypertension

Le premier effet bénéfique de l'utilisation d'un inhibiteur du RM a été montré sur la pression artérielle. Le premier antagoniste du RM utilisé en clinique, la spironolactone, s'est

montré efficace pour réduire la pression artérielle chez des patients hypertendus [9] et dans le traitement de l'hypertension résistante [10]. Les mêmes effets anti-hypertenseurs ont été obtenus en clinique avec l'utilisation d'un second antagoniste du RM, l'éplérénone, ce dernier présentant moins d'effets secondaires que la spironolactone [11, 12]. Les effets de l'antagonisme du RM sur la pression artérielle s'expliquent par les conséquences rénales sur l'homéostasie sodique et la diminution de la volémie. Cela dit, il est désormais connu que l'inhibition du RM en clinique présente des avantages thérapeutiques y compris à des doses ne modifiant pas la pression artérielle.

1.2.2 Echappement de l'aldostérone

L'utilisation des antagonistes du RM en clinique fait suite à l'observation que l'inhibition du SRAA n'induit que temporairement une baisse du niveau d'aldostérone plasmatique (aldostéronémie). En effet, il a été montré que l'inhibition de l'enzyme de conversion de l'angiotensine (ECA) chez des patients présentant un infarctus du myocarde [13] ou une IC [14] n'empêche pas le retour à la normale, voir l'augmentation de l'aldostéronémie après plusieurs mois. Cet « échappement de l'aldostérone » peut avoir des conséquences en pathologie CV. Effectivement, des études cliniques réalisées chez des patients insuffisants cardiaques sévères [15] et des patients ayant subi un infarctus du myocarde [16] ont montré que l'aldostéronémie est un marqueur de mauvais pronostic vital. Ces résultats suggèrent un intérêt clinique au blocage du RM, ce qui a été mis en évidence dans plusieurs atteintes CVs par quelques grands essais cliniques présentés ci-dessous.

1.2.3 Antagonisme du RM dans l'insuffisance cardiaque

L'étude clinique RALES (Randomized ALdactone Evaluation Study), réalisée à la fin des années 90 sur des patients atteints d'IC sévère (stade III et IV de la New York Heart Association, qui compte quatre stades au total, voir l'annexe I) a été la première à montrer les effets bénéfiques d'un antagoniste du RM en clinique. Cette étude a été réalisée en administrant aux

patients la spironolactone en supplément du traitement standard de l'IC, à savoir l'association d'un diurétique et d'un inhibiteur de l'enzyme de conversion de l'angiotensine (IEC). Les résultats montrent que l'ajout de la spironolactone au traitement standard diminue de manière significative la mortalité des patients de près de 31% (Fig.2) [17]. Cet effet a été montré comme étant indépendant de l'homéostasie sodique, rôle principal du RM, mais lié au renouvellement de la matrice extracellulaire (MEC). Les patients sous spironolactone présentent une diminution des marqueurs de la synthèse des collagènes 1 et 3, qui participent tous les deux à la fibrose cardiaque [18]. Les effets bénéfiques suite à l'utilisation de spironolactone ont aussi été observés chez des patients insuffisants cardiaques modérés (classe I et II) [19, 20]. L'utilisation de l'éplérénone, durant l'étude EPHESUS (Eplerenone Post-Acute Myocardial Infarction Heart Failure Efficacy and Survival Study), a aussi montré des effets bénéfiques sur la mortalité de patients présentant une dysfonction ventriculaire suite à un infarctus du myocarde. Les résultats montrent une diminution de la mortalité de 15% durant les 16 mois suivant le début du traitement [21]. Une étude plus récente a confirmé les effets bénéfiques de l'inhibition du RM sur la mortalité de patients insuffisants cardiaques modérés, cette fois-ci, en utilisant l'éplérénone [22]. Enfin, une étude clinique multicentrique sur les effets de la spironolactone a été réalisée récemment chez des patients présentant une insuffisance cardiaque à fraction d'éjection conservée. Cette étude n'a pas montré d'effet bénéfique de l'utilisation de la spironolactone [23]. Cependant, les résultats de cette dernière restent controversés du fait des populations étudiées. Il semble que les critères de sélection des patients n'aient pas été homogène entre les différents centres d'études et ne reflèteraient pas totalement la mortalité globale de l'IC à fraction d'éjection conservée [24, 25].

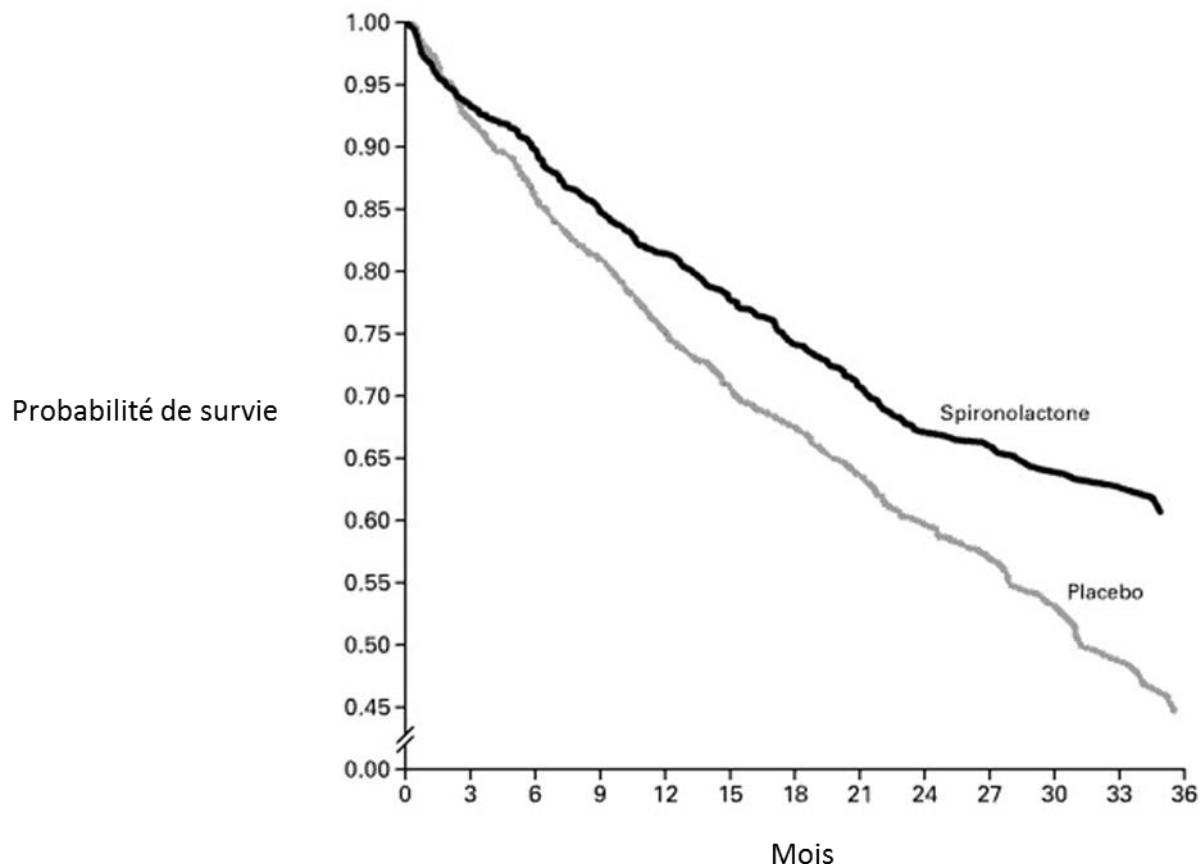


Figure 2. Etude RALES : Probabilité de survie chez les patients insuffisants cardiaques sévères Le blocage du RM par la spironolactone réduit de 30% la mortalité chez des patients insuffisants cardiaques sévères (classe III et IV de la NYHA)(Pitt *et al*, 1999)

1.2.4 Antagonisme du RM dans l'infarctus du myocarde

En plus des effets bénéfiques observés dans des stades avancés d'IC, sévère ou modéré, l'utilisation d'antagoniste du RM est aussi bénéfique dans la phase aigüe de l'infarctus du myocarde. L'utilisation d'éplérénone chez des patients, dès les 24h suivant l'infarctus du myocarde, améliore leur mortalité de 10% dans l'année suivante, par rapport au patients ayant reçu un placebo [26].

1.2.5 Antagonisme du RM dans la fibrillation atriale

Enfin, le blocage du RM en clinique présente aussi des avantages dans les troubles du rythme cardiaque. L'administration de spironolactone chez des patients souffrant de fibrillation auriculaire, à savoir une contraction anarchique des oreillettes, diminue l'apparition des événements arythmiques. L'utilisation de spironolactone diminue de 3 à 6 l'apparition d'évènement de fibrillation auriculaire durant toute la durée du traitement (12 mois) comparativement au patients n'ayant pas reçus d'antagoniste du RM [27].

1.2.6 Effets bénéfiques de l'antagonisme du RM : quels mécanismes ?

Les résultats obtenus suite à ces diverses études cliniques montrent les effets bénéfiques de l'antagonisme du RM dans diverses pathologies CVs. Ces études cliniques ont entraîné la modification des recommandations de traitement des sociétés européenne et américaine de cardiologie pour la prise en charge de l'IC et le traitement en post-infarctus. Désormais, les antagonistes du RM font partie du traitement standard.

Toutefois, si l'inhibition du RM a montré des effets bénéfiques dans la prise en charge de différentes pathologies CVs, son mécanisme d'action et les voies de signalisation qui soutiennent son activation restent encore inconnus. Le chapitre suivant va s'attacher à présenter le RM et ses rôles physiopathologiques, actuellement décrits dans les différents organes des systèmes cardiovasculaire et rénal.

1.3 Le Récepteur Minéralocorticoïde

1.3.1 Structure du RM

Le RM fait partie de la superfamille des récepteurs nucléaires, plus particulièrement de la famille des récepteurs stéroïdiens et joue un rôle de facteur de transcription, à l'instar du récepteur glucocorticoïde (RG). Le gène codant pour le RM (NR3C2) se situe sur le chromosome 4 chez l'homme et le chromosome 8 chez la souris. Ce gène a une taille de 450 kilobases (kb) et

se compose de dix exons séparés les uns des autres par huit introns. Les exons codent pour une protéine de 984 acides aminés (a.a.) chez l'homme et 978 a.a. chez la souris. La masse moléculaire du RM se situe aux alentours de 107 kilo Dalton (kDa). La structure du RM est organisée en différents domaines (Fig.3), présentés ici de la partie N-terminal à la partie C-terminal de la protéine :

- La région N-terminal (RTN) présente les domaines de régulation de l'activité transcriptionnelle du RM.
- La région centrale de la protéine correspond au domaine de liaison à l'ADN (acide désoxyribonucléique) (DLA). C'est cette partie qui se lie aux éléments de réponses hormonaux (HRE, hormone responsive element) présents dans les promoteurs des gènes cibles du RM.
- La région C-terminal correspond au domaine de liaison de son ligand hormonal (DLL).

Ce sont ces différents domaines qui vont permettre l'activité comme facteur de transcription du RM, par sa liaison à son ligand activateur, sa liaison au gène cible et enfin la liaison des co-régulateurs de son activité. Le RM est susceptible de subir de nombreuses modifications post-traductionnelles [28] ainsi que de se dimériser [29]. Le présent sujet de thèse étant l'étude des cibles du RM, par souci de clarté, je ne vais pas détailler les diverses régulations post-traductionnelles du RM.

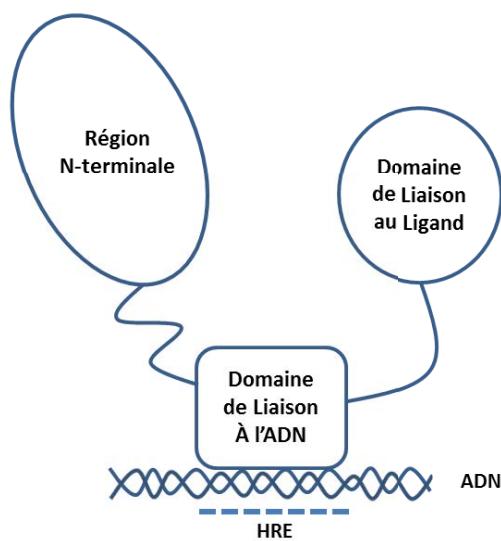
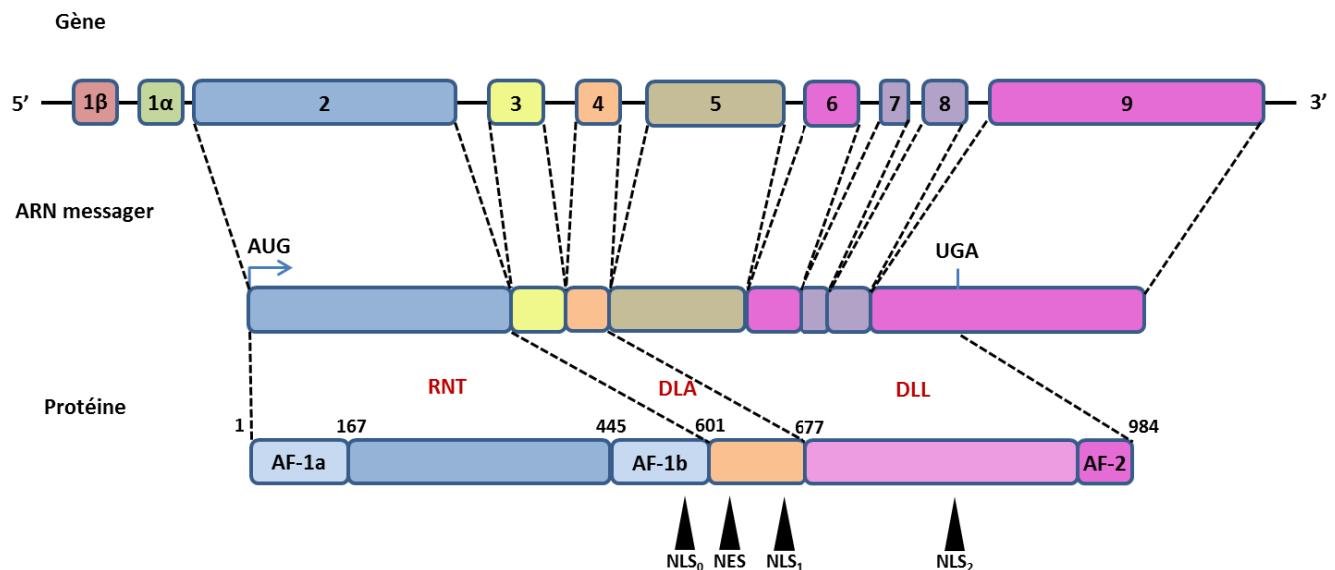


Figure 3. Structure du récepteur minéralocorticoïde humain. Le gène du RM humain est composé de 10 exons dont les deux premiers ne sont pas traduits (1 α et 1 β). Le codon d'initiation de la traduction AUG est situé 2 pb après le début de l'exon 2, tandis que le codon stop est localisé sur l'exon 9. Le récepteur contient des domaines fonctionnels distincts (AF-1a, AF-1b et AF-2), des signaux de localisation nucléaire (NLS₀, NLS₁ et NLS₂) et un domaine d'export nucléaire (NES)(Viengchareun *et al.*, 2007).

1.3.2 Ligands endogènes du RM

Le ligand du RM historiquement étudié est l'hormone minéralocorticoïde responsable de la réabsorption sodée au niveau rénal, l'aldostérone. Cependant, il a été montré que l'aldostérone comme les glucocorticoïdes, pouvaient lier le RM avec la même affinité (constante de dissociation K_d : 0,5-2nM, Fig.4) [29]. Les glucocorticoïdes étant en concentration 100 à 1000 fois supérieure que l'aldostérone dans le plasma, il existe un mécanisme de sélectivité enzymatique permettant la liaison entre l'aldostérone et son récepteur.

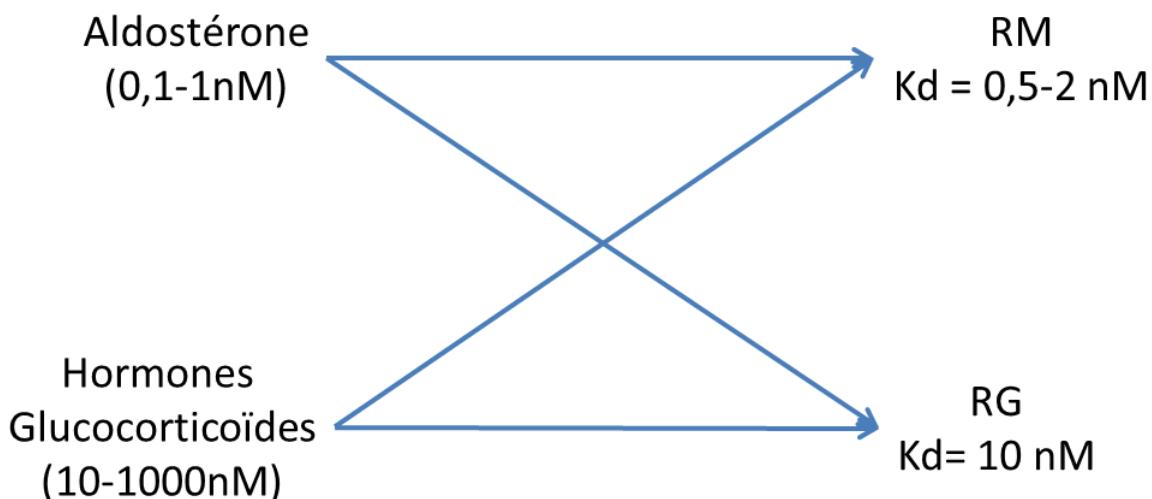


Figure 4. Liaison des hormones corticostéroïdes sur leurs récepteurs. Le RM a la même affinité pour l'aldostérone et les glucocorticoïdes; le RG a aussi une affinité équivalente pour ces hormones. Les concentrations plasmatiques physiologiques sont indiquées entre parenthèses.

1.3.2.1 Hormone minéralocorticoïde : l'aldostérone

L'aldostérone est une hormone stéroïdienne faisant partie du SRAA. Elle est synthétisée dans la zone glomérulaire de la glande surrénale à partir du cholestérol. La régulation de la synthèse d'aldostérone est complexe. Les principaux acteurs de la régulation sont le potassium, l'hormone corticotrope (ACTH) et l'angiotensine II. En se fixant à ses récepteurs de la zone glomérulaire, l'angiotensine II va induire l'augmentation de l'expression de l'aldostérone

synthase (CYP11B2) et ainsi induire la production d'aldostérone, participant à la cascade hormonale du système rénine-angiotensine-aldostérone. La synthèse extra-surrénalienne d'aldostérone est décrite dans le cerveau, mais aussi dans le système CV.

1.3.2.2 Hormones glucocorticoïdes

Les hormones glucocorticoïdes sont les stéroïdes majeurs de l'organisme. Le cortisol (chez l'homme) et la corticostérone (chez les rongeurs) sont synthétisés dans la zone fasciculaire et réticulaire de la glande surrénale. A l'instar de l'aldostérone et des autres hormones stéroïdiennes, le cortisol est synthétisé à partir du cholestérol. Sa sécrétion est régulée durant le cycle circadien avec un pic maximal de sécrétion avant le réveil et minimal le soir avant le coucher.

1.3.2.3 Sélectivité enzymatique

Les glucocorticoïdes étant en concentration beaucoup plus importante que l'aldostérone à l'état physiologique, la liaison entre l'aldostérone et le RM est maintenue par l'activité d'une enzyme sélective pour les glucocorticoïdes, la 11- β -hydroxystéroïde déshydrogénase de type 2 (11- β HSD2) [30]. La 11- β HSD2 catalyse le cortisol (chez l'homme), ou la corticostérone (chez les rongeurs) en cortisone (ou 11-déhydrocorticostérone), des métabolites inactifs. Ces métabolites présentent une faible affinité pour les récepteurs minéralocorticoïde et glucocorticoïde [31-33]. Cela va entraîner une absence de compétition locale entre les ligands et va permettre l'accès de l'aldostérone au RM dans les cellules, celle-ci n'étant pas catabolisée par la 11- β HSD2. C'est donc la co-localisation de la 11- β HSD2 avec le RM qui est l'élément majeur de la sélectivité de liaison entre l'aldostérone et son récepteur en présence de taux normaux de glucocorticoïdes.

Cependant, certains tissus exprimant le RM ne présentent pas de co-localisation de la 11- β HSD2. C'est le cas par exemple des cardiomyocytes. L'absence de la 11- β HSD2 dans les tissus exprimant le RM soulève la question de son ligand. Cette question fait l'objet de nombreuses recherches et, à l'heure actuelle, il n'y a pas de réponse définitive. Notre laboratoire, intitulé «

Récepteur Minéralocorticoïde : Physiopathologie et innovations thérapeutiques », s'intéresse plus particulièrement à la liaison entre l'aldostérone et son récepteur. De fait, le laboratoire a montré la régulation différentielle de gènes en fonction du ligand du RM, aldostérone ou glucocorticoïde. L'administration d'aldostérone chez des souris surexprimant le RM dans les cardiomycocytes induit l'expression de gènes spécifiques de la liaison entre l'aldostérone et le RM, différents de ceux induits par les glucocorticoïdes sur le RM en absence de 11- β HSD2 [34]. D'autres mécanismes de sélectivité du RM pour son ligand ont été décrits comme notamment la dimérisation du récepteur, le recrutement de co-régulateurs dépendant du ligand ou encore des modifications de la conformation ligand-dépendant ainsi qu'un transporteur spécifique des glucocorticoïdes permettant l'efflux de ces derniers hors de la cellule.

1.3.3 Antagonistes pharmacologiques du RM

Il existe actuellement deux antagonistes pharmacologiques du RM utilisés en clinique : la spironolactone et l'éplérénone. Comme évoqué précédemment dans l'introduction, ces deux agents présentent les mêmes effets thérapeutiques avec des caractéristiques différentes. La spironolactone est un antagoniste dit de première génération utilisé depuis une quarantaine d'années en clinique. La spironolactone n'est pas spécifique du RM et présente des effets secondaires de type endocriniens (gynécomastie, impuissance...) dus à sa liaison aux récepteurs des androgènes et de la progestérone. L'éplérénone, un antagoniste de deuxième génération, possède une spécificité plus importante que la spironolactone, évitant ainsi les effets secondaires indésirables, mais possède une efficacité moindre que la spironolactone [35, 36]. De nouveaux antagonistes non-stéroïdiens, dits de troisième génération, sont actuellement en phase d'essai clinique. Ceux-ci possèderaient une spécificité et une efficacité accrues par rapport à l'éplérénone et la spironolactone [37, 38].

L'utilisation des antagonistes du RM disponible en clinique présentent néanmoins certains effets secondaires potentiellement dangereux. L'inhibition du RM au niveau rénal va entraîner une augmentation de la kaliémie, qui lorsqu'elle est importante, peut entraîner des arythmies cardiaques. L'utilisation de ces antagoniste nécessite une bonne sélection des patients ainsi qu'un suivi de kaliémie [36, 39].

Dans le cadre d'études expérimentales réalisées chez des modèles murins ou cellulaires, d'autres molécules antagonistes sont disponibles telles que les RU28318 et RU26752 ou encore le canrénoate de potassium, un métabolite actif de la spironolactone, qui présente l'avantage d'être soluble dans l'eau ce qui en facilite l'administration. Afin d'obtenir un effet inhibiteur sur le RM, ces molécules sont généralement utilisées à des concentrations 100 fois plus importantes que l'aldostérone.

En parallèle des recherches menées sur la modulation de l'activité du RM, une autre approche vise à jouer au niveau du ligand du RM, plus particulièrement de l'aldostérone synthase (CYP11B2). Plusieurs études expérimentales ont montré les effets bénéfiques de l'utilisation d'antagonistes de la CYP11B2, tel que le FAD286, sur l'hypertrophie et la fibrose cardiaque ainsi que rénale, dans des modèles de rats spontanément hypertendus ou de rats uni-nephrectomisés sous régime riche en sel [40, 41]. L'administration de FAD286 chez des souris déficientes en lipoprotéine E présente des effets bénéfiques sur le développement de l'athérosclérose [42]. La comparaison entre l'utilisation de la spironolactone et le FAD286 dans un modèle d'IC chez le rat montre des effets bénéfiques similaires sur la fonction cardiaque et le remodelage. Il semble que l'inhibition de l'aldostérone synthase présente des bénéfices supplémentaires sur la production d'espèces réactives de l'oxygène (EROs) en comparaison avec l'inhibition du RM [43]. L'utilisation d'antagonistes de la CYP11B2 pourrait présenter des avantages sur les antagonistes du RM dans les pathologies présentant une hyperaldostéronémie ou encore dans les effets de l'aldostérone ne passant pas par le RM. L'étude des antagonistes de la CYP11B2 est passée en phase clinique [44]. L'antagoniste utilisé est bien toléré chez les patients mais n'est pas spécifique de la CYP11B2, il semblerait qu'il inhibe partiellement la synthèse de glucocorticoïdes, ce qui pourrait avoir des conséquences importantes lors d'un traitement [45].

1.3.4 Mécanismes d'actions du RM

Deux types de mécanismes d'action du RM ont été décrits : des mécanismes génomiques et des mécanismes non-génomiques. Les mécanismes non-génomiques sont caractérisés par des temps d'action très courts, de quelques secondes à quelques minutes, et ne sont pas bloqués par l'utilisation d'inhibiteurs de la transcription génomique. A l'inverse, les effets génomiques du RM possèdent une cinétique plus lente, de quelques dizaines de minutes à plusieurs heures, et sont bloqués par l'utilisation d'inhibiteurs de la transcription tels que l'actinomycine D. Le travail de thèse qui va être présenté ici consiste en l'étude d'une protéine, la lipocaline 2, dont l'expression est régulée de manière transcriptionnelle par le RM. L'hypothèse de travail repose sur le fait que cette protéine, à travers sa régulation par le RM, va participer aux effets de ce dernier. Par conséquent, les effets non-génomiques du RM n'étant pas étudiés ici, ils ne seront pas détaillés au cours de cette introduction.

Le mécanisme d'activité transcriptionnelle du RM est commun aux récepteurs nucléaires. La liaison du RM à son ligand induit une modification de sa conformation. Cette modification de conformation va libérer le RM de ses protéines chaperonnes (telles que la HSP90) auxquelles il est lié lorsqu'il se trouve dans le cytoplasme de la cellule. Le RM va ainsi pouvoir passer dans le noyau cellulaire et se lier à l'ADN génomique pour réaliser sa fonction de transcription. Le RM induit l'expression de ses gènes cibles grâce à la reconnaissance de séquences spécifiques de l'ADN. Ces séquences possèdent des motifs particuliers qui vont permettre la liaison du RM à l'ADN. Ces séquences spécifiques sont appelées des éléments de réponse hormonaux (hormonal response element, HRE) (Fig.5). Une fois lié à l'ADN dans le promoteur de son gène cible, le RM va recruter des co-régulateurs de la transcription. Ces co-régulateurs vont permettre le remodelage de la chromatine et la formation du complexe de transcription. Ces derniers peuvent avoir un rôle activateur, en décompactant la chromatine et en favorisant la transcription (co-activateurs) ou, à l'inverse ils peuvent induire la compaction de la chromatine et auront par conséquence un effet répresseur (co-répresseurs).

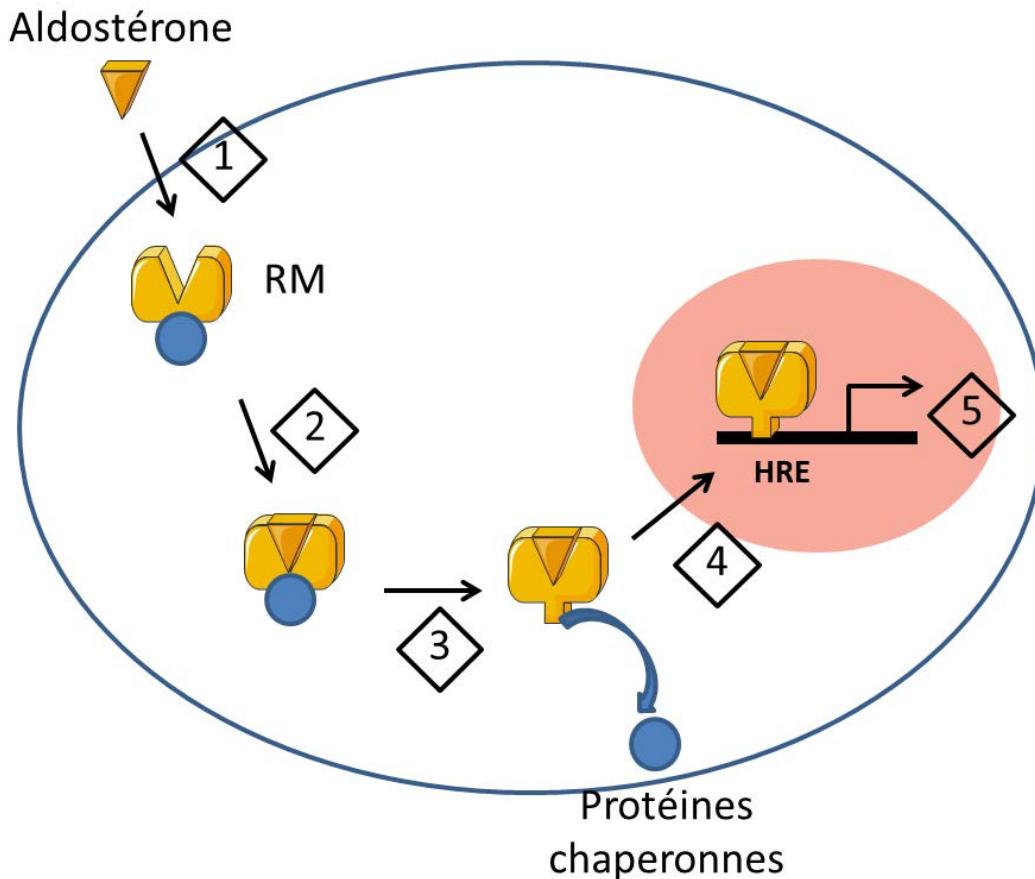


Figure 5. Mécanisme d'action du RM. 1) L'aldostérone pénètre dans la cellule. Lorsqu'il n'est pas lié à son ligand, le RM se situe dans le cytoplasme, couplé à des protéines chaperonnes telles que la HSP90. 2) Lorsque l'aldostérone se lie au RM, elle en modifie la conformation, cela a pour conséquence de libérer la HSP90 3). 4) Une fois séparé de la HSP90, le RM va rentrer dans le noyau cellulaire où il va se fixer sur les séquences HRE qu'il aura reconnu afin d'induire l'expression de ses gènes cibles 5).

1.3.5 Expression et rôle physiopathologique du RM dans les systèmes cardiovasculaire et rénal

1.3.5.1 Effets génomiques classiques du RM dans l'épithélium rénal

Les effets génomiques du RM ont été décrits il y a plusieurs dizaines d'années au niveau de l'épithélium rénal et sont responsables de l'homéostasie sodique. Lorsque la volémie diminue, cela active le SRAA, ce qui aboutit à l'augmentation de l'aldostéronémie. Au niveau du tube contourné distal du néphron, qui exprime l'enzyme de sélectivité 11-βHSD2, la liaison de

l'aldostérone au RM va entraîner son internalisation dans le noyau. Dans les cellules épithéliales, le RM va se lier à l'ADN et induire l'expression de différentes protéines impliquées dans la réabsorption de sodium (Fig.6). Parmi ces protéines on peut citer :

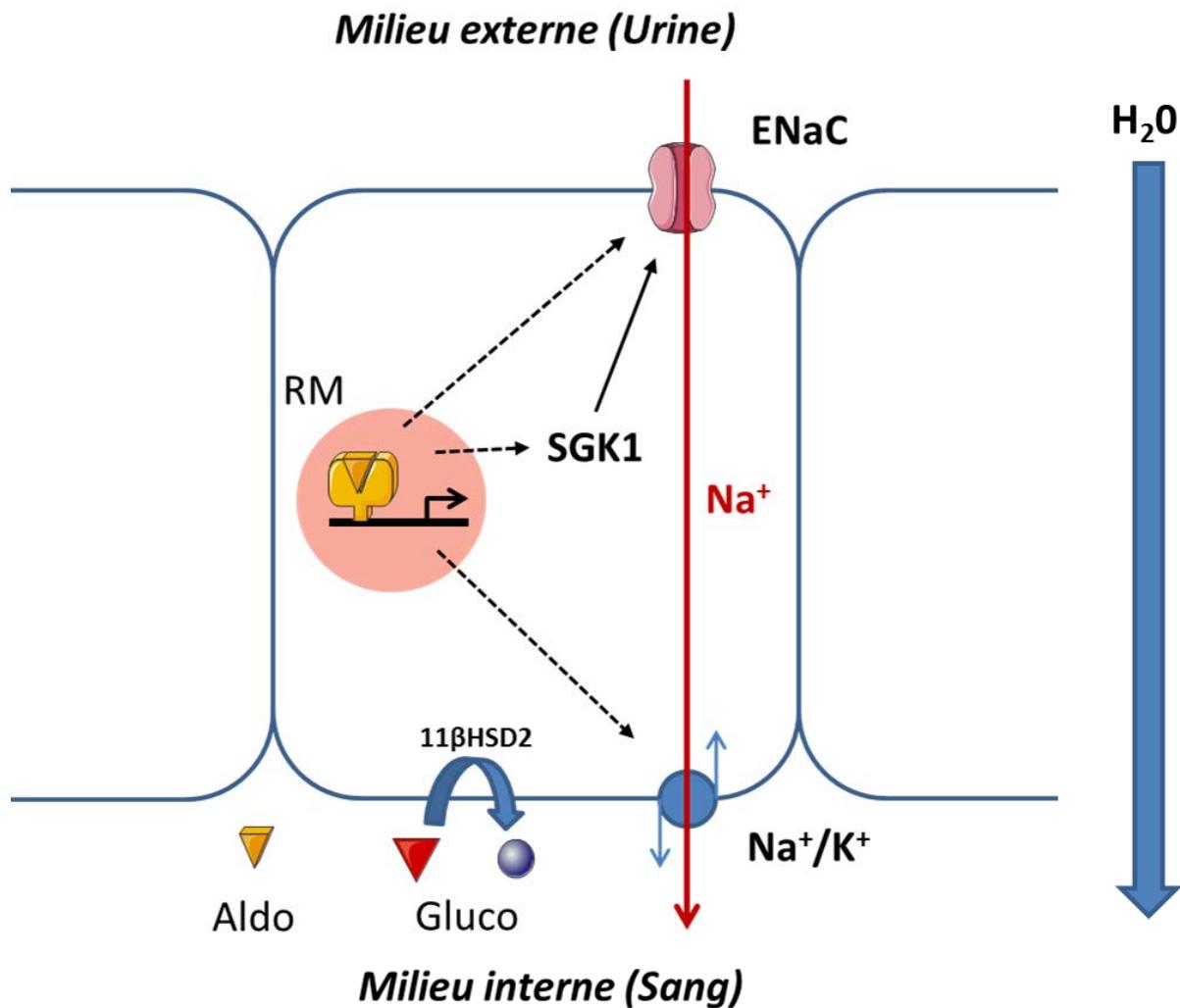


Figure 6. Effet du RM sur l'épithélium du néphron distal. Au niveau distal du néphron, la liaison de l'aldostérone au RM va entraîner la transcription des gènes du canal ENaC, de la pompe Na^+/K^+ qui vont permettre la réabsorption de sodium à travers l'épithélium rénal. SGK1 inhibe la dégradation d'ENaC ce qui maintient son activité et participe au transport sodique. La présence de l'enzyme 11- β HSD2 empêche les glucocorticoïdes de se fixer au RM.

