

SOMMAIRE

SOMMAIRE	1
LISTE DES FIGURES.....	3
LISTE DES ABREVIATIONS	4
I. INTRODUCTION	7
1 – Système Rénine-Angiotensine-Aldostérone	9
1.1 Cascade catalytique	9
1.2 Angiotensine II	9
1.3 Aldostérone	10
1.3.1 Synthèse de l'aldostérone.....	10
1.3.2 Mécanismes d'action de l'aldostérone	11
2 – Récepteur Minéralocorticoïde	12
2.1 Structure du récepteur minéralocorticoïde.....	12
2.2 Ligands endogènes du MR.....	13
2.2.1 Hormones minéralocorticoïdes et glucocorticoïdes	13
2.2.2 Sélectivité enzymatique	13
2.2.3 Autres mécanismes de sélectivité minéralocorticoïde	14
2.2.4 Autres mécanismes d'activation du MR.....	14
2.3 Mode d'action du MR	15
2.4 Rôle physiologique classique du MR.....	16
2.5 Implications physiopathologiques du MR.....	18
2.5.1 Antagonistes pharmacologiques du MR	19
2.5.2 Implication du MR dans les pathologies cardiovasculaires.....	21
2.5.3 Implication du MR dans les pathologies rénales.....	25
2.5.4 Mécanismes physiopathologiques de l'activation du MR.....	27
2.5.4.1 Implication du MR dans le stress oxydant.....	27
2.5.4.2 Implication du MR dans la fibrose.....	29
2.5.4.3 Implication du MR dans l'inflammation	32
3 – NGAL, une nouvelle cible du MR dans le système cardiovasculaire	36
3.1 La famille des lipocalines	37
3.2 Structure de NGAL	38
3.3 Expression de NGAL.....	39
3.4 Rôles de NGAL	40
3.4.1 Rôle bactériostatique et de modulation du fer.....	40
3.4.2 Rôle chimiotactique	41
3.4.3 Rôle de facteur de croissance, de différenciation et de prolifération	42
3.5 Récepteurs de NGAL	42
3.5.1 Le récepteur 24p3R.....	42
3.5.2 La mégaline	43
3.6 Implication de NGAL dans les mécanismes inflammatoires	44
3.7 Implication de NGAL dans les pathologies rénales.....	46
3.8 Implication de NGAL dans les pathologies cardiovasculaires	49
3.9 Implication de NGAL dans les effets délétères de l'activation du MR	53
4 – Objectifs de la thèse	56
II. MATERIEL & METHODES.....	59
1 – Modèles animaux	61
1.1 Invalidation génique constitutive et totale de NGAL.....	61
1.2 Déplétion de NGAL dans les cellules immunitaires	61
1.3 Traitement à l'angiotensine II.....	62

1.4 Traitement à l'isoprénaline.....	64
1.4.1 Modèle de traitement chronique à l'isoprénaline	64
1.4.2 Modèle de traitement aigu à l'isoprénaline.....	64
2 – Mesure de la pression artérielle.....	65
3 – Biologie moléculaire	65
3.1 Extraction et dosage de l'ARN des organes	65
3.2 Rétrotranscription et PCR quantitative	66
4 – Analyses histologiques.....	67
4.1 Marquage et quantification de la fibrose	67
4.2 Immunohistochimie.....	68
5 – Analyses statistiques	69
IV. RESULTATS	71
1 – Spécificité du rôle de NGAL dans la fibrose induite par l'activation du MR	73
1.1 Modèle de traitement à l'Angiotensine II.....	73
1.1.1 Modèle de traitement aigu à l'Angiotensine II	74
1.1.2 Modèle de traitement chronique à l'Angiotensine II	76
1.1.2.1 L'invalidation génique de NGAL ne prévient pas l'hypertension artérielle induite par un traitement chronique à l'AngII	76
1.1.2.2 L'invalidation génique de NGAL ne prévient pas la fibrose cardiaque induite par un traitement chronique à l'AngII	76
1.1.2.3 L'AngII n'induit pas d'inflammation ou d'expression de NGAL après 3 semaines de traitement	78
1.2 Modèle de traitement à l'isoprénaline	79
1.2.1 Modèle de traitement chronique à l'isoprénaline	79
1.2.2 Modèle de traitement aigu à l'isoprénaline.....	79
1.3 Modèle d'infarctus du myocarde par ligature de l'artère coronaire gauche	82
2 – Mécanismes de l'implication de NGAL dans les effets de l'activation du MR	129
IV. DISCUSSION	167
1 – Spécificité de l'implication de NGAL dans les modèles de pathologie CV	170
1.1 Impact de l'invalidation génique de NGAL dans les effets CV de l'AngII	170
1.1.1 Effets de l'AngII indépendants du MR.....	171
1.1.2 Complexité des interactions entre les signalisations de l'AngII et du MR	172
1.1.3 Impact potentiel du contexte inflammatoire sur l'implication de NGAL	173
2 – Impact de l'invalidation génique de NGAL dans les effets CV de l'Iso	174
3 – Impact de l'invalidation génique de NGAL dans les effets CV de l'infarctus du myocarde.....	176
2 – Mécanismes impliqués dans les effets pathologiques de NGAL	179
2.1 Implication de NGAL dans les mécanismes inflammatoires	180
2.1.1 Implication de NGAL dans l'amplification de l'inflammation.....	180
2.1.2 Source cellulaire de NGAL au site de lésion inflammatoire	182
2.1.3 Populations immunitaires impliquées dans la production de NGAL.....	184
2.1.3.1 Macrophages.....	184
2.1.3.2 Cellules dendritiques.....	185
2.1.3.3 Granulocytes neutrophiles	186
2.2 Implication de NGAL dans les mécanismes hypertensifs.....	186
2.3 Implication de NGAL dans les mécanismes profibrotiques	188
2.4 Voies de signalisations impliquées dans les effets pathologiques de NGAL.....	190
2.4.1 Voie NFκB.....	190
2.4.2 Voie Erk1/2.....	191
3 – Conclusion et perspectives.....	194
REFERENCES	196

LISTE DES FIGURES

Figure 1 – Système Rénine-Angiotensine-Aldostérone.....	10
Figure 2 – Structure du récepteur minéralocorticoïde humain.....	13
Figure 3 – Rôle classique du MR dans le transport ionique au niveau du néphron distal	18
Figure 4 – Implication du MR dans l'induction du stress oxydant.....	29
Figure 5 – Activation des myofibroblastes et induction de la fibrose	30
Figure 6 – Structure générale des lipocalines.....	37
Figure 7 – Structure tridimensionnelle du complexe NGAL-sidérophore-fer	39
Figure 8 – Modulation du fer intracellulaire par NGAL	41
Figure 9 – Rôle pro-inflammatoire de NGAL	45
Figure 10 – Effets de l'invalidation génique de NGAL sur les effets délétères induits par le challenge NAS.....	55
Figure 11 – Présentation schématique des axes de recherche de la thèse.....	57
Figure 12 – Protocole de transplantation de moelle osseuse / challenge NAS.....	63
Figure 13 – Protocoles de traitement à l'angiotensine II.....	63
Figure 14 – Protocoles de traitement à l'isoprénaline	64
Figure 15 – Cinétique de l'expression de NGAL et de l'infiltration immunitaire dans le cœur de souris soumises à un traitement à l'AngII (2,5mg/kg/jour).....	74
Figure 16 – Effets d'un traitement aigu à l'AngII sur la pression artérielle et le cœur ..	75
Figure 17 – Effets d'un traitement chronique à l'AngII sur la pression artérielle et le remodelage cardiovasculaire.....	77
Figure 18 – Effets de l'AngII sur l'expression de NGAL et l'inflammation cardiaque ..	78
Figure 19 – Effets cardiaque du traitement chronique à l'isoprénaline	79
Figure 20 – Effets du traitement aigu à l'isoprénaline	81
Figure 21 – Implication de NGAL dans certains modèles profibrotiques.....	178
Figure 22 – Mécanismes impliqués dans les effets pathologiques de NGAL.....	193

LISTE DES TABLES

Tableau 1 – Séquences des amorces utilisées pour la qPCR.....	67
---	----

LISTE DES ABREVIATIONS

SRAA	Système Rénine-Angiotensine-Aldostérone
AngII	Angiotensine II
CV	Cardiovasculaire
ECA	Enzyme de Conversion de l'Angiotensine
AT1R	Récepteur de l'Angiotensine II de type 1 (<i>Angiotensin type 1 Receptor</i>)
Aldo	Aldostérone
ACTH	Adrénocorticotrophine
MR	Récepteur Minéralocorticoïde (<i>Mineralocorticoid Receptor</i>)
NGAL	Neutrophil Gelatinase-Associated Lipocalin
RNT	Région N-Terminale
DLA	Domaine de Liaison à l'ADN
HRE	Elément de réponse aux hormones (<i>Hormone Response Element</i>)
DLL	Domaine de Liaison au Ligand
11 β -HSD2	11 β -HydroxyStéroïde Déshydrogénase de type 2
Rac1	Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1
Hsp90	Heat Shock Protein 90
ENaC	Canal sodium épithélial (<i>Epithelial Na Channel</i>)
SGK1	<i>Serum and Glucocorticoid-regulated Kinase 1</i>
IC	Insuffisance Cardiaque
IM	Infarctus du Myocarde
DOCA	<i>Deoxycorticosterone Acetate</i>
NAS	Néphrectomie-Aldostérone-Sel
CTGF	<i>Connective Tissue Growth Factor</i>
FA	Fibrillation Atriale
CML	Cellules Musculaires Lisses
KO	<i>Knock-Out</i>
WT	Wild-Type
IRC	Insuffisance Rénale Chronique
I/R	Ischémie/Reperfusion
ROS	Dérivés réactifs de l'oxygène (<i>Reactive Oxygen Species</i>)
NOX	NADPH Oxydase

NFκB	<i>Nuclear Factor Kappa B</i>
MEC	Matrice ExtraCellulaire
TEM	Transition Epithélio-Mésenchymateuse
ET1	Endothéline 1
TGFβ	<i>Transforming Growth Factor β</i>
PAI-1	<i>Plasminogen Activator Inhibitor-1</i>
IL	Interleukine
TNF-α	<i>Tumor Necrosis Factor Alpha</i>
IFN-γ	Interféron Gamma
MCP-1	<i>Monocyte Chemoattractant Protein 1</i>
OPN	Ostéopontine
LT	Lymphocyte T
DCs	Cellules dendritiques (<i>Dendritic Cells</i>)
CT-1	Cardiotrophine 1
Gal-3	Galectine 3
MMP-9	Métalloprotéinase Matricielle 9 (<i>Matrix Metalloproteinase 9</i>)
CRP	Protéine C-Réactive (<i>C-Reactive Protein</i>)
LPS	Lipopolysaccharide
IRA	Insuffisance Rénale Aiguë
EGFR	<i>Epidermal Growth Factor Receptor</i>
AAA	Anévrisme de l'Aorte Abdominale
ANF	<i>Atrial Natriuretic Factor</i>
Col	Collagène
CD	Cluster de Différenciation
Iso	Isopréraline
MO	Moelle Osseuse
LB	Lymphocyte B
α-SMA	Alpha Smooth Muscle Actin
ICAM	InterCellular Adhesion Molecule
VCAM	Vascular Cell Adhesion Molecule 1
Mφ	Macrophage
PBMCs	<i>Peripheral Blood Mononuclear Cells</i>
HGF	<i>Hepatocyte Growth Factor</i>

I. INTRODUCTION

1 – Système Rénine-Angiotensine-Aldostérone

Le système Rénine-Angiotensine-Aldostérone (SRAA) est un système hormonal en cascade qui joue un rôle central dans la régulation du volume extracellulaire, de la perfusion tissulaire, de l'homéostasie hydrosodée et de la pression artérielle. Il fonctionne comme un axe endocrinien dans lequel l'hormone active, l'angiotensine II (AngII) est formée dans l'espace extracellulaire par une séquence de clivages protéolytiques de ses précurseurs (Figure 1). Ce système a été mis en évidence il y a plus d'un siècle mais les dernières décennies ont permis de mettre en évidence son rôle important dans la mise en place des pathologies cardiovasculaires (CV) et rénales [1].

1.1 Cascade catalytique

Le premier élément de la cascade catalytique du SRAA est la rénine. Cette enzyme est synthétisée et sécrétée principalement par les cellules de l'appareil juxtaglomérulaire rénal en réponse à une diminution de la perfusion rénale ou de la concentration de sodium circulant. La rénine catalyse l'hydrolyse de l'angiotensinogène, d'origine hépatique, en un décapeptide : l'angiotensine I (Figure 1). Cette dernière est ensuite clivée à son tour en un octapeptide, l'AngII, par l'enzyme de conversion de l'angiotensine (ECA) produite principalement par l'épithélium pulmonaire (Figure 1). L'AngII ainsi libérée va pouvoir jouer de multiples rôles [1].

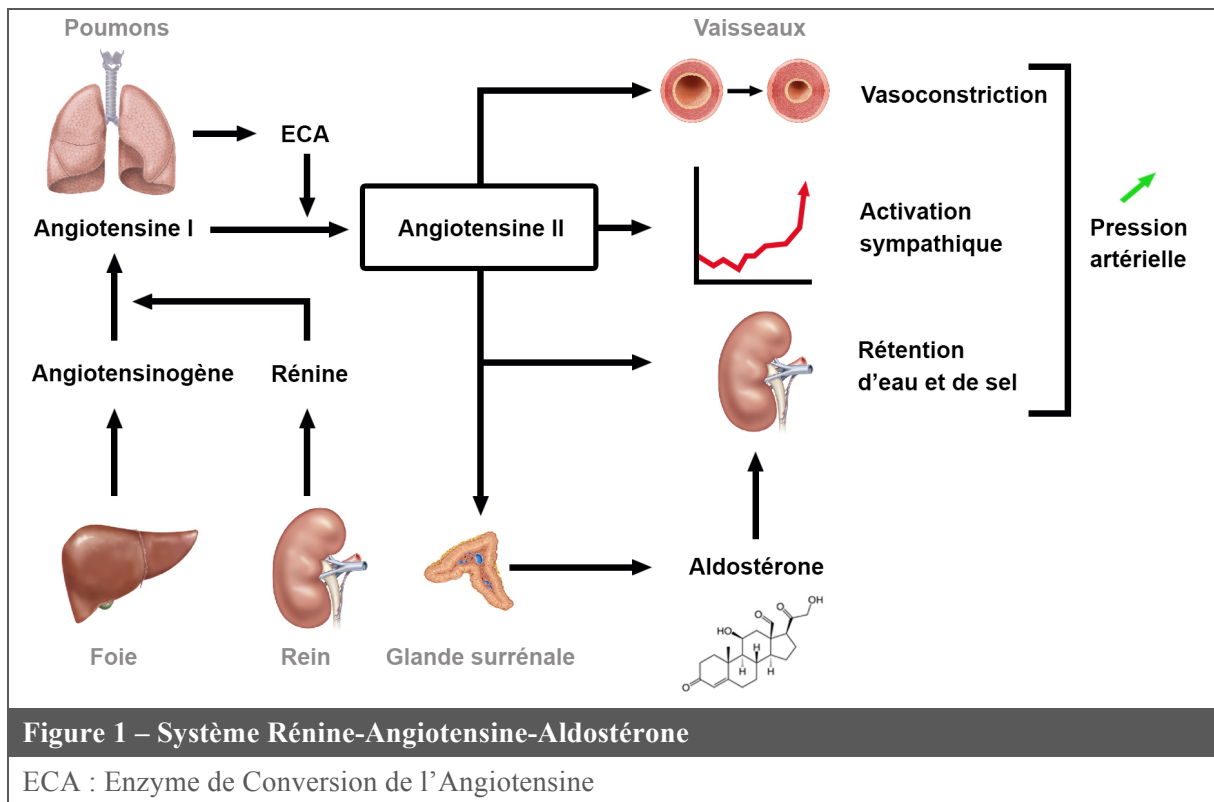
1.2 Angiotensine II

L'AngII est un hypertenseur puissant. Cet effet passe par une forte activité vasoconstrictrice ainsi que par une activation du système sympathique entraînant la libération de noradrénaline (Figure 1). De plus, l'AngII est capable d'induire la réabsorption rénale de sodium en agissant directement sur son transport au niveau du tubule rénal, et de manière

indirecte, via l'induction de la synthèse d'aldostérone par le cortex surrénalien (cf. chapitre 1.3) [1].

Au-delà de son rôle dans la régulation de la pression artérielle, il a été montré que l'AngII était impliquée dans plusieurs mécanismes physiopathologiques tels que l'inflammation, la fibrose et le stress oxydant et participait à la lésion des organes [2].

Etant donnés les effets majeurs de l'AngII sur la pression artérielle et son implication dans les lésions tissulaires, des antagonistes de son récepteur principale, le récepteur à l'AngII de type 1 (AT₁R) ainsi que des antagonistes de l'ECA ont été développés et sont aujourd'hui utilisés en clinique chez les patients souffrant de pathologies CV et rénales [1].



1.3 Aldostérone

1.3.1 Synthèse de l'aldostérone

L'aldostérone (Aldo) est une hormone stéroïdienne de la classe des minéralocorticoïdes. Elle est synthétisée à partir du cholestérol et sécrétée principalement au niveau de la zone

corticale des glandes surrénales en réponse à une stimulation par l'AngII, par l'adrénocorticotrophine (ACTH) ou par une augmentation de la concentration plasmatique de potassium. Ces différents stimuli induisent une activation de l'expression du gène *CYP11B2*, qui code pour l'aldostérone synthase, conduisant donc à une augmentation de la production d'Aldo [3].

Une production extra-surrénalienne d'Aldo a également été décrite, notamment dans le système nerveux central [4] et dans le système CV [5].

1.3.2 Mécanismes d'action de l'aldostérone

Deux mécanismes d'action de l'Aldo ont été décrits : des effets génomiques et des effets non génomiques. Le mode d'action de l'Aldo le plus classiquement décrit est un effet génomique qui passe par l'activation de son récepteur, le récepteur minéralocorticoïde, ou MR (pour *Mineralocorticoid Receptor*), au niveau du néphron distal du rein (cf. chapitre 2.4). Les effets génomiques sont visibles avec un certain délai après l'activation du MR, ce qui correspond au temps nécessaire à la transcription, à la traduction et aux éventuelles modifications post-traductionnelles des protéines synthétisées. Certains effets de l'Aldo sur le pH et le calcium intracellulaire ont cependant été décrits sur des temps trop courts (quelques minutes) pour être attribués aux mécanismes classiques d'activation génomique du MR [6, 7]. De plus, ces effets non génomiques de l'Aldo sont insensibles à l'actinomycine D (inhibiteur de la transcription) et au cycloheximide (inhibiteur de la traduction) ce qui souligne bien le fait qu'ils ne passent pas par la production de nouvelles protéines [8].

Le travail de thèse présenté ici s'intéresse à l'étude d'une protéine cible du MR, la Neutrophil Gelatinase-Associated Lipocalin (NGAL), qui est donc produite via une activation génomique classique du MR.

2 – Récepteur Minéralocorticoïde

2.1 Structure du récepteur minéralocorticoïde

Le récepteur minéralocorticoïde, est un facteur de transcription de la famille des récepteurs nucléaires stéroïdiens. Il est codé par le gène *NR3C2*, situé sur le chromosome 4 chez l'homme et 8 chez la souris. Il est composé de 10 exons, séparés les uns des autres par 8 introns, pour une longueur totale de 450 kb (Figure 2). Les deux premiers exons (1 α et 1 β) sont non codants et les huit suivants codent pour une protéine d'environ 100 kDa, composée de 984 acides aminés chez l'Homme et de 978 chez la souris. Cette protéine possède une structure tridimensionnelle typique des récepteurs nucléaires, avec 3 régions fonctionnelles majeures (Figure 2) [9] :

- Une région N-terminale (RNT) présentant des domaines de régulation de l'activité transcriptionnelle du MR.
- Un domaine central de liaison à l'ADN (DLA) en doigts de zinc, capable de se lier aux éléments de réponse aux hormones (HRE pour *Hormone Response Element*) présents dans les promoteurs des gènes cibles du MR.
- Un domaine de liaison au ligand (DLL) en position C-terminal.

Ces différents domaines vont permettre au MR de se lier à son ligand, aux promoteurs de ses gènes cibles et à ses co-régulateurs d'activité, afin qu'il puisse jouer son rôle de facteur de transcription [9].

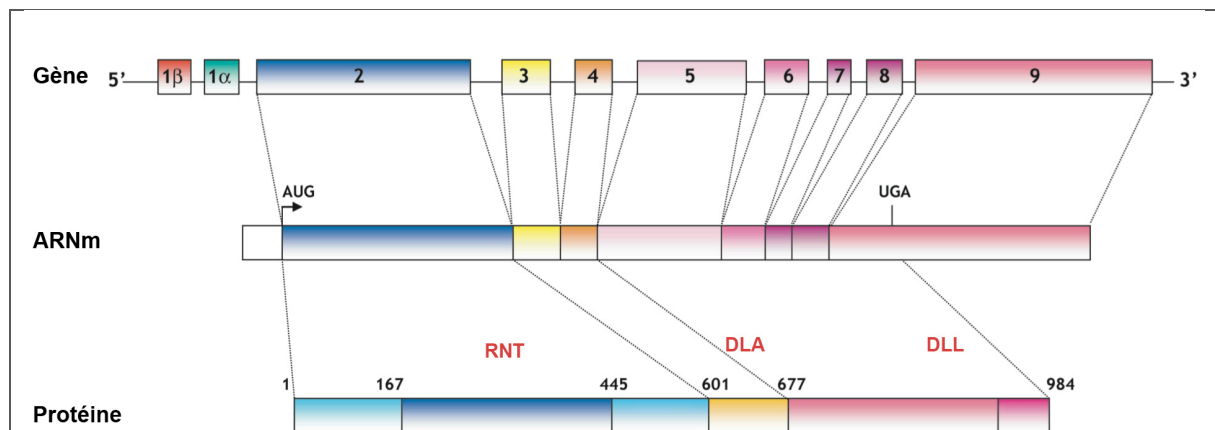


Figure 2 – Structure du récepteur minéralocorticoïde humain

RNT : Région N-Terminale, DLA : Domaine de Liaison à l'ADN, DLL : Domaine de Liaison au Ligand. Adapté de Viengchareun *et al.* [9]

2.2 Ligands endogènes du MR

2.2.1 Hormones minéralocorticoïdes et glucocorticoïdes

Le ligand historiquement décrit du MR est l'hormone minéralocorticoïde Aldo. Cependant, il a été montré que les hormones glucocorticoïdes (cortisol chez l'Homme et corticostérone chez le rongeur) étaient également capables de se lier au MR et que leur affinité avec le MR était similaire à celle de l'Aldo. A l'instar de l'Aldo, ces hormones sont synthétisées par le cortex surrénalien à partir du cholestérol et sont régulées avec le cycle circadien (pic maximal de sécrétion avant le réveil et minimal le soir avant le coucher). Cependant, leur concentration plasmatique est de 100 à 1000 fois supérieure à celle de l'Aldo. De ce fait, le MR devrait être saturé par les glucocorticoïdes en permanence, rendant sa régulation par l'Aldo impossible. Des mécanismes de sélectivité minéralocorticoïde existent donc et permettent à l'Aldo de jouer son rôle [10].

2.2.2 Sélectivité enzymatique

L'activation du MR par l'Aldo est rendue possible grâce à l'action de l'enzyme 11 β-hydroxystéroïde déshydrogénase de type 2 (11β-HSD2). Cette enzyme est exprimée par les

cellules cibles de l'Aldo et est capable de transformer le cortisol (ou corticostérone chez les rongeurs) en cortisone (ou 11-dehydrocorticosterone), un métabolite de faible affinité pour le MR. Cette enzyme va donc entraîner une absence de compétition locale entre les ligands qui va permettre à l'Aldo d'activer le MR, malgré la concentration beaucoup plus importante de glucocorticoïdes circulant [10].

L'expression de la 11 β -HSD2 n'est cependant pas ubiquitaire, et certains tissus exprimant le MR n'expriment pas cette enzyme. Cela soulève donc la question du ligand du MR dans ces tissus. Pour essayer d'y répondre, des travaux de notre laboratoire ont, par exemple, montré une régulation différentielle de certains gènes en fonction du ligand (Aldo ou corticostérone) activant le MR dans le cœur de souris, malgré l'expression faible de 11 β -HSD2 dans ce tissu [11]. Ceci suggère donc que d'autres mécanismes de sélectivité minéralocorticoïde existent.

2.2.3 Autres mécanismes de sélectivité minéralocorticoïde

Même si l'activité de la 11 β -HSD2 est reconnue comme le mécanisme de sélectivité minéralocorticoïde prépondérant, certaines études ont permis de mettre en évidence d'autres mécanismes de sélectivité. Il a, par exemple, été décrit que la conformation et la translocation nucléaire du MR varient selon le ligand [12]. De plus, la stabilité du complexe Aldo/MR serait plus importante que celle du complexe cortisol/MR [13] et son activité de transactivation serait supérieure [10]. Enfin, il a été suggéré que les processus de dimérisation du MR pourraient également représenter une source de sélectivité minéralocorticoïde [14].

2.2.4 Autres mécanismes d'activation du MR

Plus récemment, il a également été montré que la protéine Rac1 (Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1) était capable de potentialiser l'activité du MR, contribuant ainsi à

une activation du MR indépendante du ligand dans des modèles animaux de lésions cardiaques et rénales [15]. Des modifications post-traductionnelles du MR (phosphorylation, symoylation), comme celles observées pour les récepteurs aux glucocorticoïdes ou aux œstrogènes, sont également envisagées comme de possibles voies de régulation du MR [16]. De plus, un niveau de complexité supplémentaire est apporté par des « *cross-talks* » entre le MR et d'autres récepteurs cellulaires, tel que le récepteur de l'AngII AT₁R [17–20].

Ces données indiquent que l'activation du MR ne nécessite pas forcément d'augmentation du niveau d'Aldo circulante, ce qui pourrait donc expliquer les effets bénéfiques des antagonistes du MR (cf. chapitre 2.5.1) observés dans des situations pathologiques dans lesquelles les niveaux d'Aldo ne sont pas augmentés.

2.3 Mode d'action du MR

Le MR, à l'instar des autres récepteurs stéroïdiens, est présent dans le cytoplasme des cellules où il est lié à des protéines chaperonnes, telle que l'Hsp90 (Heat Shock Protein 90), qui le maintiennent inactif et dans une conformation réceptive pour ses ligands. Les ligands du MR, et l'Aldo en particulier, diffusent librement à travers la membrane plasmique des cellules et vont se lier au domaine de liaison du ligand du MR et entraîner une modification de sa conformation. Celle-ci va induire la libération du MR de ses protéines chaperonnes et sa translocation dans le noyau (Figure 3). Une fois nucléaire, le MR va alors pouvoir se fixer sur des séquences spécifiques de l'ADN (régions HRE) et ainsi recruter différents corégulateurs transcriptionnels afin de mettre en place la machinerie de transcription (MT) des gènes cibles (Figure 3). Ces corégulateurs peuvent être des coactivateurs, aidant à la décompaction de la chromatine et à la transcription des gènes, ou des corépresseurs qui vont à l'inverse induire une compaction de la chromatine et une inhibition de la transcription [9].

Des études récentes ont par ailleurs montré que la localisation cytoplasmique ou nucléaire du MR pouvait être modulée par le niveau d'expression ou d'activité de sa protéine chaperonne Hsp90. En effet, un niveau d'expression bas de la Hsp90 [21] ou une diminution de son activité [22] induisent une localisation nucléaire du MR, même en absence de ligand, sans toutefois modifier son activité.

2.4 Rôle physiologique classique du MR

Le MR est connu depuis longtemps pour son rôle important dans la régulation de l'homéostasie hydrosodée au niveau de l'épithélium rénal. Comme décrit précédemment, une activation du SRAA aboutit *in fine* à une augmentation de la concentration d'Aldo circulante. Au niveau du tube contourné distal du néphron, où est exprimée l'enzyme de sélectivité minéralocorticoïde 11- β HSD2, cette augmentation d'Aldo va entraîner une activation du MR et son internalisation dans le noyau. Le MR va alors se lier aux domaines HRE de l'ADN et induire l'expression de certains gènes importants pour la régulation de l'homéostasie hydrosodée (Figure 3) [9].

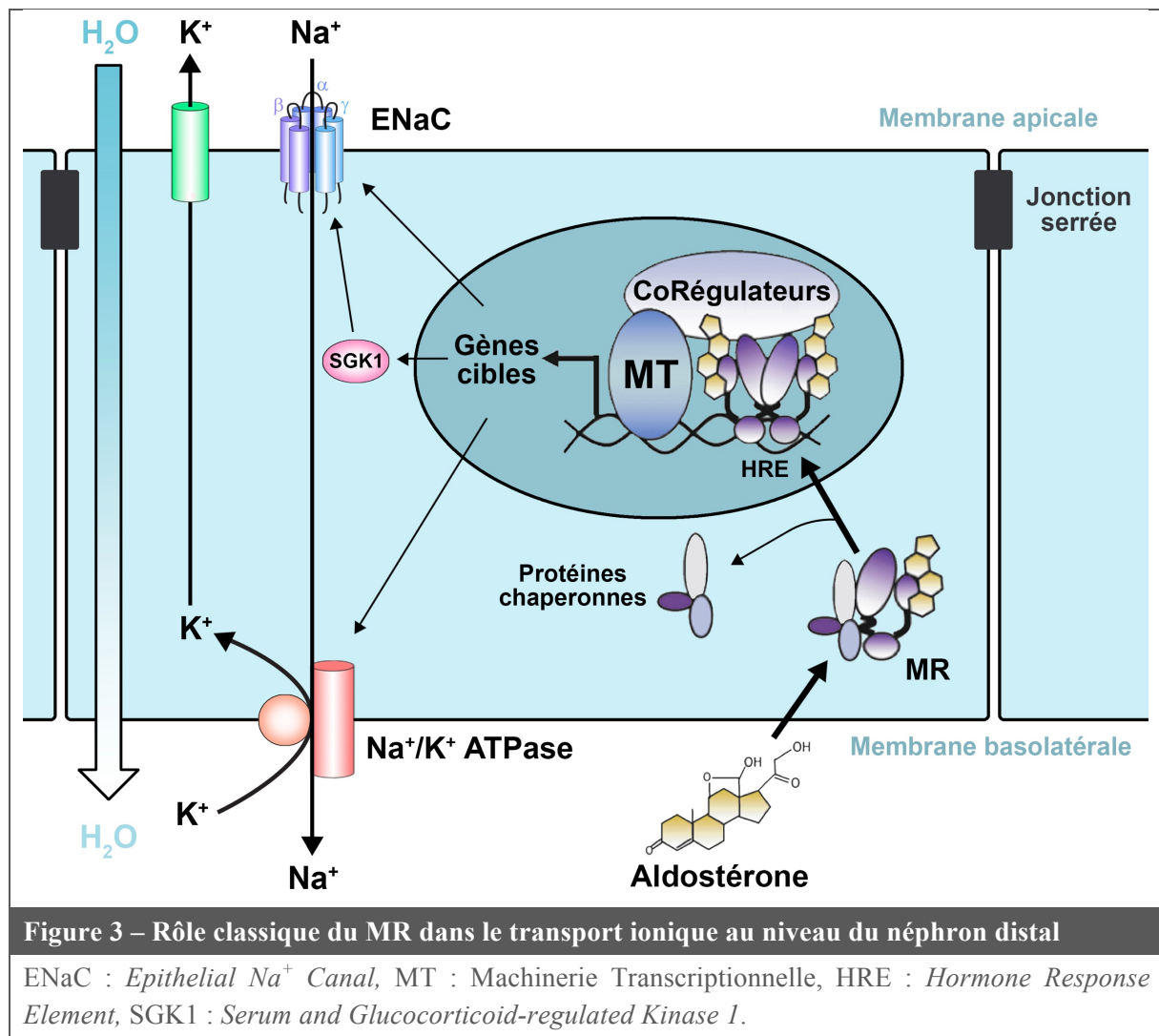
Une des cibles génomiques du MR dans le néphron distal est le canal sodium épithélial ENaC (*Epithelial Na Channel*). Il est constitué de trois sous-unités (α , β et γ) qui s'assemblent pour donner un canal fonctionnel. Il est alors adressé à la membrane apicale des cellules épithéliales et permet la réabsorption du sodium urinaire vers l'intérieur des cellules (Figure 3) [9]. La régulation d'ENaC par le MR et son rôle dans la réabsorption du sodium ont également été mis en évidence dans d'autres épithélia, tels que l'épithélium digestif [23], l'épithélium de la peau [23] et plus récemment dans l'endothélium [24, 25].

Une autre cible du MR dans le néphron distal est la pompe ionique sodium/potassium Na^+/K^+ ATPase. A l'inverse du canal ENaC, cette pompe est adressée à la membrane basolatérale des cellules épithéliales du néphron distal et permet le passage du sodium

intracellulaire vers le compartiment sanguin (Figure 3). Cette sortie de sodium est active et utilise la dégradation de l'ATP comme source d'énergie. De plus, comme son nom l'indique, cette pompe est un échangeur sodium/potassium qui permet la sortie de sodium en échange d'une entrée de potassium à l'intérieur des cellules, avec un rapport de 3 Na⁺ contre 2 K⁺. Le potassium ainsi échangé sera ensuite excrété dans les urines via des canaux apicaux (Figure 3) [26].

La protéine SGK1 (*Serum and Glucocorticoid-regulated Kinase 1*) est également une cible génomique du MR. Cette protéine est induite très rapidement par l'activation du MR par l'Aldo et possède une activité sérine kinase qui permet de prévenir l'internalisation du canal ENaC et ainsi de maintenir son activité membranaire (Figure 3) [9].

Ces différentes cibles du MR dans le néphron distal permettent la réabsorption du sodium depuis l'urine vers le compartiment sanguin. La régulation génomique de ces protéines par le MR permet donc le contrôle fin de l'homéostasie sodée de l'organisme. De plus, en raison de la pression osmotique créée par ces transports ioniques, le flux de sodium est accompagné par un flux d'eau (Figure 3). Ces mouvements d'eau vont entraîner des modifications de la volémie et donc de la pression artérielle systémique. Ainsi, l'activation du MR par l'Aldo au niveau du néphron distal induit une réabsorption de sodium et d'eau qui entraîne une augmentation de la volémie et de la pression artérielle [27].



2.5 Implications physiopathologiques du MR

Le rôle du complexe Aldo/MR dans le contrôle de la réabsorption ionique rénale, de la volémie et de la pression artérielle est connu depuis longtemps. Cependant, il est maintenant clairement établi que l'expression du MR ne se limite pas aux épithélia. De plus, un nombre croissant de données cliniques et expérimentales mettent en évidence l'implication du MR dans la progression de diverses pathologies touchant des tissus aussi variés que le cœur [28], les vaisseaux [29], le rein [30], le tissu adipeux [31], l'œil [32], ou même la peau [33]. Le travail de thèse présenté ici s'intéresse essentiellement aux effets cardiovasculaires et rénaux de

l'activation du MR. L'implication physiopathologique du MR dans les autres tissus ne sera donc pas développée.

2.5.1 Antagonistes pharmacologiques du MR

Une grande partie des études ayant permis de mettre en évidence l'implication physiopathologique du MR dans les maladies CV et rénales se base sur l'utilisation d'antagonistes pharmacologiques du MR. En effet, l'utilisation de ces antagonistes présente des effets bénéfiques en clinique humaine ainsi que des effets protecteurs dans de nombreux modèles de pathologies chez l'animal.

Il existe actuellement deux antagonistes pharmacologiques du MR utilisés en clinique : la spironolactone et l'éplérénone. Ces deux agents présentent les mêmes avantages thérapeutiques de blocage du MR mais des caractéristiques pharmacologiques différentes.

La spironolactone est un antagoniste de première génération qui est utilisé en clinique depuis plusieurs décennies. L'étude RALES a permis de mettre en évidence les effets bénéfiques de l'ajout de spironolactone au traitement standard (inhibiteur de l'ACE et diurétique furosémide) chez des patients souffrant d'insuffisance cardiaque (IC) sévère, avec une réduction de la mortalité et de la morbidité [34]. Du point de vue pharmacologique, la spironolactone présente un effet antagoniste du MR très puissant mais une spécificité pour le MR assez faible. De ce fait, elle va également se lier à d'autres récepteurs stéroïdiens telles que les récepteurs aux androgènes et à la progestérone et entraîner l'apparition d'effets secondaires de type endocriniens (gynécomastie, impuissance, etc.) [35].

L'éplérénone est un antagoniste du MR de seconde génération. Elle possède une sélectivité pour le MR plus importante que celle de la spironolactone, ce qui limite donc les effets secondaires indésirables. Cependant, elle présente une affinité pour le MR et donc une efficacité inférieure à celle de la spironolactone (environ 40x moins) et nécessite d'être utilisée

à plus forte dose pour obtenir les mêmes effets [35]. Les bénéfices cliniques de l'éplérénone sur la mortalité et la morbidité ont été mis en évidence dans les études EPHESUS, chez des patients souffrant d'IC après un infarctus du myocarde (IM) [36], et EMPHASIS, chez des patients souffrant d'IC modérée [37].

Comme décrit précédemment, l'activation du MR au niveau du néphron distal du rein induit la réabsorption du Na^+ urinaire mais également l'excrétion du K^+ dans les urines (via l'action de la pompe Na^+/K^+ ATPase notamment). L'utilisation des antagonistes du MR en clinique peut donc entraîner une augmentation de la concentration plasmatique de K^+ (kaliémie), effet secondaire potentiellement dangereux pouvant conduire à des arythmies cardiaques, surtout chez les patients dont la fonction rénale est altérée. L'utilisation de ces antagonistes nécessite donc une sélection des patients ainsi qu'un suivi de leur kaliémie et de leur fonction rénale. Malgré ce risque, il est estimé que la balance bénéfice/risque de l'utilisation des antagonistes du MR reste en faveur de leur utilisation, même chez les patients présentant une fonction rénale altérée [38].

Face à ces limitations dans l'usage des antagonistes stéroïdiens du MR, de nouveaux antagonistes non-stéroïdiens du MR ont été développés. Actuellement en phase d'essai clinique, ils possèderaient une spécificité et une efficacité accrues par rapport à la spironolactone et à l'éplérénone [35, 39]. Les résultats obtenus avec la finérénone, par exemple, dans des essais cliniques de phase II sont encourageants. L'utilisation de cet antagoniste non stéroïdien semble, en effet, apporter des effets bénéfiques similaires aux antagonistes stéroïdiens chez des patients souffrant d'insuffisance cardiaque ou rénale chronique, tout en présentant des effets secondaires moindres (notamment sur la kaliémie) [40]. Des essais cliniques de phase III sont maintenant nécessaires afin de valider ces résultats sur des durées plus longues et sur de plus larges populations de patients [40].

2.5.2 Implication du MR dans les pathologies cardiovasculaires

L'implication du MR dans la physiopathologie CV a d'abord été démontrée par l'utilisation de modèles animaux soumis à une surcharge minéralocorticoïde : les modèles de perfusion d'Aldo, ou de son précurseur, la DOCA (*Deoxycorticosterone Acetate*), adjoind d'un régime riche en sel (modèles Aldo-sel et DOCA-sel) ainsi que le modèle ajoutant une néphrectomie unilatérale (modèle NAS pour Néphrectomie-Aldo-Sel). Ces modèles expérimentaux induisent une hypertension, une hypertrophie cardiaque ainsi que le développement d'une fibrose ventriculaire, mettant en évidence l'impact CV délétère de l'activation du MR. Ces effets néfastes sont prévenus par l'utilisation d'antagonistes pharmacologique du MR [41, 42, 42, 43].

Par la suite, plusieurs études ont montré que l'implication du MR dans la physiopathologie cardiaque ne se limitait pas aux modèles de surcharge minéralocorticoïde. Chez l'animal, le blocage pharmacologique du MR limite la transition vers l'IC dans des modèles de dysfonction ventriculaire gauche [44] et d'IM [45–47], ainsi que dans des modèles de dysfonction diastolique chez le rat [48] et la souris [17].

Les études RALES [34], EPHESUS [36] et EMPHASIS [37] ont montré sans ambiguïté les effets bénéfiques du blocage pharmacologique du MR chez les patients souffrant d'IC modérée à sévère, suggérant qu'une activation excessive du MR était impliquée dans la physiopathologie de l'IC. Plus récemment, l'étude TOPCAT a évalué ce bénéfice chez des patients souffrant d'IC avec fraction d'éjection préservée. Les résultats initiaux de l'étude n'ont pas rapporté d'effet bénéfique significatif de l'utilisation de la spironolactone sur la mortalité ou le nombre d'hospitalisation pour IC [49]. Cependant, il existait une importante disparité géographique des résultats et une analyse post-hoc a ensuite révélé un bénéfice de la spironolactone au sein des patients du continent Américain [50]. Enfin, des effets bénéfiques

du blocage pharmacologique du MR ont également été démontrés chez des patients non insuffisants cardiaques ayant subi un IM [51, 52].

Dans ces essais cliniques, les effets bénéfiques du blocage du MR sont souvent observés en absence d'élévation de l'Aldo plasmatique, ce qui soulève la question de la nature du ligand du MR dans ce contexte. Il est généralement considéré que le cortisol est le ligand principal du MR dans le cœur, du fait de la faible expression de l'enzyme 11 β -HSD2 [6, 53]. Cependant, cette hypothèse est remise en question par des études montrant que les niveaux d'Aldo et de cortisol sériques sont des prédicteurs indépendants de l'augmentation du risque de mortalité dans l'IC [54, 55]. Par ailleurs, des études utilisant des souris transgéniques surexprimant l'Aldo synthase dans le cœur, et présentant donc des niveaux cardiaques d'Aldo augmentés (x2 environ), ont montré l'implication de l'Aldo cardiaque dans les mécanismes pathologiques de dysfonction coronaire [56, 57], d'hypertrophie cardiaque [58], et de fibrose [59]. L'inhibition pharmacologique de l'Aldo synthase présentait de plus des effets bénéfiques similaires à celui des inhibiteurs du MR sur l'hypertrophie et la fibrose cardio-rénale dans des modèles d'hypertension chez le rat (traitement à l'AngII et/ou challenge Néphrectomie-Sel) [60, 61], ce qui souligne l'importance de l'Aldo dans l'activation pathologique du MR *in vivo*.

Afin de mieux comprendre les effets spécifiques de l'Aldo et des glucocorticoïdes sur le cœur, notre laboratoire a conduit une étude visant à comparer les différentes signatures moléculaires cardiaques induites par des traitements avec de l'Aldo ou de la corticostérone. Cette étude a permis d'identifier plusieurs gènes dont l'expression était spécifiquement modulée par l'Aldo. Chez des souris surexprimant le MR dans les cardiomyocytes, le facteur profibrotique CTGF (*Connective Tissue Growth Factor*) par exemple était induit après un traitement avec de l'Aldo mais pas après un traitement avec de la corticostérone [11].

De nombreuses études ont par ailleurs montré l'implication du MR dans les troubles électrophysiologiques cardiaques. *Ex vivo*, l'Aldo induit une augmentation de l'activité des canaux calciques de type T dans des cardiomyocytes de rat en culture, ce qui conduit à une augmentation de la fréquence de leurs battements [62, 63]. *In vivo*, l'infusion d'Aldo ou la surexpression du MR dans les cardiomyocytes induisent un remodelage des canaux ioniques cardiaques, ce qui a d'importantes conséquences sur le contrôle de l'homéostasie calcique et mène à des troubles du rythme [64, 65]. L'utilisation d'antagonistes du MR présente des effets électrophysiologiques bénéfiques dans des modèles murins de tachycardie [66], de constriction aortique [67], d'arythmie [68], de fibrillation atriale [69], d'hypertension [70] ou de challenge minéralocorticoïde [71, 72].

En clinique, il a été montré que le risque de survenue de fibrillation atriale (FA) était plus important chez les patients souffrant d'hyperaldostéronisme primaire que chez les patients hypertendus sans hyperaldostéronisme [73]. De plus, l'aldostéronémie est élevée chez les patient présentant une FA chronique et diminue rapidement après cardioversion électrique (rétablissement d'un rythme cardiaque normal par choc électrique externe) [74]. Les patients souffrant de FA présentent également des niveaux d'expression plus élevés du MR [75] et de la 11 β HSD2 [75, 76] dans les cardiomyocytes auriculaires. L'utilisation d'antagonistes du MR a montré des effets bénéfiques avec une réduction de la survenue de FA chez des patients dialysés [77] ou ayant subi une chirurgie cardiaque [78] et une réduction des hospitalisations liées à la FA chez les patients souffrant de FA [79]. Enfin, il a été montré que l'utilisation d'antagonistes du MR chez des patients souffrant d'IC [80] ou victime d'un IM [51] induisait une diminution de leurs risques de troubles du rythme et d'arrêt cardiaque.

Le blocage pharmacologique du MR par la spironolactone ou l'éplérénone a également montré des effets bénéfiques sur la réactivité vasculaire. De nombreuses études avec des

modèles animaux ont montré des effets bénéfiques des antagonistes du MR sur la dysfonction endothéliale induite par le diabète [81], les régimes gras [82] et l'IM [83]. Chez le rat traité avec de l'Aldo, l'éplérénone prévient l'augmentation de la pression artérielle et réduit la rigidité vasculaire [84].

En clinique, l'utilisation d'antagonistes du MR améliore la fonction endothéliale chez des patients hypertendus, [85] et joue un rôle bénéfique non diurétique sur la pression artérielle [86, 87] et le remodelage vasculaire [88] chez des patients souffrant d'insuffisance rénale terminale. L'utilisation de spironolactone chez des patients diabétiques de type 2 permet par ailleurs de diminuer la pression artérielle systolique et d'améliorer la perfusion coronaire [89].

Tous ces effets bénéfiques obtenus grâce à l'utilisation des antagonistes du MR ont permis de mettre en évidence l'importance de son activation dans la physiopathologie CV. Cependant, cette approche pharmacologique ne permet pas d'étudier l'implication spécifique des différents types cellulaires exprimant le MR dans ces mécanismes. Au niveau cardiaque, le MR est exprimé à la fois par les cardiomyocytes, les cellules musculaires lisses (CML) vasculaires, les cellules endothéliales, les fibroblastes et les macrophages [90, 91]. L'implication pathologique du MR dans ces différents types cellulaires a donc été étudiée grâce à des modèles d'inactivation ou de surexpression génique tissu-spécifique du MR chez la souris.

L'inactivation génique du MR dans les cardiomyocytes améliore le remodelage pathologique dans le modèle DOCA-sel [92] et dans un modèle d'IM [93] ainsi que la fonction cardiaque dans un modèle de constriction aortique [91]. De manière intéressante, l'inactivation du MR dans les fibroblastes est sans effet dans ce même modèle de constriction aortique [91].

Les souris invalidées (KO) pour le MR dans les CML vasculaires présentent une pression artérielle plus basse et une rigidité vasculaire moins importante que les souris sauvages

(WT) au cours du vieillissement [94] ou après un challenge Aldo-sel [95] ainsi qu'une amélioration de la dysfonction ventriculaire gauche après un IM [46].

Finalement, la surexpression du MR dans les cellules endothéliales induit une augmentation de la pression artérielle basale des souris [96] mais l'invalidation du MR dans ces cellules n'a pas d'effet sur l'augmentation de la pression artérielle induite par le challenge DOCA-sel [97]. Par contre, l'invalidation du MR dans les cellules endothéliales protège les souris de la fibrose cardiaque induite par le DOCA-sel, probablement grâce à la limitation de l'inflammation [97].

Le rôle du MR exprimé par les cellules immunitaires a également été étudié et sera détaillé dans le chapitre concernant l'implication du MR dans les mécanismes inflammatoires (cf. chapitre 2.5.4.3).

2.5.3 Implication du MR dans les pathologies rénales

En 1964, Conn *et al.* ont décrit les premiers cas d'hyperaldostérionisme primaire (augmentation de la production d'Aldo par les glandes surrénales) et ont remarqué que 85% des patients atteints souffraient de protéinurie [98]. Celle-ci a initialement été attribuée à l'hypertension présente chez les patients mais l'étude de modèles animaux a par la suite permis de mettre en évidence la capacité de l'Aldo à induire une protéinurie, même en absence d'hypertension [99, 100]. En 2001, une étude a montré que l'utilisation de spironolactone chez des patients souffrant de protéinurie permettait de diminuer la protéinurie de moitié [101]. Depuis, de nombreuses autres études ont permis d'explorer le rôle de l'activation du MR dans la progression de l'insuffisance rénale chronique (IRC).

Dans les modèles animaux d'IRC, la diminution de filtration glomérulaire, la glomérulosclérose et la protéinurie induites par une infusion d'Aldo [99] sont prévenues par la

spironolactone [102] ou par l'adrénalectomie (ablation chirurgicale des glandes surrénales) [103].

De nombreuses études cliniques ont mis en évidence un effet bénéfique de l'utilisation de la spironolactone chez des patients souffrant d'IRC, avec une diminution de la protéinurie, associée ou non à une diminution de la pression artérielle, [104–108], une diminution de la progression de l'insuffisance rénale [104], et une diminution de marqueurs de lésions rénales [108].

Le blocage du MR présente également des effets bénéfiques dans d'autres modèles de pathologies rénales tels que des modèles de syndrome néphrotique [109], de néphropathie lupique [110] et de glomérulonéphrite [102, 111]. Dans la néphropathie hypertensive, l'antagonisme du MR réduit les modifications vasculaires observées dans une variété de modèles murins [100, 112–115]. Ces effets sont observés sans diminution de la pression artérielle, ce qui indique un effet protecteur non hémodynamique du blocage du MR.

Le rôle de l'activation du MR a également été démontré dans des modèles expérimentaux de néphropathie diabétique. L'expression du MR est augmentée dans le rein des animaux souffrant de diabète de type 1 (induit par streptozotocine) [116] mais pas dans celui des animaux souffrant de diabète de type 2 (souris db/db) [117]. Dans ces modèles de diabète, le blocage pharmacologique du MR prévient les lésions et la fibrose rénale [116–119] ainsi que l'albuminurie et l'inflammation [117, 118, 120–122].

Chez les patients diabétiques souffrant de protéinurie, l'utilisation de spironolactone permet de réduire l'albuminémie avec ou sans modification de la pression artérielle [104, 123–125].