- Les trois sous unités (α , β et γ) du canal sodique épithéial ENaC (pour Epithelial Sodium Channel). Les trois sous-unités vont s'assembler pour former le canal ENaC. Une fois celui-ci assemblé et adressé à la membrane, il va permettre le transport du sodium présent dans l'urine à travers le pôle apical de la cellule épithéliale.
- La pompe ionique sodium/potassium. La pompe Na^+/K^+ est exprimée à la membrane basale de la cellule épithéliale, à l'opposé d'ENaC. Son rôle est de transporter le sodium de l'intérieur de la cellule vers le milieu extracellulaire. Durant ce processus elle induit l'entrée de potassium dans la cellule.
- La sérine kinase régulée par les corticostéroïdes SGK1 (Serum and glucocorticoid-regulated kinase 1). SGK1 est une protéine induite rapidement par le RM et son activité kinase permet de prévenir l'internalisation du canal ENaC et ainsi de maintenir son activité membranaire.

Ces cibles du RM dans le néphron sont les acteurs principaux de son rôle sur l'homéostasie sodique. C'est cette réabsorption de sodium du milieu externe (urine) vers le milieu interne (sang) à travers l'épithélium rénal qui présente des conséquences sur la volémie. En effet, par pression osmotique, l'eau présente dans les urines va suivre le transport de sodium et ainsi augmenter le volume sanguin et par conséquent la pression du sang sur les parois vasculaires (pression artérielle).

La régulation d'ENaC par le RM et son rôle dans la réabsorption de sodium ont été mis en évidence dans d'autres épithéliums, comme par exemple l'épithélium digestif ou la peau [46]. Plus récemment, la présence d'ENaC et sa régulation par le RM ont été mises en évidence dans l'endothélium. Une autre partie de mon travail durant la thèse a consisté à étudier le rôle du canal ENaC dans l'endothélium à l'aide d'un modèle murin transgénique inactivé pour la sous-unité α ENaC dans les cellules endothéliales. Ces travaux ne seront pas présentés ici car encore préliminaires, mais ont donné lieu à plusieurs publications sur le sujet [47-49].

Il est désormais bien connu que l'expression du RM ne se limite pas aux épithéliums et que sa fonction est plus vaste que le contrôle de l'homéostasie sodique. Cela fait maintenant une vingtaine d'années que le RM est décrit comme participant à la progression de diverses pathologies cardiaques et vasculaires et ce, indépendamment de son action sur la rétention sodée et des conséquences de celles-ci sur le système CV (augmentation de la volémie, augmentation

des résistances périphériques, augmentation de la post-charge cardiaque...). La présence du RM va être maintenant décrite dans divers tissus et types cellulaires, incluant le système CV ou encore le système immunitaire. Nous nous focaliserons ici essentiellement sur le rôle du RM dans les tissus et organes composant ces systèmes et sur son implication dans les divers mécanismes pathologiques que sont le remodelage de la matrice, la dysfonction vasculaire, le remodelage électrophysiologique ou encore l'inflammation.

1.3.5.2 *Le récepteur minéralocorticoïde cardiaque*

Le cœur est l'organe « moteur » de l'organisme. C'est un organe creux et musculaire, qui par sa fonction de pompe va permettre la circulation du sang dans l'organisme et ainsi assurer l'irrigation et le fonctionnement des autres organes du corps. Il se compose de deux oreillettes et deux ventricules, séparés pour fonctionner en deux circuits distincts. L'oreillette et le ventricule droit font partie de la circulation pulmonaire. Ils vont transporter le sang pauvre en oxygène (provenant de la circulation systémique) vers les poumons afin de le réoxygéné. L'oreillette et le ventricule gauche font partie de la circulation systémique et vont envoyer le sang riche en oxygène (provenant de la circulation pulmonaire) vers les tissus. Le cœur est composé majoritairement de deux types cellulaires, les cardiomyocytes, les cellules responsables de la contraction, et les fibroblastes.

A l'état basal, le RM est exprimé à la fois dans les cardiomyocytes, les fibroblastes cardiaques et les vaisseaux. En revanche, l'enzyme 11- β HSD2 n'est que faiblement exprimée et ne semble pas pouvoir produire une activité suffisante pour maintenir la sélectivité de l'aldostérone pour le RM suggérant un effet glucocorticoïde sur le RM cardiaque [50-52].

L'implication du RM dans la physiopathologie cardiaque a été mise en évidence au début des années 90, par l'utilisation de modèles expérimentaux mimant une forte charge en minéralocorticoïde, le modèle de perfusion d'aldostérone adjoint d'un régime riche en sel (le modèle Aldo-Sel puis ses variantes, le modèle de néphrectomie-aldo-sel (NAS) ou le modèle DOCA-sel). Ces modèles expérimentaux induisent une hypertension, une hypertrophie cardiaque ainsi que le développement de fibrose à la fois dans le ventricule gauche et dans le ventricule

droit [53]. L'utilisation de ces modèles a montré le rôle pro-fibrosant direct du RM dû à la présence de fibrose dans le ventricule droit, le remodelage du ventricule gauche étant considéré comme la conséquence de l'augmentation de la post-charge induite par l'hypertension [54]. Le besoin de sel associé avec l'aldostérone et les mécanismes régissant cette interaction ne sont pas encore élucidés. Néanmoins l'implication du RM dans ces phénomènes de remodelage cardiaque a été démontrée par l'utilisation de ses antagonistes. L'utilisation de spironolactone ou d'éplérénone dans les modèles de surcharge minéralocorticide (Aldo-sel, NAS ou DOCA-Sel) a montré des effets bénéfiques en réduisant l'hypertrophie cardiaque, la fibrose, le stress oxydant et l'inflammation [55-61].

Dans un modèle d'hypertension et d'IC sans augmentation de l'aldostéronémie, un traitement à l'éplérénone prévient l'hypertrophie cardiaque, l'IC ainsi que l'inflammation des coronaires [62]. Chez des rats spontanément hypertendus (SHR), ayant subi une dénervation sinoaortique afin d'augmenter la variabilité de la pression sans modifier la pression moyenne, le RM est activé et passe du cytoplasme au noyau dans les cellules vasculaires intracardiaques et les cardiomyocytes. Cette activation participe aux effets délétères de la variation de pression à savoir, fibrose, recrutement de cellules inflammatoires, hypertrophie et diminution de la fraction d'éjection [63].

L'utilisation de puce sur des ARNs (acide ribonucléique) extraits de cellules en culture a permis d'identifier certains gènes régulés par le RM. Dans une lignée cellulaire de cardiomyocytes (H9C2), l'administration d'aldostérone a montré l'induction de gènes impliqués dans le remodelage de la MEC ainsi que l'inflammation [64]. En culture primaire de cardiomyocytes, l'activation du RM induit l'activité des métalloprotéases de la matrice (MMP pour Matrix Metalloproteinase) selon un processus dépendant des EROs [65].

In vivo, chez des souris surexprimant la rénine et l'aldostérone synthase dans les cardiomyocytes, il est montré que le RM participe à l'hypertrophie cardiaque induite par l'hypertension en inhibant le peptide natriurétique atrial (ANP pour Atrial Natriuretic Peptide), un facteur anti-hypertrophique [66]. L'inactivation du RM dans les cardiomyocytes induit, à l'inverse, une hypertrophie à l'état de base chez la souris, mais augmente l'expression de l'ANP lorsque les souris sont soumises à une sténose de l'aorte [67]. L'utilisation d'agonistes ou d'antagonistes pharmacologiques du RM ne permet pas d'étudier le rôle du RM dans un type

cellulaire précis. L'utilisation des modèles transgéniques a beaucoup apporté dans l'élucidation du rôle du RM dans le système cardiovasculaire. Il est à noter que l'inactivation globale et constitutive du RM est létale dès les premiers jours, à cause d'une fuite sodée rénale, confirmant le rôle prépondérant du RM dans la régulation de la balance sodée. L'utilisation de modèles transgéniques surexprimant ou inactivant le RM spécifiquement dans un type cellulaire donné a permis de dissocier les effets tissu-spécifiques du RM.

Dans le cœur, plusieurs modèles ont été réalisés afin étudier les effets spécifiques du RM dans les cardiomycocytes ou dans les fibroblastes cardiaques. La suractivation du système minéralocorticoïde cardiaque, que ce soit par surexpression du RM dans les cardiomycocytes ou surexpression de l'aldostérone synthase, entraîne une modification de la balance de remodelage de la matrice. Il a été montré que le RM cardiomycocytaire régule directement un facteur pro-fibrosant, le CTGF (Connective Tissue Growth Factor) [34]. De l'autre côté de la balance, l'augmentation d'expression de l'aldostérone synthase cardiaque induit une diminution des facteurs anti-fibrosants. Le RM participe à l'augmentation de la fibrose en augmentant à la fois les facteurs pro-fibrosants et en diminuant les facteurs anti-fibrosants [68].

L'inactivation du RM dans les cardiomycocytes prévient à la fois le remodelage et l'inflammation induits par le modèle DOCA-sel [69]. De même, l'inactivation du RM dans les cardiomycocytes prévient une partie des effets délétères induits par l'infarctus du myocarde. Les souris inactivées pour le RM (KO pour Knock-Out) présentent une meilleure fraction d'éjection et une zone d'infarctus réduite. Cette inactivation prévient l'hypertrophie cardiaque, augmente la densité capillaire et diminue le dépôt de collagène et l'expression de CTGF ainsi que la production d'anion superoxyde [70]. En revanche, dans un modèle de sténose de l'aorte, le KO cardiomycocytaire ne préserve que la fonction cardiaque et ne joue pas sur le remodelage. L'inactivation du RM dans les fibroblastes cardiaques, le deuxième type cellulaire le plus important dans le cœur, n'a aucun effet chez la souris dans ce modèle de sténose [67].

De nombreuses études réalisées *in vitro* ont montré l'implication du RM dans le remodelage ionique cardiaque. Bénitah *et al* ont mis en évidence par patch clamp l'augmentation du courant calcique I_{Ca} dans les cardiomycocytes de rats adultes traités pendant 24h avec de l'aldostérone [71] et la diminution de la densité du courant potassique sortant I_{to} [72]. Ce remodelage ionique est un phénomène précoce observé dans le cœur de rats ayant subi un

infarctus du myocarde et correspond à l'augmentation d'expression du canal calcique Cav1.2 et la diminution d'expression du canal Kv4.2. Ce remodelage est prévenu par l'antagonisme du RM [73]. Les modulations de ces courants ioniques observés *ex vivo* ont pour conséquences d'entraîner des arythmies ventriculaires dues à un allongement du potentiel d'action chez des souris surexprimant le RM spécifiquement dans les cardiomyocytes [74]. Ces souris présentent aussi une augmentation de l'activité du récepteur à la ryanodine, conséquence de la diminution d'une de ses protéines régulatrices, FKBP12 et FKBP12.6 [75]. La concentration plasmatique d'aldostérone régule le courant calcique dans les cardiomyocytes de souris [76]. Enfin, l'utilisation d'antagonistes du RM chez le chien insuffisant cardiaque prévient le développement d'arythmies [77-80].

En raison de la faible activité de la 11- β HSD2 au niveau cardiaque, la question du ligand du RM exprimé dans les cardiomyocytes reste débattue. En conditions normales, les glucocorticoïdes étant présents en quantité beaucoup plus importante que l'aldostérone, il est souvent considéré que ce sont ces derniers qui activent le RM cardiaque [81, 82]. Néanmoins, l'utilisation d'un modèle transgénique surexprimant l'aldostérone synthase au niveau cardiaque [68], ou encore l'identification de gènes cibles différentiels chez des souris surexprimant le RM dans les cardiomyocytes traitées avec de l'aldostérone ou des glucocorticoïdes [34] suggère une régulation plus complexe.

1.3.5.3 Le récepteur minéralocorticoïde vasculaire

L'autre organe composant le système CV est le réseau vasculaire. Les vaisseaux sanguins sont les conduits responsables de l'acheminement du sang, du cœur vers les tissus (réseau artériel) et des tissus vers le cœur (réseau veineux). L'expression du RM est aussi décrite au niveau vasculaire et l'utilisation de ses antagonistes a montré sa participation dans la réactivité vasculaire. Chez des patients insuffisants cardiaques de classe II et III, l'utilisation de spironolactone améliore la fonction endothéliale mesurée dans l'avant-bras. Les patients traités avec la spironolactone présentent une augmentation du flux sanguin artériel de l'avant-bras, en réponse à l'acétylcholine (Ach), plus importante que les patients sous placebo [83]. Cet effet se retrouve chez des patients hypertendus traités à l'éplérénone [84]. A l'inverse, la perfusion

d'aldostérone chez des sujets sains diminue la réponse vasodilatatrice à l'Ach [85]. Cet effet du RM sur la réactivité vasculaire pourrait être dû à la production de stress oxydant, mais l'utilisation de spironolactone directement sur des artères coronaires de cochon suggère également des effets non-génomiques du RM [86].

L'hyperaldostéronisme est associé à une altération de la fonction vasculaire chez des individus présentant un adénome sécrétant de l'aldostérone. La fonction vasculaire de ces patients est améliorée par résection de l'adénome, mais le mécanisme par lequel l'aldostérone influence la réactivité vasculaire reste à élucider. Il est proposé que l'aldostérone affecte la biodisponibilité du monoxyde d'azote (NO pour Nitric Oxide) en augmentant la quantité de radicaux libres, à la fois en accroissant leur production et en réduisant leur dégradation. Ainsi la perfusion d'aldostérone augmente l'activité de la NADPH oxydase et diminue l'expression et l'activité anti-oxydante via la diminution de la Glucose-6-phosphate déshydrogénase (G6PD), ce qui favorise la production d'EROs. Le blocage du RM prévient ces effets sur le stress oxydant et leurs conséquences sur la réactivité vasculaire [35].

La mise en évidence du rôle primordial du RM endothérial dans la réactivité vasculaire a été obtenue grâce à un modèle murin de surexpression cellule-spécifique. Les souris surexprimant le RM spécifiquement dans l'endothélium développent une hypertension modérée à l'état basal, qui est normalisée par l'utilisation d'un antagoniste du RM. L'augmentation de la réponse contractile des artères mésentériques aux vasoconstricteurs a également été mise en évidence chez ces souris, sans altérations morphologiques du lit vasculaire [87]. Le RM endothérial participe à la thrombose [88]. Dans le lit vasculaire choroïdien, l'activation inappropriée du RM par l'aldostérone ou les glucocorticoïdes induit la suractivation du canal potassique SK3 ce qui entraîne une vasodilatation délétère et un décollement de la rétine. L'utilisation d'un antagoniste du RM dans cette atteinte oculaire a montré un bénéfice thérapeutique spectaculaire [89]. À l'inverse de la suractivation, l'inactivation endothéliale du RM prévient la dysfonction endothéliale induite par le régime obésogène. L'inactivation diminue l'expression des sous-unités de la NADPH oxydase et augmente l'expression de gènes anti-oxydants [90]. Cette inactivation ne prévient pas l'augmentation de pression induite par le traitement DOCA-sel, mais prévient le recrutement de cellules inflammatoires et la fibrose cardiaque [91].

De manière intéressante, une étude a montré l'action indirecte du RM cardiomycocytaire sur la fonction vasculaire coronaire. La surexpression cardiaque du RM chez la souris induit une dysfonction endothéliale des artères coronaires due à l'altération de la voie du NO. Cette altération de la voie du NO n'est pas la conséquence de modification de la NO synthase endothéliale, mais d'une augmentation de la production d'espèces réactive de l'oxygène via la NADPH oxydase [92]. La surexpression de l'aldostérone synthase dans les cardiomycocytes avait déjà été montrée comme ayant des conséquences sur la fonction vasculaire coronaire. La surexpression de l'aldosynthase entraîne une dysfonction coronaire endothélium-indépendante due à la diminution de l'expression des sous-unités α et β des canaux potassiques de grande conductance activés par le calcium (BK_{Ca}) dans les cellules musculaires lisses (CMLs). Les canaux BK_{Ca} jouent un rôle important dans la voie de la vasorelaxation par l'EDHF [93].

Le RM et la 11- β HSD2 sont exprimés dans les CMLs humaines mais pas murines. Le RM et 11-BHSD2 sont aussi présents dans les CMLs provenant des veines [94]. L'aldostérone induit la transcription de gènes de l'inflammation comme l'ostéopontine ou l'IL6 et du remodelage comme les collagènes 1 et 3 dans les CMLs via le RM [95-97]. Chez la souris, l'inactivation du RM dans les CMLs entraîne une PAS plus basse, un tonus myogénique moins important et une réponse vasoconstrictrice à l'angiotensine II plus faible. Ces effets sont modulés par le canal calcique de type L qui est diminué dans les CMLs ne présentant pas de RM [98].

In vivo, le RM des CMLs joue aussi un rôle dans le remodelage de la paroi vasculaire. Notre laboratoire a mis en évidence la régulation de l'intégrine $\alpha 5$ par le RM dans l'aorte ayant des conséquences sur la rigidité vasculaire induite par le modèle de néphrectomie-aldostérone-sel (NAS) [99]. Il a aussi été montré que le RM participe de manière indirecte à la fibrose vasculaire en induisant l'expression de la protéine galectine 3 [100]. Dans un modèle murin d'anévrysme, l'utilisation d'éplérénone améliore la structure de la paroi vasculaire et diminue le recrutement de cellules inflammatoires et la production de cytokines pro-inflammatoires [101]. Il participe aussi dans le remodelage vasculaire suivant une lésion intime et ceci via le VEGFR1 [102].

1.3.6 Le récepteur minéralocorticoïde dans les cellules de l'immunité

Les cellules de l'immunité sont de plus en plus décrites pour leur rôle dans le déclenchement et le maintien d'une inflammation délétère dans de nombreux tissus et notamment dans le système CV. Leur présence est souvent observée dans le myocarde ou dans la paroi des vaisseaux lors de pathologies CVs, mais leur rôle direct est encore assez peu étudié. L'implication du RM dans ces types cellulaires reste à préciser.

Les premières études sur l'implication du RM dans les cellules immunitaires remontent au début des années 2000, où il a été montré *in vitro*, que l'aldostérone et le RM induisent les gènes pro-oxydants dans les cellules sanguines périphériques [103] et induisent un statut pro-inflammatoire, avec l'induction de l'expression de gènes comme PAI 1 et p22phox [104] ou la production des cytokines MCP1 et TNF α [105].

Le RM et la 11- β HSD2 sont exprimés dans les neutrophiles. Bergmann *et al* montrent que l'aldostérone (10^{-8} M) a un effet anti-inflammatoire dans les neutrophiles en inhibant le facteur de transcription NF κ B. En conséquence, le blocage du RM dans ces cellules restaure la voie de signalisation inflammatoire induite par NF κ B [106].

L'inactivation du RM dans la lignée myéloïde a montré son importance dans la polarisation des cellules et leur statut inflammatoire. *In vitro*, il a été montré que la modulation du RM dans des monocytes humains modifie l'expression de gènes de l'inflammation. L'aldostérone induit l'expression d'un phénotype pro-inflammatoire (M1) alors que l'éplérénone, modifie la polarisation des cellules avec l'expression de gènes répresseurs de l'inflammation (M2) [107]. Ces résultats sont retrouvés dans les monocytes isolés de souris inactivées pour le RM dans la lignée myéloïde. *In vivo*, cela a pour conséquence de prévenir l'hypertension et le remodelage CV induit par un modèle pharmacologique d'hypertension (un inhibiteur du NO, le L-NAME, associé à un vasoconstricteur puissant, l'angiotensine II) [108]. Dans le modèle DOCA-sel, l'inactivation génique du RM prévient l'activation des macrophages, mais ne prévient pas leur recrutement. Les macrophages n'induisent pas l'expression de gènes pro-inflammatoires et oxydants, ce qui a pour conséquence de prévenir la fibrose et l'hypertension induites par le DOCA-sel chez les souris inactivées pour le RM dans les macrophages [109, 110].

Enfin le RM a montré son importance dans d'autres types cellulaires de l'immunité tels que les cellules dendritiques. Le RM est exprimé dans les cellules dendritiques où il induit un phénotype Th17 pro-inflammatoire [111]. Ce phénotype pro-inflammatoire est induit dans le cœur de rat traités au DOCA-sel et l'inhibition de l'IL17 prévient l'augmentation de pression artérielle et le remodelage cardiaque [112].

Cela montre bien le lien entre les cellules de l'immunité et leur rôle dans l'inflammation observé lors de pathologies CVs et suggère la participation du RM dans ces phénomènes.

1.4 Lcn2, nouvelle cible du RM dans le système cardiovasculaire ?

1.4.1 Identification d'une nouvelle cible du RM dans le cœur

Les effets secondaires liés à l'utilisation d'antagonistes du RM en clinique, conduisent à chercher de nouvelles cibles thérapeutiques plus spécifiques des conséquences physiopathologiques de l'activation du RM. Ceci passe par une meilleure compréhension et une meilleure discrimination des voies de signalisations sous-jacentes au RM. Le RM étant un facteur de transcription (par opposition aux effets rapides, dits non génomiques), cela implique de savoir quels gènes sont régulés par ce dernier dans le système CV. Dans ce but, notre laboratoire a décidé d'utiliser une approche transcriptomique globale en utilisant une puce à ARN (ou microarray). La puce à ARN a été réalisée sur les ARNm de cœur soit 1) de souris transgéniques surexprimant le RM dans les cardiomyocytes [74], soit 2) de souris surexprimant le RG dans les cardiomyocytes [113] ou enfin 3) de souris sauvages. Nous avons décidé de nous intéresser aux gènes dont l'expression était uniquement modifiée par la surexpression du RM et non par celle du RG (donc considéré comme spécifique du RM) et qui pouvaient jouer un rôle dans le remodelage de la MEC. C'est ainsi qu'a été identifié le gène de la lipocaline 2 (Fig.7). Le chapitre suivant s'attachera donc à présenter cette protéine.

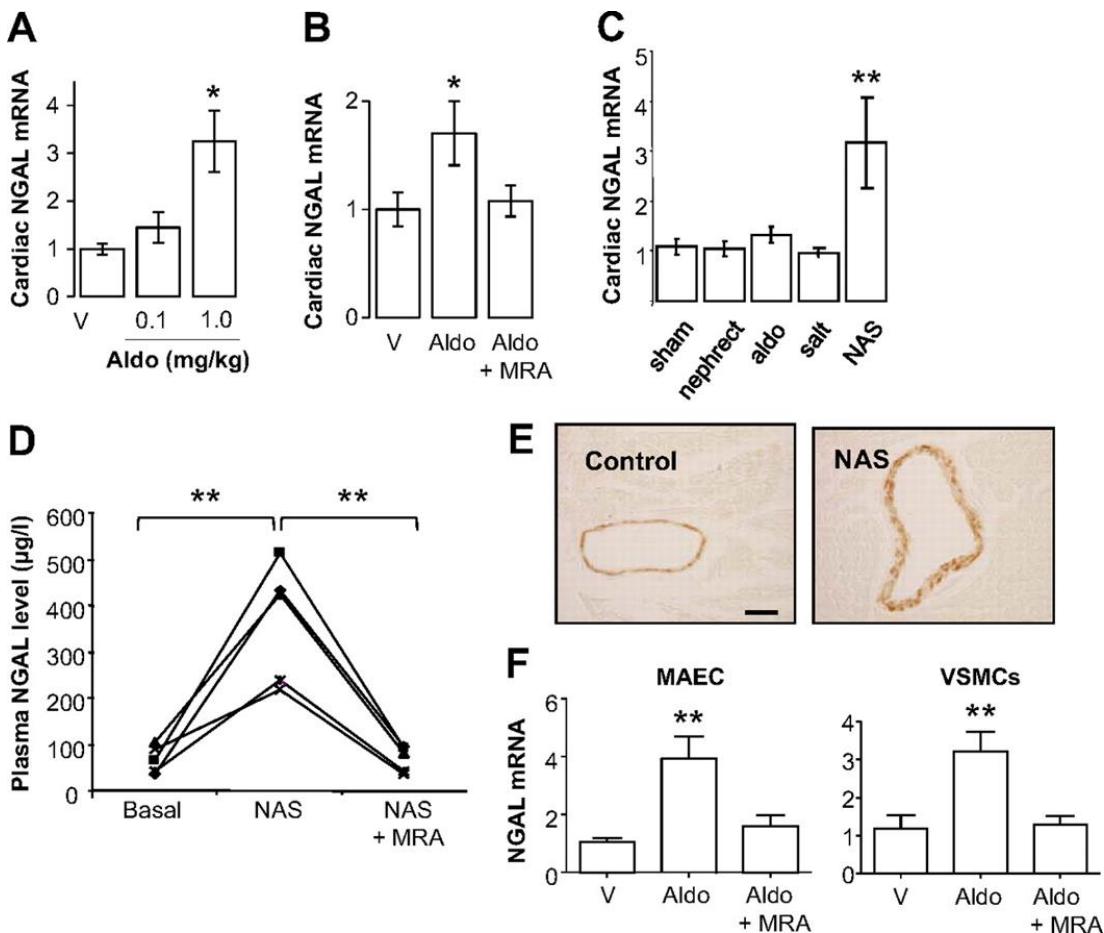


Figure 7. Lcn2 est induite par le RM dans le système cardiovasculaire. Expression cardiaque de Lcn2 chez des souris sauvages traitées avec un véhicule ou une injection d'aldostéron puis sacrifiées 6h après (A) ou traitées durant 4 semaines avec une forte dose d'aldostéron (1 mg/kg/J) seule ou en association avec la spironolactone (200 mg/kg/J)(B). (C) Expression cardiaque de la lipocaline 2 chez des souris soumises au protocole NAS durant 4 semaines ou l'un de ses composants. (D) Dosage plasmatique de Lcn2 avant NAS, après 4 semaines de NAS puis après 4 semaines de NAS et de spironolactone. (E) Immunomarquage de Lcn2 dans les coronaires de souris traitées au NAS et (F) expression de Lcn2 dans des cultures primaires de cellules endothéliales (MAEC) ou de cellules musculaire lisse vasculaire (VSMCs)(Latouche *et al*, 2012).

1.4.2 La famille des lipocalines

La lipocaline 2 fait partie de la famille protéique des lipocalines. Cette famille est composée de nombreuses protéines de petite taille dont la majorité ont un rôle de transporteur, essentiellement de substances lipophiles (telles que le rétinol, ou certaines molécules odorantes). Cette capacité de transport est due à leur structure tertiaire commune appelée « lipocalin fold ».

Cette structure se compose de huit feuillets β antiparallèles liés entre eux par des liaisons hydrogènes. Les feuillets sont reliés entre eux par des boucles. Cette architecture donne aux lipocalines une forme de calice. C'est dans cette coupe que vont venir se lier des petites molécules hydrophobes.

Contrairement aux autres familles protéiques, regroupées sur la base d'une similarité entre les séquences d'a.a., les lipocalines sont identifiées sur la base du partage d'une structure tertiaire conservée. Leurs séquences d'a.a. peuvent ne posséder que 20% de similitude. Ces différences observées entre les séquences d'a.a. des divers membres de cette famille donnent lieu à une grande variété de ligands.

Sur la base de trois domaines structuraux communs, les lipocalines se classent en deux branches. La branche des « Kernel » possède les trois domaines conservés simultanément (à l'instar de la lipocaline 2), tandis que la branche « Outlier » ne possède qu'un ou deux des domaines parmi les trois, mais jamais les trois en même temps (Fig.8) [114-117].

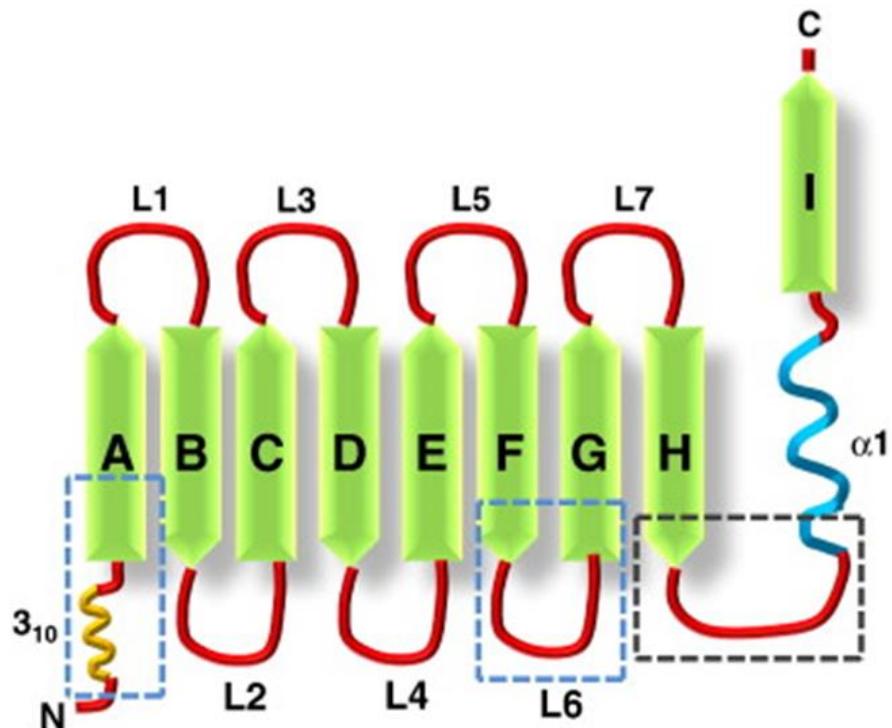


Figure 8. Structure générale des lipocalines. Les domaines structuraux communs aux lipocalines sont indiqués en bleu tandis que la région dont les acides aminés sont conservés entre les lipocalines est indiquée en noir (Chakraborty *et al*, 2012).

1.4.3 La lipocaline 2

La lipocaline 2 est un des membres de cette famille, dont elle partage les caractéristiques. C'est une glycoprotéine de petite taille, environ 25 kDa. La lipocaline 2 a été identifiée dans différentes espèces et de nombreuses situations pathologiques ou expérimentales. En plus de la lipocaline 2, elle est aussi appelée Neutrophil Gelatinase Associated Lipocalin (NGAL), 24p3, siderocalin ou encore uterocalin. Dans les travaux qui vont suivre, nous nous intéresserons essentiellement à l'isoforme murine (étudiée majoritairement dans les modèles expérimentaux) et à l'isoforme humaine (analysée en clinique). Par souci de clarté, j'utiliserai, par la suite, essentiellement le terme de lipocaline 2 (Lcn2 chez la souris, LCN2 chez l'homme).

Chez l'homme, la protéine est codée par un gène situé sur le chromosome 9. Le gène LCN2 est composé de sept exons et produit cinq transcrits donnant tous une protéine, la plus commune composée de 198 a.a. [118]. Elle a été identifiée pour la première fois au début des années 90 dans les granules des neutrophiles [119].

Chez la souris, le gène est situé sur le chromosome 2 et est composé de six exons, pour deux transcrits fonctionnels. La protéine murine est sensiblement plus longue que la forme humaine, puisque les deux protéines traduites comportent entre 200 et 284 a.a. [118]. La lipocaline 2 murine ne possède que 62% d'homologie avec son isoforme humaine [120] et fut la première à être identifiée. Elle a été purifiée à partir de cellules rénales infectées avec un vecteur SV40 [121].

1.4.3.1 Structure tridimensionnelle

La lipocaline 2 possède une structure en tonneau, à l'instar des autres membres de sa famille. Son site de liaison possède cependant deux particularités : il est polaire, et assez grand pour accueillir certaines protéines [122]. La polarité de son site de liaison permet à la lipocaline 2 de lier avec une plus grande affinité les substances lipophiles que les substances hydrophiles (forme rétinol vs forme acide rétinoïque). Cela dit, les groupes fonctionnels attachés au ligand ne

sont pas le seul type de paramètre impliqué dans la liaison avec la lipocaline 2. La structure tridimensionnelle du ligand ainsi que sa stœchiométrie entrent aussi en jeu [123].

De plus, la présence d'un résidu cystéine sur le plancher du calice permet la formation d'un pont de liaison di-sulfure avec la MMP9 (aussi appelée gélatinase B). La MMP9 est une protéine dont l'action enzymatique permet la dégradation de certains composants de la MEC comme le collagène. L'association de la lipocaline 2 avec la MMP9 ne joue pas sur son activité enzymatique, mais plutôt sur la stabilité de la protéine et diminue sa dégradation [124, 125]. C'est cette liaison à la MMP9 qui donne un des noms de la lipocaline 2, la Neutrophil Gelatinase Associated Lipocalin. La comparaison de la séquence peptidique entre le rat, la souris et l'homme a mis en évidence l'absence du résidu nécessaire à la liaison de la MMP9 chez les rongeurs. Cela suggère, a priori, que la liaison lipocaline 2/MMP9 est impossible chez la souris. Le rat ne présente pas non plus le résidu cystéine décrit comme nécessaire. Néanmoins des travaux ont mis en évidence cette liaison chez le rat [126]. Cette observation est importante à noter car si la lipocaline 2 est actuellement analysée en clinique humaine, l'essentiel de la recherche expérimentale est réalisée chez les rongeurs. En dehors de la MMP9, la lipocaline 2 est capable d'interagir avec certaines protéines d'origine bactérienne (sidérophore, cf. 1.4.3.3.1). Elle présente aussi la possibilité de se dimériser [127].

1.4.3.2 Expression et régulation de la lipocaline 2

1.4.3.2.1 Expression à l'état normal

En situation physiologique, la lipocaline 2 est exprimée dans de nombreux tissus. Chez l'homme, on retrouve son expression au niveau des tissus du système CV [128]. C'est aussi le cas chez la souris [129]. La lipocaline 2 est une protéine secrétée, il est donc possible de la doser dans le plasma. Chez l'homme sain, la concentration plasmatique de la lipocaline 2 est autour de 70 ng/ml, tandis que chez la souris elle est légèrement plus élevée (100 ng/ml) [130]. Sa clairance est essentiellement rénale [119, 131, 132], ce qui rend son dosage aussi possible dans l'urine.

1.4.3.2.2 Expression pathologique

L'expression de la lipocaline 2 est induite dans de nombreuses situations pathologiques, aussi bien inflammatoires, métaboliques qu'ischémiques, mais également dans certains cancers (voir table 4 et 5 [117]). Sa stabilité, sa résistance aux protéases et sa sécrétion, font de la lipocaline 2 un biomarqueur de choix, utilisé en clinique.

1.4.3.2.3 Régulation

La régulation de son expression dans ces nombreuses pathologies a été largement décrite. Son induction dans plusieurs situations inflammatoires suggère son implication dans la cascade cytokinique. De fait, la lipocaline 2 est induite par diverses cytokines pro-inflammatoires, IL-1 β , IL-22, IL-17, IFN γ et TNF α [133, 134]. Le facteur de transcription NF κ B peut se fixer sur le promoteur de la lipocaline 2 et est nécessaire à l'induction de la lipocaline 2 en réponse à certaines cytokines [135].

La lipocaline 2 possède également, dans son promoteur, une séquence de liaison au récepteur glucocorticoïde (GRE, Glucocorticoid Response Element). *In vitro*, il a été montré que le RG est capable de se lier directement au promoteur de la lipocaline 2 et d'induire son expression, en réponse à l'utilisation de dexamethasone, un glucocorticoïde synthétique [136, 137]. Son expression est aussi augmentée dans le cœur de souris surexprimant le RG dans les cardiomycocytes [129].

Le RG et le RM ont la faculté de se lier aux mêmes séquences promotrices. Dans notre laboratoire, il a été récemment montré que le RM peut aussi se fixer sur le promoteur de la lipocaline 2, via la séquence GRE, dans une lignée cellulaire de cardiomycocytes transfectées avec le RM. La régulation de l'expression de la lipocaline 2 par le RM dépend du temps d'incubation, mais aussi de la dose. Les glucocorticoïdes induisent également l'expression de la lipocaline 2 en culture, mais celle-ci est uniquement bloquée par les antagonistes du RM et non ceux du RG. L'induction de la lipocaline 2 dans les cardiomycocytes passe donc par le RM quel que soit le ligand. L'induction de la lipocaline 2 dans le cœur de souris surexprimant le RM dans les

cardiomyocytes est augmentée de 150 fois, alors qu'elle n'est augmentée que de 5 fois dans le cœur de souris surexprimant le RG dans les cardiomyocytes [34, 129].

Deux récepteurs à la lipocaline 2 ont été décrits jusqu'à présent : la mégaline et le récepteur 24p3. Ces deux récepteurs présentent des schémas de distribution tissulaires différents : la mégaline est localisée essentiellement au niveau rénal et plus précisément au niveau tubulaire proximal, tandis que le récepteur 24p3 est décrit comme étant ubiquitaire. Ces deux récepteurs sont décrits essentiellement comme étant des protéines membranaires jouant un rôle dans l'internalisation de la lipocaline 2 dans la cellule. Leurs rôles respectifs dans les différentes fonctions de la lipocaline 2 restent à étudier.

1.4.3.3 Fonction

1.4.3.3.1 Modulation du fer intracellulaire et fonction bactériostatique

De nombreuses fonctions ont été suggérées pour la lipocaline 2. Ces fonctions sont grandement dépendantes de la structure de la protéine et notamment des ligands qu'elle peut avoir dans son site de liaison. Il a été proposé dans un premier temps que la lipocaline soit un agent chimiотактиque pour les neutrophiles du fait de sa capacité à pouvoir lier de tels agents comme le peptide bactérien N-formyl-Met-Leu-Phe (fMLF) [138]. Si la lipocaline semble avoir des effets attractant, cela ne semble pas venir de la liaison avec cette molécule puisqu'elle paraît faible [122].

Par cristallographie, il a été montré que la lipocaline 2 se lie avec une forte affinité à certains sidérophores bactériens, comme l'enterochaline [139] et la carboxymycobactine [140]. Les sidérophores sont de petites molécules secrétées par les bactéries lors d'une invasion et capables de lier le fer de l'hôte. Le fer est un élément indispensable au développement bactérien et il est présent en quantité très faible dans l'organisme. Ces protéines vont donc se lier au fer libre (présent dans le liquide intestinal ou dans les macrophages) puis vont retourner dans la bactérie pour être utilisées dans la prolifération. En liant les sidérophores synthétisés par les bactéries, la lipocaline 2 va priver ces dernières d'un élément important et ainsi exercer un effet bactériostatique [139]. Cela a été montré *in vivo*, à l'aide de modèles murins inactivés pour la

lipocaline 2 (KO Lcn2). Ces souris KO présentent une mortalité accrue aux infections bactériennes (*E.Coli*) utilisant des sidérophores reconnus par la lipocaline 2 [130, 141]. Grâce à la plasticité de son site de liaison, la lipocaline 2 est capable de lier certains de ces sidérophores. La réponse des KO n'est pas différente de celle souris sauvages lorsqu'il s'agit d'une souche bactérienne produisant des sidérophores non reconnus par la lipocaline 2. Cependant l'expression de cette dernière ne se limite pas aux infections bactériennes et son rôle semble être plus large.

La lipocaline 2 est capable de se lier aux sidérophores, que ceux-ci soient liés au fer ou non, mais ne peut pas interagir avec le fer seul [139]. Il a été montré récemment que la lipocaline 2 pouvait se lier aux sidérophores eucaryotes, les catéchols, suggérant un rôle physiologique dans l'homéostasie du fer [142] et pas seulement dans le cas d'infections bactériennes. Les catéchols se lient faiblement avec la lipocaline 2, excepté en présence de fer. Cette interaction entre la lipocaline 2 et les catéchols est inhibée par les sidérophores bactériens, suggérant une compétition entre les sidérophores bactériens et les sidérophores endogènes pour le fer lors d'une infection. Lorsque la lipocaline 2 se lie à un siderophage libre, le complexe internalisé dans une cellule va être capable de chélater le fer intracellulaire et induire l'apoptose de celle-ci [143]. La lipocaline 2 a par ailleurs récemment été décrite comme pouvant lier l'acide linoléique [144].

1.4.3.4 *Lcn2 dans les systèmes cardiovasculaire et rénal*

L'expression de la lipocaline 2 est observée dans de nombreuses situations pathologiques, notamment dans plusieurs maladies métaboliques et certains cancers [117]. Par volonté de concision, cette partie de l'introduction se limitera aux rôles de la lipocaline 2 dans la physiologie et la physiopathologie du système CV et du système rénal. Par conséquent, son implication dans les cancers ainsi que les pathologies métaboliques sera peu ou pas, abordée dans cette thèse.

Le système CV se définit comme étant l'ensemble de l'appareil circulatoire de l'organisme ayant pour mission de contenir et de distribuer le volume sanguin. De par son rôle dans la régulation du volume sanguin et, par voie de conséquence sur l'hémodynamique, la fonction rénale a de grandes répercussions sur le système CV.

La littérature récente décrit la lipocaline 2 comme jouant un rôle important dans les processus inflammatoires aussi bien physiologiques que physiopathologiques, y compris dans les systèmes cardiovasculaire et rénal. Le rôle de la lipocaline 2 dans la biologie des cellules de l'immunité innée permet d'apporter des éléments de compréhension sur les possibles voies de signalisation et mécanismes d'action de la lipocaline 2 aux niveaux cardiaque, vasculaire et rénal.

L'utilisation de modèles murins inactivés pour la la lipocaline 2 a beaucoup apporté à la compréhension du rôle de cette dernière. Il est à noter que l'ensemble des travaux publiés sur l'inactivation du gène Lcn2 provient de trois souches transgéniques différentes : la souris provenant de l'équipe de T. Berger [141], utilisée dans notre laboratoire, celle de l'équipe de S. Akira [130] et enfin la lignée engendrée au laboratoire de L.R. Devireddy [145].

1.4.3.4.1 Lcn2 dans la physiopathologie rénale

Si la lipocaline 2 a été identifiée en premier lieu dans une culture d'épithélium rénal de souris à la fin des années 80 [121], il aura fallu attendre une vingtaine d'années, avant que son rôle au niveau du tissu rénal et de sa physiologie soit étudié.

1.4.3.4.1.1 Pathologie rénale aigüe

La première description de la lipocaline 2 dans le rein humain, ainsi que dans le système CV, a été réalisée par le groupe de Niels Borregaard à la fin des années 90. Au moyen d'une hybridation de l'ADNc de la lipocaline 2, les auteurs décrivent son expression dans un éventail de tissus humains. La lipocaline 2 est exprimée dans le rein, faiblement dans le cœur et l'aorte, et avec une expression maximale dans la trachée et la moelle épinière [128].

Son implication en physiopathologie rénale est mise en évidence peu de temps après, en 2003, à l'aide d'une approche transcriptionnelle pan-génomique réalisée dans un modèle murin d'ischémie rénale. Les travaux de Supavekin *et al* identifient la lipocaline 2 pour la première fois

comme étant un gène induit dans le rein ischémique chez la souris. Depuis, la lipocaline 2 a été décrite comme jouant un rôle bénéfique dans les lésions rénales aigües [146].

Suite à une lésion rénale aigüe, ischémique ou non (néphrotoxicité à la cisplatine, un agent pharmacologique utilisé en chimiothérapie), l'expression de la lipocaline 2 augmente rapidement dans les tissus, dès les premières heures suivant la lésion [146-148]. Son expression est trouvée essentiellement dans les tubules proximaux. De la même manière que dans le rein, son augmentation dans les urines après ischémie ou injection de cisplatine est très rapide. La lipocaline 2 apparaît dans les urines avant la diminution de la clairance de la créatinine, le marqueur classique de dysfonction rénale. Cette augmentation précoce de la lipocaline 2 urinaire suite à une lésion rénale en fait un bon marqueur clinique. Elle possède aussi l'avantage d'être mesurable dans les urines dès les premières heures suivant l'ischémie, chez des souris présentant une atteinte rénale aigüe asymptomatique. Sa concentration est corrélée à la sévérité de la pathologie [147]. L'injection de la lipocaline 2 une heure avant l'ischémie a un effet protecteur sur les lésions tubulaires et la dysfonction rénale. La lipocaline 2 est colocalisée avec les cellules en prolifération dans les tubules proximaux. Il est proposé que la lipocaline 2 joue un rôle dans la réépithérialisation des tubules à la suite d'une lésion. La lipocaline 2 lie le fer, va être internalisée dans les cellules épithéliales tubulaires et induire l'induction de gènes protecteurs tels que l'hème oxigénase 1 (HO1), diminuant l'apoptose et augmentant la prolifération. [149]. En effet, les effets bénéfiques obtenus par l'injection de la lipocaline 2 durant l'ischémie sont annulés lorsque le fer ou HO1 sont inhibés [150].

La lipocaline 2 semble donc jouer un rôle bénéfique dans les lésions rénales aigües. Néanmoins, l'utilisation de modèles murins inactivés pour la lipocaline 2 n'a pas permis de confirmer ces résultats. En effet, les souris KO Lcn2 ne présentent pas de réponse différente à l'ischémie rénale aigüe [141]. De même, la lipocaline 2 ne semble pas être indispensable à la néphrogenèse, comme cela a pu être suggéré [151-153], puisque les différents KO ne présentent pas de défaut de développement [130, 141, 145, 154].

1.4.3.4.1.2 Pathologie rénale chronique

La lipocaline 2 a aussi été impliquée dans un modèle de dysfonction rénale chronique. Dans un modèle de lésion rénale induite par néphrectomie subtotale, Viau *et al* montrent que la lipocaline 2 est augmentée dans les tubules proximaux des reins de souris malades 2 mois après l'opération. La production de la lipocaline 2 est corrélée à la sévérité des lésions tubulaires et la concentration urinaire est corrélée à la synthèse rénale. Les souris inactivées pour la lipocaline 2 sont partiellement protégées contre les lésions tubulaires et la dysfonction rénale induite par la néphrectomie subtotale. Le fer n'est pas responsable des effets prolifératifs délétères de la pathologie. La lipocaline 2 ferait partie de la cascade d'activation de l'EGFR (Epidermal Growth Factor Receptor) [155].

En conclusion, à l'heure actuelle, la lipocaline 2 est décrite comme ayant un rôle protecteur dans les lésions rénales aiguës, en favorisant la réépithéllisation et en diminuant l'apoptose via le fer. Ces effets sur le court terme sont remis en cause par l'utilisation de modèles transgéniques inactivés pour la lipocaline 2, qui ne présentent pas d'altérations lors de la nephrogenèse ni de l'ischémie rénale. En pathologie chronique, la lipocaline 2 semble avoir des effets délétères au niveau des tubules proximaux. La lipocaline 2 induirait une prolifération anormale de l'épithélium via le récepteur à l'EGFR. La lipocaline 2 s'accumule dans les tubules proximaux lésés et sa concentration urinaire est corrélée à la sévérité des lésions. Cela fait qu'actuellement La lipocaline 2 est utilisée en clinique humaine comme marqueur précoce de la dysfonction rénale.

1.4.3.4.2 Au niveau cardiaque

1.4.3.4.2.1 En clinique

En clinique, la lipocaline 2 est associée à de nombreuses maladies cardiaques, et son dosage plasmatique est utilisé comme marqueur de la sévérité de la pathologie ou comme valeur pronostique sur la mortalité CV. Un taux élevé de lipocaline 2 plasmatique obtenu chez des patients souffrant de coronaropathies est indicateur de mortalité CV sur 3 mois, 6 mois ou encore

4 ans [156-158]. L'augmentation de la lipocaline 2 dans le plasma est aussi associée à une augmentation de l'activation leucocytaire et, dans certains cas, à certains marqueurs cliniques de l'inflammation comme la protéine réactive C (CRP, C reactive protein) [157-159]. La lipocaline 2 plasmatique est aussi associée à la dysfonction rénale, dans le syndrome cardiorénal [159]. Malgré son association aux pathologies CVs, son implication exacte dans les mécanismes responsables de ces complications cliniques reste inexpliquée.

1.4.3.4.2.2 Physiopathologie cardiaque aigüe

L'utilisation de modèle animaux a permis de comprendre un peu plus le rôle de la lipocaline 2 dans les pathologies CVs. La lipocaline 2 a été mise en évidence au niveau cardiaque, au début des années 2000, à l'aide d'une approche pan génomique. La lipocaline 2 a été identifiée comme un gène dont l'expression est augmentée dans un modèle de transplantation cardiaque. A l'instar du rein, l'expression de la lipocaline 2 est augmentée dans le cœur ischémique dans les heures suivant la reperfusion [160]. Afin d'identifier la source de la lipocaline 2, Aigner *et al* ont étudié l'expression et la localisation de la lipocaline 2 dans un modèle d'allogreffe cardiaque réalisée entre souris sauvages et souris inactivées pour la lipocaline 2. L'expérience révèle que la lipocaline 2 est exprimée dans le greffon cardiaque issu de souris KO et transplanté chez des souris sauvages, mais qu'elle est absente dans le cœur issu de souris sauvages transplanté chez une souris KO Lcn2. Ces résultats suggèrent que l'augmentation de la lipocaline 2 dans le myocarde ischémique provient des granulocytes infiltrant le greffon. L'inactivation de la lipocaline 2 diminue le recrutement des granulocytes chez les KO [132] et diminue l'expression de cytokines pro-inflammatoires ainsi que l'apoptose [161].

Dans un modèle d'ischémie cardiaque réalisée chez des souris soumises à un régime riche en graisse, l'inactivation de la lipocaline 2 confère une meilleure fonction cardiaque et une meilleure fonction mitochondriale dans le cœur isolé et perfusé que dans celui des souris sauvages. Ce bénéfice est perdu lorsque les souris KO sont injectées avec de la lipocaline 2 recombinante [162].

1.4.3.4.2.3 Physiopathologie cardiaque chronique

La lipocaline 2 est aussi retrouvée dans l'IC chez les patients et dans les modèles expérimentaux. L'expression de la lipocaline 2 est augmentée dans les cardiomyocytes [163]. La lipocaline 2 recombinante induit l'apoptose de lignées cardiomyocytaires [164].

Contrairement à l'homme, l'expression de la lipocaline 2 chez le cochon est diminuée dans l'IC. Chez le cochon, la lipocaline 2 forme un complexe protéique avec la MMP9, la MMP2 ainsi que TIMP. Ces complexes de plusieurs protéines à haut poids moléculaire (MMPs/lipocaline 2/TIMP) ne sont pas actifs en zymographie, mais peuvent libérer des protéines actives de plus petites tailles. Les complexes serviraient alors de réservoir pour les protéines actives [165].

1.4.3.4.3 Au niveau vasculaire

En clinique humaine, la concentration plasmatique de lipocaline 2 est associée à diverses pathologies de la paroi vasculaire comme les anévrismes [166-168] ou l'athérosclérose [164, 169-172]. Elle est décrite comme participant à l'inflammation ainsi qu'au remodelage de la matrice extracellulaire associé et dans la régulation de la réactivité vasculaire.

1.4.3.4.3.1 Lipocaline et remodelage vasculaire

Le rôle de la lipocaline 2 a été mis en évidence dans la pathologie vasculaire pour la première fois dans un modèle de lésions carotidiennes par angioplastie chez le rat. Dans ce modèle, l'expression de la lipocaline 2 est augmentée dans les jours suivant la lésion. La lipocaline 2 est exprimée uniquement dans les CMLs. Son expression est prévenue lorsque le facteur de transcription NF κ B, un médiateur important de l'inflammation, est inhibé. L'inactivation de NF κ B prévient aussi l'activité gélatinase dans la paroi vasculaire. Cela suggère une participation de la lipocaline 2 dans le processus inflammatoire en réponse à une lésion

mécanique. La lipocaline 2 est induite par IL1 β dans des cultures de CMLs de rat où elle forme un complexe avec MMP9 dans le surnageant [126].

L'expression de la lipocaline 2 a aussi été observée dans l'anévrysme de l'aorte, où son mode d'action semble impliquer la MMP9 et où elle est associée aux cellules immunitaires de la réponse innée présentes dans le thrombus et la paroi vasculaire. Chez l'homme, la lipocaline 2 est localisée avec les neutrophiles, à la fois dans le thrombus et dans le mur vasculaire. La lipocaline 2 et MMP9 sont présentes dans le thrombus, en forme libre mais aussi en complexe (co-localisée). Le complexe lipocaline 2/MMP9 est localisé dans toutes les parties de l'anévrysme et présente une activité enzymatique gélatinase [166].

Dans l'athérosclérose, la lipocaline 2 est exprimée dans les différents types cellulaires composant la paroi vasculaire, les CMLs, l'endothélium et les macrophages [173]. La lipocaline 2 est corrélée à la stabilité de la plaque. Dans l'athérosclérose chez l'homme, elle est corrélée positivement à l'activité de la MMP9 et secrétée par les plaques d'athérome [174]. Au niveau cellulaire, la lipocaline 2 est décrite comme jouant un rôle dans la migration des CMLs, processus important de l'athérosclérose [175].

1.4.3.4.3.2 *Lcn2 et réactivité vasculaire*

La lipocaline 2 est aussi décrite comme jouant un rôle dans la réactivité vasculaire. Les travaux de Liu *et al* montrent que l'inactivation constitutive de la lipocaline 2 prévient les altérations de la réactivité vasculaire induites par l'obésité. En effet, l'administration d'un régime riche en graisses durant 17 semaines chez des souris sauvages induit une augmentation des réponses vasoconstrictrices à la phényléphrine (agoniste alpha adrénergique) et à l'Ach dans les carotides ainsi qu'une diminution de la réponse vasorelaxante à l'insuline. Ces modifications de sensibilité aux agents vasoactifs sont totalement prévenues chez les souris inactivées pour la lipocaline 2 (KO Lcn2). Ces effets sur la réactivité vasculaire sont associés à la régulation de la pression artérielle, puisque que les souris KO Lcn2 sont aussi protégées contre l'augmentation de la pression artérielle systolique (PAS) induite par le régime gras. L'administration aigüe de lipocaline 2 recombinante a des effets délétères lorsqu'elle est injectée chez des souris KO Lcn2

sous régime gras. Dès l'injection de la protéine recombinante (et ce jusqu'à 8h après), La lipocaline 2 induit une augmentation de la contraction à l'Ach, une diminution de vasodilation à l'insuline. Au niveau moléculaire, la lipocaline 2 induit un découplage de la NO synthase endothéliale, diminution de la production de monoxyde d'azote et la diminution de phosphorylation de la synthase de monoxyde d'azote endothéliale (eNOS, endothelial Nitric Oxide Synthase) en cellules. Ces effets de la lipocaline 2 sont régulés par le cytochrome P450 2C car ils sont bloqués lorsque que l'on utilise son inhibiteur [176].

1.4.3.4.4 Lcn2 dans les cellules immunitaires de la réponse innée

La cinétique et le caractère systémique de l'expression de la lipocaline 2 dans de nombreuses situations physiopathologiques ont poussé les recherches sur la lipocaline 2 vers des domaines communs et des mécanismes cellulaires partagés par les différents organes. Depuis plusieurs années, un nombre croissant d'études se penche sur la participation de la lipocaline 2 dans la réponse immunitaire innée et dans les processus inflammatoires associés.

1.4.3.4.4.1 *Lcn2 et inflammation*

La lipocaline 2 est augmentée dans un modèle expérimental de glomérulonéphrite, une inflammation chronique rénale. Cette augmentation de la lipocaline 2 au niveau rénal et urinaire est corrélée avec l'augmentation des lésions tubulaires rénales. Ces effets sont prévenus chez les souris inactivées pour le gène de la lipocaline 2. Ces bénéfices sur les lésions rénales sont perdus dès lors que les souris sont injectées avec la protéine lipocaline 2 recombinante. Les souris inactivées pour la lipocaline 2 sont protégées contre l'augmentation de protéinurie induite par la néphrite. L'injection de lipocaline 2 induit la régulation de gènes liés à l'apoptose et à l'inflammation *in vitro* et *in vivo* [177]. Ces résultats restent controversés, puisqu'une autre étude réalisée sur un autre modèle de néphrite montre un effet délétère de l'inactivation de la lipocaline 2. En effet, Eller *et al* montrent des lésions et l'inflammation rénales sont plus importante chez les souris KO présentant une néphrite que chez les souris sauvages [178].

L'augmentation de la lipocaline 2 est aussi observée dans l'inflammation chronique du myocarde. Chez des rats présentant une myocardite induite expérimentalement, l'expression de la lipocaline 2 est soutenue, à l'instar d'IL1 β , une cytokine pro-inflammatoire. La lipocaline 2 est exprimée essentiellement dans les cardiomyocytes, les fibroblastes et les cellules endothéliales, mais faiblement dans les cellules myéloïdes. La lipocaline 2 est aussi augmentée dans le cœur de patients présentant une myocardite [179].

De manière plus générale, l'expression de la lipocaline 2 est induite dans de nombreux modèles expérimentaux de pathologies inflammatoires, où son inactivation est bénéfique [180, 181]. Après l'identification pour la première fois chez l'homme dans les granules des neutrophiles, plusieurs études se sont penchées sur le rôle de la lipocaline 2 dans les cellules de l'immunité.

Ainsi, la lipocaline 2 induit le recrutement de leucocytes *in vitro* et *in vivo* [182]. Les souris inactivées pour la lipocaline 2 présentent un défaut de recrutement de leucocytes suite à l'injection de LPS ou de thyoglycolate. L'utilisation de lipocaline 2 recombinante ne corrige pas le défaut de recrutement de leucocytes chez les KO [182]. L'injection de caséine chez les KO Lcn2 n'induit pas l'expression des cytokines pro-inflammatoires telles que le TNF α ou l'IFN γ , par rapport aux souris sauvages [154]. Les neutrophiles inactivés pour la lipocaline 2 présentent une diminution de leur fonction de phagocytose, de leur fonction bactéricide, ainsi que de leur apoptose. En culture, l'utilisation de lipocaline 2 recombinante sur des macrophages induit une polarisation pro-inflammatoire (appelée M1) et inhibe le statut anti-inflammatoire (appelé M2). Les mêmes résultats sont retrouvés *in vivo*, où l'inactivation de la lipocaline 2 chez les souris prévient la polarisation des macrophages vers un statut M1 [183].

1.5 Aldostérone, RM et lipocaline 2

L'interaction entre le RM et la lipocaline 2 est désormais mieux renseignée. La présence de séquences HRE pouvant lier les récepteurs stéroïdiens et sa régulation par le RM ont été détaillés, notamment dans notre laboratoire [129, 136]. La question de la spécificité de l'activation de la lipocaline 2 par le RM dans le cœur par rapport au RG a été étudiée par Latouche *et al* [129]. La

spécificité de l'activation de la lipocaline 2 par le complexe aldo/RM plutôt que gluco/RM a été confirmée au laboratoire en étudiant la régulation de gènes dans le cœur souris surexprimant le RM, traitées avec ou sans aldostérone [34]. Entre-temps, l'augmentation de l'expression de la lipocaline 2 au niveau cardiaque a aussi été observée après 5 semaines de traitement DOCA-sel [184]. Enfin, le groupe d'Iris Jaffe a montré que le traitement d'aorte *ex vivo*, par l'aldostérone entraîne une augmentation de la lipocaline 2. Les souris étaient traitées avec de la spironolactone pour prévenir l'activation du RM au niveau basal. Une fois prélevées, les aortes étaient traitées avec 100nM l'aldostérone à différents temps d'incubation. La lipocaline 2 est induite à partir de 8 heures [185]. Au laboratoire, des données non publiées montrent la régulation de la lipocaline 2 par le RM dans des cultures de macrophages, de cellules dendritiques, le tissu adipeux de souris mutées db/db ou encore les adipocytes de souris surexprimant le RM dans les adipocytes. L'ensemble de ces données, en plus de celles publiées dans la littérature ont renforcé le lien entre la lipocaline 2 et le RM. Suite aux résultats obtenus dans le cœur de souris surexprimant le RM dans les cardiomyocytes, l'interaction entre RM et lipocaline 2 nous a paru intéressante à étudier dans le système CV.

1.6 Objectif de la thèse

Notre laboratoire étudie les effets du complexe aldo/RM dans les tissus non épithéliaux (dits non-classiques) à l'aide de modèles transgéniques surexprimant ou inactivant le RM dans spécifiquement dans des tissus. J'ai participé, dans un premier temps à la caractérisation d'un modèle d'inactivation du RM spécifiquement dans les CMLs vasculaires. Mon travail de thèse avait deux objectifs.

Dans un premier temps, j'ai été amené à participer à la caractérisation d'un modèle murin transgénique inactivé pour le RM dans les CMLs vasculaires. L'objectif de ce travail était d'étudier le rôle du RM des cellules musculaires lisses dans la réactivité vasculaire. Ces travaux ont été réalisés sous la direction de Guillaume Galmiche et font l'objet d'une publication récemment acceptée.

La deuxième, et majeure, partie de mon travail a consisté en une étude de l'implication de la lipocaline 2 dans les effets délétères CVs induit par la suractivation du RM. Pour cela, j'ai

étudié les conséquences de l'inactivation globale et constitutive de la lipocaline 2 sur les effets induit par le traitement NAS, à savoir, le remodelage de la MEC, l'inflammation ou encore la dysfonction vasculaire (Fig.9).

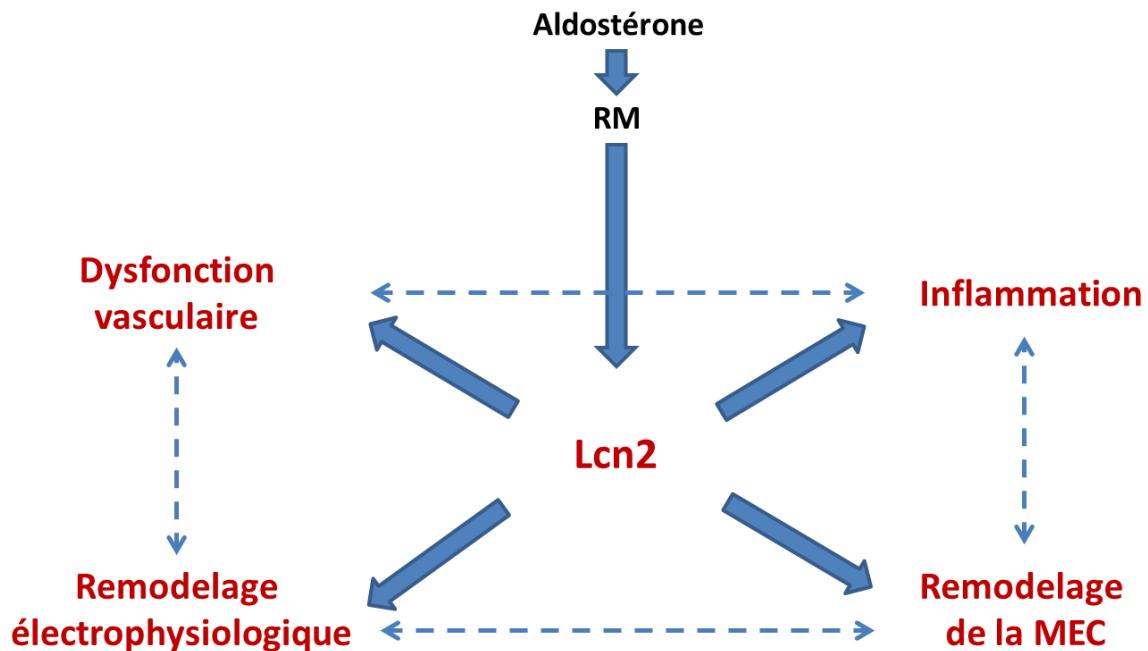


Figure 9. Hypothèse de la thèse. L'hypothèse présentée dans la thèse consiste à savoir si la lipocaline 2 (Lcn2) participe aux effets du RM dans le système cardiovasculaire décrit dans la littérature.

2 MATERIELS ET METHODES

2.1 Modèles animaux

2.1.1 Inactivation constitutive du RM dans les cellules musculaires lisses

Dans le but d'étudier la participation du RM des CMLs dans la réactivité vasculaire, nous avons réalisés nos expériences sur des souris inactivées pour le RM spécifiquement dans les CMLs. La génération de la lignée KO^{RM CML} ($\text{RM}^{\text{fl/fl}} \times \text{SM22}^{\text{Cre}}$) permettant l'inactivation spécifique du RM dans les CMLs a déjà été décrite [99]. Toutes les expériences sont réalisées chez des mâles âgés de 4 à 5 mois. Les souris ne possédant pas la Cre recombinase sont utilisées comme groupe contrôle ($\text{RM}^{\text{fl/fl}}$). Toutes les expériences ont été validées par le comité d'éthique Darwin de l'Université Pierre et Marie Curie à Paris et réalisées dans le respect de la législation européenne en vigueur sur l'expérimentation animale.

2.1.2 Inactivation constitutive de la lipocaline 2 (Souris KO Lcn2)

Afin de pouvoir étudier l'implication de la lipocaline 2 dans les effets pathophysiologiques du RM, nous avons mené nos expériences sur des souris inactivées de manière constitutive pour la lipocaline 2 (KO Lcn2). Cette inactivation est obtenue par l'insertion d'une cassette Néo dans le gène de la lipocaline 2 (Fig.10). Ce modèle murin a été établi sur fond génétique C57Bl6 dans le laboratoire de Tak W. Mak (Institut du Cancer de l'Ontario, Toronto, Canada) [141]. A l'état basal, les souris KO Lcn2 ne présentent aucune différence de viabilité. Les auteurs ont décrit une fertilité diminuée chez les femelles KO Lcn2 comparée à leurs homologues sauvages C57Bl6. Les souris sauvages servant de contrôle pour les expériences ont été commandées chez l'éleveur agréé JanvierLabs (Le Genest Saint Isle, France). Toutes les expériences sont réalisées sur des souris mâles âgées de 2 à 4 mois. Tous les animaux ont été hébergés dans une animalerie Exempt Organisme Pathogène Spécifique (EOPS) et soumis à des cycles jour/nuit de 12h chacun. La nourriture et l'eau étaient fournies *ad libidum*. Toutes les expériences ont été validées par le comité d'éthique Darwin de l'Université Pierre et Marie Curie à Paris et réalisées dans le respect de la législation européenne en vigueur sur l'expérimentation animale.