Plus récemment, l'utilisation d'antagonistes du MR s'est montrée très efficace pour prévenir les dommages induits par un épisode d'ischémie/reperfusion (I/R). Le blocage pharmacologique du MR avant ou juste après l'ischémie permet de prévenir les dommages rénaux aigus induits par l'I/R chez le rat [126–129], la souris [130, 131] et même le cochon [130]. De plus, le stress oxydant et les lésions rénales induites par l'I/R chez la souris étaient prévenus par l'invalidation du MR dans les CML mais pas par son invalidation dans les cellules endothéliales [130].

Finalement, les effets bénéfiques de l'utilisation des antagonistes du MR ont été décrits dans des modèles de néphrotoxicité à la cyclosporine [132, 133], avec une amélioration de la survie, une prévention de la fibrose interstitielle et de la perte de fonction rénale [133–136]. La néphrotoxicité induite par la cyclosporine était également prévenue chez les souris présentant une invalidation du MR dans les CML, mais pas lorsque le MR était invalidé dans les cellules endothéliales [137].

2.5.4 Mécanismes physiopathologiques de l'activation du MR

Les mécanismes physiopathologiques impliqués dans les effets délétères de l'activation du MR sont complexes et divers. Cependant, trois processus en particulier ont clairement été identifiés : le stress oxydant, la fibrose et l'inflammation.

2.5.4.1 Implication du MR dans le stress oxydant

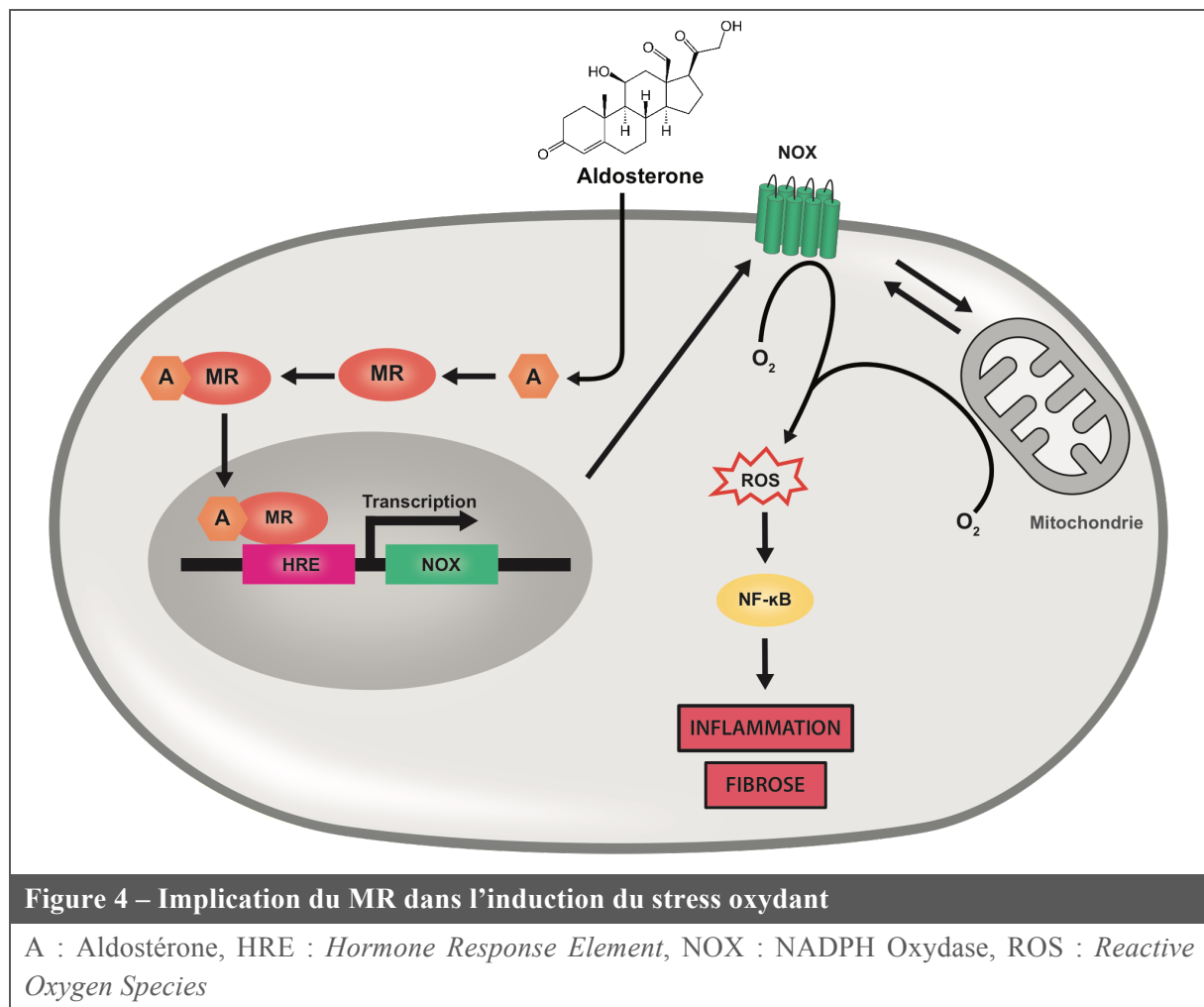
Au cours du métabolisme de l'oxygène (O_2) sont générés des dérivés réactifs de l'oxygène, ou ROS (*Reactive Oxygen Species*) : anion superoxyde ($O_2^{\cdot-}$), peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) et radical hydroxyle (HO^{\cdot}). Ces ROS sont hautement réactifs et peuvent entraîner des dommages tissulaires lorsque leurs niveaux ne sont pas régulés correctement. En condition

physiologique, ils sont éliminés au fur et à mesure de leur production et ne représentent donc pas de danger pour l'organisme. Cependant, lorsqu'ils sont produits de manière excessive, la balance entre formation et élimination est perdue, ce qui entraîne l'apparition de stress oxydant. Les ROS vont alors réagir anormalement avec les composants biologiques des tissus et conduire à des situations pathologiques [138].

Plusieurs études ont permis de montrer que le stress oxydant était un mécanisme important des effets de l'Aldo et de l'activation du MR [139]. En effet, le complexe Aldo/MR module positivement l'expression de sous-unités de la NADPH oxydase (NOX), enzyme de réduction de l'O₂ à l'origine de la production de ROS [139–142], induisant ainsi une augmentation du stress oxydant (Figure 4).

Les conséquences du stress oxydant sont multiples et participent aux effets pathologiques de l'activation du MR. Le stress oxydant induit des dommages dans l'ADN [143] et peut conduire à des modifications post-traductionnelles (carbonylation, modification d'acide sulfénique) de voies de signalisation importantes dans la mise en place des pathologies [17, 144]. De plus, le stress oxydant participe à l'activation de la voie de signalisation NF-κB qui joue un rôle important dans la médiation de l'inflammation et de la fibrose (Figure 4) [139].

In vitro, l'Aldo est capable de stimuler la production de ROS par les cardiomyocytes de rat [145]. De plus, l'utilisation d'antagonistes du MR prévient le développement du stress oxydant dans divers modèles de pathologie CV et rénale chez l'animal [44, 83, 119, 146]. Enfin, il a été montré dans des cardiomyocytes de rat que le stress oxydant était capable d'activer la signalisation du MR, via l'action de la protéine Rac1, même en l'absence de ligand [147], ce qui suggère une boucle d'amplification de l'activité du MR par le stress oxydant.



2.5.4.2 Implication du MR dans la fibrose

La fibrose est un mécanisme physiopathologique majeur de nombreuses pathologies inflammatoires chroniques. Elle est caractérisée par une production et une accumulation excessive de composants de la matrice extracellulaire (MEC), tels que le collagène et la fibronectine, au niveau d'un tissu endommagé ou enflammé. Ce mécanisme peut conduire à une dysfonction des organes car les cellules différenciées et spécialisées de l'organe sont remplacées par un tissu cicatriciel fibreux incapable de remplir les rôles spécifiques nécessaires au bon fonctionnement de l'organe. L'hypertension artérielle chronique, par exemple, est accompagnée d'une hypertrophie cardiaque en partie due à une accumulation anormale de composant de la MEC dans l'espace extracellulaire. Cette fibrose participe à augmenter la

rigidité myocardique, ce qui entraîne une dysfonction ventriculaire et peut conduire à terme à l'insuffisance cardiaque.

Un processus important dans la mise en place de la fibrose est l'activation des myofibroblastes (Figure 5). En situation de dommage tissulaire, et en particulier en contexte inflammatoire, différents types cellulaires (fibroblastes résidents, cellules épithéliales, cellules endothéliales, fibrocytes circulants, péricytes) sont activés en myofibroblastes (Figure 5), notamment grâce au processus de transition épithelio-mésenchymateuse (TEM) [148]. Les myofibroblastes sont des cellules qui participent à la cicatrisation tissulaire et qui sécrètent de larges quantités de composants de la MEC. Ce mécanisme de cicatrisation est physiologique mais lorsque qu'il est mal régulé ou que les lésions tissulaires sont trop importantes, il conduit à la mise en place d'un remodelage pathologique et au développement d'une fibrose (Figure 5) [148, 149].

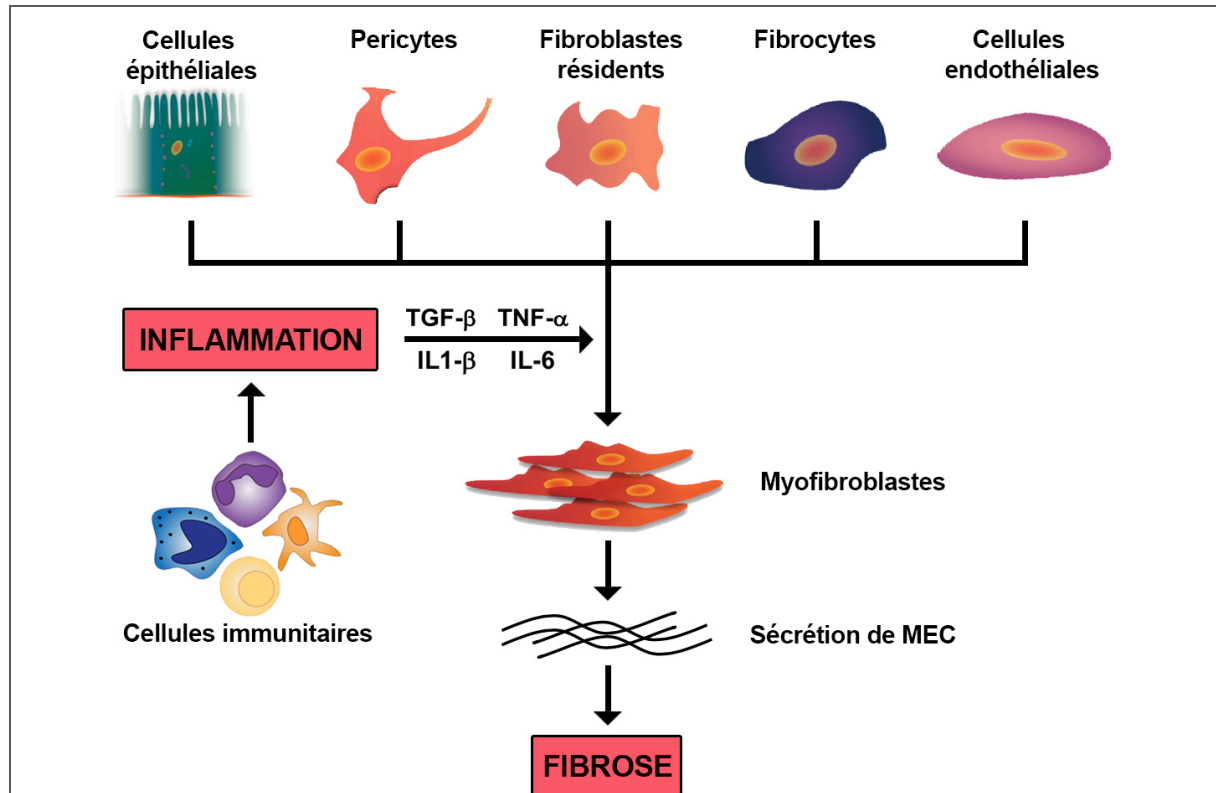


Figure 5 – Activation des myofibroblastes et induction de la fibrose

Adapté de Wynn et Ramalingam, 2012 [148] et de Borthwick *et al.* 2013 [150]

Il est aujourd'hui bien décrit que l'activation chronique du MR est associée aux mécanismes de remodelage de la MEC, de croissance cellulaire et de fibrose qui participent au développement des maladies CV et rénales [42, 43, 45, 151–155]. L'Aldo seule (*ex vivo*) ou en association avec du sel (*in vivo*) stimule l'expression de nombreuses molécules pro-inflammatoires et profibrotiques qui contribuent à la physiopathologie du remodelage cardiaque : ET1 (Endothéline 1), TGFβ (Transforming Growth Factor β), PAI-1 (Plasminogen Activator Inhibitor-1), fibronectine, collagènes (I, III et IV), et CTGF [11, 153, 156].

L'administration chronique d'hormone minéralocorticoïde (Aldo ou DOCA) et de sel chez le rat uni-néphrectomisé induit le développement de fibrose périvasculaire et interstitielle cardiaque. Ces effets sont indépendants de l'augmentation de la pression artérielle car le blocage du MR permet de prévenir la fibrose cardiaque même à des doses non hypotensives [42]. Le développement de la fibrose semble débiter autour des vaisseaux (associée avec l'inflammation coronarienne et myocardique) et s'étendre ensuite à l'interstitium cardiaque [153]. Dans l'IM, la cicatrisation et la fibrose sont améliorées par le blocage du MR [157] ou l'inactivation du MR dans les cardiomyocytes chez la souris [93].

L'administration de sel en plus de l'Aldo semble être un prérequis pour l'induction de la fibrose cardiaque *in vivo*. En effet, la surexpression cardiaque de l'Aldo synthase [57] ou du MR [65] ou l'augmentation de l'Aldo plasmatique seule [158] ne sont pas suffisants pour induire une fibrose cardiaque chez la souris. Ceci suggère donc que certains cofacteurs (sel en particulier) sont nécessaires aux effets profibrotiques de l'Aldo *in vivo*. Une étude récente a cependant décrit le développement d'une légère fibrose cardiaque chez la souris soumise à une très forte dose d'Aldo uniquement [159].

En clinique, les effets bénéfiques de l'éplérénone dans l'étude EPHESUS sont associés à une réduction du marqueur plasmatique de fibrose PINP (Procollagen type I amino-terminal

pro-peptide) [160]. Ce marqueur est également diminué par un traitement avec de la spironolactone chez des patients ayant subi un accident vasculaire cérébral [161].

Au niveau rénal, le blocage pharmacologique du MR prévient le développement de la fibrose interstitielle dans différents modèles de néphropathie [109, 110] et notamment dans la néphropathie diabétique avec une prévention de différents facteurs profibrotiques tels que le TGF β , le PAI-1, les collagènes de type I et IV et la fibronectine [116–119].

Au-delà de son rôle dans la fibrose cardiaque et rénale, le MR est également impliqué dans la fibrose d'autres organes, tels que le foie [162], les poumons [163] et la peau [164]. Le rôle profibrotique du MR apparaît donc comme un mécanisme physiopathologique général lié à son activation.

2.5.4.3 Implication du MR dans l'inflammation

Après un dommage tissulaire, la libération de cytokines pro-inflammatoires par les cellules agressées va conduire au recrutement de cellules de l'immunité innée sur le lieu de la lésion. Cette inflammation initiale, faisant notamment intervenir les macrophages et les neutrophiles, participe au nettoyage des cellules mortes et à la première phase de réparation tissulaire. Cependant, lorsque cette inflammation devient chronique, elle entraîne l'activation des cellules du système immunitaire adaptatif et contribue à la mise en place de divers mécanismes impliqués dans les pathologies CV et rénales tels que l'hypertension et la fibrose [165–167].

Le rôle majeur de l'inflammation dans le développement des maladies CV et rénales est maintenant clairement établi [165, 168–171]. Les marqueurs inflammatoires sont associés à de mauvais pronostiques en clinique et les patients souffrant d'hypertension et de maladies CV présentent une inflammation vasculaire chronique [166].

Il a été montré que l'activation du MR participe au maintien de l'inflammation [172], notamment via l'activation de la voie NF- κ B et l'induction de l'expression de cytokines pro-inflammatoires (IL-6, TNF- α , IFN- γ , etc.) [173]. Le blocage pharmacologique du MR améliore l'inflammation chronique associée aux dysfonctions CV et rénales [174, 175]. Il prévient l'inflammation cardiaque induite dans des modèles de dysfonction ventriculaire gauche [44] et de surcharge minéralocorticoïde [113]. Dans la néphropathie diabétique, la protection rénale apportée par l'antagonisme du MR est accompagnée d'une prévention de l'inflammation avec une réduction de l'infiltration des macrophages et de l'expression des marqueurs pro-inflammatoires MCP-1 (*Monocyte Chemoattractant Protein 1*), ostéopontine (OPN), TGF β et PAI-1 [117, 118, 121]. Ces données suggèrent que le MR est capable d'amplifier les mécanismes immunitaires qui jouent un rôle critique dans l'initiation et le maintien de l'hypertension, du remodelage CV et des lésions des organes cibles.

De plus, le MR est exprimé par les cellules du système immunitaire et est capable de moduler leur fonctionnement. L'activation du MR induit la polarisation des macrophages vers un phénotype pro-inflammatoire M1 alors que son invalidation génique dans les macrophages conduit à un phénotype anti-inflammatoire M2 [176–178]. L'invalidation génique du MR dans les cellules myéloïdes (macrophages, cellules dendritiques et neutrophiles) prévient le développement de l'athérosclérose chez la souris [179] ainsi que l'inflammation et la fibrose cardiaque dans de nombreux modèles profibrotiques : challenge DOCA-sel [180, 181], traitements hypertenseurs avec du L-NAME (L-nitro-arginine methyl ester) [90, 178] ou de l'AngII [178] et constriction de l'aorte thoracique [182]. De la même manière, dans un modèle d'inflammation rénale chronique (glomérulonéphrite induite par injections d'anticorps), les souris invalidées pour le MR dans les cellules myéloïdes étaient protégées contre l'inflammation et la fibrose [183].

En plus de son rôle dans les cellules de l'immunité innée, il a été montré que le MR exprimé par les cellules de l'immunité adaptative, et en particulier par les lymphocytes T, était également impliqué dans les mécanismes d'hypertension et de remodelage CV [184, 185].

Les lymphocytes T (LT) sont des cellules de l'immunité adaptative capables d'effectuer une réponse immunitaire spécifique lorsqu'elles sont activées par des cellules présentatrices d'antigènes (cellules dendritiques notamment). Les LT CD8⁺ cytotoxiques agissent directement en éliminant certaines cellules cibles (cellules endommagées, infectées, cancéreuses, ou présentant des marqueurs de non-soi) alors que les LT CD4⁺ ont un rôle de modulateur de la réponse immunitaire. Ces derniers peuvent être des cellules Th (*T-helper*) qui favorisent et amplifient la réponse immunitaire ou des cellules Treg (*T-regulator*) qui l'inhibent. Deux sous-types de cellules Th en particulier présentent un phénotype hautement pro-inflammatoire et sont associés à l'inflammation chronique et aux maladies CV : les cellules Th1 (source d'IFN- γ) et les cellules Th17 (source d'IL-17, IL-21 et IL-22) [173].

Chez l'animal, le challenge DOCA-sel induit la polarisation des LT vers un phénotype pro-inflammatoire Th1/Th17, via l'activation du MR exprimé par les cellules dendritiques (DCs, *Dendritic Cells*) [175]. De plus, l'effet protecteur des antagonistes du MR contre le remodelage cardio-rénal induit par le challenge DOCA-sel est associé à une inhibition de la polarisation Th17 des LT [175, 186]. Une étude récente utilisant un modèle de constriction de l'aorte abdominale a, par ailleurs, montré que l'invalidation du MR dans les LT protégeait le cœur des souris contre la dysfonction, l'hypertrophie, la fibrose et l'inflammation [184]. *In vitro*, l'invalidation du MR dans les LT diminuait leur activation alors qu'elle était augmentée par une surexpression du MR, révélant un rôle direct du MR exprimé par les LT dans leur activation [184].

D'autre part, de plus en plus de données décrivent le rôle des cellules immunitaires dans l'hypertension [166, 187, 188] et une étude récente a mis en évidence l'implication du MR

exprimé par les LT dans ce mécanisme, via la régulation de l'IFN- γ [185]. Après un traitement avec de l'AngII, les souris invalidées pour le MR dans les LT étaient protégées contre l'hypertension, les lésions tissulaires et l'accumulation de cellules productrices d'INF- γ (LT CD8⁺ en particulier) dans le rein et l'aorte [185]. A l'inverse, les souris surexprimant le MR dans les LT présentaient une hypertension encore plus marquée que les souris WT et cette différence était annulée par un traitement avec des anticorps anti-IFN- γ [185]. *In vitro*, l'invalidation du MR dans les LT CD8⁺ en culture induisait une diminution de l'expression de l'INF- γ alors que la surexpression du MR ou le traitement des LT CD8⁺ avec de l'Aldo induisait une augmentation de son expression [185].

Toutes ces données démontrant le rôle du MR dans les processus inflammatoires soulignent bien l'importance de ce mécanisme dans la médiation des effets délétères de l'activation du MR en pathologie.

3 – NGAL, une nouvelle cible du MR dans le système cardiovasculaire

Afin de mieux comprendre les mécanismes moléculaires de l'activation du MR dans la physiopathologie des maladies CV, de nouvelles cibles du MR ont récemment été identifiées et en particulier la cardiotrophine 1 (CT-1), la galectine 3 (Gal-3) et la Neutrophil Gelatinase-Associated Lipocalin (NGAL).

CT-1 et Gal-3 sont des molécules profibrotiques régulées positivement par le MR. Leur invalidation génique chez la souris permet de prévenir le remodelage cardiaque et l'inflammation induits par les minéralocorticoïdes [189, 190]. De plus, il a été montré que l'utilisation d'un antagoniste pharmacologique de Gal-3 était capable de prévenir le remodelage CV induit par l'Aldo-sel chez le rat [159], ce qui indique que les cibles profibrotiques en aval de la signalisation du MR peuvent être de bonnes cibles thérapeutiques alternatives lorsque les antagonistes du MR ne peuvent pas être utilisés, chez les patients à haut risque d'hyperkaliémie par exemple.

Une analyse transcriptomique pangénomique a permis à notre laboratoire d'identifier NGAL comme une nouvelle cible du MR dans le système CV [191]. Le MR, en tant que facteur de transcription, est capable de se lier directement au promoteur de NGAL et de moduler positivement sa transcription [191]. NGAL (également appelé lipocaline-2, uterocaline, siderocaline ou 24p3) est une petite glycoprotéine sécrétée de 25 kDa appartenant à la famille des lipocalines. Surtout utilisée en clinique comme biomarqueur de l'insuffisance rénale aiguë [192], il a été montré récemment qu'elle pourrait jouer un rôle important dans les pathologies CV et dans les mécanismes inflammatoires [193, 194]. NGAL semblait donc être une cible de choix dans la signalisation pathologique du RM et plusieurs études de notre laboratoire ont donc été menées afin de comprendre son implication dans les effets délétères de l'activation du MR (cf. chapitre 3.9).

3.1 La famille des lipocalines

NGAL fait partie de la famille protéique des lipocalines. Cette famille est composée de nombreuses protéines de petites tailles dont la majorité ont un rôle de transporteur, pour des substances lipophiles essentiellement. Cependant, d'autres rôles pour ces protéines ont été découverts, tels que la régulation de la division cellulaire, la différenciation, l'adhésion cellule-cellule et la survie cellulaire [193]. Contrairement à la plupart des familles protéiques, dont les membres sont identifiés sur la base de similarités de leurs séquences d'acides aminés, les membres de la famille des lipocalines partagent surtout une structure tridimensionnelle commune nécessaire à leur fonction de transport : la « *lipocalin fold* ». Cette structure est composée de huit feuillets bêta antiparallèles en forme de tonneau ouvert avec, en son creux, un site de liaison au ligand (Figure 6) [193, 195]. Les différences de séquences en acides aminés entre les membres de la famille des lipocalines peuvent être très importantes (jusqu'à 80%), ce qui permet une grande variété de ligands au sein de la famille [193, 195]. Cependant, trois domaines particuliers sont très conservés et distinguent deux branches de lipocalines : les « *Kernel* » possèdent les trois domaines conservés (comme NGAL) alors que les « *Outliers* » n'en possèdent qu'un ou deux (Figure 6) [193, 195].