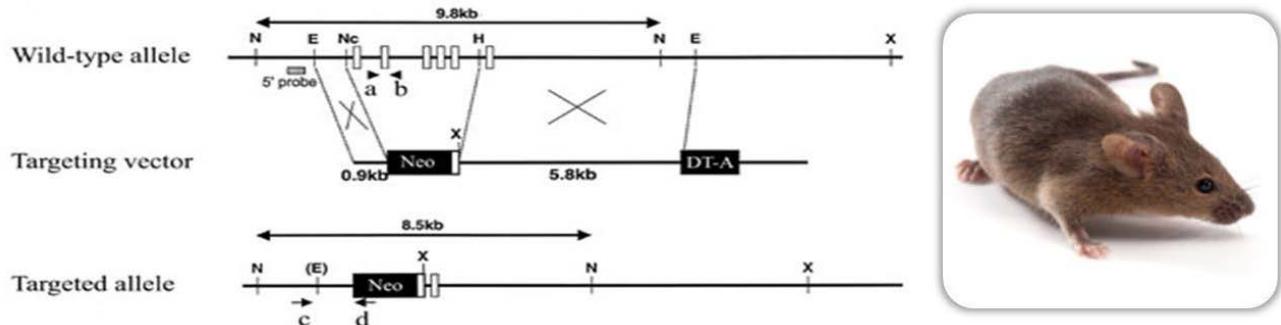


Figure 10. Modèle murin transgénique d'inactivation globale et constitutive de Lcn 2. Les souris proviennent du laboratoire de Tak W. Mak. (Berger *et al.* 2006)

2.1.3 Modèle pharmacologique d'excès de minéralocorticoïdes (Traitement NAS)

Le modèle NAS consiste en une association entre une néphrectomie, une perfusion chronique d'aldostérone sous-cutanée et l'ajout de sodium dans l'eau de boisson. Pour la néphrectomie, les souris sont anesthésiées à l'aide d'une injection intrapéritonéale d'un mélange de kétamine et de xylasine, tondues puis déposées sur un tapis chauffant maintenant leur température corporelle à 37°C. Le champ opératoire est désinfecté avec de la Bétadine. Une incision dorso-latérale est réalisée à travers la peau et le plan musculaire afin d'exposer le rein gauche, moins profond que le droit et donc plus facile d'accès. Le rein est décapsulé avec précaution afin de préserver la glande surrénale, qui ne sera pas retirée. L'artère rénale est ensuite clampée, puis nouée à l'aide d'un fil de suture en amont du clamp de manière à couper le flux sanguin une fois le clamp retiré. Enfin, le rein est dégagé à l'aide d'un scalpel puis le clamp retiré. Le plan musculaire est refermé à l'aide d'un fil de suture 6/0. Avant de refermer la peau, le même site d'incision est utilisé pour planter une pompe osmotique (Alzet, Charles River Laboratories) en sous-cutané dans la région scapulaire diffusant de l'aldostérone (200µg/kg/j ou 60µg/kg/j) (Fig.11) (Sigma-Aldrich, France). Dans les groupes contrôles, le rein gauche est décapsulé, mais il n'est pas enlevé. Le lendemain de la chirurgie, l'eau de boisson est complétée avec 1% de chlorure de sodium (1% NaCl). Les souris sont soumises à un régime normal. Les souris sont sacrifiées au bout de 4 semaines de traitement.

Le protocole est composé de 4 groupes :

- Un groupe de souris contrôle (C57Bl6 sham)
- Un groupe de souris contrôle NAS (C57Bl6)
- Un groupe de souris KO Lcn2
- Un groupe de souris KO Lcn2 NAS

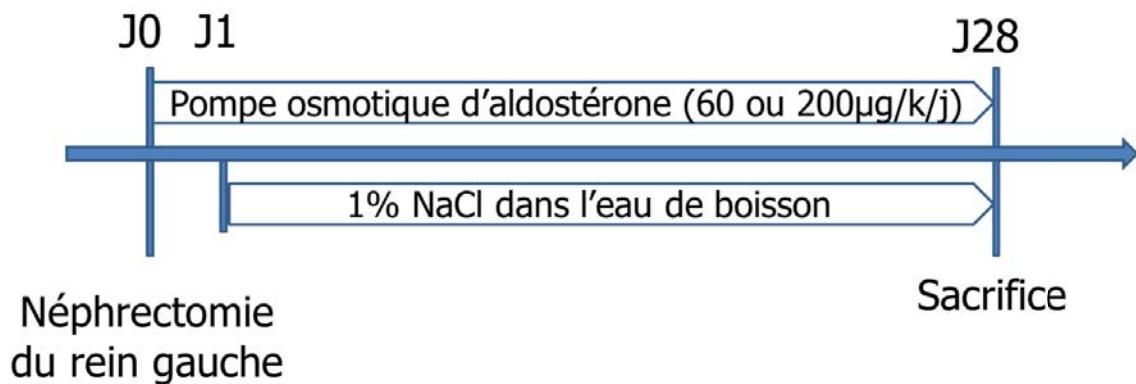


Figure 11. Protocole néphrectomie-aldostérone-sel (NAS). Les pompes osmotiques d'aldostérone sont placées sous la peau au niveau des omoplates. Les mesures de pression artérielle sont réalisées durant la troisième semaine de traitement et les recueils d'urine par cage à métabolisme quelques jours avant le sacrifice.

2.1.4 Modèle pharmacologique de perfusion d'aldostérone

Une expérience a été réalisée avec une dose d'aldostérone de 1000 μ g/kg/j, mais cette fois-ci sans néphrectomie ni ajout de NaCl dans l'eau de boisson. Les quatre groupes expérimentaux sont équivalents au protocole NAS.

2.1.5 Mesures anatomiques et préparation des tissus

Avant d'être sacrifiées, les souris sont pesées. Les souris sont sacrifiées par décapitation durant laquelle le sang est récupéré (cf. paragraphe 2.1.5). Tous les organes prélevés sont rincés

dans du tampon phosphate salin (PBS) froid (4°C) puis pesés à l'aide d'une balance de précision (excepté l'aorte). Le cœur (oreillettes exclues) et le rein droit sont ensuite divisés en trois (coupes transversales): le milieu est fixé dans du paraformaldéhyde 4% (PFA) pour les études morphohistologiques tandis que la base et l'apex du cœur (ou les pôles du rein) sont congelés dans l'azote liquide puis conservés à -80°C pour l'étude de l'expression protéique et des ARNm. L'aorte, quant à elle, est prélevée avec précaution puis divisée en trois : l'aorte thoracique est utilisée pour la réactivité vasculaire (cf. paragraphe 2.2.3), l'aorte abdominale est congelée dans l'azote liquide pour les études biochimiques et enfin un segment de trois mm environ situé entre les deux est fixé dans le PFA 4%. Le tibia gauche est prélevé pour la normalisation des poids des organes.

2.1.6 Prélèvement sanguin

Le sang total est collecté durant le sacrifice à l'aide de tubes capillaires Microvette dont les parois sont recouvertes avec de l'héparine de lithium (Sarstedt, Allemagne). Le plasma est récolté après 5 minutes de centrifugation à 2000g à température ambiante puis congelé à -80°C .

2.2 Etudes fonctionnelles

2.2.1 Mesure de la pression artérielle chez la souris vigile

La PAS est mesurée par pléthysmographie à la queue sur des souris vigiles habituées à l'appareil (trois jours d'habituation). Dix mesures par souris sont prises chaque jour entre 10h et midi durant 5 jours à l'aide de l'appareil BP2000 Visitech (Biobest, Chaville, France).

2.2.2 Fonction rénale et excrétion des ions

La fonction rénale et l'excrétion ioniques sont étudiées à l'aide de cages à métabolisme (Tecniplast, France). Les souris sont soumises à 3 jours d'habituation avec de l'eau et de la nourriture à volonté. Après habituation, l'urine est récoltée sur une période de 24h. L'urée et la

créatinine sont quantifiées dans l'urine et dans le plasma à l'aide du KONELAB (ThermoFischer Scientific, Etats-Unis), le sodium et le potassium à l'aide du photomètre de flamme (Instrumentation Laboratory, Etats-Unis).

2.2.3 Réactivité Vasculaire *ex vivo*

L'étude des réponses vasoactives à des agents pharmacologiques est réalisée sur les aortes thoraciques isolées provenant de souris KO pour la lipocaline 2 et de souris sauvages. Les vaisseaux sont prélevés avec précaution sous loupe binoculaire, puis placés dans un bain de solution saline physiologique (PSS, composition (mM) : NaCl, 130; KCl, 3,7; MgSO₄, 1,2; KH₂PO₄, 1,2; CaCl₂, 1,6; NaHCO₃, 14,9 et du glucose) froide. Les artères sont délicatement débarrassées de leurs adhérences graisseuses, puis découpées en quatre anneaux de taille équivalente (longueur 2,5 mm environ). Chaque anneau est ensuite transféré dans l'une des cuves à organes (8ml) du myographe (DMT, Aarhus, DK) contenant du PSS oxygénée à 37°C et pH 7,4 [186]. Les anneaux sont montés sur deux crochets capables de détecter des variations de force, puis laissés au repos pendant 45-60 minutes pour s'équilibrer à une tension de 1g, en changeant le milieu toutes les 10 minutes. La viabilité des anneaux est ensuite vérifiée à l'aide d'une solution isotonique de chlorure de potassium (KCl, 80 mM) ainsi que d'une concentration de phényléphrine (Phe, 10⁻⁵M) pour vérifier la capacité contractile de chaque anneau. L'étude de la réactivité vasculaire est réalisée en exposant le vaisseau à des concentrations croissantes d'agents vasoactifs administrées dans la cuve du myographe. A chaque concentration correspond une force exercée par le vaisseau sur les crochets, lue sur l'enregistreur à l'aide du logiciel Chart (ADIstruments, Nouvelle Zélande). Une période minimale de repos de 20 minutes est respectée entre chaque courbe, après plusieurs rinçages de la cuve avec du tampon PSS.

2.2.3.1 Réponses vasoconstrictrices

La voie α₁-adrénergique est étudiée par la réponse contractile à la Phe (10⁻⁹ à 10⁻⁵ mol/l). La contraction induite par l'activation des canaux calciques sensibles à la dépolarisation est étudiée à l'aide d'une courbe concentration-réponse au KCl (10 à 80 mM). Pour réaliser une courbe concentration-réponse au Ca²⁺, les anneaux sont d'abord incubés 20 min dans une solution sans

calcium (contenant 80 mM de KCl au lieu d'une quantité équimolaire de NaCl) en présence d'EGTA (2 mM) puis une solution sans EGTA. Les concentrations de calcium sont préparées à partir d'une solution stock de chlorure de calcium (CaCl_2 , 10^{-5} à 10^{-2}M). Les conséquences du relargage du calcium intracellulaire (du réticulum sarcoplasmique) ont été étudiées à l'aide d'un bolus de caféine (10^{-2}M).

2.2.3.2 Réponses vasorelaxantes

2.2.3.2.1 Dépendantes de l'endothélium

Afin d'étudier la relaxation endothélium-dépendante, une courbe de concentration-réponse à l'Ach (10^{-9} à 10^{-6}M) est réalisée sur des anneaux précontractés avec 10^{-5}M de Phe. La participation des prostacyclines (PGI_2) endogènes à la relaxation est étudiée par une courbe concentration-réponse à l'Ach présence d'indométacine (Indo, 10^{-5}M), un inhibiteur des cyclooxygénases (COX) 1 et 2, responsables de la synthèse de PGI_2 . La réponse vasorelaxante dépendante de l'endothélium induite par le NO endogène est explorée par une courbe concentration-réponse d'Ach en présence en présence de L-NAME (NG-nitro-L-arginine methyl ester), un inhibiteur du NO.

2.2.3.2.2 Indépendantes de l'endothélium

La sensibilité des CMLs vasculaires à la voie du NO et des PGI_2 est quant à elle étudiée sur des anneaux aortiques désendothélialisés et précontractés à la Phe (10^{-5}M) soit a) par une courbe concentration-réponse au nitroprussiate de sodium (SNP, 10^{-9} à 10^{-5}M), un donneur de NO soit b) par une courbe concentration-réponse au Treprostinal, un analogue synthétique de la PGI_2 (Trep, 10^{-9} to 10^{-5}M). La sensibilité des CMLs au GMP cyclique est testée par une concentration unique de 8-Br-cGMP (10^{-4}M), un analogue. Les valeurs de relaxation obtenues sur chaque anneau sont exprimées en pourcentage de relaxation par rapport à la précontraction initiale induite par la Phe.

2.3 Histologie

2.3.1 Coloration

Les études histologiques sont réalisées sur le petit segment d'aorte thoracique et sur la partie centrale du cœur fixés avec une solution à 4% de PFA durant 24h puis inclus dans de la paraffine. Les coupes des différents tissus sont réalisées à 5 μm d'épaisseur. L'acquisition des images est faite à l'aide d'un microscope Leica DM4000B et du logiciel Leica Application Suite (Leica, Wetzlar, Germany). Toutes les images sont prises à la même profondeur de champ et avec les mêmes réglages. Les mesures sont réalisées en aveugle à l'aide du logiciel ImageJ.

2.3.1.1 Trichrome de Masson

Une coloration au trichrome de Masson est réalisée sur des coupes de coeurs (5 μm) afin de mesurer les foyers inflammatoires. Le nombre et la surface des foyers inflammatoires sont mesurés au niveau interstitiel. La coloration ne permettant pas de dissocier les différents types cellulaires, les vaisseaux sont exclus de la quantification de manière systématique.

2.3.1.2 Rouge Sirius

La coloration au rouge Sirius est réalisée sur des coupes de cœur et d'aorte (5 μm) afin de déterminer le contenu en collagène. La fibrose interstitielle et la fibrose périvasculaire sont mesurées de manière indépendante et sur des champs différents. Les vaisseaux sont systématiquement exclus de la région d'intérêt lors de la mesure de la fibrose interstitielle. Pour l'aorte, la fibrose n'est mesurée qu'à l'intérieur de la média, l'aventice n'ayant pas été conservée sur tous les échantillons. Les résultats sont exprimés par un rapport de la fibrose sur la surface totale du tissu ou en dépôt de collagène sur la surface totale du tissu.

2.3.2 Immunohistologie

Des coupes de 5µm de cœur et d'aorte inclus en paraffine sont utilisées. Les coupes sont traitées avec du peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) pendant cinq minutes afin de bloquer l'activité de la peroxydase endogène. Toutes les coupes sont bloquées avec du PBS et 5% de sérum de chèvre pendant une heure, puis incubées pour une nuit avec un anticorps anti-osteopontine (OPN) (1:50 dilution; Abcam), lavées 3 fois puis incubées durant 30 minutes avec un anticorps secondaire couplé avec de la peroxydase de raifort (Dako Cytomation, Carpentaria, CA). Le signal est révélé par l'utilisation du kit substrat DAB (BD Biosciences, Etats-Unis).

2.4 Biologie moléculaire

2.4.1 Extraction des ARN totaux et retro-transcription

Pour les tissus, les ARNs messagers (ARNm) sont extraits à partir des organes après congélation (apex pour le cœur, pôle pour le rein, partie abdominale pour l'aorte) à l'aide de tubes à billes Lysing Matrix (MP Biomedicals, Etats-Unis). L'extraction est réalisée à l'aide du kit Qiagen RNeasy, par colonne d'affinité. Pendant l'extraction, les échantillons sont traités avec la DNase Qiagen afin d'éviter toute contamination d'ADN génomique. A la fin de l'extraction, les ARN sont resuspendus dans de l' H_2O RNAse Free, puis dosés au spectrophotomètre (Implen, Allemagne) à une longueur d'onde de 260 nm. Les ARNm sont considérés de bonne qualité si le ratio 260/280 est supérieur à 1,6. 500 ng d'ARNm sont ensuite retro-transcrits en ADNs complémentaires (ADNc) à l'aide de l'enzyme SuperscriptII (Life Technologies, Etats-Unis). L'ADNc produit est conservé à -20°C.

2.4.2 PCR quantitative en temps réel

L'amplification semi-quantitative en temps réel (qPCR) est réalisée à l'aide de l'iCycler (Biorad, Etats-Unis) à partir de 6 ng d'ADNc obtenus après l'étape de rétro-transcription. La qPCR est réalisée avec une dénaturation initiale (95°C durant 10 min) et 40 cycles de

dénaturation (95°C durant 15 sec), d'hybridation et d'élongation (60°C durant 1min). La polymérisation des amplicons produits est mesurée à la fin de chaque cycle grâce à la fluorescence émise par l'agent intercalant (SyBR Green). L'efficacité de chaque couple d'amorces est déterminée à l'aide d'une dilution en cascade d'un mélange d'ADNc. Le niveau relatif d'ADNc de chaque échantillon pour le gène d'intérêt est normalisé par rapport à un gène de référence, puis normalisé une deuxième fois par rapport au groupe contrôle expérimental. Les variations d'expressions sont exprimées en valeurs relatives. Les séquences des amorces utilisées sont listées dans la Table 1.

Table 1. Séquences des amorces utilisées en qPCR

	Amorces sens	Amorces anti-sens	Taille des amplicons (pb)
18S	CGC CGC TAG AGG TGA AAT TC	TCT TGG CAA ATG CTT TCG C	64
ANP	GAG TGG ACT AGG CTG CAA CA	CAG TGG CAA TGT GAC CAA GC	137
BNP	AGA CCC AGG CAG AGT CAG AA	CAG CTC TGG AAG GAC CAA GG	335
CD68	ACA AGG GAC ACT TCG GGC CA	GTC GTC TGC GGG TGA TGC AG	132
CD80	TTC ACC TGG GAA AAA CCC CCA GAA	ACG ACT GTT ATT ACT GCG CC	92
CD86	AGC AGA CGC GTA AGA GTG GCT	CAT GGT GCA TCT GGG GTC CAT C	113
αENaC	CGG AGT TGC TAA ACT CAA CAT C	TGG AGA CCA GTA CCG GC T	229
Lcn2	GGA CCA GGG CTG TCG CTA CT	GGT GGC CAC TTG CAC ATT GT	121
MCP1	ATC CCA ATG AGT AGG CTG GAG AGC	CAG AAG TGC TTG AGG TGG TTG TG	292
NHE3	CAC ACC CCG CCC ATC TAC T	CCA GGC ATA CAG CAC TGA CAT T	74
Rénine	GCC GCC TCT ACC TTG CTT GTG	GGG GCA GCT CGG TGA CCT CT	192
RM	CCA GAA GAG GGG ACC ACA TA	GGA ATT GTC GTA GCC TGC AT	162

2.5 Biochimie

2.5.1 Extraction et dosage des protéines

L'analyse de l'expression protéique par Western Blot est réalisée dans le cœur et dans l'aorte de souris sauvages et de souris inactivées pour le gène de la lipocaline 2 (KO Lcn2). Les échantillons sont extraits immédiatement après le sacrifice de l'animal à l'aide du tampon d'extraction cOmplete Lysis-M complémenté d'un cocktail d'inhibiteurs de protéases et de phosphatases (Roche, Suisse). Les extraits sont centrifugés à 4°C à 14000 rpm pendant 10 minutes et la concentration protéique est mesurée dans le surnageant à l'aide du Pierce Protein Assay (Bio-Rad, Etats-Unis).

2.5.2 Western Blot

30 microgrammes de protéines sont chargés dans un gel à 4-15% de polyacrylamide. La migration s'effectue pendant une à deux heures (suivant la taille de la protéine d'intérêt) à 120V. Les protéines sont ensuite transférées sur une membrane de nitrocellulose à l'aide d'un appareil de transfert semi-sec Trans-Blot Turbo (Bio-Rad, Etats-Unis). Après le transfert, les membranes sont colorées au rouge Ponceau afin de vérifier l'efficacité de la migration et du transfert des protéines. La détection des protéines se fait à l'aide d'anticorps spécifiques. La révélation des anticorps se fait par chimioluminescence à l'aide du kit ECL (Bio-Rad, Etats-Unis) et de la station photographique Las-4000 (Fujifilm, Japon). La quantification des images obtenues se fait à l'aide du logiciel MultiGauge (Fujifilm, Japon). Les variations d'expression protéiques sont exprimées en valeurs relatives, issues de la normalisation des valeurs de la protéine d'intérêt sur une protéine dite de référence, puis une seconde normalisation par rapport au groupe contrôle expérimental. Les anticorps utilisés pour les westerns blots sont listés dans la Table 2.

Table 2. Liste des anticorps utilisés

Anticorps	Source	Dilution	Fabricant
Western blot			
Collagène 1	Lapin	1/1000	Abcam
Collagène 3	Lapin	1/500	Santa Cruz
Elastine	Lapin	1/250	Abcam
Immunohistochimie			
Ostéopontine	Lapin	1/50	Abcam

2.5.3 Dosage ELISA

Certaines protéines circulantes plasmatiques sont mesurées à l'aide de DuoSet ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay) provenant de chez R&D systems (R&D systems, Etats-Unis). Les différents tests ELISA sont réalisés dans des plaques de 96 puits, dans lesquelles on fixe des anticorps, dit de capture, reconnaissant la protéine d'intérêt. Les échantillons sont ensuite déposés dans les puits et on les laisse incuber sur la nuit. Après rinçage, un deuxième anticorps, dit de détection, couplé à la peroxydase est ajouté dans chaque puits. Après un second rinçage, un substrat est mis en présence de la peroxydase ce qui va modifier la couleur de la solution. Les résultats sont lus à l'aide d'un spectrophotomètre. Afin de pouvoir quantifier les protéines, une courbe étalon est réalisée sur la même plaque.

2.6 Analyses statistiques

Les résultats sont exprimés en donnant la valeur moyenne de chaque groupe plus ou moins l'erreur standard à la moyenne (Moyenne \pm ESM). Pour une comparaison de 2 groupes, le test non paramétrique de Mann-Whitney est utilisé. Pour une comparaison de 4 groupes, une analyse de variance (ANOVA) à 2 voies (effets du génotype et du traitement) suivie des post-tests de

Bonferroni ou de Tukey est réalisée. Les différences entre groupes sont considérées significatives lorsque $P<0.05$. L'analyse statistique est réalisée à l'aide du logiciel GraphPad Prism 6.0 (GraphPad Software Inc., Etats-Unis).

3 RESULTATS

3.1 Participation du RM des cellules musculaires lisses vasculaires à la réactivité vasculaire

Les résultats qui vont être présentés ont été obtenus durant la caractérisation d'un modèle transgénique d'inactivation du RM spécifiquement dans les CMLs. L'objectif était d'identifier l'implication du RM des cellules musculaires lisses dans la réactivité vasculaire aux agents vasoactifs. Ce projet s'inscrivait dans une exploration plus poussée du rôle du RM dans les cellules musculaires lisses.

L'inactivation du RM dans les CMLs ne modifie pas la sensibilité ni l'efficacité de la réponse constrictrice à la Phe en comparaison aux souris sauvages (figure 12A). Comme attendu, l'absence de l'endothélium induit l'augmentation de la réponse constrictrice à la Phe chez les souris sauvages. Les mêmes résultats sont observés chez les souris inactivées pour le RM dans les CMLs (figure 12A).

Afin de tester les réponses constrictrices agonistes-indépendantes, des courbes concentration-réponse au KCl ainsi qu'au calcium (Ca^{2+}) ont été réalisées. Les réponses maximales induites par le KCl et l'ajout de Ca^{2+} extracellulaire sont moins importantes chez les KO que chez les souris sauvages (figure 12B et C). Cette différence est maintenue lorsque que l'endothélium est retiré (figure 12B et C). La contraction induite par la caféine, qui induit la libération de calcium intracellulaire, n'est pas différente entre les deux groupes ($4,48 \pm 0,36$ et $5,02 \pm 0,46$; KO vs WT), suggérant que la libération de calcium intracellulaire par les récepteur à la ryanodine n'est pas altérée (figure 12D). En conclusion, ces résultats suggèrent que la réponse vasoconstrictrice des KO^{RM CML} est associée à une signalisation altérée du Ca^{2+} extracellulaire.

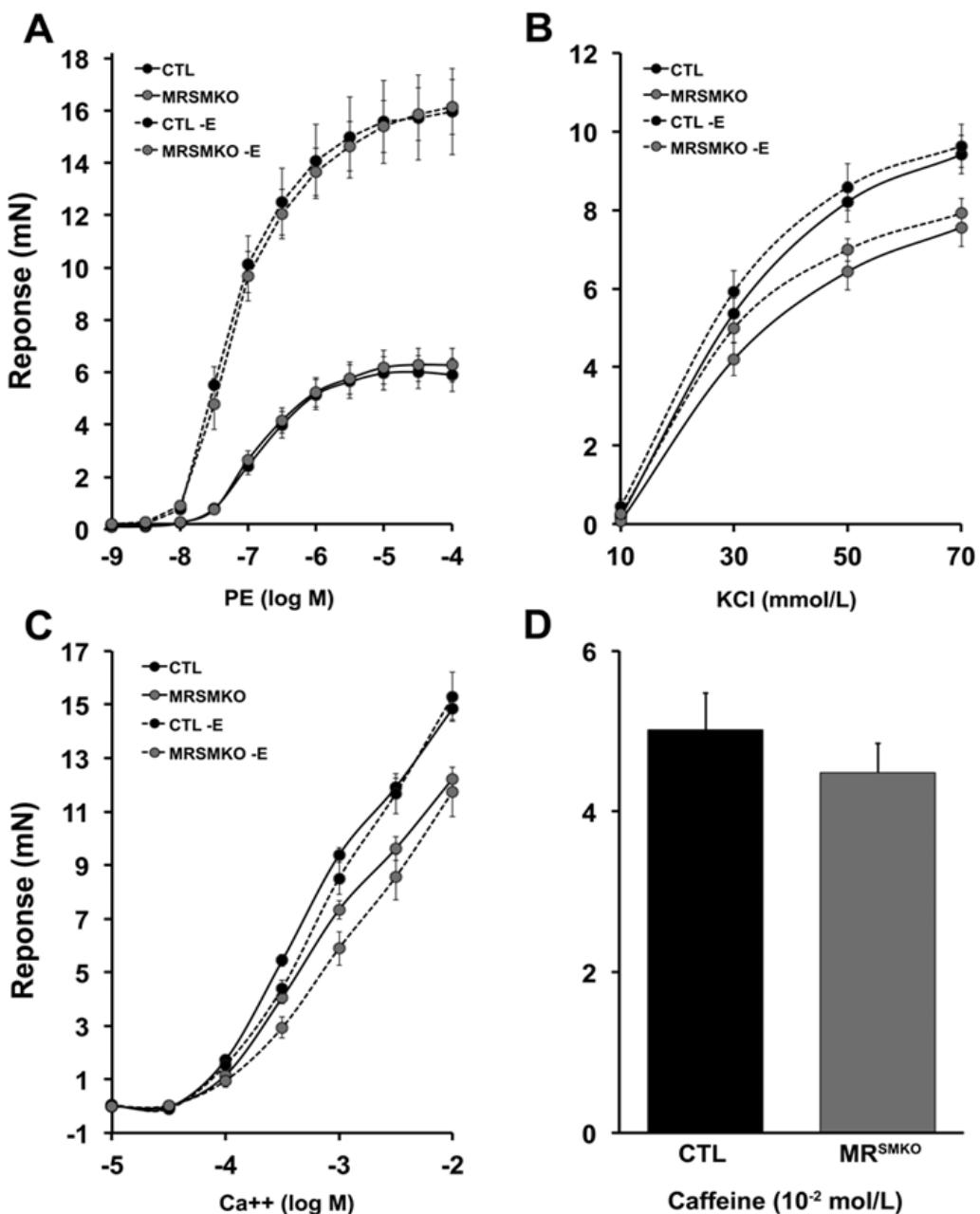


Figure 12. Réponses vasculaires aux agents vasoconstricteurs des souris inactivées pour le RM dans les CMLs et leurs contrôles. La réponse contractile est exprimée en milliNewton. (A) Phénylephrine, (B) Chlorure de potassium, (C) Calcium et (D) Caféine.

La réponse vasorelaxante induite par l'Ach est similaire entre les souris sauvages et les souris inactivées pour le RM (figure 13A). Afin d'étudier spécifiquement la réponse relaxante induite par la prostacycline (PGI_2), la relaxation à l'Ach a été étudiée en présence d'un inhibiteur

de la voie des prostaglandines, l'indométacine. La réponse relaxante des KO en présence d'indométacine est réduite par rapport aux souris contrôles (figure 13B). Afin d'étudier la part du monoxyde d'azote dans la réponse vasorelaxante à l'Ach, nous avons utilisé un inhibiteur

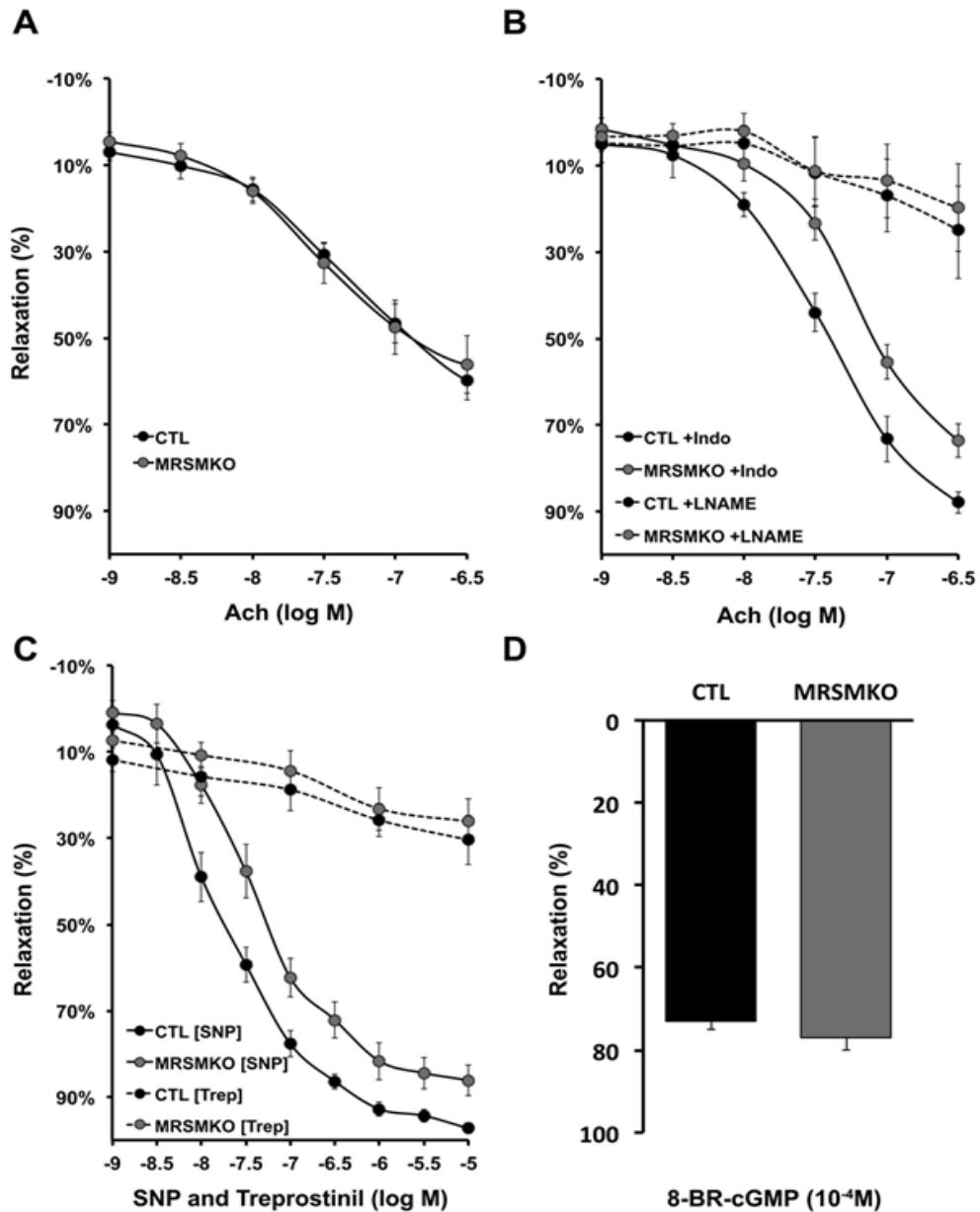


Figure 13. Réponses vasculaires aux agents relaxants des souris inactivées pour le RM dans les CMLs et leurs contrôles. Relaxations dépendantes de l'endothélium (A et B) et relaxation indépendantes de l'endothélium (C et D).

du NO, le L-NNA. Dans ces conditions, la relaxation induite par l'Ach est plus faible, mais similaire entre les deux lignées (Fig 13B).

Les réponses vasorelaxantes indépendantes de l'endothélium ont été explorées avec des courbes concentration-réponses au SNP, un donneur de NO, ou au Treprostinal, un analogue de la PGI₂. Chez les souris KO, la réponse vasorelaxante au SNP est plus faible que celle des souris contrôles (fig. 13C), alors que le Treprostinal induit une relaxation modeste mais similaire entre les deux groupes (fig. 13C). Ces données suggèrent que l'altération de la réponse au SNP chez les KO pourrait être due à une diminution de la production GMP cyclique. Afin de s'affranchir de la production de GMPc, nous avons testé la relaxation induite par le 8-Br-cGMP, un analogue stable du GMPc. La relaxation induite par le 8-Br-cGMP est similaire entre les souris sauvages et les souris inactivées pour le RM dans les CMLs (fig. 13D).

En conclusion, ces résultats suggèrent que le RM des cellules musculaires lisses vasculaires participe à la réactivité vasculaire. L'inactivation du RM dans les CMLs est associée à une altération de la réponse vasorelaxante au NO. En revanche, l'inactivation du RM des CMLs ne modifie pas la synthèse ni la sensibilité à la voie de la prostacyclines. Les mécanismes moléculaires sous-jacents restent encore à découvrir.

3.2 Protocole d'activation du RM *in vivo*

Dans cette partie, les résultats de deux protocoles NAS vont être présentés :

- NAS 200 : un protocole NAS à forte dose (200µg/kg/j), réalisé chez des souris sauvages et des souris KO Lcn2 (table 3)
- NAS 60 : un protocole NAS à faible dose (60µg/kg/j), réalisé chez des souris sauvages et des souris KO Lcn2 (table 4)

Table 3. Paramètres physiologiques de la série NAS 200

	Sauvages		Ko Lcn2	
	Contrôles	NAS	Contrôles	NAS
N	6	6	6	6
Masse corporelle (g)	26,0 ± 0,85	30,1 ± 0,67 **	28,7 ± 1,15	25,4 ± 0,44 ***
Longueur du tibia (mm)	18,2 ± 0,26	18,6 ± 0,14	18,9 ± 0,12	17,8 ± 0,48
Pds cœur/Lg tibia (mg/mm)	5,75 ± 0,27	8,70 ± 0,50 *	6,47 ± 0,17	8,49 ± 0,67 *
Pds rein droit/Lg tibia (mg/mm)	11,0 ± 0,62	20,4 ± 0,57 *	11,2 ± 0,52	15,5 ± 0,38 **

Table 4. Paramètres physiologiques de la série NAS 60

	Sauvages		Ko Lcn2	
	Contrôles	NAS	Contrôles	NAS
N	6	8	6	7
Masse corporelle (g)	25,3 ± 0,3	25,3 ± 0,4 *	23,7 ± 0,6	25,0 ± 0,4 ***
Longueur du tibia (mm)	16,9 ± 0,17	16,7 ± 0,11	16,3 ± 0,10	16,8 ± 0,21
Pds cœur/Lg tibia (mg/mm)	6,82 ± 0,14	7,90 ± 0,14 ****	6,40 ± 0,16	7,77 ± 0,09 ****
Pds rein droit/Lg tibia (mg/mm)	10,2 ± 0,31	15,4 ± 0,73 ****	10,6 ± 0,46	16,1 ± 0,42 ****

Le traitement NAS ne modifie pas le poids du corps (CT vs CT NAS table 3). Il induit une augmentation de PAS (mesurée dans la 3ème semaine du traitement), une hypertrophie cardiaque ainsi qu'une hypertrophie rénale. Nous retrouvons l'hypertension et les hypertrophies cardiaques et rénales chez les souris sauvages traitées dans nos deux protocoles (Table 3, 4 et fig 15A et B). Notre modèle est donc fonctionnel et reproductible. Afin de vérifier la possible implication de la lipocaline 2 dans les effets observés nous avons regardé l'expression de la lipocaline 2 dans les trois tissus principaux qui nous intéressent : l'aorte, le cœur et le rein. Dans le protocole NAS 200, l'expression de la lipocaline 2 est induite de 3 et 5 fois dans le cœur et le rein des souris sauvages traitées (Fig 14A). Elle est augmentée de deux fois dans le cœur des souris NAS 60 (Fig 14B).

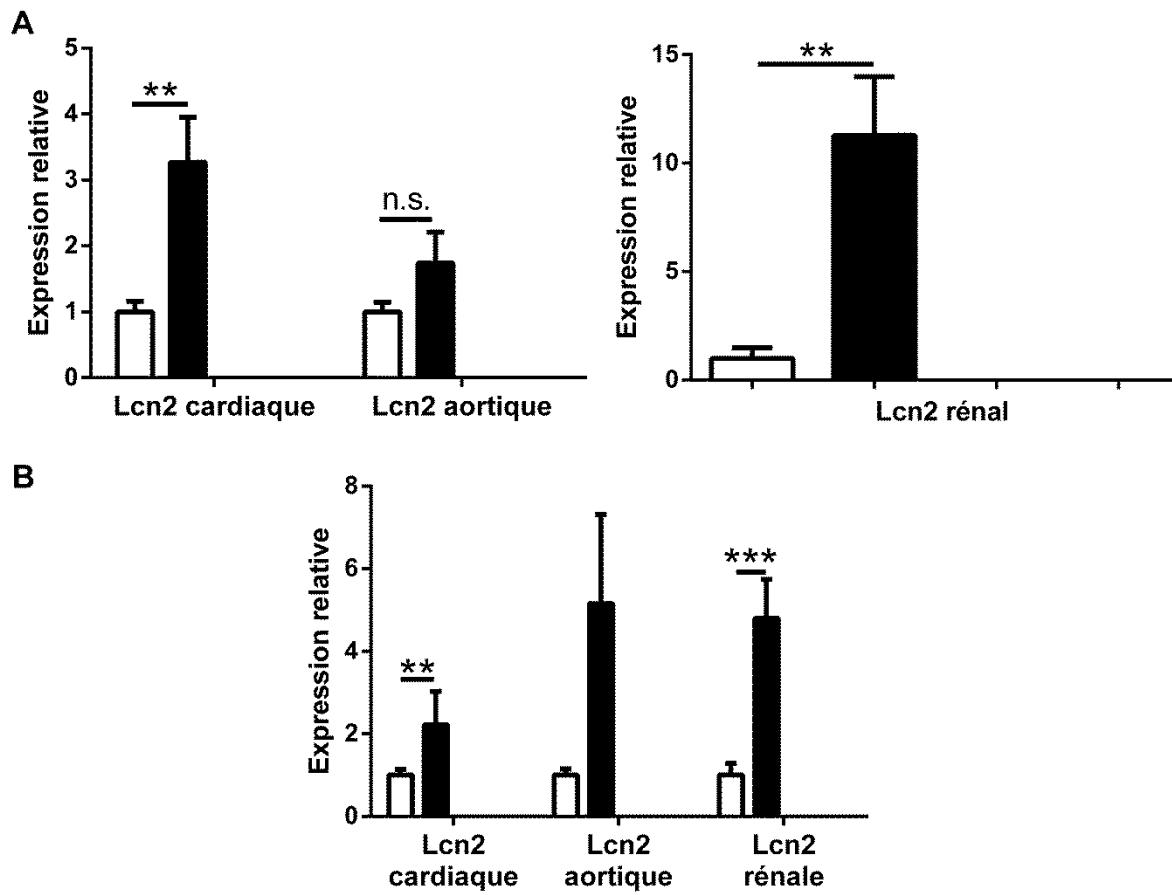


Figure 14. Expression de la lipocaline 2 aux niveaux cardiovasculaire et rénal dans le traitement NAS. Niveau d'expression de l'ARN Lcn2 dans le cœur, l'aorte et le rein du protocole (A) NAS 200, (B) NAS 60

3.3 La lipocaline 2 est impliquée dans l'augmentation de la pression artérielle induite par le modèle NAS

3.3.1 L'inactivation de la lipocaline 2 prévient l'hypertension induite par le NAS

Le protocole NAS 200 induit une augmentation de la PAS d'un peu plus de 25 mmHg chez les souris sauvages dès la troisième semaine de traitement. Cette augmentation de pression est totalement prévenue chez les souris inactivées pour la lipocaline 2 (Fig 15A). Cette observation du rôle de la lipocaline 2 dans la modulation de la pression artérielle par le protocole NAS a été vérifiée dans un autre protocole : dans le protocole NAS 60, le traitement induit aussi une augmentation d'environ 20 mmHg chez les souris sauvages, sans modifier la pression des souris KO Lcn2 (Fig 15B).

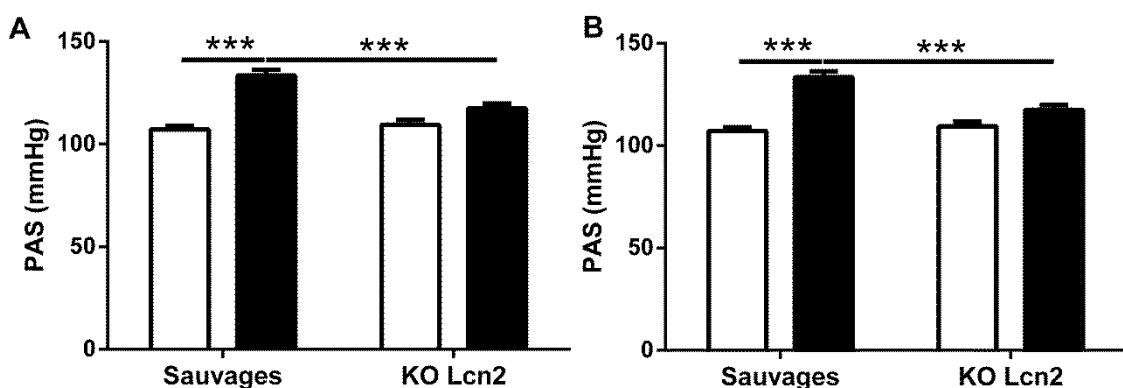


Figure 15. Effet de l'inactivation de le Lcn2 sur la pression artérielle systolique. (A) NAS 200, (B) NAS 60

3.3.2 L'inactivation de la lipocaline 2 ne prévient pas l'hypertrophie cardiaque induite par le NAS

L'augmentation de pression artérielle est souvent associée à une hypertrophie cardiaque dite compensatrice. Il s'agit pour le cœur d'augmenter son volume musculaire afin d'être capable de vaincre l'augmentation de la pression en post-charge. L'hypertrophie cardiaque est évaluée en rapportant le poids du cœur sur la longueur du tibia, cette dernière étant considérée comme stable durant le protocole. Dans le NAS 200, nous n'observons aucune différence sur la longueur des

tibias entre les quatre groupes. Le groupe de souris C57Bl6 traité présente une augmentation du ratio poids du cœur sur longueur du tibia, et donc une hypertrophie cardiaque. Cette augmentation du poids du cœur chez les souris sauvages NAS est cohérente avec l'augmentation de leur PAS. Chez les souris inactivées pour le gène de la lipocaline 2, on retrouve cette hypertrophie induite par le NAS (Table 3) malgré l'absence d'augmentation de pression. Au niveau moléculaire, nous avons regardé l'expression cardiaque d'ANP, une hormone produite sous l'effet de l'étirement mécanique de la paroi du cœur. Chez les souris sauvages NAS 200, l'expression de l'ANP est augmentée en moyenne de cinq fois sous traitement NAS, sans être statistiquement significative. Chez les souris KO Lcn2, il y a une augmentation statistiquement significative de l'ANP d'un facteur sept. Les mêmes résultats sont observés pour le BNP (Brain Natriuretic Peptide, Fig 16).

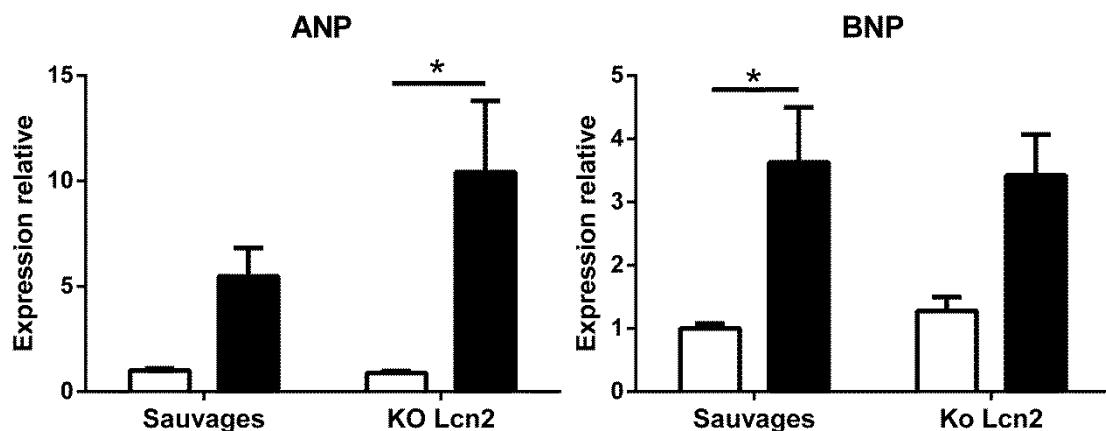


Figure 16. Conséquences de l'inactivation de Lcn2 sur l'expression de gènes impliqués dans le remodelage cardiaque : NAS 200.

Nous obtenons les mêmes résultats dans la série NAS 60, avec une augmentation de l'hypertrophie par le NAS dans les deux lignées de souris (table 4) et une augmentation de l'expression d'ANP chez toutes les souris traitées au NAS, KO comme sauvages (Figure 17). De nouveau, chez les KO Lcn2 NAS 60, l'hypertrophie n'est pas liée à l'augmentation de pression.

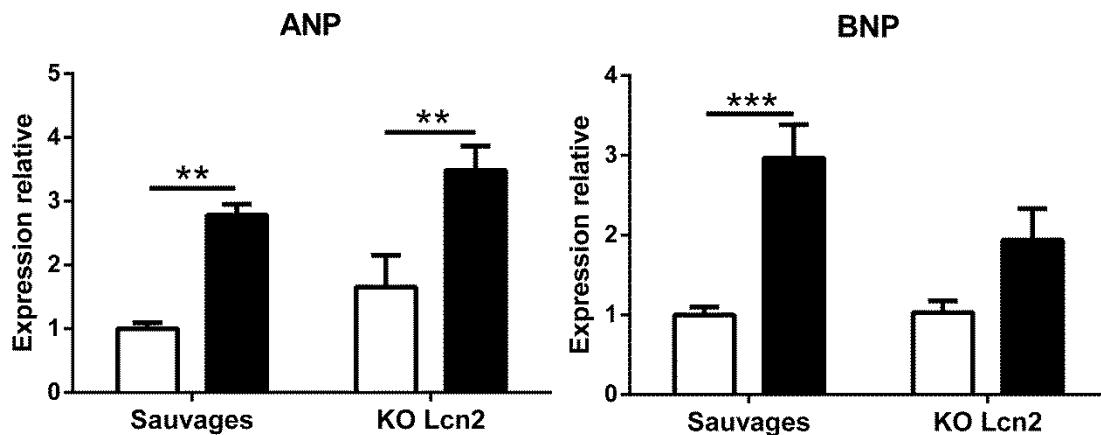


Figure 17. Conséquences de l'inactivation de Lcn2 sur l'expression de gènes impliqués dans le remodelage cardiaque : NAS 60.

3.3.3 Len2 n'est pas impliquée dans la dysfonction vasculaire induite par le NAS 200

Afin de trouver l'origine de cette différence de régulation de la pression artérielle, nous avons exploré les effets du traitement NAS sur la fonction vasculaire dans l'aorte de souris sauvages et de souris inactivées pour la lipocaline 2.

3.3.3.1 Réponse vasoconstrictrice à la phényléphrine

A l'état basal, les souris C57Bl6 et les souris KO Lcn2 ne présentent pas de différence dans leur réponse vasoconstrictrice à la Phe (Fig 18A). Les deux lignées murines développent une contraction maximale similaire (environ 2 mN) à 10^{-6} M de Phe et ne présentent pas de différence d'aire sous la courbe (Fig 18A). Lorsque les souris sont soumises au traitement NAS, leurs réponses vasoconstrictrices sont très fortement augmentées quel que soit le génotype. La sensibilité à la Phe est augmentée, avec une réponse dès la concentration de $10^{-7.5}$ M en NAS contre $10^{-6.5}$ M dans les groupes contrôles et une augmentation de la réponse maximale de contraction qui monte jusqu'à 10 mN contre 2 à l'état basal. Les augmentations de sensibilité et d'efficacité en réponse à la Phe ne sont pas modifiées chez les souris KO Lcn2.

3.3.3.2 Réponse vasorelaxante endothélium dépendante (acétylcholine) et endothélium indépendante (nitroprussiate de sodium)

La réponse à l’Ach est identique entre les souris sauvages et les KO à l’état de base, dans les concentrations vasorelaxantes de l’Ach (Fig 18B, de 10^{-9} M à $10^{-6.5}$ M). Au-delà de $10^{-6.5}$ M, les souris sauvages développent une réponse constrictrice à l’Ach qui n’est pas présente chez les souris inactivées pour la lipocaline 2. Après quatre semaines de traitement NAS, cette double réponse à l’Ach disparaît. En effet, le traitement induit une diminution de l’efficacité et de la sensibilité de la réponse vasorelaxante à l’Ach, similaire chez les souris sauvages et KO (Fig 18B). A l’instar de la réponse à l’Ach, la relaxation au SNP n’est pas différente à l’état de base entre les deux génotypes. Elle est altérée de la même manière suite au traitement NAS, avec une diminution de la sensibilité et de l’efficacité de la réponse vasorelaxante (Fig 18C).

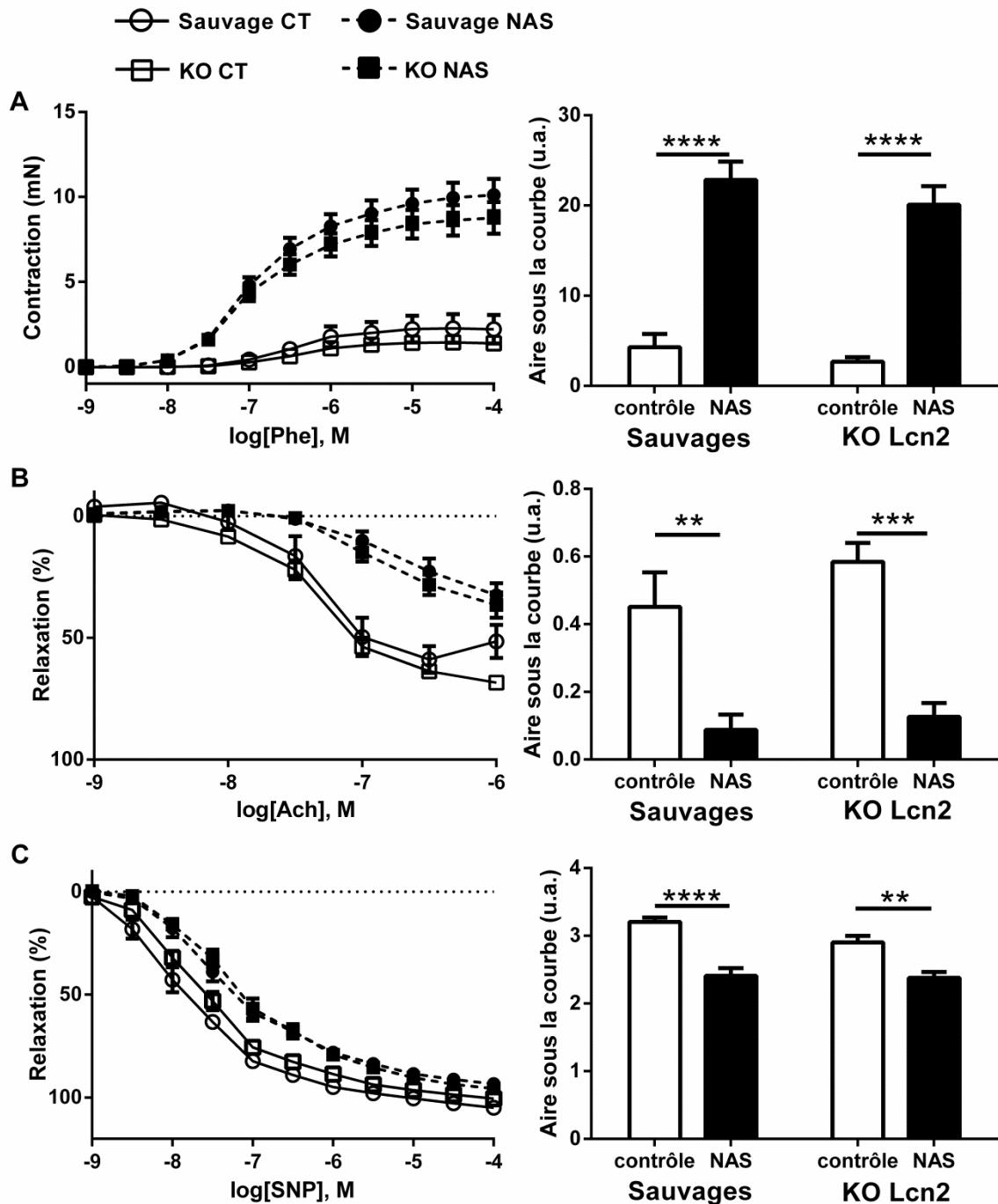


Figure 18. Effet du traitement NAS sur la réactivité vasculaire aortique : NAS 200. Réponse contractile à la phénylephrine (A) et réponses relaxantes endothélium dépendante (B, Acétylcholine) et indépendante (C, Nitroprussiate de Sodium)

3.3.4 Lipocaline 2 et fonction rénale dans le protocole NAS 200

Comme décrit précédemment, les souris traitées présentent une hypertrophie rénale (table 1). L'hypertrophie rénale induite chez les souris KO Lcn2 est moins importante que chez les souris sauvages. Pour étudier les effets rénaux possibles de la lipocaline 2, nous avons étudié la fonction rénale à l'aide de cages à métabolisme. La clairance de la créatinine est diminuée de la même manière chez les souris traitées (Fig 19A). Le ratio sodium sur potassium est augmenté de la même manière chez les souris sauvages et chez les souris KO, sans qu'il n'y ait de différences à l'état basal (Fig 19C). Le traitement NAS ne modifie pas l'expression du RM au niveau rénal. En revanche, il modifie de la même manière l'expression de la rénine (diminution) et de la sous-unité α ENaC (augmentation). Le transporteur NHE3 est diminué chez les souris sauvages traitées et semble diminué chez les KO mais ce n'est pas significatif (Fig 20). Il n'y a donc pas d'effet du génotype sur les paramètres rénaux, ni sur la fonction rénale. Au niveau du rein, nous observons ici aussi une augmentation du ratio rein/tibia.

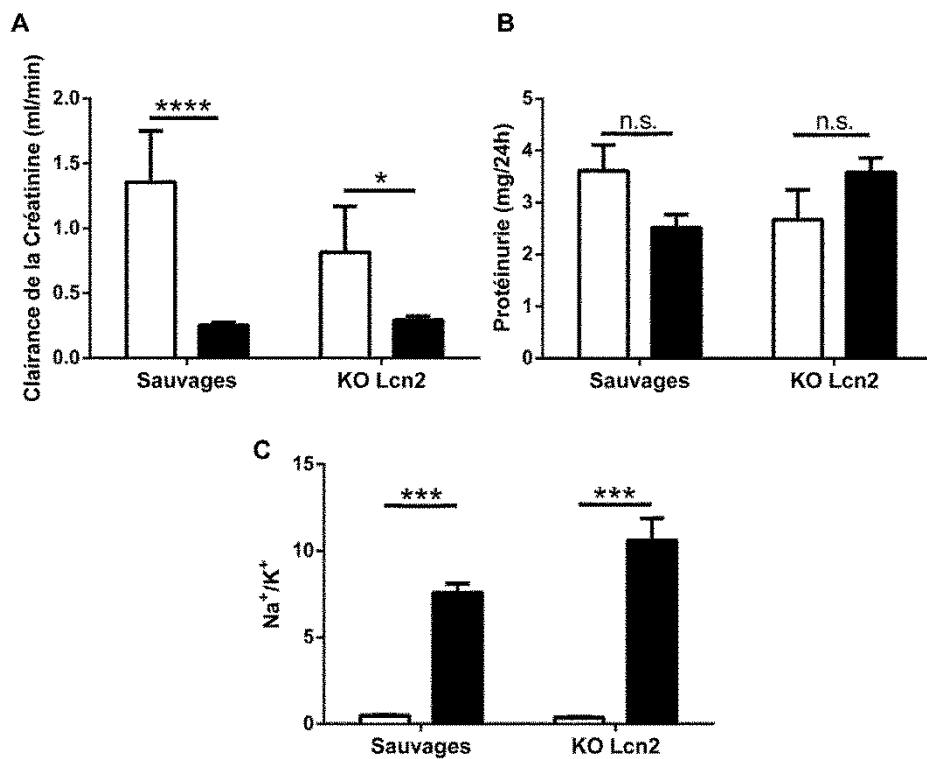


Figure 19. Fonction rénale du protocole NAS 200. (A) Clairance de la créatinine, (B) Protéinurie sur 24h et (C) ratio du sodium urinaire sur le potassium urinaire.

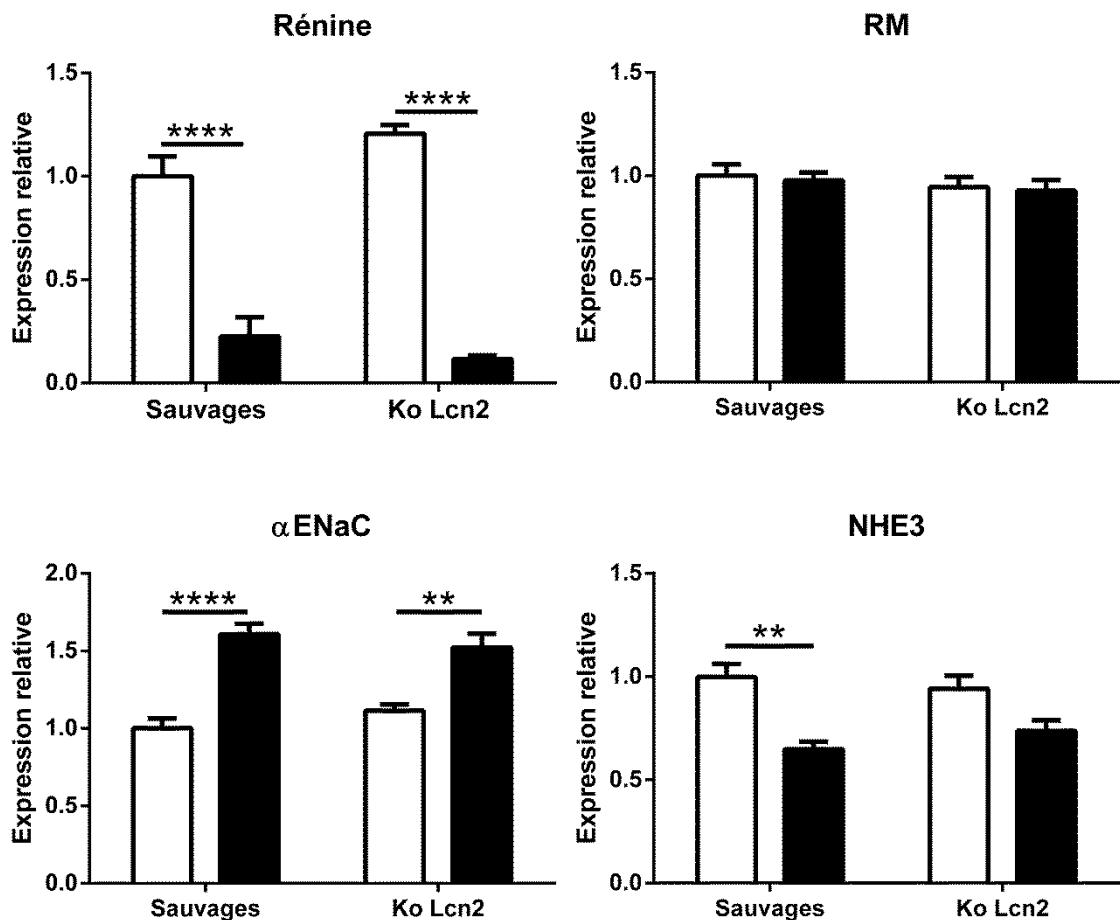


Figure 20. Effet du protocole NAS 200 sur les gènes impliqués dans l’homéostasie sodique au niveau rénal.

3.3.5 Conclusion

L’inactivation de la lipocaline 2 chez les souris KO Lcn2 prévient l’augmentation de pression induite par le traitement NAS mais ne prévient pas l’hypertrophie cardiaque. Ces résultats suggèrent deux mécanismes différents modulés par l’aldostérone, un mécanisme Lcn2 dépendant (l’hypertension) et un mécanisme Lcn2 indépendant (l’hypertrophie). La lipocaline 2 n’est pas impliquée dans les effets vasculaires du NAS, tels que l’altération de la sensibilité et de l’efficacité des agents vasoactifs au niveau de l’aorte. La lipocaline 2 n’est pas non plus impliquée dans les effets rénaux induits par le NAS.

3.4 Lipocaline 2 et remodelage de la matrice extracellulaire

3.4.1 L'inactivation de la lipocaline 2 prévient le développement de la fibrose cardiaque périvasculaire induite par le NAS

La mesure d'un marqueur plasmatique issu du clivage du pro-collagène de type 1 en collagène de type 1, le pro-peptide N-terminal du pro-collagène 1 (PINP, Fig 21A), est un bon indice de la maturation du collagène de type 1. Dans le protocole NAS 200, les souris sauvages traitées présentent une augmentation de la concentration plasmatique de PINP de 50% en comparaison les souris sauvages contrôles. Cette augmentation est totalement inhibée chez les souris KO Lcn2 traitées (Fig. 21B).

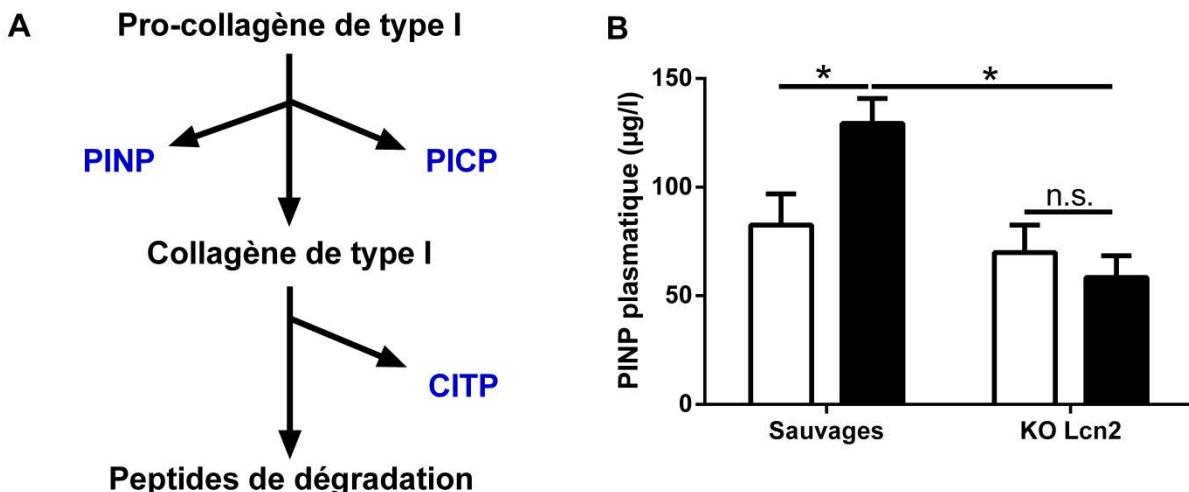


Figure 21. Effet de l'inactivation de la lipocaline 2 sur l'expression d'un marqueur plasmatique de synthèse du collagène 1 dans le protocole NAS 200 : Pro-peptide N-terminal du pro-collagène 1.

En conséquence, nous avons évalué la fibrose au niveau CV à l'aide de coloration rouge Sirius pour évaluer les dépôts de collagène. Dans le cœur, le traitement NAS 200 n'induit pas de dépôt de collagène au niveau interstitiel. En revanche, la fibrose périvasculaire est augmentée par le NAS chez les souris sauvages, mais cette augmentation est prévenue chez les KO (Fig 22A et B). Au niveau aortique, le dépôt de collagène est aussi plus important chez les souris CT NAS par rapport à l'état basal, alors que l'inactivation de la lipocaline 2 le prévient totalement chez les souris KO Lcn2 (Fig 22D et E).

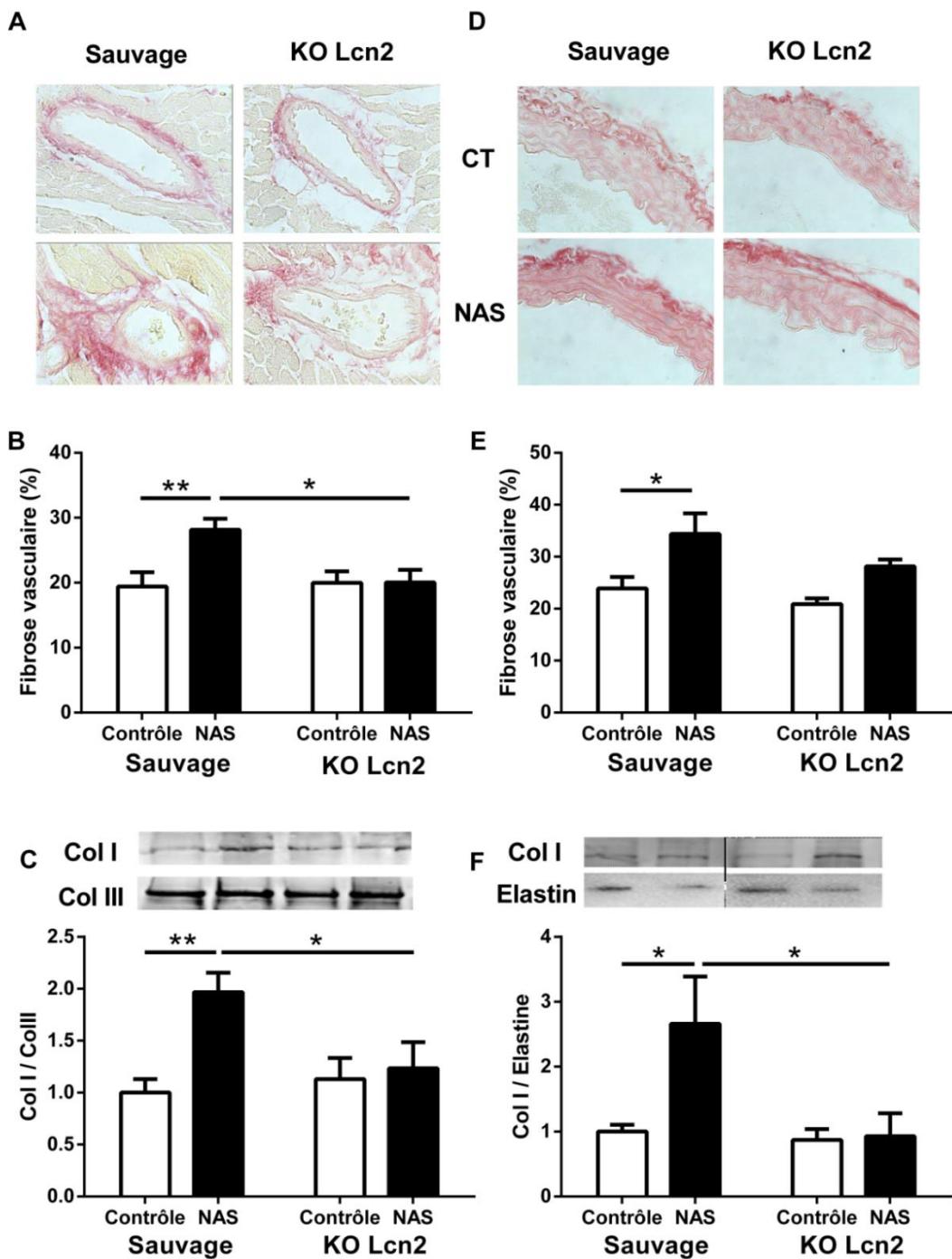


Figure 22. Effet de l'inactivation de la lipocaline 2 sur le remodelage de la matrice extracellulaire induite par le NAS 200 au niveau cardiovasculaire. (A et C) Photographies des colorations rouges sirius dans le cœur et l'aorte. (B et E) Quantification de la fibrose obtenue à partir du rouge sirius dans le cœur et l'aorte. (C et F) Western Blot du collagène 1 dans le cœur et l'aorte.