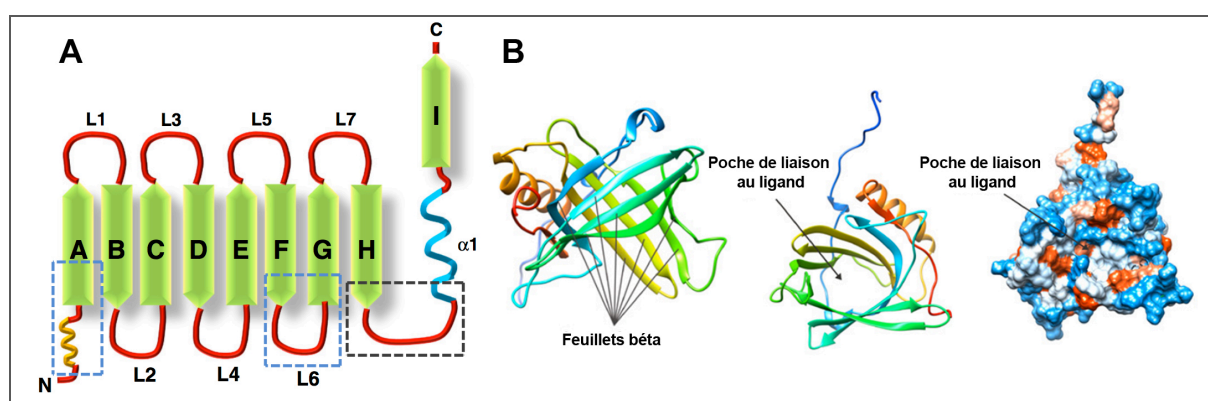


Figure 6 – Structure générale des lipocalines

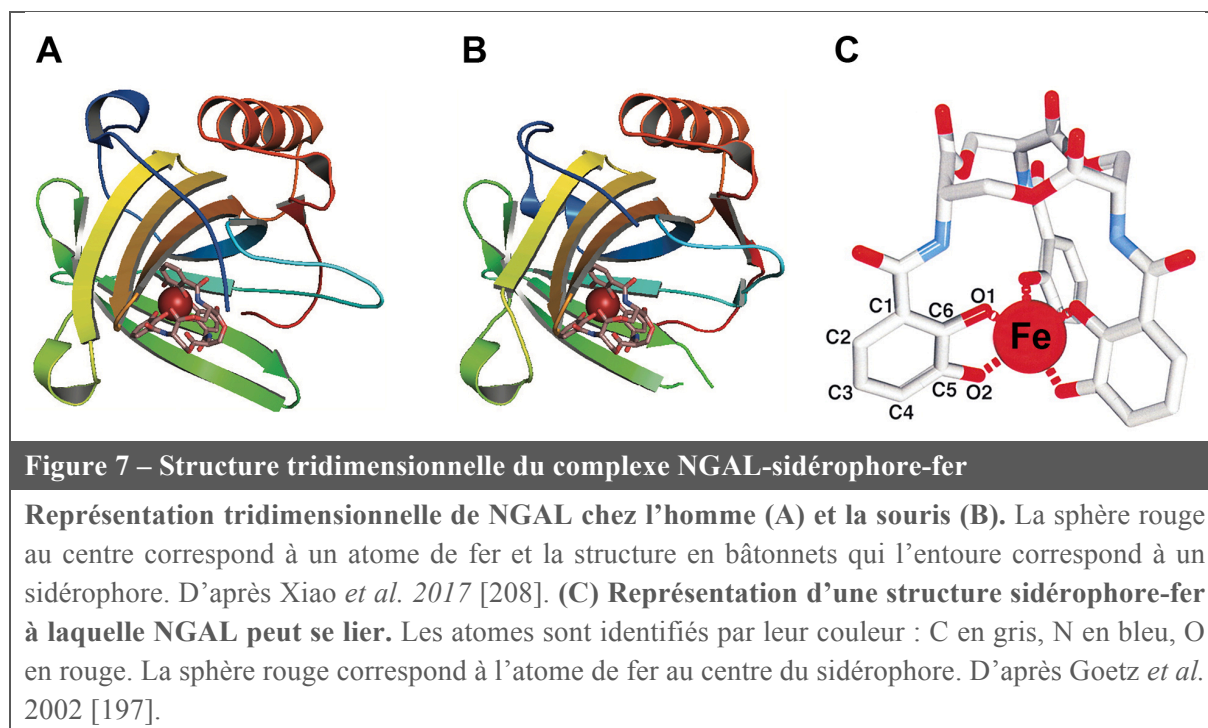
(A) Représentation schématique de la « *lipocalin fold* » commune aux lipocalines. Les régions encadrées en bleu correspondent aux domaines structurellement conservés au sein de la famille des lipocalines et la région encadrée en noir correspond à un domaine présentant une forte conservation en acides aminés. D'après Chakraborty *et al.* 2012 [193]. (B) Représentations tridimensionnelles de la structure des lipocalines. D'après Candido *et al.* 2014 [196]

3.2 Structure de NGAL

Comme les autres membres de la famille des lipocalines, NGAL possède une structure tridimensionnelle en tonneau. Son site de liaison possède cependant deux particularités : il est polaire et assez large pour accueillir certaines protéines [197]. De plus, la présence d'un résidu cystéine en position 87 permet à NGAL de former un pont disulfure avec un ligand particulier, la Métalloprotéinase Matricielle 9 (MMP-9) [198]. C'est d'ailleurs cette liaison avec la MMP-9, également appelée gélatinase B, qui a donné à NGAL son nom de « *Gelatinase-Associated* ». La MMP-9 est une protéine dont l'action enzymatique permet la dégradation de certains composants de la MEC et qui est donc impliquée dans les mécanismes de remodelage tissulaire [199–203]. La liaison de la MMP-9 à NGAL ne modifie pas son activité mais stabilise la protéine et diminue sa dégradation [198, 204].

Il a été montré que le résidu cystéine 87 présent chez l'Homme était absent chez les rongeurs, ce qui laisse penser *a priori* que la liaison NGAL/MMP-9 est impossible chez le rat et la souris. Cependant, certaines études suggèrent l'inverse. NGAL a en effet été détectée en complexe avec la MMP-9 dans le surnageant de CML de rat en culture [205] et colocalisée avec la MMP9 dans des plaques d'athérome chez la souris [206]. De plus, dans un modèle de cancer du sein chez la souris, les souris KO NGAL présentaient une activité MMP-9 plasmatique réduite par rapport au souris témoins, illustrant un lien fonctionnel entre NGAL et la MMP-9 [207].

Hormis la MMP-9, NGAL est également capable d'interagir avec d'autres ligands et notamment avec certains sidérophores d'origine bactérienne (Figure 7), ce qui lui confère une activité bactériostatique par liaison du fer (cf. chapitre 3.4.1).



3.3 Expression de NGAL

NGAL a été identifiée pour la première fois dans les granules des neutrophiles matures mais a été décrite depuis dans de nombreux autres types cellulaires. [209–211]. En effet, NGAL a été retrouvée dans des cellules aussi variées que les cellules rénales [212], les cellules endothéliales [213], les cellules hépatiques [214], les CML [215], les cardiomyocytes [191], les neurones [216] et dans différentes populations de cellules immunitaires telles que les macrophages [215, 217] et les cellules dendritiques [218].

NGAL a été décrite comme un biomarqueur de lésion rénale aiguë car elle est libérée rapidement en réponse à un dommage tubulaire [219, 220]. C’est une protéine sécrétée qui est donc dosable dans le plasma. Chez l’homme sain, la concentration plasmatique de NGAL est d’environ 70 ng/mL [221]. Chez la souris, elle est légèrement plus élevée, aux alentours de 100 ng/mL [217, 222]. Sa clairance est essentiellement rénale, ce qui rend son dosage également possible dans l’urine [209, 221, 223]. Ces éléments ajoutés à sa bonne stabilité et à sa résistance aux protéases en font un biomarqueur de choix pour l’utilisation en clinique [219, 220].

L'expression de NGAL est induite dans de nombreuses situations pathologiques et en particulier dans les situations inflammatoires, ischémiques et métaboliques [193]. Les chapitres 3.6 à 3.8 seront donc consacrés à la description des implications physiopathologiques de NGAL dans les maladies CV et rénales.

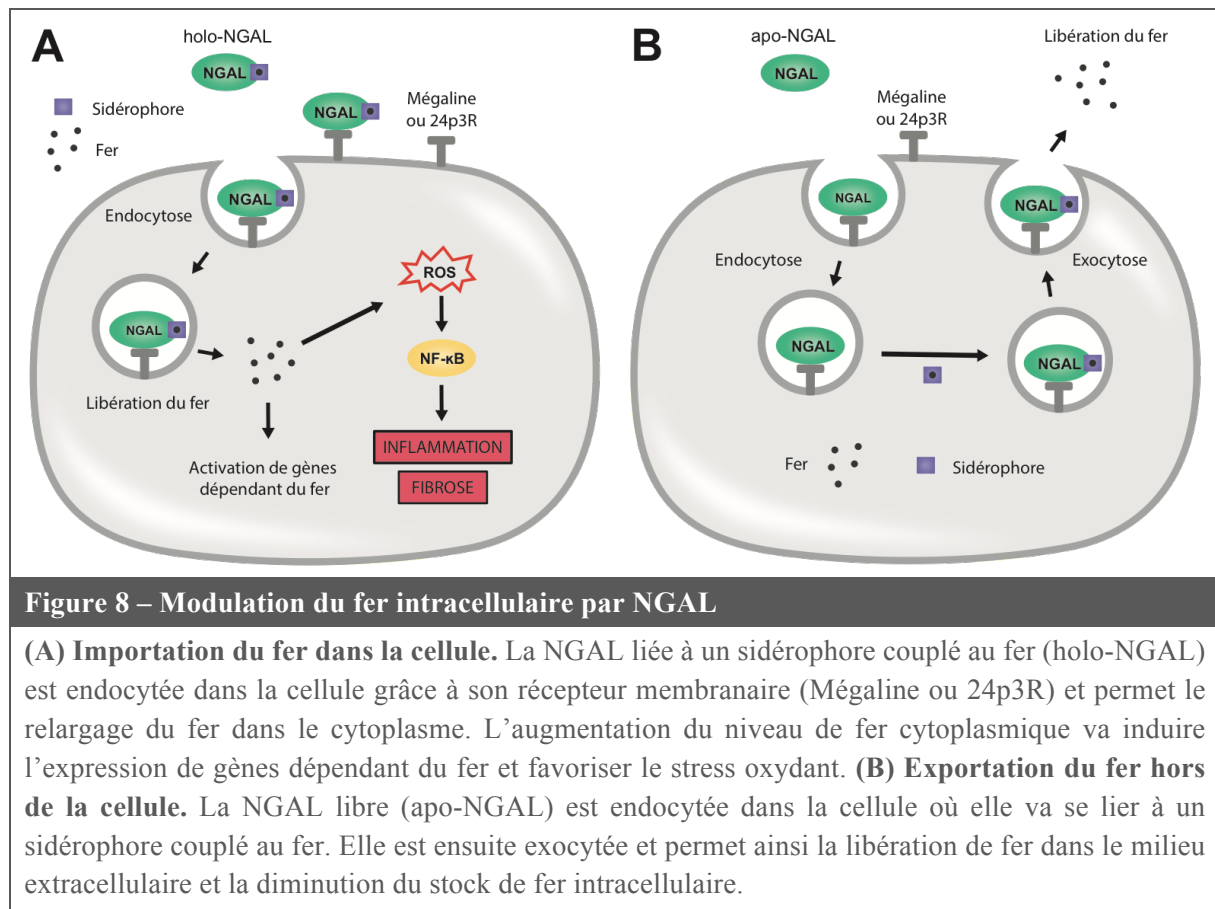
3.4 Rôles de NGAL

3.4.1 Rôle bactériostatique et de modulation du fer

Comme mentionné précédemment, NGAL est impliquée dans la défense antibactérienne grâce à la séquestration du fer. Le fer est un élément indispensable au développement des bactéries, mais présent en très faibles quantités dans l'organisme. Pour capter le fer de l'hôte, les bactéries libèrent donc des protéines à forte affinité pour le fer, les sidérophores. Des études *in vitro* ont montré que NGAL était capable de se lier aux sidérophores bactériens et de jouer ainsi un rôle bactériostatique en réduisant la disponibilité du fer pour les bactéries [197]. De plus, une étude utilisant un modèle de souris invalidées génétiquement pour NGAL (KO NGAL) a montré que ces souris présentaient une susceptibilité accrue aux infections bactériennes [224].

Il a également été montré que NGAL était capable de se lier aux sidérophores endogènes présents chez l'homme, les catéchols. Cela suggère donc un rôle de NGAL dans l'homéostasie du fer, même en absence d'infection bactérienne [225]. Lorsque NGAL se lie à un sidérophore couplé au fer (holo-NGAL), il va le transporter à l'intérieur de la cellule et ainsi augmenter la concentration cytosolique de fer (Figure 8A). A l'inverse, lorsqu'il est libre (apo-NGAL), il va permettre la captation de fer intracellulaire et son transport vers l'espace extracellulaire, induisant donc une diminution de la concentration intracellulaire de fer (Figure 8B) [226]. Ce rôle de NGAL dans l'homéostasie du fer pourrait avoir un impact important en pathologie puisque les niveaux de fer sont impliqués dans divers mécanismes délétères tels que le stress

oxydant [227], l'inflammation [228], l'apoptose [227, 229, 230] et la fibrose [230] (Figure 8A).



3.4.2 Rôle chimiotactique

Plusieurs études ont mis en évidence un rôle pro-inflammatoire et chimiotactique de NGAL. Il a été montré, par exemple, que la migration des neutrophiles en culture était induite par un traitement avec de la NGAL recombinante [231, 232]. De plus, les neutrophiles provenant de souris KO NGAL présentent une réduction de leurs propriétés chimiotactiques et de leurs capacités d'adhésion [231]. Dans un modèle murin de psoriasis (maladie inflammatoire de la peau), l'infiltration des neutrophiles dans le derme était diminuée chez les souris traitées avec un anticorps anti-NGAL et augmentée par un traitement avec de la NGAL recombinante [232]. Il a également été montré que le recrutement des cellules immunitaires dans le cœur de souris soumises à un épisode d'I/R était prévenu chez les souris KO NGAL [223]. Lorsque des

cœurs de souris KO NGAL étaient transplantés chez des souris WT, une diminution significative de l'infiltration granulocytaire était observée par rapport à une transplantation entre souris WT [223]. Enfin, de nombreuses expériences réalisées dans des modèles cellulaires et murins de cancer ont mis en évidence un rôle de NGAL dans la migration et l'invasion cellulaire [207, 233–239].

L'implication de NGAL dans les processus inflammatoires sera détaillée plus longuement dans le chapitre 3.6.

3.4.3 Rôle de facteur de croissance, de différenciation et de prolifération

Il a également été montré que NGAL présentait des caractéristiques de facteur de croissance, de différenciation et de prolifération [240]. En effet, NGAL stimule la prolifération et la différenciation épithéliale de cellules issues du rein embryonnaire de rat et est capable d'induire l'organisation en tubule des cellules épithéliales de souris en culture [241]. NGAL induit par ailleurs la prolifération de CML vasculaires humaines en culture [242]. Il a été montré que NGAL participait à la transition épithélio-mésenchymateuse *in vivo* dans un modèle d'adénocarcinome pulmonaire chez la souris [237] et *in vitro* dans des cellules de cancer de la prostate [233] et du sein [239]. Dans ces modèles, NGAL favorisait la motilité et les capacités invasives et métastatiques des cellules cancéreuses. Le rôle de NGAL dans la prolifération cellulaire a par ailleurs été mise en évidence dans d'autres modèles de cancer [243, 244].

3.5 Récepteurs de NGAL

3.5.1 Le récepteur 24p3R

Le récepteur 24p3R est l'un des deux récepteurs connus de NGAL. C'est un récepteur endocytaire présentant une forte affinité pour NGAL et qui permet à ce dernier de pénétrer à l'intérieur des cellules. Il participe notamment au contrôle de l'homéostasie du fer en permettant

le passage de NGAL vers l'intérieur ou l'extérieur de la cellule, modulant ainsi la quantité de fer intracellulaire. L'expression de ce récepteur a été identifiée dans différents tissus et notamment dans le cœur [226]. En conditions inflammatoires, le 24p3R est exprimé dans la totalité du tissu cardiaque et, en particulier, à la surface des cardiomyocytes [245]. Par ailleurs, il a été montré que le 24p3R était exprimé dans le néphron distal [246] et qu'il était impliqué dans l'endocytose de l'albumine et dans l'activation des voies de signalisation pro-inflammatoires et profibrotiques du NFκB et du TGF-β induites par l'albumine [247]. Enfin, l'expression du 24p3R était augmentée à la surface des neutrophiles de patients souffrant de psoriasis. L'utilisation d'un siRNA anti-24p3R a, de plus, permis de mettre en évidence le rôle primordial de ce récepteur dans l'activation des neutrophiles par NGAL en culture [232].

3.5.2 La mégaline

L'autre récepteur connu pour NGAL est la mégaline (ou *low-density lipoprotein receptor-related protein 2*, LRP2). La mégaline est un récepteur endocytaire également, mais multi-ligand, qui est exprimé au niveau de différents épithélia et, en particulier, des épithélia à forte capacité absorbative tels que l'épithélium du tubule rénal, de l'iléon, ou du plexus choroïde dans le cerveau [248]. La mégaline a également été détectée dans des cardiomyocytes cultivés *in vitro* [249] ainsi que dans différents types de cellules immunitaires telles que les lymphocytes T, les lymphocytes B, les granulocytes et les monocytes/macrophages [250]. La mégaline appartient à la famille des récepteurs aux lipoprotéines de basse densité [251] et il a été montré qu'elle était capable de se lier à diverses lipocalines [195, 252] mais que son affinité pour NGAL était plus importante que pour les autres lipocalines [253].

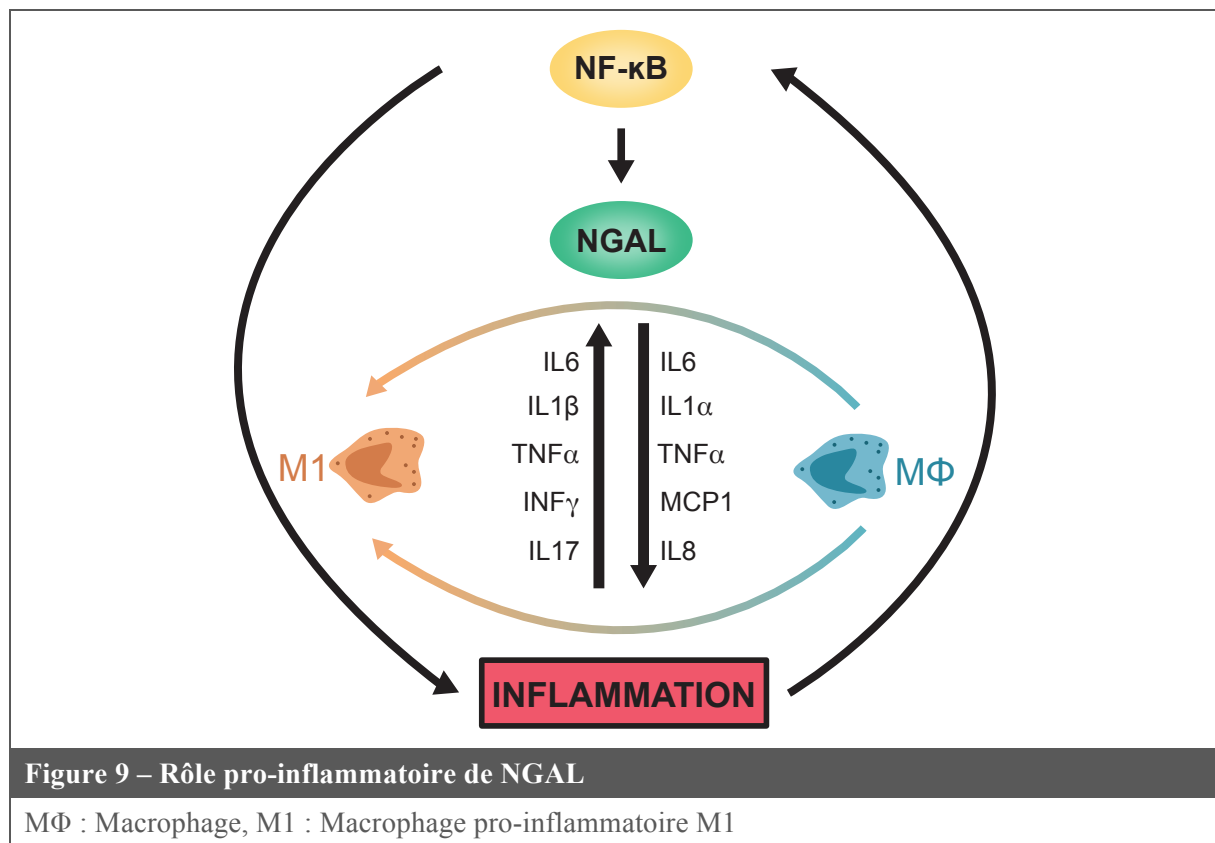
3.6 Implication de NGAL dans les mécanismes inflammatoires

Comme décrit précédemment, NGAL a d'abord été décrite dans les neutrophiles [211] et observée plus tard dans d'autres types de cellules immunitaires telles que les macrophages [215, 217] et les cellules dendritiques [218].

Dans l'insuffisance cardiaque ainsi que dans diverses autres pathologies présentant une composante inflammatoire, il a été montré que les niveaux sériques ou plasmatiques de NGAL libre étaient corrélés avec ceux d'autres marqueurs inflammatoires (TNF- α , CRP, IL-6, nombre de leucocytes circulant) [254–258].

Une activation de l'expression de NGAL peut être induite par divers stimuli pro-inflammatoires, tels que le LPS [259–261], l'IL-1 β [214, 262–267], l'IL-6 [213, 267], l'IL-17 [268], l'IFN- γ [269] et le TNF- α [266, 267, 269, 270] selon les types cellulaires. De plus, NGAL est régulée positivement par une activation de la voie NF- κ B [205, 214, 243, 244, 263, 265, 267, 271–275]. A l'inverse, NGAL est capable d'induire l'expression de diverses molécules pro-inflammatoires telles que l'IL-8 [215, 232, 276], l'IL-6 [215, 232, 276], l'IL-1 α [232], le TNF- α [232] et le MCP-1 [215, 276]. Enfin, il a été montré que NGAL était impliquée dans la polarisation des macrophages vers un phénotype pro-inflammatoire M1, à la fois *in vitro* et *in vivo* [277].

Toutes ces données suggèrent l'existence d'un cercle vicieux dans lequel NGAL serait surexprimée en conditions inflammatoires et capable de potentialiser l'inflammation grâce à l'induction de l'expression de médiateurs pro-inflammatoires (Figure 9).



Au-delà de son implication dans la réponse immunitaire innée et aiguë, il a également été rapporté que NGAL serait impliquée dans l'inflammation chronique et les maladies auto-immunes. Les niveaux urinaires de NGAL étaient augmentés chez des patients souffrant de néphropathie lupique et étaient associés au degré de gravité de la maladie [278]. Dans un modèle de myocardite auto-immune chez le rat, NGAL était fortement exprimée dans les cardiomyocytes, les CML vasculaires, les fibroblastes et les neutrophiles [245]. De plus, cette élévation de NGAL était particulièrement marquée durant la phase active de la myocardite et suivait de près les niveaux d'IL-1 β cardiaque et plasmatique [245]. Dans un modèle d'inflammation aiguë de la peau induite par injection d'anticorps, les souris KO NGAL présentaient une réduction de l'inflammation de 50% associée à une réduction de l'infiltration immunitaire par rapport aux souris WT [279]. Le même effet était retrouvé en injectant des souris WT avec un anticorps anti-NGAL et l'inflammation était restaurée par le traitement avec de la NGAL recombinante [279].

3.7 Implication de NGAL dans les pathologies rénales

Aujourd'hui, la créatinine est le marqueur de lésion rénale le plus classiquement utilisé. Cependant, de plus en plus d'études décrivent NGAL comme un meilleur marqueur de lésion rénale dans l'insuffisance rénale aiguë (IRA) et chronique (IRC).

Chez l'animal, l'I/R induit une augmentation massive du niveau de NGAL dans les 3 heures suivant l'ischémie alors que l'augmentation de créatinine n'est que légère [280]. De plus, la concentration en créatinine sérique augmente après une ischémie bilatérale sévère mais reste inchangée après une ischémie bilatérale légère ou une ischémie unilatérale [280]. Dans l'IRA, NGAL est augmentée jusqu'à 1000 fois dans l'urine (de 0,04 à 40 mg/mL) et de 300 fois dans le sang (de 0,1 à 30 µg/mL) [222, 280, 281].

Chez les patients souffrant d'IRA, il a été montré que le niveau relatif de NGAL sérique était corrélé à la gravité des dommages rénaux et que des niveaux élevés de NGAL sérique étaient associés à un risque de mortalité accru [254]. De plus, les concentrations de NGAL urinaire et sérique ont été décrites comme des marqueurs sensibles, spécifiques et hautement prédictifs de l'IRA après une chirurgie cardiaque [282].

Plusieurs études ont par ailleurs suggéré NGAL comme marqueur de dommage rénal dans des contextes pathologiques plus larges que l'ischémie [283, 284].

En utilisant un modèle de souris exprimant une version bioluminescente de NGAL, Paragas *et al.* ont étudié l'origine de NGAL au cours de l'IRA. Ils ont ainsi déterminé qu'au cours de l'I/R, NGAL était libérée par les cellules de la branche ascendante large de l'anse de Henlé et du canal collecteur et uniquement dans les zones ischémiques du rein [285]. De plus, en réalisant des transplantations de rein entre souris WT et KO NGAL, ils ont pu mettre en évidence que l'augmentation de la concentration de NGAL urinaire au cours de l'ischémie était

majoritairement due à la libération de NGAL directement au niveau du rein mais qu'il existait également une légère contribution de NGAL extra-rénale [285].