A 60 μ g/kg/j, le traitement NAS induit une augmentation de fibrose au niveau cardiaque chez les souris sauvages, qui est prévenue chez les souris KO (fig 23).

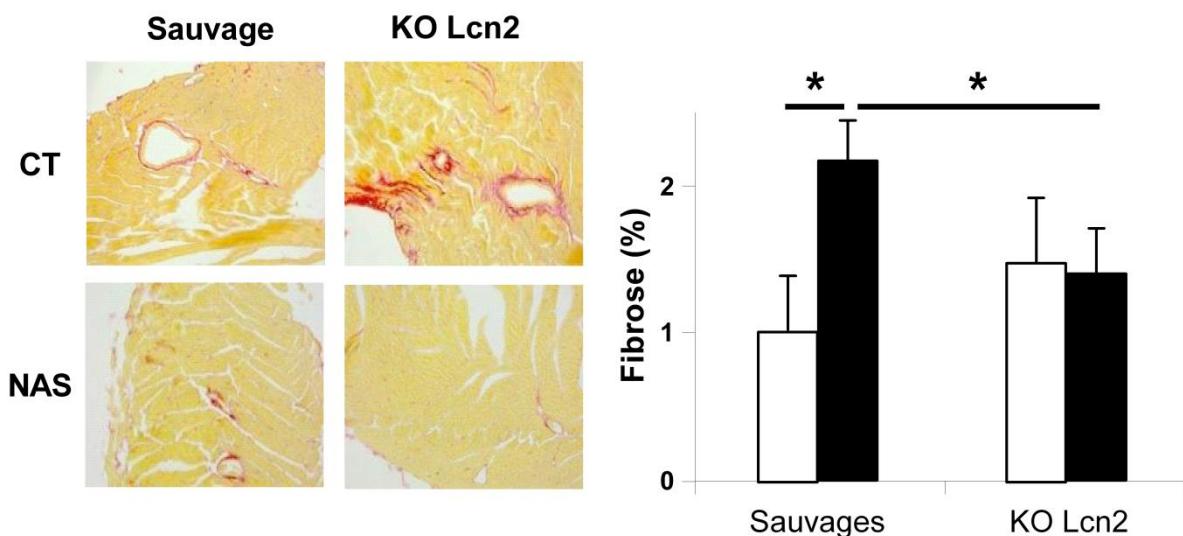


Figure 23. Effet de l'inactivation de la lipocaline 2 sur le remodelage de la matrice au niveau cardiovasculaire dans le protocole NAS 60.

3.4.2 L'inactivation de la lipocaline 2 prévient la synthèse de collagène 1 dans le cœur et les vaisseaux

Dans le protocole NAS 200, nous retrouvons par western blot des résultats qui vont dans le sens du PINP. En effet, le ratio d'expression protéique du collagène 1 sur le collagène 3, un indice de rigidité cardiaque, est induit de deux fois dans le cœur des souris C57Bl6 soumises au traitement NAS. Les souris inactivées pour la lipocaline 2 ne présentent pas d'augmentation du ratio (Fig 22C).

Dans l'aorte, les observations sont les mêmes qu'au niveau cardiaque. L'inactivation de la lipocaline 2 prévient l'augmentation du ratio du collagène 1 sur l'élastine, un indice de rigidité artérielle (Fig 22F).

Modèle d'excès de minéralocorticoïdes *in vivo* non hypertenseur : perfusion sous cutanée d'aldostérone seule (1000 μ g/kg/j)

Afin pouvoir dissocier les effets observés sur la PAS d'une part et le développement de fibrose et remodelage de la MEC d'autre part, nous avons décidé de réaliser un protocole de surcharge minéralocorticoïde à l'aide d'aldostérone seule, n'entrant pas d'augmentation de la pression artérielle (Aldo 1000).

Table 5. Paramètres physiologiques de la série Aldo 1000

	Sauvages		Ko Lcn2	
	Contrôles	Aldo	Contrôles	Aldo
N	9	10	8	10
Masse corporelle (g)	31,2 ± 0,7	31,5 ± 0,7	33,6 ± 0,8	34,3 ± 0,6
Longueur du tibia (mm)	17,6 ± 0,08	17,9 ± 0,15	18,3 ± 0,12 **	18,2 ± 0,11
Pds cœur/Lg tibia (mg/mm)	8,53 ± 0,26	8,38 ± 0,2	7,82 ± 0,12	8,13 ± 0,19
Pds rein droit/Lg tibia (mg/mm)	22,2 ± 0,88	27,5 ± 1,42 **	20,1 ± 0,58	26,5 ± 0,52 ***

Nous avons mesuré la PAS avant et après le traitement. Nous n'observons pas de différence de PAS entre les groupes avant le traitement à l'aldostérone, ni après le traitement (Table 5, Fig 24). De la même manière, il n'y a pas de différence lorsque l'on compare la pression du même animal avant et après le traitement. Notre protocole à forte dose d'aldostérone ne modifie donc pas la PAS, comme attendu.

3.4.3 L'aldostérone seule n'induit pas de remodelage cardiovasculaire

Comme pour le protocole NAS 200, nous avons mesuré le PINP plasmatique afin d'évaluer le statut fibrosant des souris. L'aldostérone seule double la concentration de PINP circulant chez

les souris sauvages. Il n'y a pas de différence significative chez les souris KO Lcn2, mais la tendance observée laisse penser que l'aldostérone augmente la concentration de pro-peptide de la même manière que chez les souris sauvages (Fig 24).

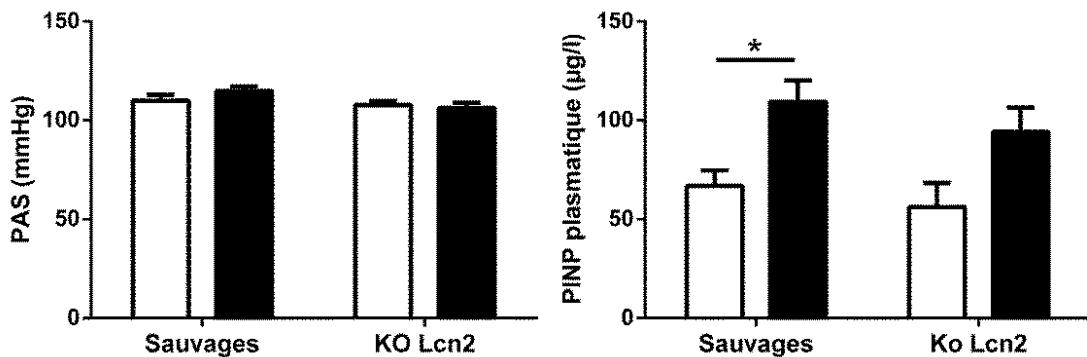


Figure 24. Conséquences de la perfusion de d'aldostérone sur la pression artérielle systolique et sur le PINP plasmatique dans le protocole Aldo 1000.

Le traitement à l'aldostérone ne modifie pas le dépôt de collagène interstitiel dans le cœur des souris sauvages. En revanche, l'aldostérone diminue la fibrose dans le cœur des souris KO, chez qui le niveau basal de collagène interstitiel est deux fois plus important que chez les souris sauvages dans cette série (Fig 25A et C). Pour la fibrose cardiaque périvasculaire, l'aldostérone n'a aucun effet sur le dépôt de collagène quel que soit la lignée murine. Le niveau de fibrose périvasculaire est identique dans les cœurs des quatre groupes de souris (Fig 25B et D). Au niveau moléculaire, la quantité de collagène 1 n'est pas modifiée par quatre semaines de perfusion d'aldostérone. Ici encore, le niveau basal des souris KO est plus élevé que les souris sauvages pour cette série (Fig 25E).

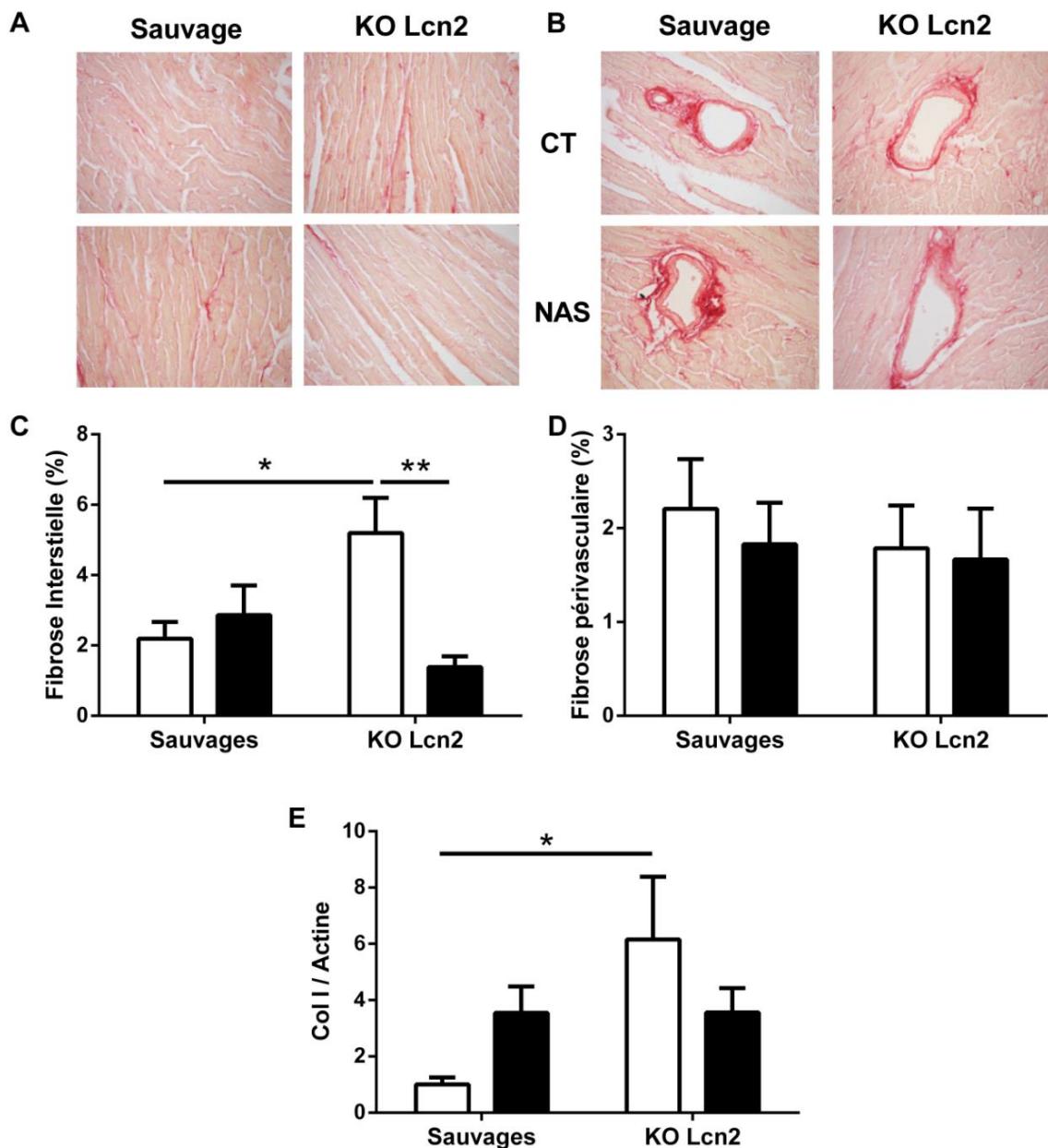


Figure 25. Effets du protocole Aldo 1000 sur le remodelage de la matrice extracellulaire au niveau cardiaque. (A et B) Photographies des colorations au rouge sirius. (B et E) Quantification de la fibrose obtenue à partir du rouge sirius au niveau interstitiel (C) et périvasculaire (D). (E) Western Blot du collagène 1 dans le cœur

Au niveau aortique, nous n'observons aucune différence sur la fibrose (Fig 26A et B) ni sur la quantité de collagène 1 entre les différents groupes expérimentaux (Fig 26C).

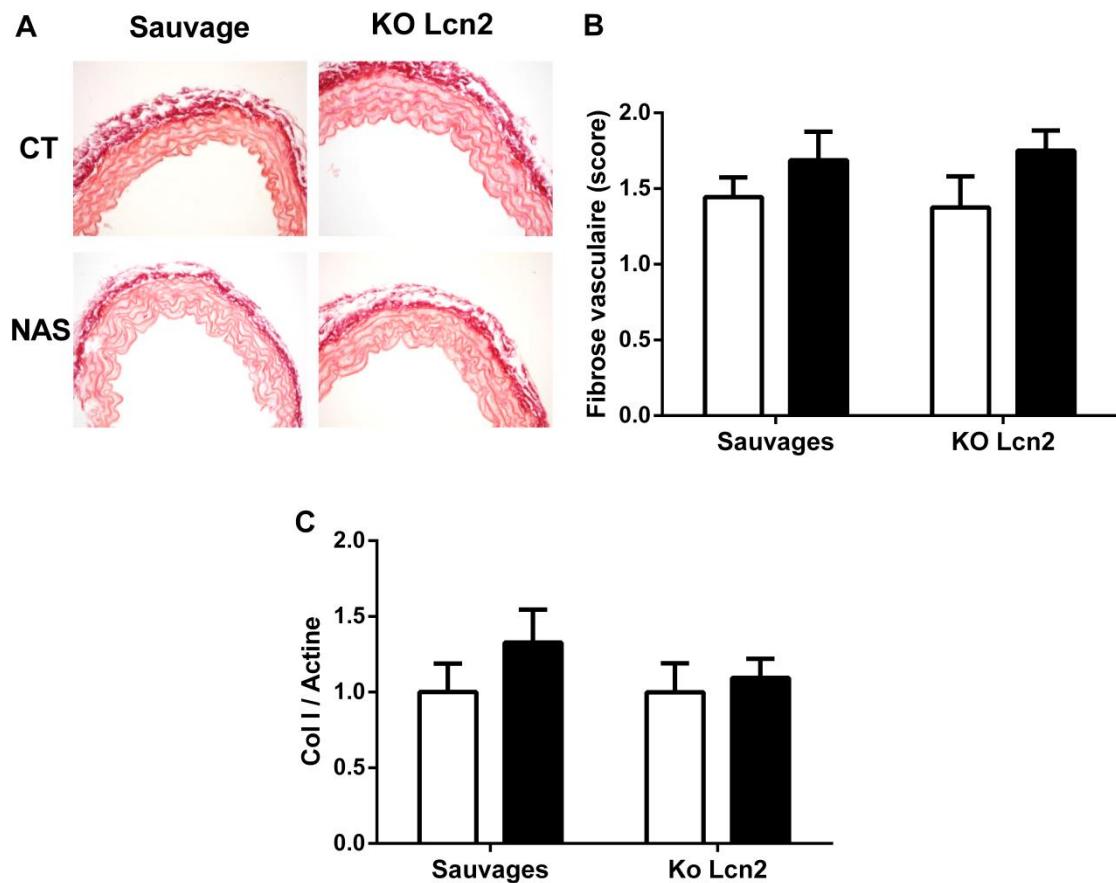


Figure 26. Effets du protocole Aldo 1000 sur le remodelage de la matrice extracellulaire au niveau aortique. (A) Photographies des colorations au rouge sirius. (B) Quantification de la fibrose obtenue à partir du rouge sirius et (C) Western Blot du collagène 1 dans l'aorte.

3.4.4 Conclusion

Ce modèle de forte dose d'aldostérone sans ajout de sodium ne nous a donc pas permis de clarifier le rôle des différents facteurs.

3.5 L'inactivation de la lipocaline 2 prévient l'augmentation des marqueurs de l'inflammation induit par l'aldostérone.

3.5.1 Len2 est impliquée dans l'augmentation des marqueurs inflammatoires induit par le traitement NAS

Dans la série NAS 200, la concentration plasmatique de CRP, un marqueur d'inflammation systémique, est doublée chez les souris sauvages traitées au NAS. Cette augmentation est totalement prévenue chez les souris inactivées pour Lcn2 (Fig 27A). Cette augmentation de la concentration plasmatique de la CRP suggère donc des modifications de l'état inflammatoire des souris induites par le traitement.

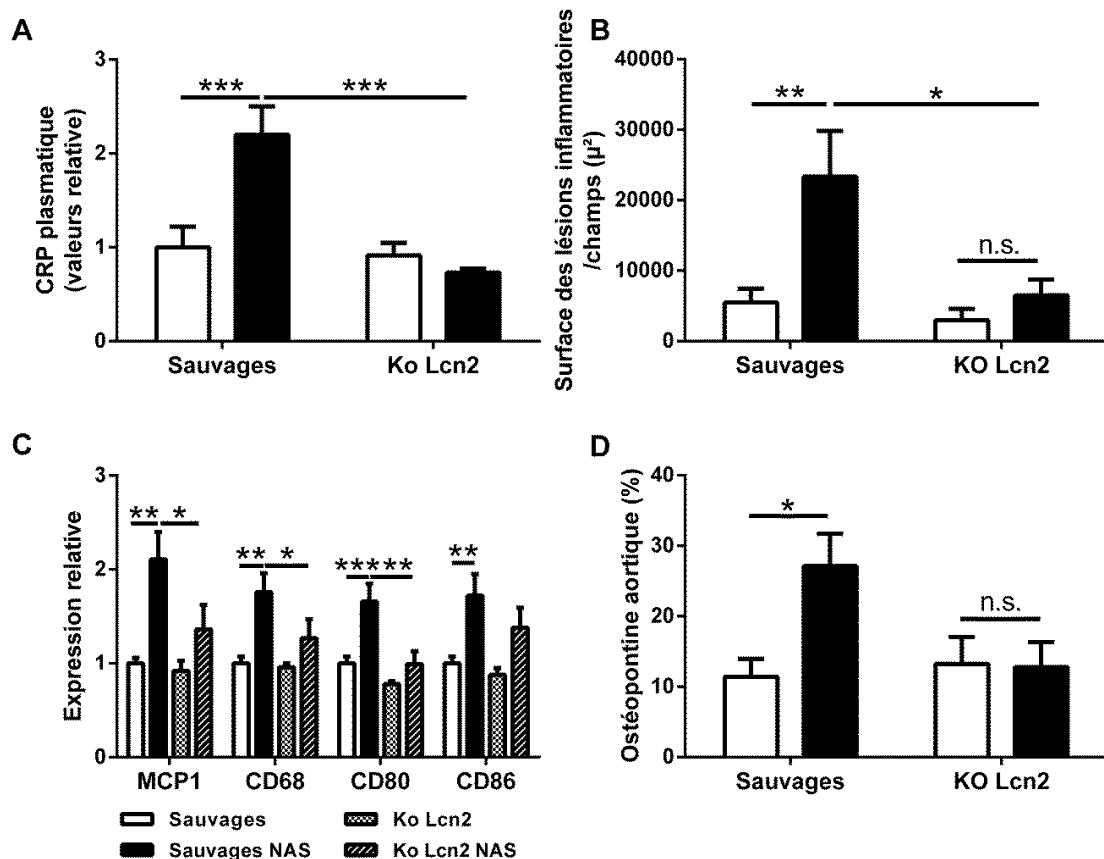


Figure 27. Effets de l'inactivation de la lipocaline 2 sur l'expression de marqueurs de l'inflammation. (A) Dosage de la Protéine Réactive C plasmatique dans le protocole NAS 200. (B) Quantification de la surfaces des lésions inflammatoires dans le cœur de souris du protocole NAS 200. (C) Expression cardiaque de marqueurs de l'inflammation dans le protocole NAS 60 et (D) Quantification de l'ostéopontine dans la paroi vasculaire aortique.

A l'aide d'une coloration de trichrome de Masson, nous avons mesuré la taille et la surface des foyers inflammatoires dans le tissu cardiaque. Chez les souris sauvages, on observe une augmentation de la surface des foyers inflammatoires dans le cœur induite par les effets combinés de l'aldostérone et du sel. En absence de lipocaline 2, la surface de ces lésions est réduite de manière importante (Fig. 27B). Dans la série NAS 60, on observe dans le cœur des souris traitées une augmentation de l'expression de marqueurs inflammatoires tels que MCP1, une chimiokine pour les macrophages, CD68, un marqueur de phagocytose, ou encore CD80 et CD86, des marqueurs de cellules présentatrices d'antigène comme les cellules dendritiques. L'augmentation de l'expression de ces gènes par le NAS 60 est inhibée chez les souris KO Lcn2 (Fig 27C).

Au niveau aortique, l'ostéopontine, un marqueur de l'inflammation, est augmentée par le NAS 200 chez les souris sauvages. L'inactivation de la lipocaline 2 protège les KO de cette augmentation de l'ostéopontine (Fig 27D).

4 DISCUSSION

Ce travail de thèse a consisté à étudier l'implication du récepteur minéralocorticoïde dans le système cardiovasculaire. La première partie de ce travail a concerné les conséquences de l'inactivation du RM dans la CML. La deuxième partie était ciblée sur le rôle d'une cible directe du RM dans le système cardiovasculaire : la lipocaline 2.

4.1 Inactivation du récepteur minéralocorticoïde dans la cellule musculaire lisse

Dans cette première partie, nous avons analysé le rôle du RM de la CML dans la réactivité vasculaire aortique. L'implication du RM des CMLs dans la réponse contractile à la Phe a déjà été étudié dans un autre modèle de souris KO inductible [98]. De manière intéressante, les auteurs ont observés une réponse contractile des KO à la Phe plus faible que les sauvages, mais uniquement chez des souris âgées. Chez des souris de 2 mois, l'inactivation du RM n'avait pas d'effet sur la contraction à la Phe [98]. En utilisant un modèle non-inductible (constitutive), nous n'avons pas confirmé ces résultats. McCurley *et al* ont rapporté une altération de la réponse vasoconstrictrice au BayK8644, un agoniste du canal calcique Cav1.2 [98]. Les auteurs ont observés une diminution de l'ARNm de Cav1.2, suggérant un défaut dans l'expression du canal calcique. Bien que nous ne confirmions pas la diminution de l'expression de l'ARNm de la sous-unité Cav1.2 dans notre modèle, nous avons montré que la contraction en réponse au Ca^{2+} extracellulaire, ainsi qu'au KCl, sont altérées chez les $\text{KO}^{\text{RM CML}}$. La réponse contractile à la libération de calcium intracellulaire (caféine) n'étant pas différente, ces résultats restent cohérents avec une potentielle dysfonction du canal Cav1.2. Néanmoins, l'utilisation de patch clamp se révèle nécessaire pour étudier l'activité de ce canal calcique.

La deuxième observation que nous avons faite est que l'inactivation du RM dans les CMLs participe aussi aux réponses relaxantes des CMLs. Nous avons montré que la réponse au SNP est plus faible chez les KO que chez les sauvages, suggérant soit une diminution de la sensibilité des CMLs au NO, soit une diminution de la production de NO par l'endothélium. De plus l'utilisation d'un analogue du GMPc n'a pas mis en évidence de différence entre les deux lignées, suggérant une altération en amont de la voie de signalisation du NO. La réponse vasorelaxante à l'Ach étant

similaire entre les KO^{RM CML} et leurs contrôles, cela signifie que l'altération de la voie du NO au niveau des CMLs est compensée par les autres voies de la relaxation dépendante de l'endothélium. L'EDHF ayant été montré comme ne participant pas à la relaxation au niveau de l'aorte, nous ne l'avons pas étudié dans cette étude [187]. La voie des prostanoïdes a été étudiée à l'aide d'un inhibiteur des cyclooxygénases, l'indométacine. Les résultats obtenus après incubation à l'indométacine suggèrent que la participation de la PGI₂ à la relaxation induite par l'Ach est plus importante chez les KO que chez les souris sauvages. Néanmoins, cette observations est à tempérer, car l'indométacine est décrite comme diminuant la contraction à la Phe [188]. De fait, les précontractions à la Phe en présence d'indométacine sont plus faibles chez les KO que chez les sauvages. Cela pourrait aussi suggérer une altération de la voie de l'Endothelium Derived Contracting Factor chez les KO.

Le mécanisme sous-jacent de l'altération de la réponse de NO n'est pas identifié. Etant donné que la relaxation induite par un analogue de GMPc (8-Br-cGMP) est similaire chez les deux lignées, une diminution de l'expression de la guanylate cyclase au niveau de la protéine ou de l'activité pourrait expliquer la diminution de la réponse au SNP.

4.2 Inactivation de la lipocaline 2 dans le modèle NAS

La deuxième partie de mon travail a concerné l'étude de l'implication potentielle de la lipocaline 2 dans les effets physiopathologiques du RM dans le système cardiovasculaire. L'augmentation de l'expression de la lipocaline 2 dans le système cardiovasculaire a été mise en évidence par plusieurs équipes [184, 185]. Notre laboratoire a été le premier à mettre en évidence la régulation directe de l'expression de la lipocaline 2 par le complexe aldostérone/RM dans les cardiomyocytes [34, 129]. La lipocaline 2 est induite dans de nombreuses pathologies, dont les pathologies CVs, métaboliques et le cancer. En dehors de son rôle de transporteur de fer ayant pour conséquences des effets bactériostatiques lors de certaines infections, la fonction de la protéine n'est encore que partiellement décrite. L'hypothèse du travail présentée ici est que la lipocaline 2 participe aux effets délétères induits par la suractivation du RM observéss dans certaines pathologies cardiovasculaires, ayant pour conséquence le développement d'une hypertension, associée à un remodelage de la matrice extracellulaire et à l'apparition d'une inflammation.

4.2.1 Validation et limite du modèle utilisé

Afin d'étudier l'implication de la lipocaline 2 dans la cascade de signalisation du RM, nous avons choisi d'associer : a) un modèle murin d'inactivation globale et constitutive de la lipocaline 2 avec b) un modèle « pharmacologique » expérimental (NAS) de suractivation de la cascade minéralocorticoïde (aldostérone/RM). Dans le but de limiter les interactions possibles entre la voie minéralocorticoïde et les hormones sexuelles, nous avons décidé de réaliser notre étude uniquement chez des souris mâles.

4.2.1.1 Protocole de néphrectomie unilatérale associée à un apport d'aldostérone et de sodium

Le modèle d'uni-néphrectomie avec perfusion d'aldostérone et de sel a été mis au point, à l'origine, chez le rat [55]. L'objectif de ce modèle était de pouvoir étudier le remodelage du cœur et distinguer les voies induites par les facteurs hémodynamiques (la pression) et les facteurs hormonaux (SRAA). Ce modèle est associé à une élévation de la PAS et un développement de fibrose dans les deux ventricules, avec un niveau d'angiotensine II circulante normal (diminué au début du traitement avec un retour à la normale après plusieurs semaines)[55].

Les résultats obtenus durant cette thèse avec le protocole NAS chez la souris sont compatibles avec la majorité des effets publiés dans la littérature. Si la dose, la durée ou encore le fond génétique peuvent varier dans la littérature, les effets sont sensiblement les mêmes. Les deux protocoles que nous avons réalisés (à savoir 60 μ g et 200 μ g chez des souris KO Lcn2) montrent une élévation de la PAS mesurée par pléthysmographie à la fin des 3 semaines de traitements. Au niveau cardiaque, cette augmentation de pression s'accompagne d'une hypertrophie du cœur. L'étude de l'hypertrophie n'étant pas l'objectif de ce travail, je n'ai pas caractérisé les conséquences au niveau des deux ventricules cardiaques. Pour ce qui est du remodelage de la matrice extracellulaire, les résultats obtenus dépendent de la dose d'aldostérone infusée. Les souris traitées 4 semaines avec 200 μ g ont développé de la fibrose, contrairement à celles traitées avec 60 μ g. Contrairement à une autre étude utilisant un protocole NAS identique [189], les souris ont développé uniquement de la fibrose périvasculaire et pas de fibrose

interstitielle. Le protocole de perfusion d'aldostérone seule (Aldo 1000) n'a pas montré d'augmentation de la pression artérielle, mais n'a pas reproduit le développement de fibrose rapporté dans la littérature [100, 190]. Au niveau de l'expression des ARNs, nous observons une augmentation des ARNs de certains composants de la matrice extracellulaire, tels que le collagène 1 ou le collagène 3, en accord avec à ce qui est décrit dans la littérature. Nous observons aussi une augmentation de l'expression de marqueurs de distension cardiaque tels que le BNP ou l'ANP.

Les souris présentent une augmentation de la PAS, mesurée par pléthysmographie à la queue, durant leur période d'inactivité. C'est une élévation modeste de la pression, environ 20mmHg, qui ne correspond pas à la définition clinique de l'hypertension. Ces résultats sont obtenus dans nos deux protocoles NAS (NAS 60, NAS 200) et ont été précédemment observés [189, 191]. Nous n'avons pas relevé d'épaississement de la paroi vasculaire ni d'hypertrophie de l'aorte mais nous avons observés des dépôts de collagène au niveau de la media de l'aorte. Nous avons mesuré les réponses vasoactives de l'aorte à différents agents, tels que le KCl, la phénylephrine (Phe) ou l'acétylcholine (Ach). Nous avons montré que le traitement NAS ne modifie pas la réponse au KCl, mais augmente la sensibilité des vaisseaux à la Phe et entraîne une dysfonction endothéliale en réponse à l'Ach ainsi qu'une dysfonction de la réponse relaxante des CMLs au SNP comme il a été rapporté dans la littérature [192].

Au niveau rénal, le traitement NAS est décrit comme ayant des conséquences sur le statut fibrosant et inflammatoire [193]. Nous n'avons pas analysé la structure du rein et, par conséquent, les possibles lésions ou dépôts de collagène. Le traitement NAS 200 induit une diminution de la clairance de la créatinine après 4 semaines de traitement et présente des conséquences sur l'homéostasie sodique. Cette dernière est un équilibre entre l'apport de sodium et son excréition de l'organisme. Le traitement NAS augmente à la fois l'apport sodé (à l'aide de NaCl 1% dans l'eau de boisson) mais diminue également son excréition en stimulant sa réabsorption au niveau rénal à l'aide d'aldostérone. Dans le cas présent, il ne nous a pas été possible de mesurer le volume sanguin. Il est logique de penser que l'augmentation de la PAS témoigne d'une augmentation de la volémie suite à l'augmentation de réabsorption de sodium. Quoiqu'il en soit, l'apport sodé dû au NAS n'est que faiblement absorbé, comme en atteste la très forte augmentation du ratio Na^+/K^+ , indice de l'excration sodée, après 4 semaines de traitement

NAS. Si l'absorption complète du sodium n'est physiologiquement pas possible car cela induirait une trop grande réabsorption d'eau, il est à noter que le ratio Na^+/K^+ est l'inverse de celui attendu avec l'aldostérone seule. De plus, cet apport massif de sodium régule négativement le SRAA, puisque l'expression de la rénine est très fortement diminuée. Dans le protocole NAS 60, comme dans NAS 200, nous n'observons pas d'atteinte glomérulaire, la protéinurie n'étant pas modifiée.

Enfin, le traitement NAS est aussi caractérisé par la présence d'un statut inflammatoire [194], défini par le recrutement de cellules de l'immunité et l'expression de cytokines pro-inflammatoire. Dans ce traitement, nous observons une augmentation du niveau plasmatique de la CRP, un marqueur de l'inflammation utilisé en clinique humaine. Au niveau du cœur, on voit apparaître des foyers de cellules inflammatoires. Enfin, dans la paroi vasculaire, l'expression de l'OPN, un autre marqueur de l'inflammation, est augmentée, en accord avec les résultats de la littérature [96, 100]. Nous avons plusieurs marqueurs de l'inflammation qui augmentent, mais nous n'avons pas pu étudier pour l'instant le recrutement de cellules inflammatoires en histologie. Par ailleurs, dans le protocole NAS 60, nous observons l'induction de l'expression de quelques marqueurs de l'inflammation.

En conclusion, le traitement NAS a correctement fonctionné et nous permet d'étudier le remodelage et l'inflammation induit par l'activation du RM.

Dans le modèle expérimental associant une néphrectomie, aldostérone et sel, l'implication du RM est démontrée par la prévention du remodelage lorsque les animaux sont traités avec un antagoniste du RM à une dose ne réduisant pas l'hypertension [57]. Il faut noter qu'un traitement par l'aldostérone seule ou un régime riche en sel seul ne reproduisent pas la pathologie. C'est leur association, en présence d'une uni-néphrectomie, qui est pathologique. On ignore pourquoi le régime riche en sel est indispensable en association avec l'administration de minéralocorticoïdes. Le modèle entraîne une activation inappropriée du RM, malgré la surcharge sodée. L'implication potentielle du RG a été testée par l'administration d'un antagoniste spécifique, le RU486, ou d'un agoniste, la corticostérone, aux animaux sous aldo/sel [60], ou encore par l'administration d'un agoniste du RM et du RG, le 9a-fluorocortisol [195]. L'administration de RU486 n'inhibe pas le remodelage induit par l'aldostérone. Le 9a-fluorocortisol induit un remodelage équivalent à l'aldostérone. La corticostérone induit un remodelage discret (augmentation du collagène interstitiel) bien moins important que l'aldostérone. Ces résultats suggèrent que le RG n'est pas

impliqué dans l'action de l'aldostérone dans ce modèle et que le remodelage correspond à une action spécifique des hormones minéralocorticoïdes (aldostérone ou DOCA) via le RM. C'est un modèle expérimental assez éloigné de la pathologie humaine, puisqu'il s'agit à la fois d'augmenter l'apport en sodium et de stimuler sa réabsorption à l'aide d'aldostérone.