Une autre source suggérée de NGAL urinaire, en particulier dans les maladies extra-rénales, serait la NGAL circulante. Elle serait libérée dans la circulation systémique aux sites d'inflammation, par les cellules immunitaires notamment [286], et filtrée par le glomérule rénal. La majorité de la NGAL serait ensuite réabsorbée par le tubule proximal, qui exprime la mégaline, et le reste serait excrété dans l'urine. Ce dernier point est illustré par exemple par une étude montrant que des souris déficientes en mégaline présentent une fuite urinaire de NGAL [253].

Au-delà de son rôle de biomarqueur, NGAL est impliquée activement dans les mécanismes de lésions rénales. En effet, il a été montré qu'elle jouait un rôle protecteur dans l'insuffisance rénale aiguë (IRA), après un épisode d'I/R par exemple [222, 287], mais qu'elle était délétère à long terme et favorisait la progression vers l'insuffisance rénale chronique (IRC) [288, 289].

Lors d'un épisode d'I/R, le relargage de larges quantités de fer au moment de l'ischémie favorise le stress oxydant et l'induction de lésions tissulaires. De plus, la reperfusion qui suit augmente encore la quantité de fer, ce qui exacerbe les dommages induits par le stress oxydant [290–293]. Il a été montré dans des modèles animaux que l'utilisation de capteurs de fer [294, 295], et notamment l'injection de NGAL recombinante [222, 287], permettait de limiter les dommages précoces induits par l'I/R ou le rejet du greffon lors d'une transplantation rénale [296]. Une étude a montré par ailleurs que la greffe de macrophages surexprimant la cytokine anti-inflammatoire IL-10 permettait de protéger de l'ischémie chez le rat, et d'améliorer la régénération cellulaire et la réparation tissulaire [297] via l'induction de NGAL. En effet, lorsque les rats étaient traités avec un anticorps anti-NGAL, le rôle protecteur de cette greffe

était perdu. Plus récemment, une étude a montré que l'infusion de macrophages surexprimant NGAL permettait d'améliorer la fibrose rénale dans un modèle d'obstruction urétérale unilatérale chez la souris [298].

En contraste avec son effet protecteur dans l'IRA, NGAL est considérée comme un facteur pro-inflammatoire favorisant l'IRC. En effet, certaines études ont montré qu'un niveau de NGAL urinaire élevé était associé à un risque plus important d'IRC [289, 299]. De plus, chez les patients souffrant d'IRC [289, 300] ou dans des modèles murins d'IRC [288, 289], les niveaux de NGAL sont augmentés et corrélés à l'importance des lésions rénales.

L'implication de NGAL dans la médiation de l'IRC a été étudiée dans des modèles animaux, et en particulier grâce à l'utilisation de souris KO NGAL. Dans un modèle d'IRC induite par injection d'anticorps, l'invalidation génique de NGAL protégeait les souris contre la protéinurie et les lésions tubulaires alors que l'ajout de NGAL recombinante exacerbait la néphropathie et diminuait la survie [288]. De manière similaire, dans un modèle d'IRC induite par néphrectomie subtotale les souris KO NGAL présentaient moins d'apoptose, de lésions rénales (glomérulosclérose, atrophie tubulaire, fibrose interstitielle, infiltration immunitaire) et de protéinurie que les souris WT ainsi qu'une meilleure fonction rénale [289]. De manière intéressante, cette étude a également permis de montrer que NGAL était un effecteur des effets prolifératifs de l'EGFR (*Epidermal Growth Factor Receptor*) [289] qui est connu pour jouer un rôle important dans la progression de l'IRC [301].

En conclusion, l'implication de NGAL dans les maladies rénales semble dépendre des mécanismes pathologiques à l'œuvre. Après une lésion rénale aiguë il joue un rôle protecteur, notamment via ses effets de capteur de fer, alors que dans un contexte plus chronique, ses effets pro-inflammatoire et prolifératif en font un acteur délétère.

3.8 Implication de NGAL dans les pathologies cardiovasculaires

Plusieurs études décrivent des niveaux de NGAL circulante élevés chez les patients souffrant de maladies CV [302, 303]. Chez les patients victimes d'un IM à la phase aiguë ou souffrant d'IC chronique, les niveaux de NGAL sériques sont plus élevés que chez les sujets sains [266, 302, 303]. Il a d'ailleurs été montré que les niveaux de NGAL plasmatiques étaient plus élevés chez les patients victimes d'un IM que chez ceux souffrant de maladies coronariennes stables [304].

Certaines études suggèrent que NGAL pourrait présenter une valeur pronostique chez les patients souffrant d'IC car de hauts niveaux de NGAL plasmatiques ou urinaires sont associés à plus de complications rénales [266, 302, 305] et de mortalité [306–308]. Ces niveaux élevés de NGAL pourraient être en partie expliqués par l'insuffisance rénale retrouvée chez un grand nombre de patients insuffisants cardiaques [309]. Les niveaux de NGAL circulante ont d'ailleurs été décrits également comme des prédicteurs de complications CV chez des patients souffrant d'ICR [310, 311]. Cependant, plusieurs études ont montré que NGAL était un prédicteur d'incident CV même en l'absence de dysfonction rénale [312–314].

Finalement, dans une étude suivant des sujets sains pendant 10 ans, un niveau basal de NGAL plus élevé était associé à une augmentation de la proportion d'événements cardiaques indésirables et de la mortalité en générale, toutes causes confondues [315].

Chez l'animal, la production de NGAL est augmentée dans le cœur et l'aorte après un IM [206] et, en particulier, dans les cardiomyocytes des zones non ischémiques du cœur [266]. La production de NGAL est également augmentée dans des cardiomyocytes isolés de rat, en réponse à des stimulations par différentes molécules pro-inflammatoires telles que l'endothéline 1, l'IL-1 β et le TNF- α [266].

Dans les artères de patients souffrant d'athérosclérose, l'expression de NGAL a été retrouvée dans les cellules endothéliales, dans les cellules musculaires lisses (CML) et dans les macrophages, et était associée à la présence de symptômes chez les patients [215]. Le niveau de NGAL circulante était de plus associé à la vulnérabilité des plaques [316]. Dans un modèle d'athérosclérose chez la souris, NGAL était colocalisée avec les macrophages et la MMP-9 dans les plaques d'athérome, suggérant un rôle de NGAL dans le remodelage médié par la MMP-9, même si l'existence d'une liaison NGAL/MMP-9 n'a pas été clairement démontrée chez la souris [206]. La même colocalisation NGAL/MMP-9 était d'ailleurs retrouvée dans le cœur de souris après IM [206].

Dans un modèle d'ischémie cérébrovasculaire chez le rat, une forte augmentation de NGAL et de MMP-9 était retrouvée dans l'intima de l'artère carotide commune des animaux [205]. Dans ce modèle, le blocage de la voie NF- κ B *in vivo* entraînait une suppression presque totale de l'expression de NGAL et de MMP-9, suggérant un rôle central de la signalisation NF- κ B dans leur régulation transcriptionnelle dans ce contexte [205]. *In vitro*, dans des CML en culture, l'expression de NGAL était également induite de manière NF- κ B dépendante par un traitement avec de l'IL-1 β [205].

Le rôle de NGAL a également été mis en évidence dans les lésions cardiaques induites par un épisode d'I/R [277, 317]. Dans un modèle de cœur isolé perfusé, les souris KO NGAL présentaient une meilleure fonction contractile cardiaque que les souris WT après un épisode d'I/R, ainsi qu'une taille d'infarctus réduite [317]. De plus, le traitement des souris KO NGAL soumises à l'I/R avec de la NGAL recombinante entraînait une altération de la récupération fonctionnelle cardiaque et une diminution de la fonction mitochondriale [317]. Dans un modèle d'I/R après transplantation cardiaque chez la souris, l'utilisation d'anticorps anti-NGAL

permettait de diminuer l'infiltration de macrophages et de neutrophiles dans la zone ischémique, de réprimer la polarisation M1 des macrophages et d'améliorer les lésions cardiaques dues à l'I/R [277].

L'analyse de biopsies de patients présentant un anévrisme de l'aorte abdominale (AAA) a permis d'identifier l'expression du complexe NGAL/MMP-9 au niveau de la paroi vasculaire ainsi que dans le thrombus présent dans la lumière des vaisseaux. Les neutrophiles représentaient la source majeure de l'expression de NGAL dans ce contexte [318]. Dans un modèle d'AAA chez la souris, l'absence de NGAL (souris KO NGAL) ou son blocage (anticorps anti-NGAL) présentaient les mêmes effets protecteurs contre le développement de l'AAA, avec une diminution de l'infiltration des neutrophiles et de l'activité des MMPs [319].

Il a également été montré que NGAL était capable de réduire l'autophagie et d'induire une résistance à l'insuline dans les cardiomyocytes de rat. Ces deux facteurs jouent des rôles bien établis dans les cardiomyopathies [320]. Une étude récente utilisant un modèle d'IM a d'ailleurs montré que les souris KO NGAL présentaient une augmentation de l'autophagie qui était associée à une diminution de l'apoptose et à une fonction cardiaque préservée après l'infarctus [321].

NGAL a également été associée aux troubles cardiométaboliques. Dans l'obésité chez l'homme et l'animal, les niveaux de NGAL circulante sont augmentés et corrélés à l'augmentation de la pression artérielle et au niveau de résistance à l'insuline [322]. Une étude récente de notre laboratoire a par ailleurs rapporté une augmentation des niveaux plasmatiques du complexe NGAL/MMP-9 dans une cohorte de patients obèses en corrélation avec l'augmentation de marqueurs circulants de fibrose [323].

Dans des modèles animaux d'obésité, les souris KO NGAL étaient protégées contre l'hypertension [324, 325], l'inflammation [325, 326] et les dysfonctions endothéliales [324] et cardiométaboliques [317, 324, 326] induites par un régime riche en graisse. A l'inverse, l'administration conjointe de NGAL recombinante et d'acide linoléique chez la souris WT favorisait le stress oxydant, la dysfonction endothéliale, l'inflammation et l'hypertension [325]. La désamidation de NGAL (par l'acide linoléique notamment) améliore sa stabilité et favorise son accumulation [325].

Comme décrit précédemment, NGAL est connue pour son rôle bactériostatique par séquestration du fer. Elle effectue le transport du fer en s'associant à un sidérophore et peut augmenter ou diminuer la quantité de fer intracellulaire, participant ainsi à la maintenance de l'homéostasie du fer. Il est donc intéressant de noter que la surcharge en fer et la déficience en fer ont toutes deux été liées à des cardiomyopathies. La première a été associée à un stress oxydant accru et la seconde à une dysfonction mitochondriale, une fonction cardiaque altérée [327], un état d'hypercoagulation et un stress oxydant lié à l'anémie [328]. La capacité de NGAL à réguler l'homéostasie du fer pourrait donc jouer un rôle important dans la mise en place des cardiomyopathies.

Il a par ailleurs été montré que NGAL participait à l'apoptose des cardiomyocytes entraînant une accumulation de fer intracellulaire [329]. L'apoptose des cardiomyocytes pourrait donc influencer le processus de remodelage sous-jacent au développement de certaines pathologies cardiaques et notamment de l'IC.

3.9 Implication de NGAL dans les effets délétères de l'activation du MR

Les effets secondaires liés à l'utilisation des antagonistes du MR en clinique incitent à chercher de nouvelles cibles thérapeutiques plus spécifiques des conséquences physiopathologiques de l'activation du MR. Pour ce faire, une meilleure compréhension des voies de signalisation en aval du MR est nécessaire. Le MR étant un facteur de transcription, cette compréhension passe notamment par l'identification de nouvelles cibles génomiques.

Comme mentionné précédemment, une étude de notre laboratoire a permis d'identifier NGAL comme une nouvelle cible du MR dans le système CV [191]. Une analyse transcriptomique globale par puce à ARN a été utilisée afin de comparer les transcrits des cœurs de souris WT et de souris transgéniques surexprimant le MR (MRcardio) ou le GR (GRcardio) dans les cardiomyocytes. NGAL est alors apparu comme un gène très fortement induit dans le cœur des souris MRcardio (x150) et beaucoup moins dans celui des souris GRcardio (x5) traduisant une spécificité de son expression par l'activation du MR [191]. Cette spécificité a ensuite été vérifiée *in vitro* dans des cardiomyocytes de rat surexprimant le MR. Le traitement de ces cellules avec de l'Aldo ou de la cortisone induisait une augmentation de l'expression de NGAL qui était prévenue par un blocage pharmacologique du MR mais pas du GR [191]. Finalement, l'utilisation d'une construction plasmidique présentant un gène rapporteur précédé du promoteur de NGAL a permis de mettre en évidence la fixation du MR à ce dernier au niveau d'une séquence HRE et donc l'activation directe de l'expression de NGAL par le MR [191]. Cette induction de l'expression de NGAL par l'activation du MR a par la suite été rapportée dans le cœur de souris soumises à un challenge DOCA-sel [330] et chez des souris MRcardio traitées avec de l'Aldo [11].

Etant donné le nombre croissant d'études liant NGAL aux pathologies CV, une étude de notre laboratoire par Tarjus *et al.* a été mise œuvre afin d'élucider l'implication de NGAL

dans les effets CV délétères de l'activation du MR. L'utilisation de souris KO NGAL soumises au challenge NAS a ainsi permis de démontrer le rôle critique de NGAL dans la physiopathologie de l'activation du MR au niveau du système CV. L'invalidation génique de NGAL permet en effet de prévenir l'hypertension (Figure 10B), la fibrose (Figure 10C) et l'inflammation (Figure 10D) induite par le NAS.

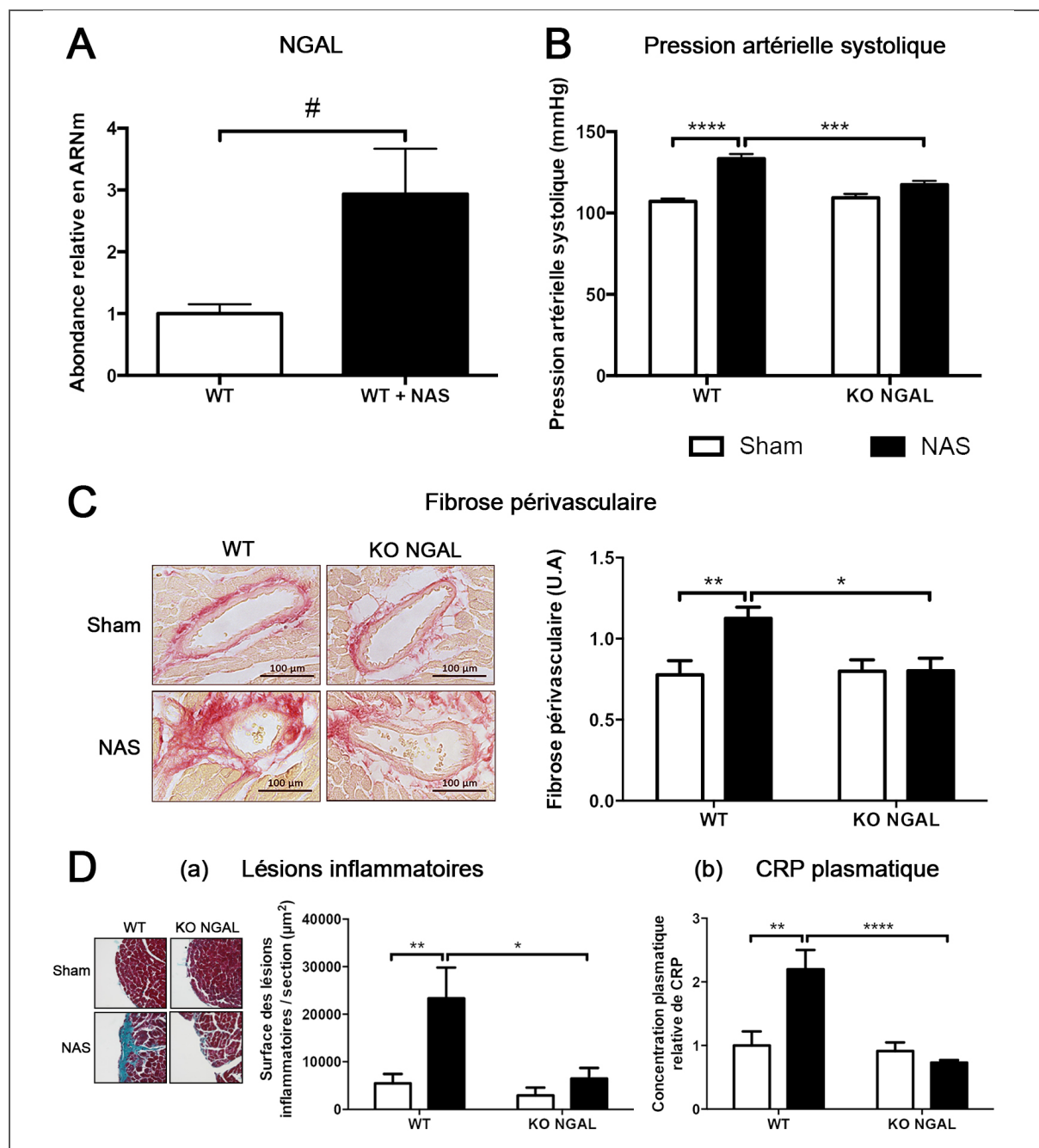


Figure 10 – Effets de l’invalidation génique de NGAL sur les effets délétères induits par le challenge NAS.

Le traitement NAS induit une augmentation du niveau de transcription de NGAL (A). L’invalidation génique de NGAL permet de prévenir (B) l’augmentation de pression (mesure de pression à la queue), (C) l’augmentation de la fibrose périvasculaire (coloration au rouge Sirius) et (D) l’inflammation induites par le NAS : (a) augmentation des lésions inflammatoires (région de fibrose présentant une forte accumulation de cellules inflammatoires) mesurées sur coupes de cœur marquées au trichrome de Masson et (b) augmentation de la concentration plasmatique de la protéine C réactive (CRP, marqueur de l’inflammation) dosée par ELISA et exprimée en nombre de fois par rapport au groupe témoin WT Sham. [#]p < 0,05 (test de Mann-Whitney) contre WT. *p < 0,05 **p < 0,01 ***p < 0,001 ****p < 0,0001 (ANOVA à deux facteurs et post-test de Tukey) entre les conditions.

D’après Tarjus *et al.* 2016 [323] et données non publiées du laboratoire.

4 – Objectifs de la thèse

Les résultats précédents du laboratoire ont permis de mettre en évidence le rôle crucial de NGAL dans la médiation des effets délétères de l'activation du MR dans le système CV [323]. Cependant, la source de NGAL impliquée dans ces mécanismes n'a pas été clairement identifiée.

L'implication des cellules immunitaires dans la mise en place des dommages cardiaques et rénaux est maintenant clairement établie [170, 331]. De plus, un nombre croissant d'études décrivent le rôle du MR exprimé par les cellules immunitaires dans l'évolution des maladies CV [173]. NGAL étant décrite comme une protéine inflammatoire [193, 332–334], nous avons émis l'hypothèse que la production de NGAL par les cellules immunitaires pourrait être impliquée dans les dommages cardiaques et rénaux induits par l'activation du MR.

Mon projet de thèse comporte deux parties complémentaires. Il vise (1) à étudier la **spécificité** de l'implication de NGAL dans la médiation des effets profibrotiques de l'activation du MR dans le système CV et (2) à déterminer les **mécanismes** mis en œuvre dans ces effets.

(1) NGAL étant une protéine pro-inflammatoire et profibrotique, nous avons voulu savoir si son implication dans les mécanismes de remodelage CV était spécifique de l'activation directe du MR dans le challenge NAS, ou si elle pouvait également être impliquée dans d'autres modèles profibrotiques. Pour répondre à cette question, nous avons soumis des souris KO NGAL à trois modèles profibrotiques différents du challenge NAS utilisé dans l'étude de Tarjus *et al.* Le premier est un modèle de traitement chronique à l'AngII, hormone centrale du SRAA (Figure 11 – ❶). Le second est un modèle de traitement aigu à l'isoprénaline (Figure 11 – ❷), un agoniste β -adrénergique. Et le dernier est un modèle d'infarctus du myocarde par ligature d'une artère coronaire (Figure 11 – ❸).

(2) Afin d'élucider les mécanismes impliquant NGAL dans les effets délétères de l'activation du MR, nous avons étudié le rôle de la NGAL produite spécifiquement par les cellules immunitaires dans la fibrose et l'inflammation induite par l'Aldo. Pour ce faire, nous avons généré des souris chimériques présentant une déplétion de NGAL dans les cellules immunitaires et nous les avons soumises au challenge NAS (Figure 11 – ④).

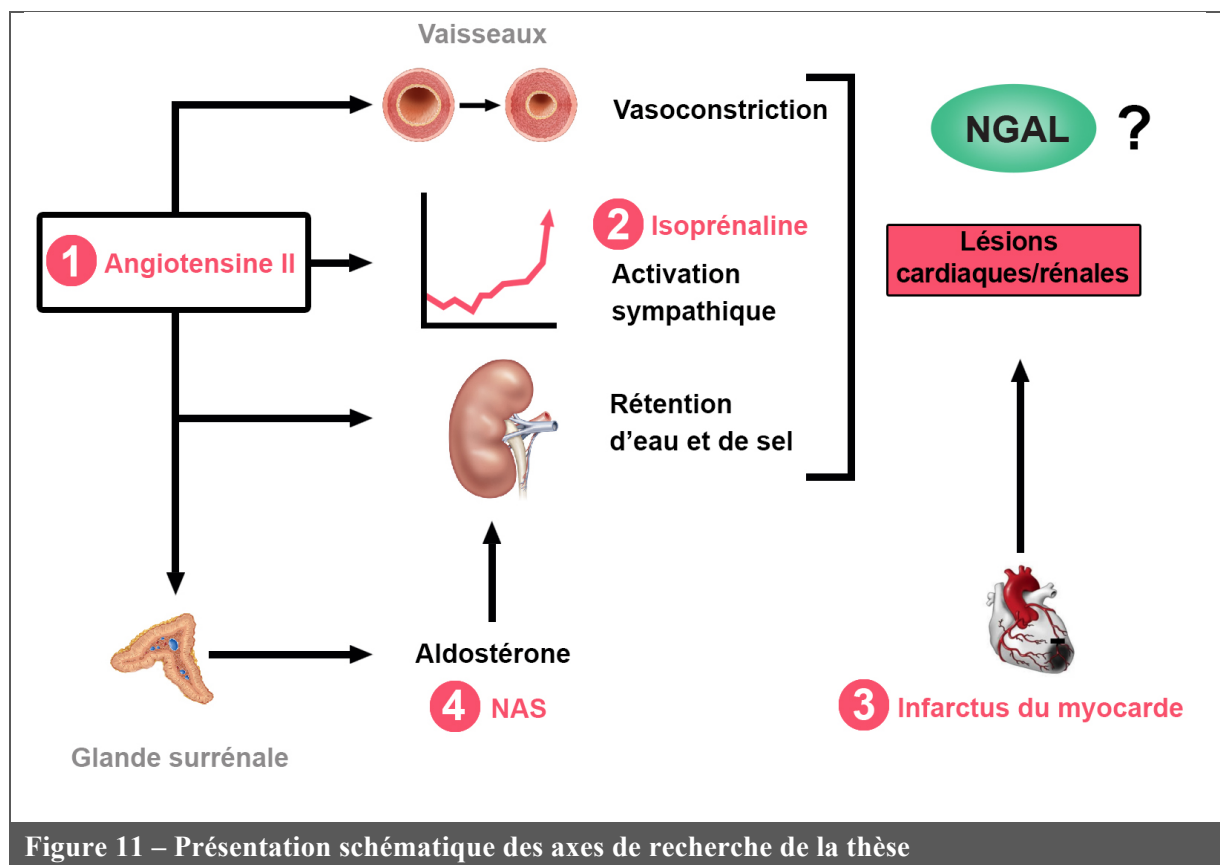


Figure 11 – Présentation schématique des axes de recherche de la thèse

II. MATERIEL & METHODES

Les méthodes utilisées dans les études en cours de publication sont décrites dans les articles 1 (chapitre IV-1.3) et 2 (chapitre IV-2). Les méthodes utilisées dans les études non publiées sont présentées ici. Le modèle de transplantation de moelle osseuse utilisée dans l'article 2 est également décrit ici en plus grands détails.

1 – Modèles animaux

1.1 Invalidation génique constitutive et totale de NGAL

Afin de pouvoir étudier l'implication de NGAL dans les effets délétères de différents modèles profibrotiques, nous avons réalisé nos expériences sur des souris présentant une invalidation génique constitutive et totale de NGAL (souris KO NGAL). 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). L'invalidation de NGAL est obtenue par l'insertion d'une cassette Néo dans le gène de NGAL [224]. Les souris sauvages (WT) servant de témoin pour nos expériences sont des souris WT « *littermates* » provenant de la même lignée.

1.2 Déplétion de NGAL dans les cellules immunitaires

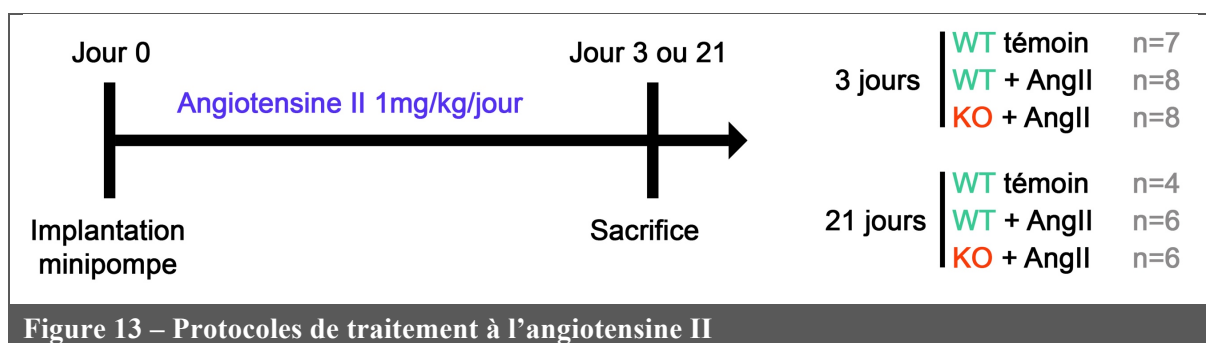
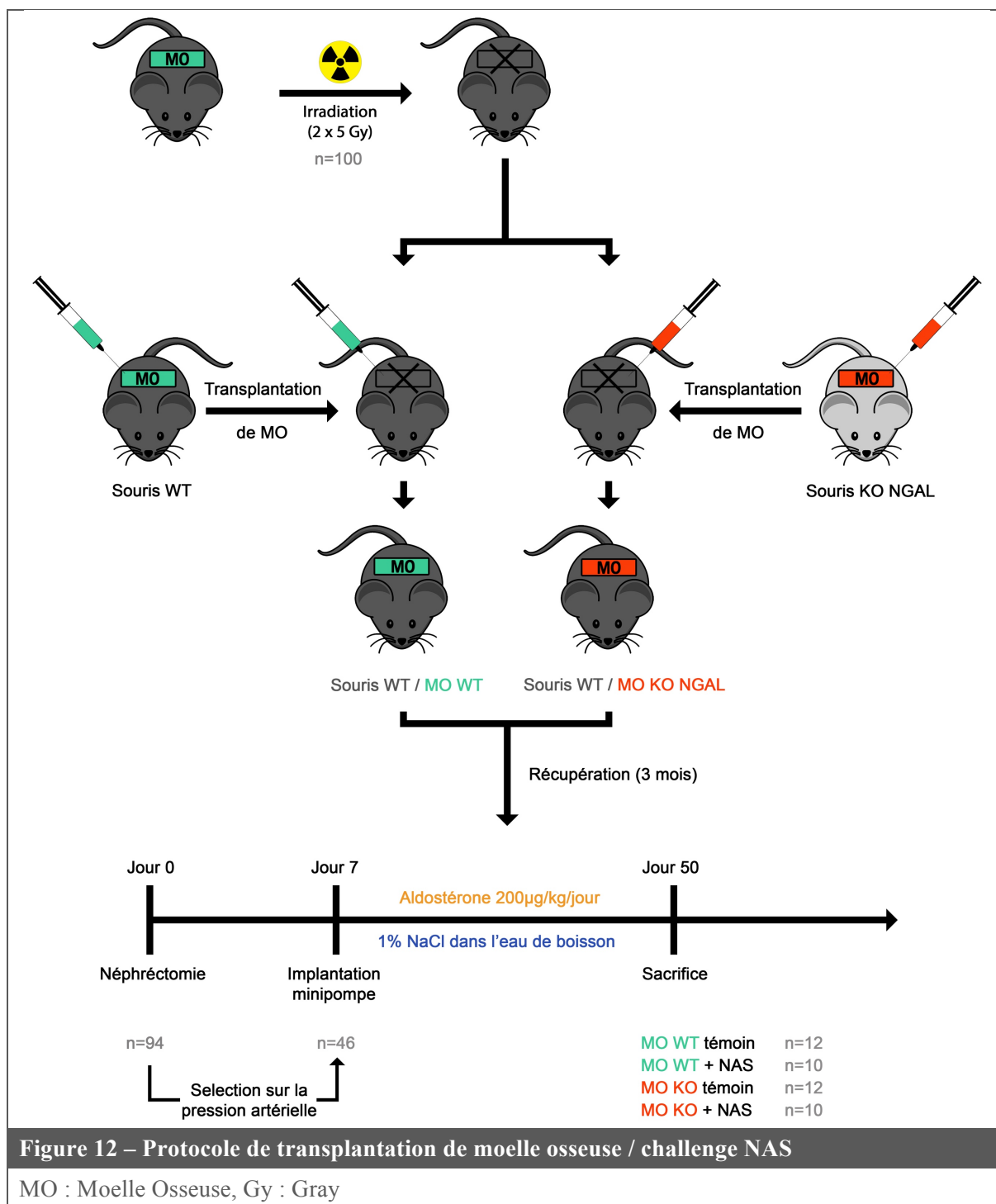
Afin d'analyser le rôle de la NGAL produite par les cellules immunitaires dans les effets délétères de l'activation du MR, nous avons réalisé un modèle de transplantation de moelle osseuse en partenariat avec l'animalerie de la Pitié Salpêtrière (Figure 12). Des souris WT sur fond génétique C57Bl6 ont été irradiées (deux irradiations de 5 Grays à 5h d'intervalle) puis transplantées avec de la moelle osseuse (10 millions de cellules) provenant de souris WT ou KO NGAL. Ce modèle nous a donc permis d'obtenir des souris présentant une invalidation génique de NGAL uniquement dans les cellules de la moelle osseuse, et donc dans les cellules immunitaires. Après une période de récupération de 3 mois, nous avons ensuite soumis les

souris au challenge Néphrectomie-Aldostérone-Sel (Aldo à 200µg/kg/jour, NaCl 1%) pendant 6 semaines (Figure 12).

Le modèle de transplantation de moelle osseuse est invasif et les souris irradiées sont fragiles. Dans nos premiers essais, la mortalité des souris était importante, en particulier chez les souris transplantées avec de la moelle WT (20% de mortalité contre 5% chez les souris transplantées avec de la moelle KO). De plus, la néphrectomie entraînait une hypotension chez certaines souris, ce qui rendait l'analyse des effets du NAS sur la pression artérielle impossible. Nous avons donc finalement décidé d'effectuer une sélection des souris avant de les soumettre au challenge NAS. Après la période de récupération, toutes les souris étaient néphrectomisées, puis leur pression artérielle était mesurée. Seuls les animaux chez lesquels la néphrectomie était sans effet sur la pression artérielle étaient ensuite inclus dans le protocole expérimental (Figure 12).

1.3 Traitement à l'angiotensine II

Les souris ont été anesthésiées par injection intrapéritonéale de kétamine et xylazine. Des minipompes osmotiques (Alzet, Etats-Unis) ont ensuite été implantées en sous-cutané sur le flanc des animaux, permettant de délivrer de l'AngII à une dose de 1 mg/kg/jour (Sigma-Aldrich, Etats-Unis) (animaux WT + Ang II et KO + AngII). Les souris ont ensuite été sacrifiées après 3 jours ou 3 semaines de traitement (Figure 13).



1.4 Traitement à l'isoprénaline

1.4.1 Modèle de traitement chronique à l'isoprénaline

De la même manière que pour l'AngII, des souris WT ont été implantées avec des minipompes osmotiques délivrant 35, 45, ou 60 mg/kg/jour d'isoprénaline. Les souris ont ensuite été sacrifiées 14 (pour la dose de 45mg/kg/jour) ou 28 jours après le début du traitement (Figure 14A).

1.4.2 Modèle de traitement aigu à l'isoprénaline

Des souris WT ou KO NGAL ont reçu 2 injections sous-cutanées par jours pendant deux jours d'isoprénaline à 150 mg/kg/injection. Les souris SHAM étaient injectées avec du sérum physiologique, solvant de l'isoprénaline. Les souris ont ensuite été sacrifiées 28 jours après la première injection (Figure 14B).

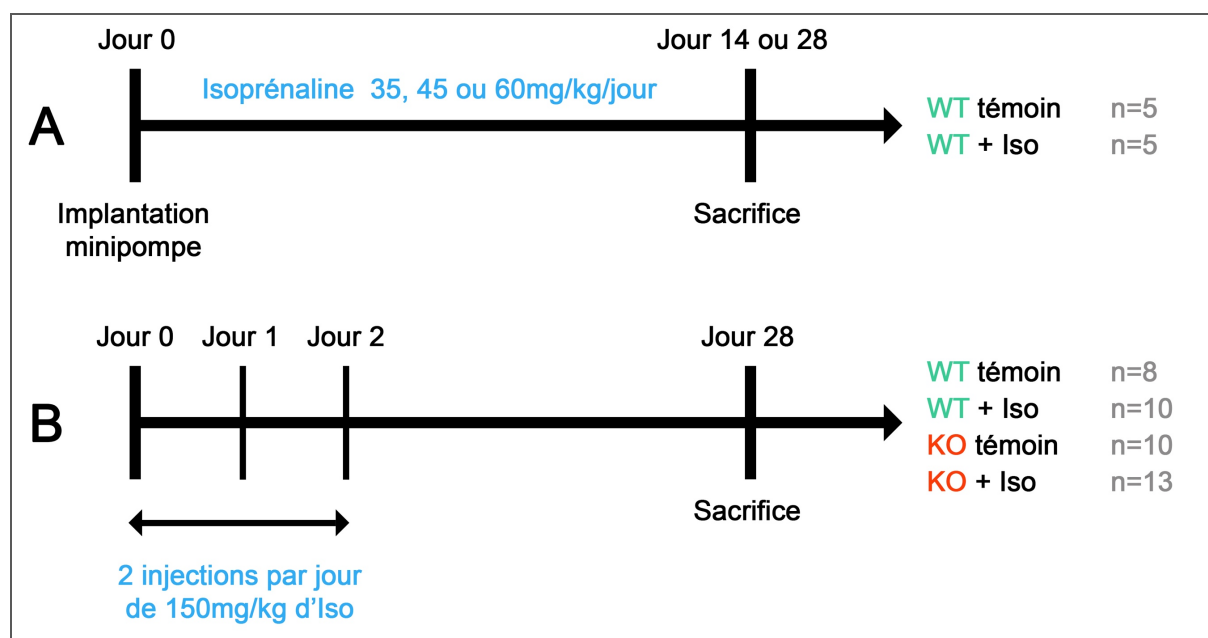


Figure 14 – Protocoles de traitement à l'isoprénaline

Traitement (A) chronique et (B) aigu à l'isoprénaline.

2 – Mesure de la pression artérielle

La pression artérielle systolique ainsi que la fréquence cardiaque des souris ont été mesurées à la queue (méthode de *tail-cuff plethysmography*) avec un appareil BP2000-Série 2 de chez Visitech Systems (Bioseb, Chaville, France) chez des souris conscientes, après une habitude de 4 jours précédant le début du traitement. Pour le traitement chronique à l'AngII, des mesures de pressions ont été réalisées 3 jours par semaine. Pour les protocoles de traitement chronique ou aigu à l'Iso, des mesures de pressions ont été réalisées tous les jours de la semaine précédant le sacrifice des animaux.

3 – Biologie moléculaire

3.1 Extraction et dosage de l'ARN des organes

Les apex des cœurs des souris ont été déposés dans des tubes à billes (Lysing matrix D, MP biomedicals, Etats-Unis) contenant 750 µL de Trizol (Life Technologies, Etats-Unis) puis broyés pendant 40 s à une vitesse de 6 m/s grâce à l'appareil Faspred (MP biomedicals, Etats-Unis). 200 µL de chloroforme (Sigma-Aldrich, Etats-Unis) ont ensuite été ajoutés aux broyas afin d'extraire l'ARN et le mélange a été centrifugé 15 min à 16000g et 4°C. La phase aqueuse supérieure d'environ 400 µL contenant l'ARN a été récupérée et mélangée à 400 µL d'isopropanol (Sigma-Aldrich, Etats-Unis) afin de le faire précipiter. Après centrifugation du mélange pendant 10 min à 16000g, à 4°C, le culot contenant l'ARN a été lavé avec de l'éthanol à 70% frais, puis resuspendu dans 50 µL d'eau DNase/RNase free (Qiagen, Allemagne). La concentration des solutions d'ARN obtenues de cette manière a finalement été mesurée en utilisant un spectrophotomètre à une longueur d'onde de 260 nm (Thermoscientific, Etats-Unis) et les échantillons ont été stockés à - 80°C.

3.2 Rétrotranscription et PCR quantitative

10 µg d'ARN de cœur ont été traités à la DNase (Qiagen, Allemagne) dans du tampon RDD (Qiagen, Allemagne) et 2 µg d'ARN traités ont ensuite été hybridés avec des amorces non spécifiques (Random Primers, Life Technologies) pendant 10 min à 70°C puis rétrotranscrits pendant 1h à 42°C à l'aide de l'enzyme M-MLV (Life Technologies) dans un volume final de 39 µL (24 µL de solution d'ARN traité à la DNase + 8 µL de Tampon 5X (Life Technologies) + 4 µL de DTT (Life Technologies) + 2 µL de dNTP à 10 mM (Life Technologies) + 1 µL d'enzyme M-MLV). Les ADNc concentrés obtenus ainsi ont ensuite été dilués afin d'obtenir des solutions à 1ng/µL. Une gamme de dilution permettant d'évaluer l'efficacité de la qPCR a également été réalisée en additionnant 6 µL de chacun des échantillons d'ADNc concentrés. Le premier point de gamme a été établi par une dilution de ce mélange au dixième et les quatre points suivant par dilutions successives au tiers.

La quantification de l'expression des gènes d'intérêt a été réalisée par qPCR en ajoutant 15 µL de mélange de réaction dans les 96 puits d'une plaque de qPCR (Biorad, Etats-Unis) contenant 6 µL d'ADNc à 1ng/µL ou de gamme, 1,5 µL d'amorces sens et antisens (5 mM) spécifiques du gène d'intérêt (Eurogentec, Belgique) et 9 µL d'un mix de qPCR contenant notamment du SYBR Green et de l'ADN polymérase (iQ SYBR Green Supermix, Biorad). L'amplification a été réalisée à l'aide d'un thermocycleur C1000 (Biorad, Etats-Unis) avec un cycle de dénaturation initiale de l'ADNc (95°C pendant 10 min) suivi de 40 cycles de dénaturation (95°C pendant 15 s), d'hybridation et d'élongation (60°C pendant 1 min). Les amorces utilisées sont les suivantes (Tableau 1) :

Amorces	Séquence sens (5' - 3')	Séquence antisens (3' - 5')
18S	CGC CGC TAG AGG TGA AAT TC	TCT TGG CAA ATG CTT TCG C
UBC	CGG AGT CGC CCG AGG TCA CA	GGG CTC GAC CTC CAG GGT GAT
β-actine	TTC TAC AAT GAG CTG CGT GTG	CAG GTC CAG ACG CAG GAT
NGAL	ATG TGC AAG TGG CCA CCA CG	CGC ATC CCA GTC AGC CAC AC
ANF	CTC GTC TTG GGC TTT TGG	TCG GGG AGG GAG CTA AGT
CTGF	AAC CGC AAG ATC GGA GTG TGC A	TCC TCG CAG CAT TTC CCA GGC A
Col-1	CCC CGG GAC TCC TGG ACT T	CCC CGG GAC TCC TGG ACT T
Col-3	CT GGA GCC CCT GGA CTA ATA G	GCC CAT TTG CAC CAG GTT CT
TGF-β	TGC GCT TGC AGA GAT TAA AA	CTG CCG TAC AAC TCC AGT GA
MCP-1	ATC CCA ATG AGT AGG CTG GAG AGC	CAG AAG TGC TTG AGG TGG TTG TG
CD-68	ACA AGG GAC ACT TCG GGC CA	GTC GTC TGC GGG TGA TGC AG
OPN	CCT GGC TGA ATT CTG AGG GAC	CTG CTT CTG AGA TGG GTC AGG
Fibronectine	CCA CCC CCA TAA GGC ATA GG	GTA GGG GTC AAA GCA CGA GTC ATC
Tableau 1 – Séquences des amorces utilisées pour la qPCR		

4 – Analyses histologiques

4.1 Marquage et quantification de la fibrose

Au moment du sacrifice, la tranche médiane du cœur des souris était placée dans du PFA à 4% pour fixation. Le lendemain, ces morceaux de cœur étaient lavés 3 fois 20 min dans du PBS puis stockés à 4°C dans de l'éthanol à 70%. Les organes étaient ensuite inclus en paraffine (McCormick Scientific, Etats-Unis) et des coupes de 5 µm étaient réalisées avec un microtome (RM 2125 RT Leica, Wetzlar, Germany).

Pour l'étude de la fibrose, des coupes de cœur ont été marquées au rouge Sirius afin de révéler les dépôts de collagène. Les coupes ont d'abord été déparaffinées dans des bains successifs de xylènes (deux bains de 10 min) (Sigma-Aldrich, Etats-Unis) et d'éthanol 100% (2 min), 90% (2 min) et 70% (2 min). Elles ont ensuite été colorées au rouge Picro-Sirius (0,1% de rouge Sirius dilué dans de l'acide picrique) pendant 1h puis rincées à l'eau courante. Les coupes marquées ont finalement été déshydratées par des bains successifs d'éthanol à 70% (2 min), 90% (2 min) et 100% (2 min) et de xylènes (deux bains de 10 min) avant d'être montées

sous lamelle en utilisant un produit de montage eukitt (O.Kindler GmbH, Allemagne). Des images des coupes ont été réalisées en utilisant un microscope Leica DM4000B couplé au logiciel Leica Application Suite (Leica, Wetzlar, Germany). La quantification de la fibrose a ensuite été réalisée grâce à l'utilisation du logiciel Fiji. Pour la mesure de la fibrose interstitielle, l'aire de la surface rouge correspondant aux dépôts de collagène a été divisée par l'aire de tissu total, ce qui a permis d'obtenir un pourcentage de fibrose. Ces mesures ont été effectuées sur des images en grossissement x100 couvrant le cœur entier. Pour la mesure de la fibrose périvasculaire, l'aire de la surface rouge entourant les vaisseaux a été divisée par l'aire des vaisseaux correspondants afin d'obtenir une quantification relative de la fibrose exprimée en unités arbitraires (U.A). Ces mesures ont été effectuées sur 6 à 12 images de vaisseaux par cœur au grossissement x400.

4.2 Immunohistochimie

Afin de réaliser un immunomarquage anti-NGAL, des coupes de cœur inclus en paraffine ont été déparaffinées comme pour le marquage au rouge Sirius et traitées à l' H_2O_2 à 3% pendant 10 min afin de bloquer l'activité peroxydase endogène du tissu. Les coupes ont ensuite été bloquées avec du sérum normal de cheval à 1% (NHS) dans du PBS pendant 30 min. Après le blocage, les coupes ont d'abord été incubées pendant 1h avec un anticorps primaire anti-NGAL produit chez la chèvre (R&D Systems, Etats-Unis) puis incubées pendant 30 min avec un anticorps secondaire anti-chèvre biotinylé (Vector Laboratories, Royaume-Unis) dilués respectivement à 1/100 et 1/400 dans du tampon de blocage (NHS 1%). Les coupes ont ensuite été incubées pendant 30 min avec une solution de streptavidine-HRP (Kit Vectastain ABC, Vector Laboratories), permettant de lier la peroxydase de radis (HRP) aux anticorps secondaires biotinylés grâce à l'affinité entre la streptavidine et la biotine. Finalement, un substrat coloré de la HRP, le 3,3'-Diaminobenzidine (DAB) (DAB Substrate Kit, BD Biosciences, Etats-Unis),

a été ajouté aux coupes pendant 10 min, permettant de révéler les anticorps secondaires et donc NGAL par une coloration marron.

5 – Analyses statistiques

Les résultats sont présentés sous forme de moyenne \pm erreur type de la moyenne (SEM). Les analyses statistiques sur deux groupes ont été réalisées par un équivalent non paramétrique du t-test adapté aux petits échantillons, le test de Mann-Whitney. Les analyses statistiques sur trois groupes ont été réalisées par un équivalent non paramétrique de l'ANOVA à un facteur adapté aux petits échantillons, le test de Kruskal-Wallis, suivi du post-test de comparaisons multiples de Dunns. Les analyses statistiques sur les pressions artérielles ou sur quatre groupes ont été réalisées par ANOVA à deux facteurs (temps et traitement ou génotypes et traitement) suivie du post-test de comparaisons multiples de Tukey. Les analyses statistiques ont été réalisées à l'aide du logiciel GraphPad Prism (V.6.01). Des valeurs de $p < 0,05$ ont été considérées comme significatives.

IV. RESULTATS

1 – Spécificité du rôle de NGAL dans la fibrose induite par l'activation du MR

Les travaux récents de notre laboratoire ont permis de mettre en évidence le rôle primordial de NGAL dans les effets délétères de l'activation du MR par l'Aldo et, en particulier, son implication dans les mécanismes profibrotiques [323]. Nous avons voulu savoir si l'implication de NGAL dans ces mécanismes était spécifique des effets de l'activation du MR par l'Aldo ou si NGAL pouvait également jouer un rôle dans d'autres modèles de fibrose cardiaque. Pour répondre à cette question, nous avons étudié l'effet de l'inactivation génique de NGAL dans 3 modèles de fibrose cardiaque différents du challenge NAS :

1.1 Un modèle de traitement à l'Angiotensine II

1.2 Un modèle de traitement à l'Isoprénaline

1.3 Un modèle d'infarctus du myocarde par ligature de l'artère coronaire gauche

1.1 Modèle de traitement à l'Angiotensine II

Le traitement à l'AngII est un modèle de pathologie CV couramment utilisé chez le rongeur. Une infusion chronique d'AngII induit une hypertension artérielle ainsi qu'une hypertrophie et une fibrose cardiaque [335]. Des données obtenues par une équipe collaboratrice au Pays-Bas (Stéphane Heymans, Pays-Bas) ont permis de mettre en évidence une augmentation de l'expression de NGAL dans le cœur de souris traitées avec de l'AngII. Cet effet est précoce et transitoire, avec une très forte induction de NGAL dans les premiers jours de traitement mais qui diminue rapidement et disparaît après une semaine de traitement (Figure 15A). De manière intéressante, cette augmentation précoce de l'expression de NGAL est associée à une induction de l'infiltration immunitaire dans le cœur des souris traitées qui suit le même profil transitoire (Figure 15B).