L'un des objectifs de cette thèse était d'étudier l'implication possible de la lipocaline 2 dans les effets pathologiques du RM. Pour cela, il était important d'étudier l'expression de la lipocaline 2 suite à l'activation de la voie minéralocorticoïde par le traitement NAS. Dans la littérature, la lipocaline 2 est décrite par plusieurs équipes comme étant augmentée dans les protocoles NAS ou DOCA-sel. Au niveau cardiaque, l'expression protéique de la lipocaline 2 est augmentée après 5 semaines de traitement DOCA-sel chez la souris [184]. La même observation a été faite dans un protocole NAS après 4 semaines de traitement chez la souris, où l'expression cardiaque de Lcn2 est augmentée d'un facteur 3. Cette augmentation n'est pas induite si les souris ne sont soumises qu'à une néphrectomie seule, un apport sodé seul ou une perfusion d'aldostérone seule. Cela montre bien la nécessité d'utiliser le modèle NAS dans l'étude de notre hypothèse [129]. Dans les différents protocoles que nous avons réalisés, nous observons bien une augmentation de l'expression de la lipocaline 2 au niveau cardiaque, que cela soit avec une faible dose d'aldostérone (NAS 60), ou avec une dose plus importante (NAS 200). L'expression rénale de la lipocaline 2 est aussi augmentée. Malgré une tendance à l'augmentation en moyenne, la différence d'expression au niveau aortique n'est pas statistiquement significative. Cependant, son induction dans la paroi vasculaire ainsi que les types cellulaires qui la composent avaient déjà été observés [129]. Le niveau plasmatique de la lipocaline 2 est aussi induit par le NAS et prévenu par l'utilisation d'antagoniste du RM. Nous n'avons pas dosé le niveau plasmatique de la lipocaline 2 dans nos différents protocoles. L'expression cardiaque de Lcn2 peut être induite par l'utilisation d'une forte dose d'aldostérone seule [129]. Cet effet passe par le RM puisque l'utilisation d'un antagoniste du RM bloque cet effet. Le protocole à forte dose d'aldostérone seule que nous avons réalisé n'induisant aucun effet sur le remodelage décrit dans la littérature [100, 190], par conséquent nous n'avons donc pas regardé le niveau d'expression de la lipocaline 2. L'augmentation de l'expression de la lipocaline 2 dans le cœur ainsi que dans le rein nous a permis d'envisager son étude dans nos modèles NAS.

4.2.1.2 Inactivation globale et constitutive de la lipocaline 2 chez la souris

Afin de déterminer le rôle de la lipocaline 2 dans les effets CVs induits par un traitement NAS, nous avons choisi d'utiliser un modèle d'inactivation globale et constitutive de la lipocaline 2. Comme évoqué dans l'introduction, il existe plusieurs modèles d'inactivation génique de La lipocaline 2. Durant toute la durée de cette thèse, nous avons utilisé le modèle provenant du laboratoire de T. Berger et T.W. Mak [141]. Afin de pouvoir évaluer la participation de la lipocaline 2 dans la voie minéralocorticoïde il était important d'évaluer les effets de l'inactivation de la lipocaline 2 à l'état basal. Comme déjà décrit dans la littérature, les souris ne présentaient pas de défaut de développement, et leurs naissances se faisaient selon un ratio mendélien. A l'état de base, les souris inactivées pour la lipocaline 2 ne présentent pas de différence de PAS, ni de fréquence cardiaque. Une étude réalisée sur des cœurs isolés perfusés montre une fonction cardiaque améliorée chez les souris KO par rapport aux souris sauvages. En effet, l'absence de la lipocaline 2 améliore la fraction d'éjection, ainsi que la fraction de raccourcissement du cœur. Cela serait dû à une meilleure fonction mitochondriale [162].

Au niveau vasculaire, les souris KO Lcn2 âgées (22 semaines) ont été décrites comme étant moins sensibles à la Phe que les souris sauvages et plus sensibles à la relaxation à l'insuline dans l'aorte [176]. Cela n'a probablement pas de conséquence sur nos résultats puisque nous avons étudié des souris plus jeunes (12 semaines), qui d'après les auteurs de l'étude réagissent comme les souris contrôles [176]. Nous avons observé une différence de réponse à l'Ach à l'état basal, avec une absence de réponse constrictrice aux fortes doses chez les KO. Cela n'avait pas d'influence sur les résultats observés après un traitement NAS.

Au niveau rénal, aucune différence n'a été observé dans la fonction rénale, la protéinurie ou encore la réabsorption du sodium chez les souris inactivées pour la lipocaline 2. La réabsorption du sodium n'a été étudiée qu'à l'équilibre, sur une période de 24h. Cela n'exclut pas la possibilité d'un rôle pour la lipocaline 2 dans la régulation aigüe de la balance sodée.

Au niveau de la réponse immunitaire, les souris KO Lcn2 ont été décrites comme étant plus sensibles aux infections bactériennes [141]. Nous n'avons pas observé de mortalité plus importante des souris KO après chirurgie. Le modèle murin que nous avons utilisé ne présente aucune différence en termes de quantité ou de type de population de cellules immunitaires [141].

En revanche, il est à noter que l'un des autres modèles d'inactivation de la lipocaline 2 (celui provenant du laboratoire de Devireddy [145]) présente de nombreuses altérations des cellules de l'immunité à l'état basal, suggérant des effets possiblement moins marqués que dans le modèle que nous utilisons. En effet, Liu *et al* ont montré que l'inactivation de Lcn2 dans leur modèle induisait une augmentation de cellules dans la moelle osseuse, de leucocytes dans le sang et de splenocytes dans la rate. Les souris âgées présentent plus de neutrophiles. Cette accumulation de cellules est due à un défaut d'apoptose. Les résultats sont plus ou moins importants d'un fond génétique à un autre [145]. Les auteurs ont aussi décrit dans leur modèle une dysfonction des neutrophiles, au niveau de leur recrutement sur un site inflammatoire et dans leur capacité de phagocytose [154]. Ces effets n'ont pas été décrits dans le modèle que nous utilisons, mais laissent entrevoir de possibles fonctions pour la lipocaline 2. Les raisons pour lesquelles deux modèles d'inactivation complète de la lipocaline 2 ne présentent pas les mêmes conséquences restent inconnues.

Une des difficultés concernant l'étude de la lipocaline 2 concerne sa faculté d'être secrétée. En effet, cela induit deux questions a) quel est son lieu de synthèse et de sécrétion b) quel est son site d'action. Il n'est pas à exclure que la lipocaline 2 puisse agir par voie autocrine suite à sa sécrétion. Néanmoins, l'utilisation d'un modèle d'inactivation globale ne nous permet pas de dissocier ces deux questions. La littérature actuelle et les études que nous avons réalisées au laboratoire montrent que la lipocaline 2 est exprimée dans une variété importante de types cellulaires, et ce, sous contrôle minéralocorticoïde. Dans les systèmes cardiovasculaire et rénal, la lipocaline 2 a été décrite dans la majorité des types cellulaires, à savoir les cardiomycocytes, l'endothélium, les CMLs ainsi que l'épithélium rénal distal. Les éléments inconnus restent donc essentiellement son lieu et son mode d'action.

L'utilisation du modèle murin pour l'étude de la lipocaline 2 présente un avantage par rapport à l'homme ou d'autres mammifères plus grands tels que le cochon ou le singe. En effet, la souris, de par sa séquence en a.a., ne présente pas le résidu cystéine décrit comme nécessaire à la liaison de la MMP9. Cela signifie qu'il est possible d'étudier uniquement le rôle intrinsèque de la lipocaline 2 sans les conséquences de la liaison potentielle à la MMP9. Chez l'homme, la lipocaline 2 est souvent décrite comme étant associée à la MMP9 et participant à sa stabilisation. Cela étant dit, dans la littérature, la liaison entre la lipocaline 2 et la MMP9 n'a pas été décrite en

détail au niveau CV, que cela soit par co-immunoprécipitation ou bien par évaluation de l'activité gélatinase de la MMP9. Durant mes travaux de thèse, nous ne nous sommes pas penchés sur cette possible interaction et par conséquent je n'ai pas de résultats pouvant confirmer ou infirmer la liaison entre la lipocaline 2 et MMP9 chez la souris.

4.2.2 La lipocaline 2 est impliquée dans l'augmentation de la pression artérielle induite par le modèle NAS

Le premier résultat majeur de l'inactivation de la lipocaline 2 dans un modèle d'activation de la voie minéralocorticoïde obtenue dans cette thèse est la prévention de l'augmentation de la PAS. En effet, ce résultat se retrouve dans les deux séries réalisées durant ces travaux, NAS 60 et NAS 200. Dans la littérature, il y a peu d'études mettant à jour le lien entre lipocaline 2 et modification de la pression artérielle. Une étude clinique a montré que la présence de polymorphismes dans le promoteur de la lipocaline 2 induisait des variations modérées de la pression artérielle dans une population originaire de Hong Kong. Néanmoins, les conséquences des polymorphismes (gain ou perte de fonction) ainsi que leur corrélation avec le niveau de la lipocaline 2 circulant ou le sens de variation de la pression artérielle n'ont pas été étudiés [196]. Une autre étude clinique plus récente a montré une corrélation entre la lipocaline 2 et l'hypertension. Chez des patients présentant une hypertension essentielle, le niveau plasmatique de lipocaline 2 est plus important que chez des sujets sains et il est corrélé avec la PAS [197]. Les mécanismes sous-jacents restent inconnus. La régulation de la pression artérielle se fait à travers deux mécanismes : a) la régulation du volume sanguin via l'homéostasie sodique rénale b) la régulation des résistances périphériques via la réactivité vasculaire. Dans cette optique, nous avons étudié les effets de la lipocaline 2 dans le modèle NAS au niveau rénal et au niveau vasculaire. Au niveau rénal, nous n'avons pas observé de différence chez les souris inactivées pour la lipocaline 2 traitées au NAS comparativement aux souris témoins. Les KO présentent la même augmentation du ratio Na^+/K^+ ainsi que la diminution de l'expression de la rénine. De même, l'expression de transporteurs ioniques, tels qu'ENaC ou NHE3, n'est pas modifiée par l'inactivation de la lipocaline 2. Au niveau vasculaire, nous avons étudié la réactivité de l'aorte à différents agents vasoactifs, un vasoconstricteur α_1 -adrénergique (Phe), un vasodilatateur endothélium-dépendant (Ach) et un vasodilatateur endothelium-indépendant (SNP). Les réponses

ne varient pas entre les deux lignées, et l'inactivation de la lipocaline 2 ne prévient pas les effets du NAS sur la dysfonction endothéliale. De manière surprenante, à l'état basal les KO répondent différemment aux fortes concentrations d'Ach. Là où les souris sauvages vont se contracter, les KO ne présentent pas cette réponse biphasique et cette contraction. Ceci étant, cette différence disparaît lorsque les souris sont traitées 4 semaines au NAS, ce qui n'explique pas la différence de pression observée. L'une des possibilités pour expliquer cette variation de pression entre KO et témoins peut venir d'une différence de réponse vasoactive dans les petits vaisseaux de résistances (artères mésentériques) ou encore d'une modification des réponses vasculaires aux stimuli mécaniques tels que la relaxation en réponse au flux (forces de cisaillement), ou encore la contraction en réponse à l'augmentation de pression intraluminale (tonus myogénique). Ces deux éléments n'ont pas été étudiés dans la présente étude et mériteraient d'être approfondis. Le rôle bénéfique de la lipocaline 2 dans la dysfonction endothéliale a été mis en évidence dans un modèle d'obésité. Les auteurs ont montré que l'inactivation globale de la lipocaline 2 prévient les effets délétères de plusieurs semaines de régime riche en gras sur la fonction endothéliale.

Afin de replacer la lipocaline 2 dans la voie de signalisation minéralocorticoïde, il est intéressant de comparer les résultats obtenus ici à ceux obtenus dans des modèles d'inactivation du RM (en amont de la lipocaline 2) dans les différents tissus du système CV. L'inactivation spécifique du RM endothérial dans un modèle d'obésité induit par un régime riche en graisse entraîne une prévention de la dysfonction endothéliale [90]. Ces résultats sont à mettre en parallèle de ceux obtenus avec le KO Lcn2. L'inactivation du RM dans les CMLs ne présente pas d'effets sur l'augmentation de pression induite par le traitement à l'aldostérone-sel [98]. A l'inverse, une suractivation du RM spécifiquement dans les cardiomyocytes induit une dysfonction endothéliale des artères coronaires [92]. Cela suggère une communication locale entre cardiomyocytes et cellules endothéliales par un médiateur sécrété. On peut émettre l'hypothèse que la lipocaline 2 est impliquée, d'autant plus que c'est dans ce modèle de surexpression du RM humain dans les cardiomyocytes que sa régulation par le RM a été montrée [129]. L'étude de la participation de la lipocaline 2 dans la réactivité vasculaire mériterait également d'être approfondie.

4.2.3 Lipocaline 2 participe au remodelage de la matrice extracellulaire dans le système cardiovasculaire

Le deuxième résultat majeur de nos travaux est l'implication de la lipocaline 2 dans le remodelage de la matrice extracellulaire induit par le traitement NAS. En effet, les résultats de notre étude montrent que l'inactivation de la lipocaline 2 prévient le développement pathologique de la MEC et notamment le dépôt de collagène autour des vaisseaux. La production de la MEC est un équilibre permanent entre la synthèse et la dégradation de ses composants. Dans notre modèle, nous avons montré que le traitement NAS augmentait la synthèse des composants de la MEC tels que les collagènes 1 et 3. Cette augmentation de synthèse des collagènes induite par le traitement NAS est inhibée par l'inactivation de la lipocaline 2. S'il est vrai que nous n'avons pas quantifié la dégradation des composants, en mesurant l'activité des MMPs ou la concentration plasmatique de l'ICTP, il semble raisonnable d'affirmer que la balance de la MEC penche du côté de sa synthèse, puisque l'on observe une augmentation du dépôt de ses constituants. Ici encore, le mécanisme d'action de la lipocaline 2 reste inconnu. Des résultats encore préliminaires réalisés en collaboration, montrent que l'administration de la protéine recombinante la lipocaline 2 sur des fibroblastes cardiaques humains en culture induit l'expression du gène du collagène 1. Ceci pourrait donc expliquer le rôle de la lipocaline 2 dans la synthèse de matrice extracellulaire.

4.2.4 L'inactivation de la lipocaline 2 prévient l'augmentation des marqueurs de l'inflammation induit par l'aldostérone.

Enfin le dernier résultat de nos travaux est la participation de la lipocaline 2 au processus inflammatoire induit par le NAS. Dans la littérature, la lipocaline 2 est de plus en plus décrite comme un acteur de la cascade inflammatoire. Dans notre étude, l'inactivation de la lipocaline 2 diminue l'expression de marqueurs de l'inflammation, tel que la CRP, diminue la surface des lésions inflammatoires, le recrutement de cellules inflammatoires dans le myocarde et l'expression de protéines pro-inflammatoires tels que l'OPN dans la paroi vasculaire. Le temps nous a manqué pour pouvoir approfondir la participation de la lipocaline 2 dans l'inflammation. A l'heure actuelle, nous ne savons pas quelles cellules de l'immunité sont recrutées et quels sont leur profil d'activation. L'utilisation des différents modèles d'inactivation a mis en évidence un

rôle de la lipocaline 2 dans les cellules de l'immunité. La lipocaline 2 serait impliquée dans la maturation des leucocytes [145, 198], dans leur recrutement sur le site inflammatoire [161, 182] ou encore dans leur activation [183, 199]. Il est intéressant de noter que le rôle du RM dans les cellules de l'immunité est de plus en plus décrit comme régulant l'inflammation. Deux modèles d'inactivation du RM dans les monocytes ont montré son implication dans la polarisation pro-inflammatoire des cellules et sur le remodelage CV [108, 109]. Il est possible d'envisager que l'induction de la lipocaline 2 par le RM, qu'il s'agisse du RM présent dans la lignée des cellules myéloïdes ou bien du RM présent dans un autre type cellulaire, entraîne la polarisation des cellules de l'immunité dans un stade inflammatoire. Une activation chronique du RM entraînerait une augmentation chronique de la lipocaline 2, une inflammation chronique induisant le remodelage et l'augmentation de la pression artérielle.

4.2.5 Mécanismes et cinétique

Une des questions à laquelle ce travail ne peut malheureusement pas répondre concerne la source et le site d'action de la lipocaline 2. Dans la littérature, la lipocaline 2 est décrite comme étant ubiquitaire et son expression est augmentée dans de nombreuses situations pathologiques. Dans notre étude, la lipocaline 2 est augmentée dans tous les organes composant le système CV et le rein et nous avons émis l'hypothèse qu'elle agissait directement sur ceux-ci. La lipocaline 2 est toujours induite après 4 semaines de traitement au NAS et son inactivation prévient à la fois l'augmentation de PAS, le remodelage de la fibrose et l'inflammation. Si son mécanisme d'action dans le NAS est encore inconnu, on peut se demander si la lipocaline 2 intervient directement dans ces trois phénomènes ou si l'un d'eux est responsable des autres. Les interactions entre hypertension et remodelage du ventricule gauche sont décrites depuis longtemps. L'inflammation est aussi avancée comme participant au remodelage du tissu après une lésion. Depuis une dizaine d'années, de plus en plus d'études suggèrent la participation des cellules de l'immunité dans le développement de l'hypertension [200]. La faculté des cellules de l'immunité à pouvoir secréter des cytokines participant à l'hypertension [112] ou bien des molécules pro-fibrosantes tels que le TGF β en font des acteurs privilégiés des atteintes CVs. Il a été montré que leur recrutement, mais plus particulièrement leur activation, est un élément indispensable au développement de ces atteintes CVs [201]. Il serait intéressant dans notre modèle d'essayer de distinguer ces trois

phénomènes. Cela passerait par une étude approfondie de leurs cinétiques respectives afin de se placer à des temps de traitement n’induisant pas ces phénomènes simultanément, le recrutement de cellules inflammatoires prenant quelques heures contre plusieurs jours pour l’installation d’une fibrose et d’une hypertension.

5 CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Ce travail de thèse a mis en évidence deux choses : la participation du récepteur minéralocorticoïde de la cellule musculaire lisse dans la réactivité vasculaire d'une part, et le rôle important que joue la lipocaline 2 dans les effets physiopathologiques du RM au niveau cardiovasculaire d'autre part.

La première partie de ce travail de thèse a mis en évidence l'implication du RM de la cellule musculaire lisse dans la réactivité vasculaire, à la fois dans les réponses contractiles et relaxantes. L'absence du RM au niveau de la CMLs entraîne une diminution de la contraction en réponse à l'augmentation de calcium extracellulaire, ainsi qu'à la dépolarisation induite par le KCl. Le mécanisme reste encore inconnu, mais une des cibles potentielles pourrait être le canal calcique voltage dépendant Cav1.2. L'étude de son implication nécessiterait d'avoir recours à des études électrophysiologiques. L'inactivation du RM entraîne aussi des conséquences au niveau de la relaxation. Les CMLs n'exprimant pas le récepteur minéralocorticoïde présentent un défaut de relaxation. Ce défaut de relaxation est compensé au niveau de l'endothélium, mais le mécanisme d'action est pour le moment encore inconnu.

La deuxième partie de ce travail a montré la participation de la lipocaline 2 dans la voie de signalisation minéralocorticoïde au niveau cardiovasculaire. Notre laboratoire avait déjà mis en évidence la lipocaline 2 comme cible directe du complexe aldostérone/RM dans le système cardiovasculaire. Dans cette étude, nous avons montré que la lipocaline 2 est directement impliquée dans les effets délétères de l'activation du RM. Pour cela, nous avons étudié les conséquences d'un modèle pharmacologique expérimental de suractivation minéralocorticoïde (le traitement NAS) chez des souris ne présentant pas de lipocaline 2 (les souris KO Lcn2). Il en résulte que l'inactivation génique de la lipocaline 2 prévient : le remodelage de la matrice extracellulaire, l'augmentation de la pression artérielle systolique et le développement de l'inflammation induit par le NAS au niveau cardiovasculaire. Durant cette thèse nous n'avons pas eu le temps de répondre à plusieurs questions importantes : 1) Quelles sont les conséquences physiologiques de l'inactivation de Lcn2 sur la fonction cardiaque dans le modèle NAS ? 2) Quels sont les mécanismes mis en jeu par la lipocaline 2 pour induire ces phénomènes de fibrose,

hypertension et inflammation ? 3) Quel est ou quels sont les types cellulaires impliqués dans les effets de la lipocaline 2 ?

L'inactivation de la lipocaline 2 dans le modèle NAS prévient le remodelage de la matrice extracellulaire au niveau cardiovasculaire. Au vu de ces résultats, il serait intéressant d'en étudier les conséquences au niveau de la fonction cardiaque. En effet, celle-ci n'a pas été étudiée dans ce travail de thèse. Concernant les mécanismes d'actions, il n'est pas évident de dissocier les effets obtenus à la fois sur le remodelage de la matrice, la pression artérielle ou encore l'inflammation, ces trois éléments étant souvent associés et interdépendants. Plusieurs études récentes suggèrent un rôle de la lipocaline 2 soit, comme facteur pro-inflammatoire soit comme facteur responsable de dysfonction endothéliale. En collaboration avec un laboratoire espagnol, nous avons obtenu des résultats, encore préliminaires, montrant le caractère pro-fibrosant de la lipocaline 2 directement sur des fibroblastes en culture. Le travail en cours vise à étudier l'implication de l'aldostérone et du RM dans ses effets.

La lipocaline 2 est une protéine secrétée que l'on retrouve exprimée dans de nombreux tissus et dans de nombreuses situations physiopathologiques. Le deuxième axe de recherche faisant suite à ce sujet de thèse est l'identification des types cellulaires impliqués dans la synthèse de lipocaline 2 dans le contexte de l'activation de la voie de signalisation minéralocorticoïde. De nombreuses études font état de l'implication grandissante du système immunitaire dans les pathologies cardiovasculaires et le rôle de la lipocaline 2 dans les cellules de l'immunité est largement observé. Le laboratoire souhaite donc étudier le rôle de la lipocaline 2 et des cellules de l'immunité dans le contexte de l'activation de la voie de signalisation minéralocorticoïde. Ce sujet de recherche fait actuellement partie d'un projet de thèse qui commence. Les premières expériences consisteront à étudier le rôle de Lcn2 dans les cellules de l'immunité circulantes, ceci à l'aide d'un transfert de moelle entre les souris inactivées pour la lipocaline 2 et des souris sauvages.

Enfin, la dernière perspective du laboratoire concernant la lipocaline 2 est la recherche de molécules pouvant moduler sa fonction. Actuellement, le laboratoire, en partenariat avec une entreprise privée, recherche des molécules pouvant antagoniser la lipocaline 2. Cela aurait un intérêt en recherche fondamentale afin de pouvoir disséquer les effets de la protéine, mais cela pourrait aussi éventuellement avoir un intérêt thérapeutique.

BIBLIOGRAPHIE

1. Mathers, C.D. and D. Loncar, *Projections of global mortality and burden of disease from 2002 to 2030*. PLoS Med, 2006. **3**(11): p. e442.
2. Gaziano, T.A., L.H. Opie, and M.C. Weinstein, *Cardiovascular disease prevention with a multidrug regimen in the developing world: a cost-effectiveness analysis*. Lancet, 2006. **368**(9536): p. 679-86.
3. Rock, K.L., et al., *The sterile inflammatory response*. Annu Rev Immunol, 2010. **28**: p. 321-42.
4. De-An, P., et al., *Increased expression of mineralocorticoid receptor and 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 2 in human atria during atrial fibrillation*. Clin Cardiol, 2010. **33**(1): p. 23-9.
5. Tsai, C.T., et al., *Increased expression of mineralocorticoid receptor in human atrial fibrillation and a cellular model of atrial fibrillation*. J Am Coll Cardiol, 2010. **55**(8): p. 758-70.
6. Chai, W., et al., *Steroidogenesis vs. steroid uptake in the heart: do corticosteroids mediate effects via cardiac mineralocorticoid receptors?* J Hypertens, 2010. **28**(5): p. 1044-53.
7. Yoshida, M., et al., *Mineralocorticoid receptor is overexpressed in cardiomyocytes of patients with congestive heart failure*. Congest Heart Fail, 2005. **11**(1): p. 12-6.
8. Yakirevich, E., et al., *Mineralocorticoid receptor and 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type II expression in renal cell neoplasms: a tissue microarray and quantitative RT-PCR study*. Am J Surg Pathol, 2008. **32**(6): p. 874-83.
9. Wolf, R.L., et al., *Treatment of hypertension with spironolactone. Double-blind study*. JAMA, 1966. **198**(11): p. 1143-9.
10. Chapman, N., et al., *Effect of spironolactone on blood pressure in subjects with resistant hypertension*. Hypertension, 2007. **49**(4): p. 839-45.
11. Weinberger, M.H., et al., *Eplerenone, a selective aldosterone blocker, in mild-to-moderate hypertension*. Am J Hypertens, 2002. **15**(8): p. 709-16.
12. Burgess, E.D., et al., *Long-term safety and efficacy of the selective aldosterone blocker eplerenone in patients with essential hypertension*. Clin Ther, 2003. **25**(9): p. 2388-404.
13. Borghi, C., et al., *Evidence of a partial escape of renin-angiotensin-aldosterone blockade in patients with acute myocardial infarction treated with ACE inhibitors*. J Clin Pharmacol, 1993. **33**(1): p. 40-5.
14. McKelvie, R.S., et al., *Comparison of candesartan, enalapril, and their combination in congestive heart failure: randomized evaluation of strategies for left ventricular dysfunction (RESOLVD) pilot study*. The RESOLVD Pilot Study Investigators. Circulation, 1999. **100**(10): p. 1056-64.
15. Swedberg, K., et al., *Effects of enalapril and neuroendocrine activation on prognosis in severe congestive heart failure (follow-up of the CONSENSUS trial)*. CONSENSUS Trial Study Group. Am J Cardiol, 1990. **66**(11): p. 40D-44D; discussion 44D-45D.
16. Vantrimpont, P., et al., *Two-year time course and significance of neurohumoral activation in the Survival and Ventricular Enlargement (SAVE) Study*. Eur Heart J, 1998. **19**(10): p. 1552-63.

17. Pitt, B., et al., *The effect of spironolactone on morbidity and mortality in patients with severe heart failure. Randomized Aldactone Evaluation Study Investigators.* N Engl J Med, 1999. **341**(10): p. 709-17.
18. Zannad, F., et al., *Limitation of excessive extracellular matrix turnover may contribute to survival benefit of spironolactone therapy in patients with congestive heart failure: insights from the randomized aldactone evaluation study (RALES).* Rales Investigators. Circulation, 2000. **102**(22): p. 2700-6.
19. Boccanfuso, A., et al., *Anti-remodelling effect of canrenone in patients with mild chronic heart failure (AREA IN-CHF study): final results.* Eur J Heart Fail, 2009. **11**(1): p. 68-76.
20. Vizzardi, E., et al., *Effect of spironolactone on left ventricular ejection fraction and volumes in patients with class I or II heart failure.* Am J Cardiol, 2010. **106**(9): p. 1292-6.
21. Pitt, B., et al., *Eplerenone, a selective aldosterone blocker, in patients with left ventricular dysfunction after myocardial infarction.* N Engl J Med, 2003. **348**(14): p. 1309-21.
22. Zannad, F., et al., *Eplerenone in patients with systolic heart failure and mild symptoms.* N Engl J Med, 2011. **364**(1): p. 11-21.
23. Pitt, B., et al., *Spironolactone for heart failure with preserved ejection fraction.* N Engl J Med, 2014. **370**(15): p. 1383-92.
24. Elguindy, A.M., *TOPCAT misses its primary endpoint: Should spironolactone be abandoned in HFpEF?* Glob Cardiol Sci Pract, 2013. **2013**(4): p. 357-60.
25. McMurray, J.J. and C. O'Connor, *Lessons from the TOPCAT trial.* N Engl J Med, 2014. **370**(15): p. 1453-4.
26. Montalescot, G., et al., *Early eplerenone treatment in patients with acute ST-elevation myocardial infarction without heart failure: The Randomized Double-Blind Reminder Study.* Eur Heart J, 2014.
27. Dabrowski, R., et al., *Effect of combined spironolactone-beta-blocker +/- enalapril treatment on occurrence of symptomatic atrial fibrillation episodes in patients with a history of paroxysmal atrial fibrillation (SPIR-AF study).* Am J Cardiol, 2010. **106**(11): p. 1609-14.
28. Faresse, N., *Post-translational modifications of the mineralocorticoid receptor: How to dress the receptor according to the circumstances?* J Steroid Biochem Mol Biol, 2014. **143C**: p. 334-342.
29. Farman, N. and M.E. Rafestin-Oblin, *Multiple aspects of mineralocorticoid selectivity.* Am J Physiol Renal Physiol, 2001. **280**(2): p. F181-92.
30. White, P.C., T. Mune, and A.K. Agarwal, *11 beta-Hydroxysteroid dehydrogenase and the syndrome of apparent mineralocorticoid excess.* Endocr Rev, 1997. **18**(1): p. 135-56.
31. Funder, J.W., et al., *Mineralocorticoid action: target tissue specificity is enzyme, not receptor, mediated.* Science, 1988. **242**(4878): p. 583-5.
32. Bocchi, B., et al., *Glucocorticoid metabolism by 11-beta hydroxysteroid dehydrogenase type 2 modulates human mineralocorticoid receptor transactivation activity.* J Steroid Biochem Mol Biol, 2003. **84**(2-3): p. 239-44.
33. Rebuffat, A.G., et al., *The 11-ketosteroid 11-ketodexamethasone is a glucocorticoid receptor agonist.* Mol Cell Endocrinol, 2004. **214**(1-2): p. 27-37.
34. Messaoudi, S., et al., *Aldosterone-specific activation of cardiomyocyte mineralocorticoid receptor in vivo.* Hypertension, 2013. **61**(2): p. 361-7.
35. Leopold, J.A., et al., *Aldosterone impairs vascular reactivity by decreasing glucose-6-phosphate dehydrogenase activity.* Nat Med, 2007. **13**(2): p. 189-97.

36. Colussi, G., C. Catena, and L.A. Sechi, *Spironolactone, eplerenone and the new aldosterone blockers in endocrine and primary hypertension*. J Hypertens, 2013. **31**(1): p. 3-15.
37. Bauersachs, J., *The ARTS of third-generation mineralocorticoid receptor antagonists: achieving cardiovascular benefit with minimized renal side effects?* Eur Heart J, 2013. **34**(31): p. 2426-8.
38. Kolkhof, P. and S.A. Borden, *Molecular pharmacology of the mineralocorticoid receptor: prospects for novel therapeutics*. Mol Cell Endocrinol, 2012. **350**(2): p. 310-7.
39. Maron, B.A. and J.A. Leopold, *Aldosterone receptor antagonists: effective but often forgotten*. Circulation, 2010. **121**(7): p. 934-9.
40. Fiebeler, A., et al., *Aldosterone synthase inhibitor ameliorates angiotensin II-induced organ damage*. Circulation, 2005. **111**(23): p. 3087-94.
41. Lea, W.B., et al., *Aldosterone antagonism or synthase inhibition reduces end-organ damage induced by treatment with angiotensin and high salt*. Kidney Int, 2009. **75**(9): p. 936-44.
42. Gamliel-Lazarovich, A., et al., *FAD286, an aldosterone synthase inhibitor, reduced atherosclerosis and inflammation in apolipoprotein E-deficient mice*. J Hypertens, 2010. **28**(9): p. 1900-7.
43. Mulder, P., et al., *Aldosterone synthase inhibition improves cardiovascular function and structure in rats with heart failure: a comparison with spironolactone*. Eur Heart J, 2008. **29**(17): p. 2171-9.
44. Amar, L., et al., *Aldosterone synthase inhibition with LCI699: a proof-of-concept study in patients with primary aldosteronism*. Hypertension, 2010. **56**(5): p. 831-8.
45. Calhoun, D.A., et al., *Effects of a novel aldosterone synthase inhibitor for treatment of primary hypertension: results of a randomized, double-blind, placebo- and active-controlled phase 2 trial*. Circulation, 2011. **124**(18): p. 1945-55.
46. Garty, H. and L.G. Palmer, *Epithelial sodium channels: function, structure, and regulation*. Physiol Rev, 1997. **77**(2): p. 359-96.
47. Jeggle, P., et al., *Epithelial sodium channel stiffens the vascular endothelium in vitro and in Liddle mice*. Hypertension, 2013. **61**(5): p. 1053-9.
48. Kusche-Vihrog, K., et al., *The epithelial Na⁺ channel: a new player in the vasculature*. Curr Opin Nephrol Hypertens, 2014. **23**(2): p. 143-8.
49. Warnock, D.G., et al., *Blood pressure and amiloride-sensitive sodium channels in vascular and renal cells*. Nat Rev Nephrol, 2014. **10**(3): p. 146-57.
50. Qin, W., et al., *Transgenic model of aldosterone-driven cardiac hypertrophy and heart failure*. Circ Res, 2003. **93**(1): p. 69-76.
51. Alzamora, R., L. Michea, and E.T. Marusic, *Role of 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase in nongenomic aldosterone effects in human arteries*. Hypertension, 2000. **35**(5): p. 1099-104.
52. Lombes, M., et al., *Prerequisite for cardiac aldosterone action. Mineralocorticoid receptor and 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase in the human heart*. Circulation, 1995. **92**(2): p. 175-82.
53. Brilla, C.G., *Aldosterone and myocardial fibrosis in heart failure*. Herz, 2000. **25**(3): p. 299-306.
54. Brilla, C.G. and K.T. Weber, *Mineralocorticoid excess, dietary sodium, and myocardial fibrosis*. J Lab Clin Med, 1992. **120**(6): p. 893-901.

55. Brilla, C.G., et al., *Remodeling of the rat right and left ventricles in experimental hypertension*. Circ Res, 1990. **67**(6): p. 1355-64.
56. Robert, V., et al., *Biological determinants of aldosterone-induced cardiac fibrosis in rats*. Hypertension, 1995. **26**(6 Pt 1): p. 971-8.
57. Brilla, C.G., L.S. Matsubara, and K.T. Weber, *Anti-aldosterone treatment and the prevention of myocardial fibrosis in primary and secondary hyperaldosteronism*. J Mol Cell Cardiol, 1993. **25**(5): p. 563-75.
58. Sun, Y., et al., *Aldosterone-induced inflammation in the rat heart : role of oxidative stress*. Am J Pathol, 2002. **161**(5): p. 1773-81.
59. Rocha, R., et al., *Aldosterone induces a vascular inflammatory phenotype in the rat heart*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2002. **283**(5): p. H1802-10.
60. Young, M., et al., *Mineralocorticoids, hypertension, and cardiac fibrosis*. J Clin Invest, 1994. **93**(6): p. 2578-83.
61. Young, M.J., et al., *Early inflammatory responses in experimental cardiac hypertrophy and fibrosis: effects of 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase inactivation*. Endocrinology, 2003. **144**(3): p. 1121-5.
62. Nagata, K., et al., *Mineralocorticoid receptor antagonism attenuates cardiac hypertrophy and failure in low-aldosterone hypertensive rats*. Hypertension, 2006. **47**(4): p. 656-64.
63. Yasuoka, S., et al., *Blood pressure variability activates cardiac mineralocorticoid receptor and induces cardiac remodeling in hypertensive rats*. Circ J, 2013. **77**(6): p. 1474-81.
64. Fejes-Toth, G. and A. Naray-Fejes-Toth, *Early aldosterone-regulated genes in cardiomyocytes: clues to cardiac remodeling?* Endocrinology, 2007. **148**(4): p. 1502-10.
65. Rude, M.K., et al., *Aldosterone stimulates matrix metalloproteinases and reactive oxygen species in adult rat ventricular cardiomyocytes*. Hypertension, 2005. **46**(3): p. 555-61.
66. Azibani, F., et al., *Aldosterone inhibits the fetal program and increases hypertrophy in the heart of hypertensive mice*. PLoS One, 2012. **7**(5): p. e38197.
67. Loher, A., et al., *Ablation of mineralocorticoid receptors in myocytes but not in fibroblasts preserves cardiac function*. Hypertension, 2011. **57**(4): p. 746-54.
68. Azibani, F., et al., *Aldosterone inhibits antifibrotic factors in mouse hypertensive heart*. Hypertension, 2012. **59**(6): p. 1179-87.
69. Rickard, A.J., et al., *Cardiomyocyte mineralocorticoid receptors are essential for deoxycorticosterone/salt-mediated inflammation and cardiac fibrosis*. Hypertension, 2012. **60**(6): p. 1443-50.
70. Fraccarollo, D., et al., *Deletion of cardiomyocyte mineralocorticoid receptor ameliorates adverse remodeling after myocardial infarction*. Circulation, 2011. **123**(4): p. 400-8.
71. Benitah, J.P. and G. Vassort, *Aldosterone upregulates Ca(2+) current in adult rat cardiomyocytes*. Circ Res, 1999. **85**(12): p. 1139-45.
72. Benitah, J.P., et al., *Effects of aldosterone on transient outward K⁺ current density in rat ventricular myocytes*. J Physiol, 2001. **537**(Pt 1): p. 151-60.
73. Perrier, E., et al., *Mineralocorticoid receptor antagonism prevents the electrical remodeling that precedes cellular hypertrophy after myocardial infarction*. Circulation, 2004. **110**(7): p. 776-83.
74. Ouvrard-Pascaud, A., et al., *Conditional mineralocorticoid receptor expression in the heart leads to life-threatening arrhythmias*. Circulation, 2005. **111**(23): p. 3025-33.

75. Gomez, A.M., et al., *Mineralocorticoid modulation of cardiac ryanodine receptor activity is associated with downregulation of FK506-binding proteins*. Circulation, 2009. **119**(16): p. 2179-87.
76. Perrier, R., et al., *A direct relationship between plasma aldosterone and cardiac L-type Ca²⁺ current in mice*. J Physiol, 2005. **569**(Pt 1): p. 153-62.
77. Shroff, S.C., et al., *Selective aldosterone blockade suppresses atrial tachyarrhythmias in heart failure*. J Cardiovasc Electrophysiol, 2006. **17**(5): p. 534-41.
78. Stambler, B.S., et al., *Aldosterone blockade attenuates development of an electrophysiological substrate associated with ventricular tachyarrhythmias in heart failure*. Heart Rhythm, 2009. **6**(6): p. 776-83.
79. Esposito, C.T., et al., *Spironolactone improves the arrhythmogenic substrate in heart failure by preventing ventricular electrical activation delays associated with myocardial interstitial fibrosis and inflammation*. J Cardiovasc Electrophysiol, 2013. **24**(7): p. 806-12.
80. Stambler, I., *The unexpected outcomes of anti-aging, rejuvenation, and life extension studies: an origin of modern therapies*. Rejuvenation Res, 2014. **17**(3): p. 297-305.
81. Funder, J.W., *The nongenomic actions of aldosterone*. Endocr Rev, 2005. **26**(3): p. 313-21.
82. Young, M. and J.W. Funder, *Eplerenone, but not steroid withdrawal, reverses cardiac fibrosis in deoxycorticosterone/salt-treated rats*. Endocrinology, 2004. **145**(7): p. 3153-7.
83. Farquharson, C.A. and A.D. Struthers, *Spironolactone increases nitric oxide bioactivity, improves endothelial vasodilator dysfunction, and suppresses vascular angiotensin I/angiotensin II conversion in patients with chronic heart failure*. Circulation, 2000. **101**(6): p. 594-7.
84. Fujimura, N., et al., *Mineralocorticoid receptor blocker eplerenone improves endothelial function and inhibits Rho-associated kinase activity in patients with hypertension*. Clin Pharmacol Ther, 2012. **91**(2): p. 289-97.
85. Farquharson, C.A. and A.D. Struthers, *Aldosterone induces acute endothelial dysfunction in vivo in humans: evidence for an aldosterone-induced vasculopathy*. Clin Sci (Lond), 2002. **103**(4): p. 425-31.
86. Bauersachs, J., et al., *Addition of spironolactone to angiotensin-converting enzyme inhibition in heart failure improves endothelial vasomotor dysfunction: role of vascular superoxide anion formation and endothelial nitric oxide synthase expression*. J Am Coll Cardiol, 2002. **39**(2): p. 351-8.
87. Nguyen Dinh Cat, A., et al., *The endothelial mineralocorticoid receptor regulates vasoconstrictor tone and blood pressure*. FASEB J, 2010. **24**(7): p. 2454-63.
88. Lagrange, J., et al., *Endothelial mineralocorticoid receptor activation enhances endothelial protein C receptor and decreases vascular thrombosis in mice*. FASEB J, 2014. **28**(5): p. 2062-72.
89. Zhao, M., et al., *Mineralocorticoid receptor is involved in rat and human ocular chorioretinopathy*. J Clin Invest, 2012. **122**(7): p. 2672-9.
90. Schafer, N., et al., *Endothelial mineralocorticoid receptor activation mediates endothelial dysfunction in diet-induced obesity*. Eur Heart J, 2013. **34**(45): p. 3515-24.
91. Rickard, A.J., et al., *Endothelial cell mineralocorticoid receptors regulate deoxycorticosterone/salt-mediated cardiac remodeling and vascular reactivity but not blood pressure*. Hypertension, 2014. **63**(5): p. 1033-40.

92. Favre, J., et al., *Coronary endothelial dysfunction after cardiomyocyte-specific mineralocorticoid receptor overexpression*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2011. **300**(6): p. H2035-43.
93. Garnier, A., et al., *Cardiac specific increase in aldosterone production induces coronary dysfunction in aldosterone synthase-transgenic mice*. Circulation, 2004. **110**(13): p. 1819-25.
94. Bafford, R., et al., *Mineralocorticoid receptor expression in human venous smooth muscle cells: a potential role for aldosterone signaling in vein graft arterialization*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2011. **301**(1): p. H41-7.
95. Jaffe, I.Z. and M.E. Mendelsohn, *Angiotensin II and aldosterone regulate gene transcription via functional mineralocorticoid receptors in human coronary artery smooth muscle cells*. Circ Res, 2005. **96**(6): p. 643-50.
96. Kiyosue, A., et al., *Aldosterone-induced osteopontin gene transcription in vascular smooth muscle cells involves glucocorticoid response element*. Hypertens Res, 2011. **34**(12): p. 1283-7.
97. Zhu, C.J., et al., *The mineralocorticoid receptor-p38MAPK-NF κ B or ERK-Sp1 signal pathways mediate aldosterone-stimulated inflammatory and profibrotic responses in rat vascular smooth muscle cells*. Acta Pharmacol Sin, 2012. **33**(7): p. 873-8.
98. McCurley, A., et al., *Direct regulation of blood pressure by smooth muscle cell mineralocorticoid receptors*. Nat Med, 2012. **18**(9): p. 1429-33.
99. Galmiche, G., et al., *Smooth muscle cell mineralocorticoid receptors are mandatory for aldosterone-salt to induce vascular stiffness*. Hypertension, 2014. **63**(3): p. 520-6.
100. Calvier, L., et al., *Galectin-3 mediates aldosterone-induced vascular fibrosis*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2013. **33**(1): p. 67-75.
101. Kurobe, H., et al., *Protective effects of selective mineralocorticoid receptor antagonist against aortic aneurysm progression in a novel murine model*. J Surg Res, 2013. **185**(1): p. 455-62.
102. Pruthi, D., et al., *Aldosterone promotes vascular remodeling by direct effects on smooth muscle cell mineralocorticoid receptors*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2014. **34**(2): p. 355-64.
103. Ahokas, R.A., et al., *Aldosteronism and peripheral blood mononuclear cell activation: a neuroendocrine-immune interface*. Circ Res, 2003. **93**(10): p. e124-35.
104. Calo, L.A., et al., *Effect of aldosterone and glycyrrhetic acid on the protein expression of PAI-1 and p22(phox) in human mononuclear leukocytes*. J Clin Endocrinol Metab, 2004. **89**(4): p. 1973-6.
105. Miura, R., et al., *Aldosterone synthesis and cytokine production in human peripheral blood mononuclear cells*. J Pharmacol Sci, 2006. **102**(3): p. 288-95.
106. Bergmann, A., et al., *Aldosterone abrogates nuclear factor kappaB-mediated tumor necrosis factor alpha production in human neutrophils via the mineralocorticoid receptor*. Hypertension, 2010. **55**(2): p. 370-9.
107. Labuzek, K., et al., *Eplerenone promotes alternative activation in human monocyte-derived macrophages*. Pharmacol Rep, 2013. **65**(1): p. 226-34.
108. Usher, M.G., et al., *Myeloid mineralocorticoid receptor controls macrophage polarization and cardiovascular hypertrophy and remodeling in mice*. J Clin Invest, 2010. **120**(9): p. 3350-64.

109. Rickard, A.J., et al., *Deletion of mineralocorticoid receptors from macrophages protects against deoxycorticosterone/salt-induced cardiac fibrosis and increased blood pressure*. Hypertension, 2009. **54**(3): p. 537-43.
110. Bienvenu, L.A., et al., *Macrophage mineralocorticoid receptor signaling plays a key role in aldosterone-independent cardiac fibrosis*. Endocrinology, 2012. **153**(7): p. 3416-25.
111. Herrada, A.A., et al., *Aldosterone promotes autoimmune damage by enhancing Th17-mediated immunity*. J Immunol, 2010. **184**(1): p. 191-202.
112. Amador, C.A., et al., *Spiromolactone decreases DOCA-salt-induced organ damage by blocking the activation of T helper 17 and the downregulation of regulatory T lymphocytes*. Hypertension, 2014. **63**(4): p. 797-803.
113. Sainte-Marie, Y., et al., *Conditional glucocorticoid receptor expression in the heart induces atrio-ventricular block*. FASEB J, 2007. **21**(12): p. 3133-41.
114. Flower, D.R., *The lipocalin protein family: structure and function*. Biochem J, 1996. **318** (Pt 1): p. 1-14.
115. Akerstrom, B., D.R. Flower, and J.P. Salier, *Lipocalins: unity in diversity*. Biochim Biophys Acta, 2000. **1482**(1-2): p. 1-8.
116. Grzyb, J., D. Latowski, and K. Strzalka, *Lipocalins - a family portrait*. J Plant Physiol, 2006. **163**(9): p. 895-915.
117. Chakraborty, S., et al., *The multifaceted roles of neutrophil gelatinase associated lipocalin (NGAL) in inflammation and cancer*. Biochim Biophys Acta, 2012. **1826**(1): p. 129-69.
118. Salier, J.P., *Chromosomal location, exon/intron organization and evolution of lipocalin genes*. Biochim Biophys Acta, 2000. **1482**(1-2): p. 25-34.
119. Kjeldsen, L., et al., *Isolation and primary structure of NGAL, a novel protein associated with human neutrophil gelatinase*. J Biol Chem, 1993. **268**(14): p. 10425-32.
120. Kjeldsen, L., J.B. Cowland, and N. Borregaard, *Human neutrophil gelatinase-associated lipocalin and homologous proteins in rat and mouse*. Biochim Biophys Acta, 2000. **1482**(1-2): p. 272-83.
121. Hraba-Renevey, S., et al., *SV40-induced expression of mouse gene 24p3 involves a post-transcriptional mechanism*. Oncogene, 1989. **4**(5): p. 601-8.
122. Goetz, D.H., et al., *Ligand preference inferred from the structure of neutrophil gelatinase associated lipocalin*. Biochemistry, 2000. **39**(8): p. 1935-41.
123. Chu, S.T., et al., *The hydrophobic pocket of 24p3 protein from mouse uterine luminal fluid: fatty acid and retinol binding activity and predicted structural similarity to lipocalins*. J Pept Res, 1998. **52**(5): p. 390-7.
124. Triebel, S., et al., *A 25 kDa alpha 2-microglobulin-related protein is a component of the 125 kDa form of human gelatinase*. FEBS Lett, 1992. **314**(3): p. 386-8.
125. Yan, L., et al., *The high molecular weight urinary matrix metalloproteinase (MMP) activity is a complex of gelatinase B/MMP-9 and neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL). Modulation of MMP-9 activity by NGAL*. J Biol Chem, 2001. **276**(40): p. 37258-65.
126. Bu, D.X., et al., *Induction of neutrophil gelatinase-associated lipocalin in vascular injury via activation of nuclear factor-kappaB*. Am J Pathol, 2006. **169**(6): p. 2245-53.
127. Strong, R.K., et al., *Expression, purification, crystallization and crystallographic characterization of dimeric and monomeric human neutrophil gelatinase associated lipocalin (NGAL)*. Acta Crystallogr D Biol Crystallogr, 1998. **54**(Pt 1): p. 93-5.

128. Cowland, J.B. and N. Borregaard, *Molecular characterization and pattern of tissue expression of the gene for neutrophil gelatinase-associated lipocalin from humans*. Genomics, 1997. **45**(1): p. 17-23.
129. Latouche, C., et al., *Neutrophil gelatinase-associated lipocalin is a novel mineralocorticoid target in the cardiovascular system*. Hypertension, 2012. **59**(5): p. 966-72.
130. Flo, T.H., et al., *Lipocalin 2 mediates an innate immune response to bacterial infection by sequestrating iron*. Nature, 2004. **432**(7019): p. 917-21.
131. Axelsson, L., M. Bergenfeldt, and K. Ohlsson, *Studies of the release and turnover of a human neutrophil lipocalin*. Scand J Clin Lab Invest, 1995. **55**(7): p. 577-88.
132. Aigner, F., et al., *Lipocalin-2 regulates the inflammatory response during ischemia and reperfusion of the transplanted heart*. Am J Transplant, 2007. **7**(4): p. 779-88.
133. Arena, A., et al., *Both IL-1beta and TNF-alpha regulate NGAL expression in polymorphonuclear granulocytes of chronic hemodialysis patients*. Mediators Inflamm, 2010. **2010**: p. 613937.
134. Cowland, J.B., et al., *Neutrophil gelatinase-associated lipocalin is up-regulated in human epithelial cells by IL-1 beta, but not by TNF-alpha*. J Immunol, 2003. **171**(12): p. 6630-9.
135. Karlsen, J.R., N. Borregaard, and J.B. Cowland, *Induction of neutrophil gelatinase-associated lipocalin expression by co-stimulation with interleukin-17 and tumor necrosis factor-alpha is controlled by IkappaB-zeta but neither by C/EBP-beta nor C/EBP-delta*. J Biol Chem, 2010. **285**(19): p. 14088-100.
136. Hakim, O., et al., *Glucocorticoid receptor activation of the Ciz1-Lcn2 locus by long range interactions*. J Biol Chem, 2009. **284**(10): p. 6048-52.
137. Garay-Rojas, E., et al., *An apparent autocrine mechanism amplifies the dexamethasone- and retinoic acid-induced expression of mouse lipocalin-encoding gene 24p3*. Gene, 1996. **170**(2): p. 173-80.
138. Bratt, T., S. Ohlson, and N. Borregaard, *Interactions between neutrophil gelatinase-associated lipocalin and natural lipophilic ligands*. Biochim Biophys Acta, 1999. **1472**(1-2): p. 262-9.
139. Goetz, D.H., et al., *The neutrophil lipocalin NGAL is a bacteriostatic agent that interferes with siderophore-mediated iron acquisition*. Mol Cell, 2002. **10**(5): p. 1033-43.
140. Holmes, M.A., et al., *Siderocalin (Lcn 2) also binds carboxymycobactins, potentially defending against mycobacterial infections through iron sequestration*. Structure, 2005. **13**(1): p. 29-41.
141. Berger, T., et al., *Lipocalin 2-deficient mice exhibit increased sensitivity to Escherichia coli infection but not to ischemia-reperfusion injury*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2006. **103**(6): p. 1834-9.
142. Bao, G., et al., *Iron traffics in circulation bound to a siderocalin (Ngal)-catechol complex*. Nat Chem Biol, 2010. **6**(8): p. 602-9.
143. Nairz, M., et al., *Absence of functional Hfe protects mice from invasive Salmonella enterica serovar Typhimurium infection via induction of lipocalin-2*. Blood, 2009. **114**(17): p. 3642-51.
144. Song, E., et al., *Deamidated lipocalin-2 induces endothelial dysfunction and hypertension in dietary obese mice*. J Am Heart Assoc, 2014. **3**(2): p. e000837.
145. Liu, Z., et al., *Multiple apoptotic defects in hematopoietic cells from mice lacking lipocalin 24p3*. J Biol Chem, 2011. **286**(23): p. 20606-14.

146. Supavekin, S., et al., *Differential gene expression following early renal ischemia/reperfusion*. Kidney Int, 2003. **63**(5): p. 1714-24.
147. Mishra, J., et al., *Identification of neutrophil gelatinase-associated lipocalin as a novel early urinary biomarker for ischemic renal injury*. J Am Soc Nephrol, 2003. **14**(10): p. 2534-43.
148. Mishra, J., et al., *Neutrophil gelatinase-associated lipocalin: a novel early urinary biomarker for cisplatin nephrotoxicity*. Am J Nephrol, 2004. **24**(3): p. 307-15.
149. Mishra, J., et al., *Amelioration of ischemic acute renal injury by neutrophil gelatinase-associated lipocalin*. J Am Soc Nephrol, 2004. **15**(12): p. 3073-82.
150. Mori, K., et al., *Endocytic delivery of lipocalin-siderophore-iron complex rescues the kidney from ischemia-reperfusion injury*. J Clin Invest, 2005. **115**(3): p. 610-21.
151. Yang, J., et al., *An iron delivery pathway mediated by a lipocalin*. Mol Cell, 2002. **10**(5): p. 1045-56.
152. Yang, J., et al., *Iron, lipocalin, and kidney epithelia*. Am J Physiol Renal Physiol, 2003. **285**(1): p. F9-18.
153. Gwira, J.A., et al., *Expression of neutrophil gelatinase-associated lipocalin regulates epithelial morphogenesis in vitro*. J Biol Chem, 2005. **280**(9): p. 7875-82.
154. Liu, Z., R. Petersen, and L. Devireddy, *Impaired neutrophil function in 24p3 null mice contributes to enhanced susceptibility to bacterial infections*. J Immunol, 2013. **190**(9): p. 4692-706.
155. Viau, A., et al., *Lipocalin 2 is essential for chronic kidney disease progression in mice and humans*. J Clin Invest, 2010. **120**(11): p. 4065-76.
156. Alvelos, M., et al., *Prognostic value of neutrophil gelatinase-associated lipocalin in acute heart failure*. Int J Cardiol, 2013. **165**(1): p. 51-5.
157. Chan, C.P., et al., *Multiple atherosclerosis-related biomarkers associated with short- and long-term mortality after stroke*. Clin Biochem, 2012. **45**(16-17): p. 1308-15.
158. Falke, P., A.M. Elneihoum, and K. Ohlsson, *Leukocyte activation: relation to cardiovascular mortality after cerebrovascular ischemia*. Cerebrovasc Dis, 2000. **10**(2): p. 97-101.
159. Alvelos, M., et al., *Neutrophil gelatinase-associated lipocalin in the diagnosis of type 1 cardio-renal syndrome in the general ward*. Clin J Am Soc Nephrol, 2011. **6**(3): p. 476-81.
160. Amberger, A., et al., *Gene expression profiling of prolonged cold ischemia and reperfusion in murine heart transplants*. Transplantation, 2002. **74**(10): p. 1441-9.
161. Sickinger, S., et al., *Lipocalin-2 as mediator of chemokine expression and granulocyte infiltration during ischemia and reperfusion*. Transpl Int, 2013. **26**(7): p. 761-9.
162. Yang, B., et al., *Improved functional recovery to I/R injury in hearts from lipocalin-2 deficiency mice: restoration of mitochondrial function and phospholipids remodeling*. Am J Transl Res, 2012. **4**(1): p. 60-71.
163. Yndestad, A., et al., *Increased systemic and myocardial expression of neutrophil gelatinase-associated lipocalin in clinical and experimental heart failure*. Eur Heart J, 2009. **30**(10): p. 1229-36.
164. Xu, G., et al., *Lipocalin-2 induces cardiomyocyte apoptosis by increasing intracellular iron accumulation*. J Biol Chem, 2012. **287**(7): p. 4808-17.
165. Kiczak, L., et al., *Expression and complex formation of MMP9, MMP2, NGAL, and TIMP1 in porcine myocardium but not in skeletal muscles in male pigs with tachycardia-induced systolic heart failure*. Biomed Res Int, 2013. **2013**: p. 283856.

166. Folkesson, M., et al., *Presence of NGAL/MMP-9 complexes in human abdominal aortic aneurysms*. Thromb Haemost, 2007. **98**(2): p. 427-33.
167. Akyel, A., et al., *Neutrophil gelatinase-associated lipocalin levels in isolated coronary artery ectasia*. Can J Cardiol, 2011. **27**(6): p. 773-8.
168. de Franciscis, S., et al., *Increased plasma levels of metalloproteinase-9 and neutrophil gelatinase-associated lipocalin in a rare case of multiple artery aneurysm*. Ann Vasc Surg, 2013. **27**(8): p. 1185 e5-7.
169. Anwaar, I., et al., *Endothelial derived vasoactive factors and leukocyte derived inflammatory mediators in subjects with asymptomatic atherosclerosis*. Angiology, 1998. **49**(12): p. 957-66.
170. Forsblad, J., et al., *Clinical manifestations of atherosclerosis in an elderly population are related to plasma neopterin, NGAL and endothelin-1, but not to Chlamydia pneumoniae serology*. Int Angiol, 2002. **21**(2): p. 173-9.
171. Giaginis, C., et al., *Clinical implication of plasma neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL) concentrations in patients with advanced carotid atherosclerosis*. Clin Chem Lab Med, 2010. **48**(7): p. 1035-41.
172. Xiao, Y., et al., *Circulating lipocalin-2 and retinol-binding protein 4 are associated with intima-media thickness and subclinical atherosclerosis in patients with type 2 diabetes*. PLoS One, 2013. **8**(6): p. e66607.
173. Hemdahl, A.L., et al., *Expression of neutrophil gelatinase-associated lipocalin in atherosclerosis and myocardial infarction*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2006. **26**(1): p. 136-42.
174. te Boekhorst, B.C., et al., *Molecular MRI of murine atherosclerotic plaque targeting NGAL: a protein associated with unstable human plaque characteristics*. Cardiovasc Res, 2011. **89**(3): p. 680-8.
175. Chung, T.W., et al., *Lipocalin-2 elicited by advanced glycation end-products promotes the migration of vascular smooth muscle cells*. Biochim Biophys Acta, 2013. **1833**(12): p. 3386-3395.
176. Liu, J.T., et al., *Lipocalin-2 deficiency prevents endothelial dysfunction associated with dietary obesity: role of cytochrome P450 2C inhibition*. Br J Pharmacol, 2012. **165**(2): p. 520-31.
177. Pawar, R.D., et al., *Neutrophil gelatinase-associated lipocalin is instrumental in the pathogenesis of antibody-mediated nephritis in mice*. Arthritis Rheum, 2012. **64**(5): p. 1620-31.
178. Eller, K., et al., *Lipocalin-2 expressed in innate immune cells is an endogenous inhibitor of inflammation in murine nephrotoxic serum nephritis*. PLoS One, 2013. **8**(7): p. e67693.
179. Ding, L., et al., *Lipocalin-2/neutrophil gelatinase-B associated lipocalin is strongly induced in hearts of rats with autoimmune myocarditis and in human myocarditis*. Circ J, 2010. **74**(3): p. 523-30.
180. Shashidharanmurthy, R., et al., *Differential role of lipocalin 2 during immune complex-mediated acute and chronic inflammation in mice*. Arthritis Rheum, 2013. **65**(4): p. 1064-73.
181. Jha, M.K., et al., *The pivotal role played by lipocalin-2 in chronic inflammatory pain*. Exp Neurol, 2014. **254C**: p. 41-53.
182. Schroll, A., et al., *Lipocalin-2 ameliorates granulocyte functionality*. Eur J Immunol, 2012. **42**(12): p. 3346-57.

183. Jang, E., et al., *Secreted protein lipocalin-2 promotes microglial M1 polarization*. FASEB J, 2013. **27**(3): p. 1176-90.
184. Wang, Q., et al., *Impact of salt on cardiac differential gene expression and coronary lesion in normotensive mineralocorticoid-treated mice*. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol, 2012. **302**(9): p. R1025-33.
185. Newell, B.G., et al., *Aldosterone regulates vascular gene transcription via oxidative stress-dependent and -independent pathways*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2011. **31**(8): p. 1871-80.
186. Mulvany, M.J. and W. Halpern, *Contractile properties of small arterial resistance vessels in spontaneously hypertensive and normotensive rats*. Circ Res, 1977. **41**(1): p. 19-26.
187. Chataigneau, T., et al., *Acetylcholine-induced relaxation in blood vessels from endothelial nitric oxide synthase knockout mice*. Br J Pharmacol, 1999. **126**(1): p. 219-26.
188. Alvarez, Y., et al., *Hypertension increases the participation of vasoconstrictor prostanoids from cyclooxygenase-2 in phenylephrine responses*. J Hypertens, 2005. **23**(4): p. 767-77.
189. Johar, S., et al., *Aldosterone mediates angiotensin II-induced interstitial cardiac fibrosis via a Nox2-containing NADPH oxidase*. FASEB J, 2006. **20**(9): p. 1546-8.
190. Lopez-Andres, N., et al., *A role for cardiotrophin-1 in myocardial remodeling induced by aldosterone*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2011. **301**(6): p. H2372-82.
191. Nakamura, T., et al., *Critical role of apoptosis signal-regulating kinase 1 in aldosterone/salt-induced cardiac inflammation and fibrosis*. Hypertension, 2009. **54**(3): p. 544-51.
192. Griol-Charhbili, V., et al., *Epidermal growth factor receptor mediates the vascular dysfunction but not the remodeling induced by aldosterone/salt*. Hypertension, 2011. **57**(2): p. 238-44.
193. Lam, E.Y., et al., *Mineralocorticoid receptor blockade but not steroid withdrawal reverses renal fibrosis in deoxycorticosterone/salt rats*. Endocrinology, 2006. **147**(7): p. 3623-9.
194. Blasi, E.R., et al., *Aldosterone/salt induces renal inflammation and fibrosis in hypertensive rats*. Kidney Int, 2003. **63**(5): p. 1791-800.
195. Young, M.J. and J.W. Funder, *Mineralocorticoids, salt, hypertension: effects on the heart*. Steroids, 1996. **61**(4): p. 233-5.
196. Ong, K.L., et al., *Role of genetic variants in the gene encoding lipocalin-2 in the development of elevated blood pressure*. Clin Exp Hypertens, 2011. **33**(7): p. 484-91.
197. Park, C.G. and K.M. Choi, *Lipocalin-2, A-FABP and inflammatory markers in relation to flow-mediated vasodilatation in patients with essential hypertension*. Clin Exp Hypertens, 2014.
198. Miharada, K., et al., *Lipocalin 2-mediated growth suppression is evident in human erythroid and monocyte/macrophage lineage cells*. J Cell Physiol, 2008. **215**(2): p. 526-37.
199. Jang, E., et al., *Phenotypic polarization of activated astrocytes: the critical role of lipocalin-2 in the classical inflammatory activation of astrocytes*. J Immunol, 2013. **191**(10): p. 5204-19.
200. Schiffrin, E.L., *The immune system: role in hypertension*. Can J Cardiol, 2013. **29**(5): p. 543-8.

201. Chan, C.T., et al., *Reversal of vascular macrophage accumulation and hypertension by a CCR2 antagonist in deoxycorticosterone/salt-treated mice*. Hypertension, 2012. **60**(5): p. 1207-12.

ANNEXES

Classification NYHA		
Stade I (faible)	<ul style="list-style-type: none"> • Pas de limitation de l'activité physique • L'activité physique ordinaire n'entraîne pas de fatigue excessive, des palpitations, ou dyspnée (essoufflement) 	Stade asymptomatique
Stade II (modéré)	<ul style="list-style-type: none"> • Légère limitation de l'activité physique • L'activité physique à l'aise au repos, mais ordinaire entraîne fatigue, palpitations, ou dyspnée. 	
Stade III (modéré)	<ul style="list-style-type: none"> • Limitation marquée de l'activité physique • Confortable au repos, mais une activité moins qu'ordinaire entraîne fatigue, palpitations, ou dyspnée. 	Stades symptomatiques: Insuffisance Cardiaque
Stade IV (sévère)	<ul style="list-style-type: none"> • Impossible d'effectuer toute activité physique sans gêne • Les symptômes de l'insuffisance cardiaque au repos. Si aucune activité physique est entreprise, l'inconfort est augmentée. 	

PUBLICATIONS

1. - Messaoudi S, Gravez B, **Tarjus A**, Pelloux V, Ouvrard-Pascaud A, Delcayre C, Samuel J, Launay JM, Sierra-Ramos C, Alvarez de la Rosa D, Clément K, Farman N, Jaisser F. Aldosterone-specific activation of cardiomyocyte mineralocorticoid receptor in vivo. *Hypertension*. 2013 Feb;61(2):361-7. doi: 10.1161/HYPERTENSIONAHA.112.198986. Epub 2013 Jan 7.
2. - Jeggle P, Callies C, **Tarjus A**, Fassot C, Fels J, Oberleithner H, Jaisser F, Kusche-Vihrog K. Epithelial sodium channel stiffens the vascular endothelium in vitro and in Liddle mice. *Hypertension*. 2013 May;61(5):1053-9. doi: 10.1161/HYPERTENSIONAHA.111.199455. Epub 2013 Mar 4.
3. - Gravez B, **Tarjus A**, Jaisser F. Mineralocorticoid receptor and cardiac arrhythmia. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 2013 Dec;40(12):910-5. doi: 10.1111/1440-1681.12156. Review.
4. - Gravez B, **Tarjus A**, Jimenez-Canino R, El Moghrabi S, Messaoudi S, Alvarez de la Rosa D, Jaisser F. The diuretic torasemide does not prevent aldosterone-mediated mineralocorticoid receptor activation in cardiomyocytes. *PLoS One*. 2013 Sep 9;8(9):e73737. doi: 10.1371/journal.pone.0073737. eCollection 2013.
5. - Kusche-Vihrog K, **Tarjus A**, Fels J, Jaisser F. The epithelial Na⁺ channel: a new player in the vasculature. *Curr Opin Nephrol Hypertens*. 2014 Mar;23(2):143-8. doi: 10.1097/01.mnh.0000441054.88962.2c.
6. - Warnock DG, Kusche-Vihrog K, **Tarjus A**, Sheng S, Oberleithner H, Kleyman TR, Jaisser F. Blood pressure and amiloride-sensitive sodium channels in vascular and renal cells. *Nat Rev Nephrol*. 2014 Mar;10(3):146-57. doi: 10.1038/nrneph.2013.275. Epub 2014 Jan 14. Review.
7. - **Tarjus A**, Belozertseva E, Louis H, El Moghrabi S, Labat C, Lacolley P, Jaisser F*, Galmiche G*. Role of smooth muscle cell mineralocorticoid receptor in vascular tone. *Accepté chez Pflügers Archiv - European Journal of Physiology*
8. - **Tarjus A**, Martinez-Martínez E, Latouche C, El Moghrabi S, Berger T, Wah Mak T, Fay R, Farman N, Rossignol P, Zannad F, López-Andrés N, Jaisser F. Neutrophil gelatinase-associated lipocalin, a novel mineralocorticoid biotarget, is mandatory for hypertension and cardiovascular extracellular matrix remodeling. *Soumission à l'automne*
9. - **Tarjus A**, Jeggle P, Fassot C, Maase M, El Moghrabi S, Loufrani L, Farman N, Hansen P. B. L, Henrion D, Warnock D, Kusche-Vihrog K and Jaisser F. Endothelial α ENaC subunit is crucial to shear stress sensing and endothelial stiffness. *Soumission à l'automne*

BREVETS

1. - **Tarjus A**, El Moghrabi, Farman N, Jaisser F. NGAL cible thérapeutique du système cardiovasculaire. Inserm Transfert 2011
2. - **Tarjus A**, López-Andrés N, Rossignol P, Zannad F, Farman N, Jaisser F. Methods and pharmaceutical compositions for the treatment of cardiac fibrosis. Inserm Transfert 2012