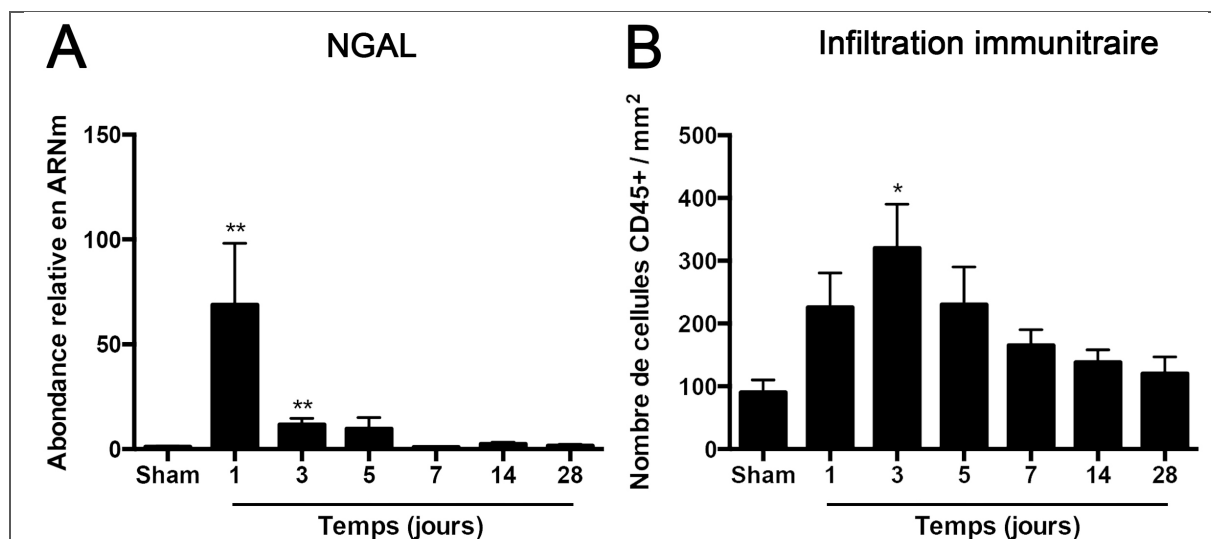


Figure 15 – Cinétique de l'expression de NGAL et de l'infiltration immunitaire dans le cœur de souris soumises à un traitement à l'AngII (2,5mg/kg/jour)

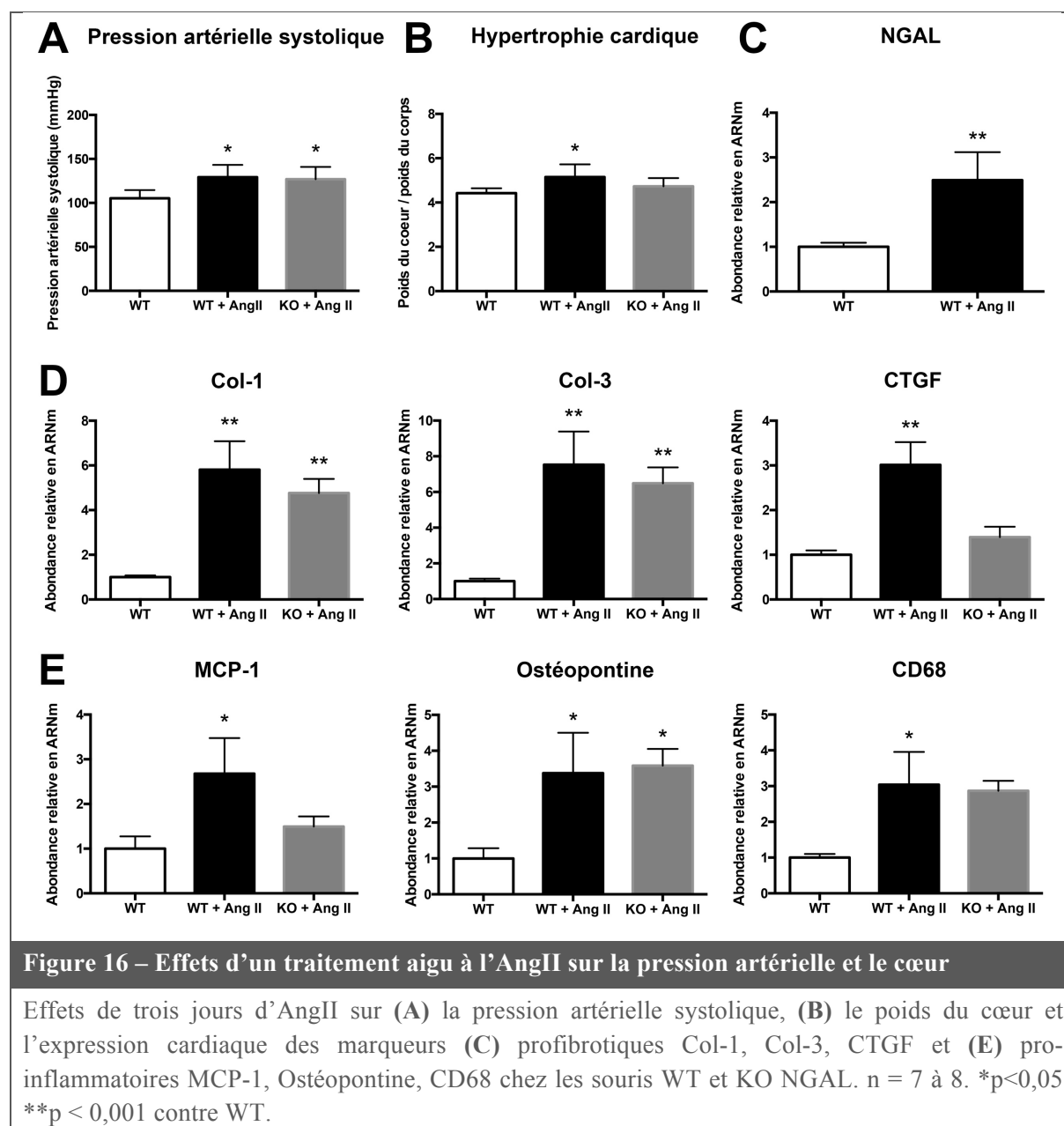
(A) Mesure de l'abondance cardiaque relative de l'ARNm codant pour NGAL par qPCR, à chaque temps, exprimée en nombre de fois par rapport au groupe témoin (Sham). La normalisation de l'abondance a été effectuée par rapport au gène de ménage GAPDH. (B) Quantification de l'immunomarquage anti-CD45+ (marqueur commun des leucocytes) réalisé sur coupe de cœur. Groupe Sham (n = 6) et n = 5 à chaque temps. *p < 0,05 **p < 0,01 (test de Mann-Whitney) contre Sham. Données non publiées de l'équipe de Stéphane Heymans, Pays-Bas.

1.1.1 Modèle de traitement aigu à l'Angiotensine II

L'expression de NGAL induite par l'AngII étant précoce, nous nous sommes placé à un temps précoce afin d'étudier son implication potentielle dans les effets de l'AngII. Nous avons donc traité des souris invalidées (KO NGAL) ou non (WT) pour NGAL avec de l'AngII pendant 3 jours à une dose modérée de 1mg/kg/jour.

Les souris WT et KO NGAL traitées présentaient une augmentation similaire de pression artérielle systolique après 3 jours d'AngII (Figure 16A). L'invalidation génique de NGAL ne prévient donc pas l'augmentation de pression induite par un traitement aigu à l'AngII. Les souris WT traitées présentaient par ailleurs une hypertrophie cardiaque (Figure 16B) ainsi qu'une induction de l'expression cardiaque de NGAL (Figure 16C) et des marqueurs profibrotiques Col-1, Col-3, CTGF (Figure 16D) et pro-inflammatoires MCP-1, Ostéopontine, et CD68 (Figure 16E). Certains de ces effets étaient également observés chez les souris KO

traitées (induction de Col-1, Col-3, Ostéopontine) alors que d'autres semblaient partiellement prévenus par l'invalidation génique de NGAL (hypertrophie cardiaque, induction de CTGF, MCP-1, CD68) mais sans qu'aucune différence significative ne puisse être établie en comparaison des souris WT traitées.



1.1.2 Modèle de traitement chronique à l'Angiotensine II

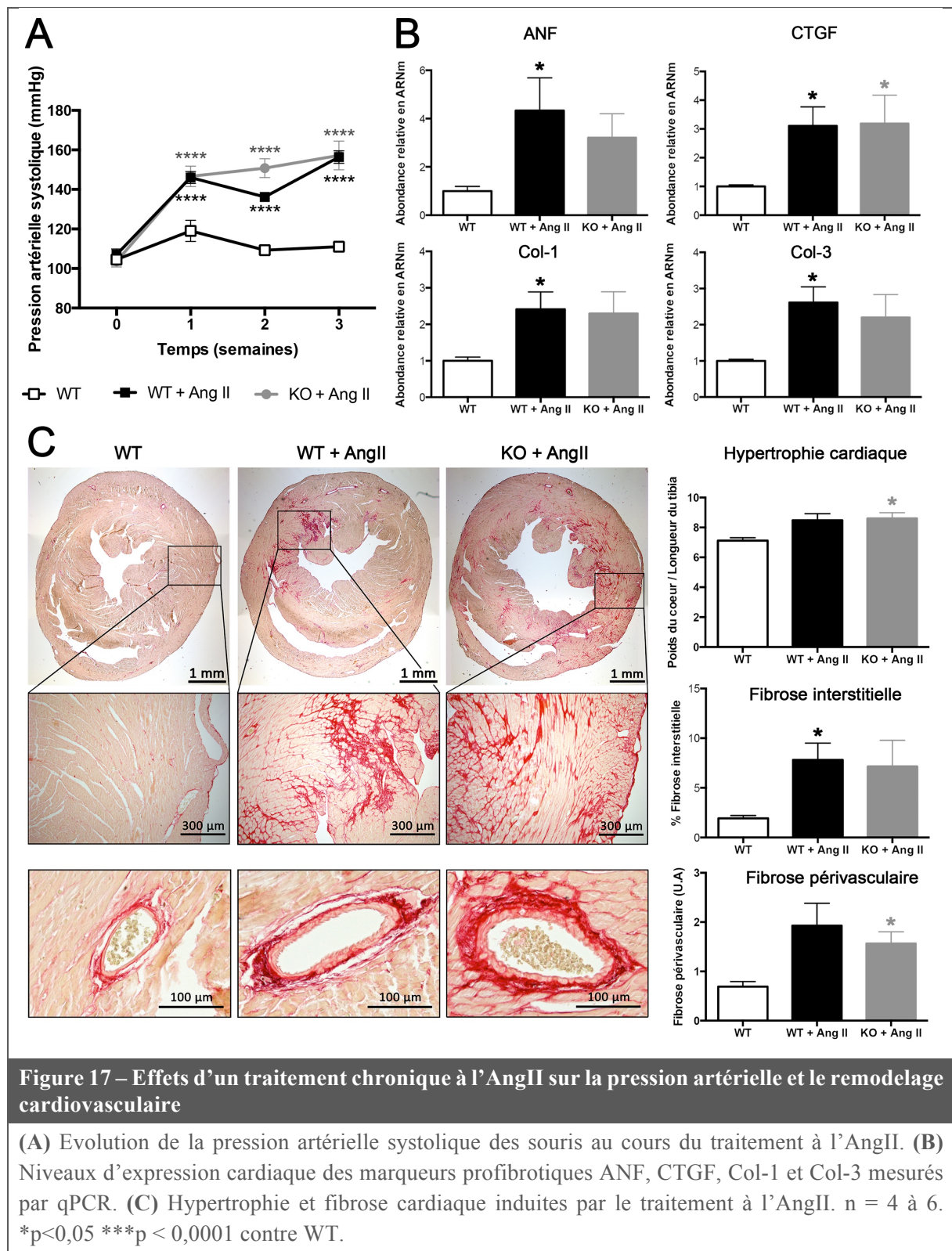
Nous avons ensuite voulu analyser l'implication potentielle de l'induction précoce de NGAL dans les effets profibrotiques d'un traitement chronique à l'AngII. Nous avons donc traité des souris WT et KO NGAL avec de l'AngII à la même dose de 1 mg/kg/jour mais pendant 3 semaines.

1.1.2.1 L'invalidation génique de NGAL ne prévient pas l'hypertension artérielle induite par un traitement chronique à l'AngII

Afin d'étudier l'effet de l'invalidation de NGAL sur l'augmentation de pression artérielle induite par l'AngII, nous avons réalisé des mesures de pression durant les trois semaines de traitement (Figure 17A). Après une semaine, la pression artérielle des souris traitées était significativement augmentée par rapport aux souris témoins (environ 146 mmHg contre 118 mmHg) et est restée élevée jusqu'à la fin du traitement (environ 157 mmHg contre 110 mmHg à 3 semaines de traitement). Cependant, aucune différence de pression n'a pu être observée entre les souris WT et KO traitées à l'AngII (Figure 17A). L'invalidation génique de NGAL ne prévient donc pas l'augmentation de pression induite par le traitement chronique à l'AngII.

1.1.2.2 L'invalidation génique de NGAL ne prévient pas la fibrose cardiaque induite par un traitement chronique à l'AngII

Après 3 semaines de traitement, les souris traitées avec l'AngII présentaient une hypertrophie cardiaque (Figure 17C), une induction de marqueurs de remodelage (ANF, CTGF, Col I et Col III) (Figure 17B) ainsi qu'une fibrose interstitielle et périvasculaire importante révélée par marquage au rouge Sirius sur coupe de cœur (Figure 17C). Cependant, aucun de ces effets délétères induits par le traitement à l'AngII n'était prévenu chez les souris KO.



1.1.2.3 L'AngII n'induit pas d'inflammation ou d'expression de NGAL après 3 semaines de traitement

Le niveau d'expression de NGAL mesuré par qPCR n'était pas augmenté chez les souris traitées après 3 semaines d'AngII (Figure 18A). Ce résultat était retrouvé au niveau protéique par une absence d'immunomarquage anti-NGAL similaire chez les souris traitées et témoins (Figure 18B). Ce dernier résultat manque cependant de robustesse car, en l'absence de contrôle positif, nous n'avons pas pu vérifier la validité de l'immunolocalisation. De manière intéressante, l'analyse de l'expression de marqueurs pro-inflammatoires (TGF- β , MCP-1 et CD-68) n'a pas révélé de statut inflammatoire cardiaque chez les souris traitées après 3 semaines d'AngII (Figure 18C).

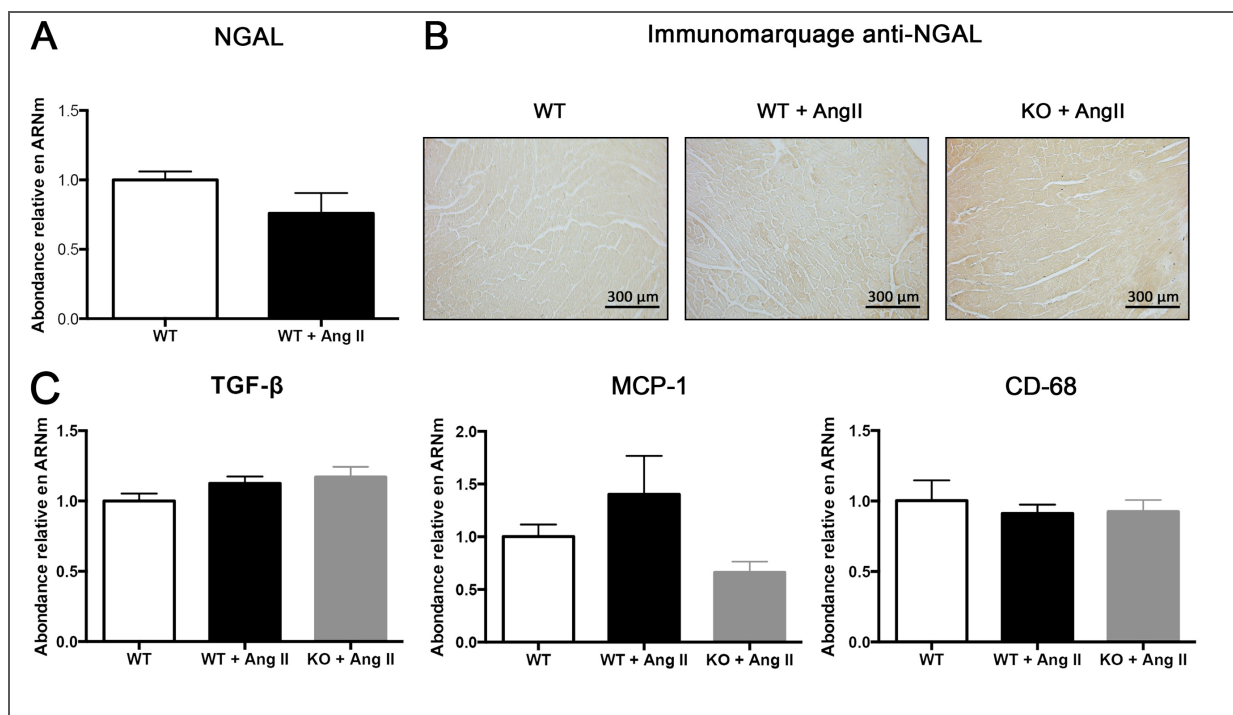


Figure 18 – Effets de l'AngII sur l'expression de NGAL et l'inflammation cardiaque

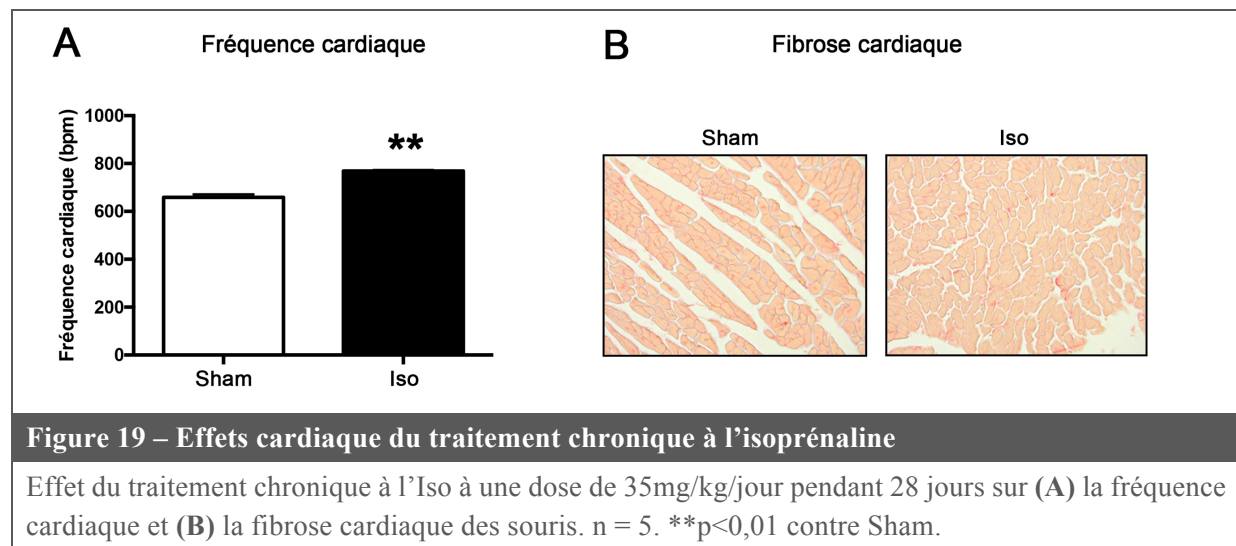
(A) Niveaux d'expression cardiaque de NGAL mesurés par qPCR. (B) Immunomarquage anti-NGAL sur coupe de cœur. (C) Niveaux d'expression cardiaque des marqueurs pro-inflammatoires TGF- β , MCP-1 et CD-68 mesurés par qPCR. n = 4 à 6.

1.2 Modèle de traitement à l'isoprénaline

L'isoprénaline (Iso), également appelée isoprotérénol, est un agoniste β -adrénergique capable d'induire une augmentation de la fréquence et de la contractilité cardiaque. Le traitement pharmacologique à l'Iso est un modèle de pathologie CV induisant une nécrose des cardiomyocytes et une fibrose cardiaque [335].

1.2.1 Modèle de traitement chronique à l'isoprénaline

Afin de mettre au point le modèle de fibrose cardiaque induite par traitement chronique à l'Iso, nous avons testé différentes doses décrites dans la littérature : 35, 45 et 60 mg/kg/jour pendant 14 ou 28 jours [336–338]. Notre protocole était efficace, comme en atteste l'augmentation du rythme cardiaque observée chez les souris traitées (Figure 19A), mais aucunes des doses testées n'a permis d'induire de fibrose cardiaque chez la souris C57Bl6 dans nos conditions expérimentales (Figure 19B).



1.2.2 Modèle de traitement aigu à l'isoprénaline

Face à l'absence de fibrose dans le modèle chronique, nous avons décidé de tester un modèle profibrotique de traitement aigu à forte dose d'Iso utilisé récemment par Vergaro *et al.*

[339] : 2 injections par jour d'Iso à 150 mg/kg/injection pendant 2 jours. Suite aux injections, nous avons évalué la fibrose cardiaque 28 jours plus tard. Comme pour le traitement à l'AngII, nous avons étudié l'implication potentielle de NGAL dans les effets profibrotiques de l'Iso grâce à l'utilisation de souris KO NGAL.

Au moment du sacrifice, les souris injectées à l'Iso avaient une pression artérielle (Figure 20A) et une fréquence cardiaque (Figure 20B) normales ainsi qu'un cœur de poids similaire aux souris témoins (Figure 20F). L'expression cardiaque de NGAL était augmentée chez les souris traitées à l'Iso (Figure 20C). De plus, le cœur des souris traitées présentait une fibrose cardiaque (Figure 20F) ainsi qu'une légère augmentation (non significative) de l'expression de marqueurs profibrotiques (Figure 20D). Ces effets profibrotiques de l'Iso n'étaient cependant pas prévenus chez les souris KO. Par ailleurs, l'exploration de marqueurs pro-inflammatoires (Figure 20E) n'a pas permis de mettre en évidence de statut inflammatoire cardiaque chez les souris traitées 4 semaines après l'injection d'Iso.

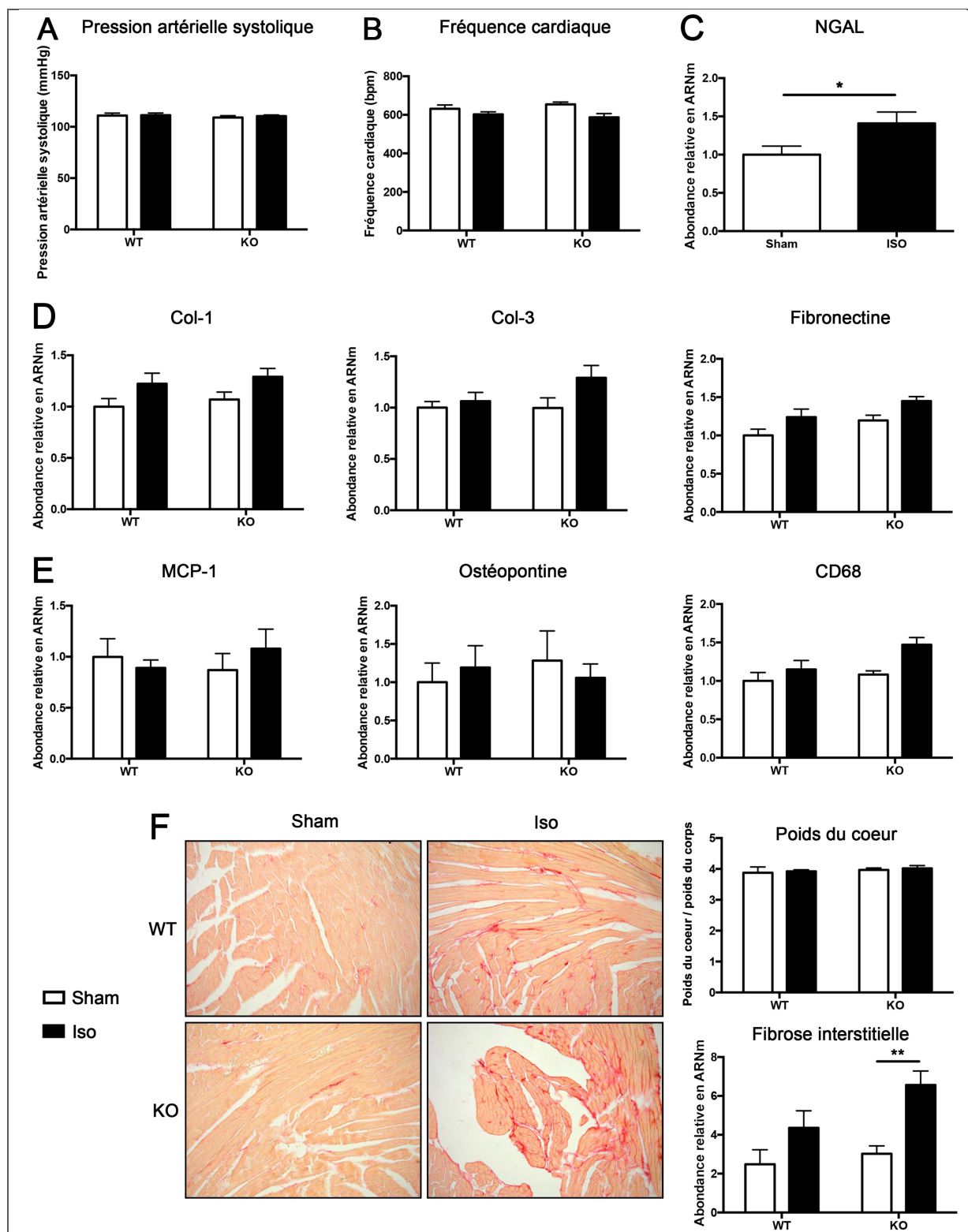


Figure 20 – Effets du traitement aigu à l'isoprénaline

Effet du traitement aigu à l'Iso sur (A) la pression artérielle systolique, (B) la fréquence cardiaque, (D) l'expression cardiaque de NGAL et des marqueurs (E) profibrotiques Col-1, Col-3, fibronectine et pro-inflammatoires MCP-1, Ostéopontine, CD68 ainsi que (F) sur le poids du cœur et la fibrose cardiaque chez les souris WT et KO NGAL. n = 8 à 13. *p<0,05 **p<0,01 contre Sham.

1.3 Modèle d'infarctus du myocarde par ligature de l'artère coronaire gauche

Les résultats de ce chapitre, résumés ici en français, ont été obtenus en étroite collaboration avec une équipe de Rouen (Antoine Ouvrard-Pascaud, Rouen) et sont acceptés pour publication dans le journal *Hypertension*. L'article, rédigé par Ernesto Martinez-Martinez, post-doctorant dans notre laboratoire, est inséré dans les pages suivantes.

La ligature coronaire gauche est un modèle classique d'infarctus du myocarde (IM) chez le rongeur. L'ischémie induite par la ligature entraîne une nécrose myocardique et une fibrose interstitielle associée à une dégradation de la fonction cardiaque [335]. Afin d'étudier l'implication potentielle de NGAL dans les conséquences délétères de l'IM, nous avons une nouvelle fois utilisé des souris KO NGAL que nous avons soumises à une ligature coronaire gauche, réalisée par nos collaborateurs de Rouen.

Une semaine après l'IM, le niveau cardiaque de NGAL était augmenté chez les souris ligaturées et cette augmentation était prévenue par un traitement avec de la finérénone, un antagoniste du MR. La fibrose interstitielle cardiaque induite par l'IM trois mois après l'opération était moins importante chez les souris KO ligaturés (KO-IM) que chez les souris WT ligaturées (WT-IM). Les analyses fonctionnelles réalisées par nos collaborateurs de Rouen ont de plus mis en évidence une fonction cardiaque améliorée chez les souris KO-IM par rapport aux souris WT-IM, avec une meilleure contractilité et une meilleure compliance ventriculaire gauche, ainsi qu'un volume d'éjection systolique et un débit cardiaque augmentés.

Par ailleurs, l'utilisation de fibroblastes cardiaques humains en culture a permis d'explorer le rôle profibrotique de la cascade Aldo/MR/NGAL *in vitro*. Le traitement de ces cellules avec de l'Aldo (10^{-8} M) induisait une augmentation de l'expression de NGAL ainsi qu'une augmentation de la production de Col-1. Le traitement des cellules avec de la NGAL recombinante humaine induisait également la production de Col-1. Ces résultats soulignent

donc le rôle profibrotique direct de l'Aldo et de NGAL dans ce modèle cellulaire. De manière intéressante, l'induction de Col-1 par l'Aldo était bloquée par l'ajout de finérénone ou d'un siRNA anti-NGAL, indiquant donc que cet effet profibrotique passe par l'activation du MR et par l'induction de l'expression de NGAL qui en résulte. Enfin, l'utilisation d'un inhibiteur de la voie NFκB prévenait les effets profibrotiques de l'Aldo et de NGAL dans les fibroblastes cardiaques humains, mettant en évidence le rôle important de cette voie de signalisation dans la médiation des effets profibrotiques de la cascade Aldo/MR/NGAL.

Article 1

The aldosterone target NGAL is involved in cardiac remodeling after myocardial infarction through NF κ B pathway



Accepted in Hypertension

The aldosterone target NGAL is involved in cardiac remodeling after myocardial infarction through NFκB pathway

Ernesto Martínez-Martínez, PhD¹, **Mathieu Buonafine, MSc¹**, Ines Boukhalfa, MSc², Jaime Ibarrola, MSc³, Amaya Fernández-Celis³, Peter Kolkhof, PhD⁴, Patrick Rossignol, MD, PhD⁵, Nicolas Girerd, MD⁵, Paul Mulder, PhD², Natalia López-Andrés, PhD^{3,5}, Antoine Ouvrard-Pascaud, PhD^{2*}, Frédéric Jaisser, MD, PhD^{1*}

¹INSERM, UMRS 1138, Team 1, Centre de Recherche des Cordeliers, Pierre et Marie Curie University, Paris Descartes University, Paris, France. ²Inserm U1096, UFR Médecine-Pharmacie, Rouen, France. ³Cardiovascular Translational Research. Navarrabiomed (Miguel Servet Foundation), Instituto de Investigación Sanitaria de Navarra (IdiSNA), Pamplona. Spain. ⁴BAYER AG, Cardiology Research, Wuppertal, Germany. ⁵INSERM, Centre d'Investigations Cliniques-Plurithématique 1433, UMR 1116 Université de Lorraine, CHRU de Nancy, French-Clinical Research Infrastructure Network (F-CRIN) INI-CRCT, Nancy, France.

*Both authors contributed equally to this work.

Short title: NGAL in myocardial infarction

Corresponding author:

Dr. Frédéric Jaisser

INSERM U1138, Centre de Recherche de Cordeliers, Team 1. 15 rue de l'Ecole de Médecine, 75006, Paris, France. Tel: +33144278106. Fax: +33144276421

E-mail: frederic.jaisser@inserm.fr

ABSTRACT

Myocardial Infarction (MI) is accompanied by cardiac fibrosis, which contributes to cardiac dysfunction. Mineralocorticoid receptor (MR) antagonists have beneficial effects in patients with left ventricle (LV) dysfunction after MI. We herein investigated the role of the MR target Neutrophil Gelatinase–Associated Lipocalin (NGAL) in post-MI cardiac damages.

Both higher baseline NGAL and a greater increase in serum NGAL levels during follow-up were significantly associated with lower six-month LV ejection fraction recovery in a cohort of 119 post-MI patients, as assessed by cardiac magnetic resonance imaging. NGAL protein levels increased in the LV at seven days post-MI in wild type mice with left coronary artery ligation (WT-MI). This effect was prevented by treatment with the non-steroidal MR antagonist finerenone (1mg/kg/day). NGAL knock-out mice with MI (NGAL KO-MI) had lower LV interstitial fibrosis and inflammation, better LV contractility and compliance, and greater stroke volume and cardiac output than WT-MI at three months post-MI. Aldosterone (10^{-8} M) increased NGAL expression in cultured human cardiac fibroblasts. Cells treated with aldosterone or NGAL (500 ng/ml) showed increased production of collagen type I. The effects of aldosterone were abolished by finerenone (10^{-6} M) or NGAL knock-down. This NGAL-mediated activity relied on NF κ B activation, confirmed by use of the NF κ B specific inhibitor BAY11-7082, which prevented the effect of both aldosterone and NGAL on collagen type I production.

In conclusion, NGAL, a downstream MR activation target, is a key mediator of post-MI cardiac damage. NGAL may be a potential therapeutic target in cardiovascular pathological situations in which MR is involved.

Keywords: fibrosis, mineralocorticoid receptor, myocardial infarction, neutrophil gelatinase–associated lipocalin.

INTRODUCTION

Myocardial infarction (MI) is increasing worldwide and is a major cause of death in industrialized countries, with approximately 25% of patients developing congestive heart failure (HF).¹ MI is associated with adverse left ventricular (LV) remodeling, involving cardiomyocyte hypertrophy and cardiac fibrosis, which together contribute to alterations in cardiac architecture and ischemic HF.² Identification of novel therapeutic targets to reduce cardiac remodeling, post-infarct, is a current challenge.

Aldosterone, via activation of the mineralocorticoid receptor (MR), is a key regulator of blood pressure and electrolytic balance.³ It plays an important role in cardiac remodeling via the MR, promoting inflammation, fibrosis, and hypertrophy.⁴⁻⁶ Previous studies have demonstrated the beneficial effects of mineralocorticoid receptor antagonists (MRAs) in preclinical models of MI⁷ and in patients with HF following MI. The Eplerenone Post-Acute Myocardial Infarction Heart Failure Efficacy and Survival Study (EPHESUS)⁸ reported that the addition of eplerenone to standard medical therapy improved survival in patients with LV dysfunction after MI. The beneficial effects of MRAs, post-MI, have also been demonstrated in patients without HF.⁹ A recent study has demonstrated that a nonsteroidal MRA, finerenone, improved LV and coronary function post-MI.¹⁰ Despite accumulating evidence that MRAs are beneficial in MI, a better understanding of the underlying mechanism linking MR activation and its impact on MI is critical and may help to identify new biotargets in MI.

Lipocalin 2 (Lcn2), also known in humans as neutrophil gelatinase–associated lipocalin (NGAL) or oncogene 24p3, was previously identified as a novel MR target in the cardiovascular system.¹¹⁻¹³ NGAL is a 25 kDa glycoprotein belonging to the lipocalin superfamily.^{14, 15} In a recent study from our group, we demonstrated that NGAL plays a key role in blood pressure and cardiovascular extracellular matrix (ECM) remodeling after MR activation. Genetic NGAL inactivation in mice blunted hypertension and vascular fibrosis induced by aldosterone-salt

challenge.¹² We hypothesized that the MR target NGAL is a key factor in the development of cardiac fibrosis and cardiac dysfunction induced by MI, as MR activation is associated with deleterious effects in MI.

We studied the direct effects of NGAL on cardiac function and ECM remodeling by combining a clinical survey of NGAL serum levels in a cohort of post-MI-patients and preclinical studies in NGAL knockout mice subjected to left coronary artery ligations. We explored underlying mechanisms in primary cultures of human cardiac fibroblasts, one of the major cellular components of the heart.

METHODS

Detailed methods are available in the supplemental material

Post-myocardial infarction cohort

The study population was comprised of 119 patients who were successfully reperfused following a first acute STEMI, included in a prospective monocentric cohort study (Relation Between Aldosterone and Cardiac Remodeling After Myocardial Infarction - REMI Study), performed in a university hospital between April 2010 and December 2013.¹⁶ Patients underwent cardiac magnetic resonance (CMR) during the first four days of the acute event and at the six-month follow-up. The study was approved by an institutional review committee and the subjects gave informed consent. It was sponsored by the Nancy CHRU.

Myocardial infarction

Experiments conformed to the 2010/63 directive of the EU and the *Guide for Care and Use of Laboratory Animals* of the US National Institute of Health (No.85-23). Left coronary artery ligations were performed in eight-week-old male NGAL KO C57BL/6J mice (NGAL KO-MI, n = 6-13) and wild type littermates (WT-MI; n = 6-13) under anesthesia (3.6mg/kg xylazine, IP, plus 2% isoflurane). Analgesia was induced using buprenorphine (0.05 mg/kg, SC) just after induction of anesthesia and after 6, 12, 24, and 48 h following coronary artery ligation. The snare was not tied for sham-operated mice (WT-Sham; n=6-9). Finerenone (1 mg/kg/day) was administered as a food additive for seven days, starting the day after MI (Fine-MI).

Cell culture

Human cardiac fibroblasts were obtained from Promocell and maintained in medium (Fibroblast Media 3). Cells were cultured according to the manufacturer's instructions and used

between passages 5 and 7. Cells were stimulated with aldosterone (10^{-8} M, Sigma), finerenone (10^{-6} M, Bayer), or recombinant hNGAL (500 ng/mL, R&D Systems) for 24 h for protein analysis. The doses were chosen based on previous studies.^{6, 12}

For the study of the intracellular pathways, cells were treated with recombinant hNGAL for 5, 10, 30, and 60 min. The chemical inhibitors PD98059 (Sigma Aldrich) and BAY 11-7082 (Sigma Aldrich) were added at 10^{-5} mol/L 1 h prior to NGAL stimulation.

Statistics

Data are presented as the means \pm SEM. Student's t test (2-tailed) was used to compare paired groups of independent samples. ANOVA with Bonferroni adjustment for post-hoc tests was used for multiple comparisons.

Continuous data from the REMI cohort are presented either as the means + SD or the median (25-75 percentile). A paired t-test was used to compare values obtained at baseline and six months. The associations between baseline NGAL levels and changes in NGAL levels with LVEF recovery were evaluated using multivariable linear regression models. The outcome variable of this model was the change in the LVEF between baseline and six months, expressed as a continuous variable. Thus, a positive Beta value provided by the linear regression model indicates greater LVEF recovery (i.e. an increased LVEF within six months of the baseline evaluation). Adjustment variables were selected *a priori* based on their known association with post-myocardial infarction remodeling.

Data analysis was performed using GraphPad Prism V6.01 (GraphPad Software, San Diego, CA) Software Inc and SAS version 9.3 (SAS Institute Inc., Cary, N.C., USA). The predetermined significance level was $P < 0.05$.

RESULTS

NGAL is associated with lower LV ejection fraction recovery in patients following myocardial infarction

The study group consisted of 119 post-myocardial infarction patients: 56 ± 10 years-old, 85.7% men, Killip class 2-3 9.2%, baseline median BNP 152 pg/mL (80-257), loop diuretics at baseline 2.1%. Overall, NGAL levels remained stable during follow-up (71.6 ng/mL (60.3-91.3) at baseline vs 71.7 ng/mL (55.9-89.0) at six months ($p = 0.35$)) and the LVEF rose from $42 \pm 8\%$ to $49 \pm 9\%$ ($p < 0.001$). In multivariable linear regression adjusted for anterior myocardial location, baseline BNP, baseline infarct size, and baseline LVEF, both higher baseline serum NGAL levels (Beta per 10 ng/mL increase = -0.82 ± 0.25 , $p = 0.001$) and a larger increase in serum NGAL levels during follow-up (Beta per 10 ng/mL increase = -0.82 ± 0.22 , $p = 0.0003$) were significantly associated with lower recovery of LVEF after six months, evaluated by cardiac magnetic imaging (Table 1).

Inactivation of NGAL improves LV function and cardiac remodeling in MI

We investigated the role of NGAL in the recovery of LV function and cardiac remodeling following MI in mice by inducing MI in NGAL KO mice and wild type littermates. Of note, all functional and histological parameters were similar between WT-Sham and NGAL KO-Sham mice (Sup table 1). We measured a 1.7-fold increase in cardiac NGAL protein levels at seven days post-MI in wild-type mice (Sup fig S1) and aldosterone plasma levels in WT-MI mice (572.8 ± 6.9 pg/mL) as compared to WT-Sham mice (416.7 ± 6.9 pg/mL; $p < 0.05$). Echocardiography showed that WT-MI mice at seven days post-MI displayed greater LV end-systolic and end-diastolic diameters (LVESD and LVEDD) than sham-operated (WT-Sham) mice, together with reduced fractional shortening without modifications in stroke volume or in

cardiac output. NGAL KO-MI mice partly blunted the modifications in LV diameters observed in WT-MI mice (Sup table 2). Infarct size was similar between wild type mice with MI (WT-MI) and NGAL KO mice with MI (NGAL KO-MI) (%: WT-MI 34 ± 3 , $n = 9$ vs. NGAL KO-MI 39 ± 4 , $n = 8$; NS).

Echocardiography data three months post-MI showed that WT-MI mice displayed greater LVESD and LVEDD than WT-Sham, together with reduced fractional shortening (Table 2). This was accompanied by decreased stroke volume and reduced cardiac output in the WT-MI mice. NGAL KO-MI mice had a lower LVESD, with a trend toward better fractional shortening, than WT-MI mice, participating in the improvement of both stroke volume and cardiac output at three months post-MI (Table 2).

Three months post-MI, LV hemodynamic studies showed that the dP/dt_{\max} and dP/dt_{\min} rates of LV pressure rise and fall, taken as indices of global LV contractility and diastolic function, were negatively altered in WT-MI versus WT-Sham mice, but were much less strongly affected in KO NGAL-MI mice (Table 2). LV pressure volume-curves showed that there was no modification of LV end-systolic pressure (LVESP) (Figure 1A), and no significant increase in LV end-diastolic pressure (LVEDP), i.e. LV filling pressure, in the KO NGAL-MI mice relative to WT-Sham mice (Figure 1B). However, WT-MI mice had a lower LV end-systolic pressure–volume relation (LVESPVR) (Figure 1A) and higher LV end-diastolic pressure–volume relation (LVEDPVR) than WT-Sham mice (Figure 1B), indicating impaired LV contractility and compliance, respectively. Again, both LV contractility and compliance were better in NGAL KO-MI than WT-MI mice, (Figure 1A and 1B).

Improvements in LV function were sustained by improvements in LV remodeling at three months post-MI: LV weight was higher for WT-MI than WT-Sham mice, while there was no increase in NGAL KO-MI mice (Table 2). WT-MI mice presented an increase in myocyte cross sectional area (MCSA) and the hypertrophic marker ANP (Sup fig S2) as compared to

WT-Sham mice, effects not prevented in NGAL KO-mice. Furthermore, the increase in interstitial myocardial fibrosis observed in WT-MI mice was markedly reduced in NGAL KO-MI mice (Figure 1C). WT-MI mice presented an increase in cardiac α -SMA protein levels, an effect not observed in NGAL KO-MI mice (Sup fig S3).

In addition, WT-MI mice showed an increase in several inflammatory markers such as IL-6 (Sup fig S4A), CD3 (Sup fig S4B), CD45 (Sup fig S4C), CD68 (Sup fig S4D) and CD80 (Sup fig S4E) as compared to WT-Sham mice at three months post-MI. The increase in proinflammatory markers, except CD45, was prevented in NGAL KO-MI mice (Sup fig s4).

NGAL mediates the effects of aldosterone in human cardiac fibroblasts

We next investigated the role of NGAL in aldosterone-mediated effects in human cardiac fibroblasts. Aldosterone induced NGAL protein synthesis in human cardiac fibroblasts (Figure 2A) and enhanced the secretion of collagen type I (Figure 2B) after 24 hours of stimulation. These effects were prevented by the MRA finerenone (Figure 2A and 2B). Increased cardiac NGAL expression in MI was also blunted by finerenone treatment *in vivo* (Sup fig S1). We studied the direct effect of NGAL on collagen production by treating human cardiac fibroblasts with recombinant hNGAL (500 ng/mL) for 24 hours. Human NGAL induced an increase in collagen type I (Figure 2C) and collagen type III (Figure 2D) protein levels. These data indicate that NGAL has direct profibrotic effects in human cardiac fibroblasts.

Aldosterone also induced collagen type I (Figure 2E), but not collagen type III production in human cardiac fibroblasts (Figure 2F). We performed NGAL silencing experiments to investigate the role of NGAL in these aldosterone-mediated effects. siRNA-mediated down expression of NGAL prevented the aldosterone-induced increase in collagen type I levels (Figure 2E). Altogether, these data suggest that NGAL may directly control collagen production

in MI and that aldosterone/MR-mediated NGAL expression may be involved in the MR-mediated deleterious effects that are prevented by finerenone in MI.¹⁰

NFκB mediates the profibrotic actions of NGAL

We then investigated the intracellular mechanism by which NGAL exerts its pro-fibrotic effects in human cardiac fibroblasts. Recombinant hNGAL induced the phosphorylation of ERK 1/2 (Figure 3A) and NFκB after five minutes of stimulation (Figure 3B), whereas phosphorylation of STAT-3 was not altered (Figure 3C). The addition of PD98059, a specific inhibitor of ERK 1/2, was unable to block the hNGAL-mediated increase in collagen type I protein levels (Figure 3D). In contrast, pretreatment with BAY 11-7082, a specific NFκB pathway inhibitor, blocked the increase in collagen type I protein levels induced by hNGAL (Figure 3E), highlighting the role of NFκB in the profibrotic effect of NGAL. Our data indicate that NGAL could activate the NFκB pathway promoting an increase in the phosphorylation of its negative modulator IκB (Sup fig S5). BAY 11-7082 was also able to prevent the increase in collagen type I protein levels induced by aldosterone in human cardiac fibroblasts, indicating that NFκB activation has a key role in the profibrotic action of both aldosterone and NGAL in these cells (Figure 3F). Genetic deletion of NGAL in mice blunted the cardiac NFκB phosphorylation observed seven days post-MI (Figure 4A), without modifications of NFκB phosphorylation in any of the groups studied at three months post-MI (Sup fig S3).

DISCUSSION

The purpose of this study was to investigate the role of the recently identified MR target NGAL in cardiac remodeling and function after MI. Serum NGAL was associated with less LVEF improvement following MI. We demonstrated that cardiac NGAL expression is elevated at seven days post-MI and that this effect is dependent on MR activation. The absence of NGAL expression *in vivo* prevented the interstitial cardiac fibrosis, inflammation and cardiac dysfunction observed after MI. Recombinant human NGAL exerted direct profibrotic actions in human cardiac fibroblasts by increasing collagen type I, whereas NGAL knock-down prevented aldosterone-induced synthesis of collagen type I. The MR target NGAL thus appears to be a key mediator of cardiac damage induced by MI, through its profibrotic properties.

Increased systemic levels of NGAL have been reported in clinical studies in patients with MI.¹⁷⁻²⁰ NGAL is also a biomarker of renal injury,^{21, 22} and it is thus difficult to dissociate the modulation of NGAL, related to renal dysfunction, associated with cardiovascular diseases from a direct relationship with cardiac or vascular injury. NGAL plasma levels are elevated in coronary heart disease in patients without renal dysfunction,²³ and correlate with the severity of the disease.¹⁹ In addition, NGAL predicts mortality and cardiovascular disease in older adults without kidney disease,²⁴ as well as in patients with HF following MI.^{25, 26} In the present study, increased serum NGAL levels were correlated with lower LVEF recovery in post-MI patients after six months. NGAL has already been reported to be associated with clinical outcome in a biomarker substudy of the OPTIMAAL trial.²⁶ Patients in the REMI cohort were of similar age (55 year old) but had higher LVEF (50% vs 32%) when compared to the OPTIMAAL biomarker substudy population. Most importantly, all patients included in the OPTIMAAL substudy were NYHA 2 or higher whereas only 3 patients of the REMI population had diuretics, suggesting that the vast majority had no symptoms of HF. In the REMI cohort, our results indicate that higher serum NGAL is associated with less LVEF improvement (i.e. less reverse

remodeling) following MI. Reverse remodeling has been mainly studied following cardiac resynchronization²⁷ but is also frequent following MI. It has been reported to occur in a third of patients following MI and is strongly associated with favorable clinical outcome.^{28, 29} Of note, Funaro et al reported that in a cohort of acute MI, the only variable (while competing with age and baseline systolic LV volumes) significantly associated with a 2-year event-free survival was reverse remodeling (hazard ratio: 0.28 (0.12–0.66)).²⁸ Similarly, Spinelli et al reported extreme association (HR <0.20) between reverse remodeling and the composite of reinfarction, HF hospitalization and death.²⁹ As a consequence, our results, in light of the aforementioned evidence, suggest that higher NGAL levels could have a detrimental effect in patients following MI through its association with less reverse ischemic remodeling. A limitation of the analysis deserves to be mentioned. Since the REMI cohort was primarily design to study the factors associated with the early myocardial remodeling post MI, no control population was considered.

Elevated vascular and myocardial levels of NGAL have been reported in several experimental models of cardiovascular diseases, such as atherosclerosis³⁰ and aortic abdominal aneurysm³¹, as well as after MI.^{26, 32-34} We confirmed these results in mice at seven days post-MI and showed that increased NGAL levels were due to MR activation. A previous study showed that the lack of NGAL improved the functional recovery and reduced infarct size of isolated mouse hearts subjected to ischemia/reperfusion. This effect was associated with the restoration of mitochondrial function and phospholipid remodeling.³⁵ Mice lacking NGAL were protected from cardiac cell death and elicited a higher autophagic response in a study limited to the first 24 hours after cardiac ischemia.³³ We show in the present study that the absence of NGAL expression *in vivo* is beneficial after MI, reducing cardiac fibrosis, inflammation and the impairment of cardiac function.

Changes in collagen synthesis occur in patients with congestive HF and LV systolic dysfunction after acute MI,¹ an effect partially mediated by MR activation.¹⁰ Finerenone is a highly selective nonsteroidal MRA that mediates end-organ protection with a lower risk of electrolyte disturbances than other MRAs.³⁶ Previous studies have demonstrated the beneficial effects of finerenone, which improves post-MI LV function.^{10, 36} We show here NGAL levels did not increase at seven days post-MI in finerenone-treated animals and that Aldosterone modulates NGAL expression through MR activation in human cardiac fibroblasts. Indeed, aldosterone also modulates NGAL expression in cardiomyocytes and smooth muscle cells.¹¹ We further demonstrated that NGAL mediates the profibrotic actions of aldosterone in human cardiac fibroblasts: aldosterone did not increase collagen type I protein levels in NGAL-knock down cells. We propose that NGAL is a mediator of aldosterone-induced fibrosis following MI. This is in accordance with another experimental setting where we reported that genetic disruption of NGAL prevented hypertension and cardiovascular remodeling associated with MR activation by aldosterone treatment.¹²

The underlying mechanisms linking NGAL, MR activation, and collagen type I expression are centered on NFκB activation; we demonstrated that NFκB activation is necessary for the profibrotic effects of NGAL. NFκB regulates many processes in the cardiovascular system, including inflammation, cell survival, differentiation, fibrosis, and proliferation.³⁷ NFκB is a key regulator of cardiac responses to ischemia and reperfusion. The alterations in oxygen availability that occur in MI can activate NFκB.³⁸ Several studies have demonstrated that NFκB is upregulated three days after MI in mice³⁹ and that this increase is maintained at seven and thirty days post-MI.⁴⁰⁻⁴² These results are in accordance with our data showing an increase in the phosphorylation of NFκB seven days after MI. Frantz et al. have demonstrated that the genetic inactivation of NFκB improves survival and reduces LV dilatation eight weeks after MI.⁴³ Our data suggest that NGAL could activate NFκB through a phosphorylation of IκB. In

addition, inhibition of NFκB phosphorylation by pharmacological approaches reduced ECM deposition and adverse cardiac remodeling after MI.^{40, 41} NFκB is therefore involved in the NGAL-mediated profibrotic effect of aldosterone, as summarized in Fig 4B.

In conclusion, this study demonstrates the beneficial effects of NGAL deletion in mice subjected to left artery coronary ligation by limiting cardiac fibrosis, inflammation and LV dysfunction associated with MI. It also demonstrates the detrimental effect of increased cardiac NGAL levels within days of MI and shows a correlation between circulating NGAL levels and reduced recovery of systolic function in patients during the first six months following a MI. NGAL is a novel mediator of the actions of aldosterone and is an exciting potential therapeutic target for cardiovascular diseases in which MR is involved, such as MI, as well as perhaps mineralocorticoid-independent ECM remodeling in the CV system and beyond.

Perspectives

NGAL, which is overexpressed by the heart following MI, is an emerging potential therapeutic target for the detrimental consequences associated with MI. NGAL deletion blocks cardiac dysfunction and fibrosis in experimental MI. Further studies are required to establish the potential therapeutic benefit of NGAL inhibition in patients with MI.

Acknowledgments

We are grateful for the excellent technical assistance of the CEF team and their support with animal care. We are grateful to the staffs of the Nancy CIC-P, CIC-IT, and Cardiology Unit, who managed the cohort study. We are grateful to Marie Pieronne-Deperrois and Jean-Paul Henry for their technical help and Thorsten Berger and Tak W. Mak (University of Toronto, Canada) for kindly sharing the NGAL KO mice.

Sources of funding

This work was funded by grants from the *Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale*, the *Centre de Recherche Industrielle et Technique*, the European Fibro-Targets Project (grant agreement No. FP7#602904), the European Regional Development Fund (ERDF) in Normandy, the FP7-funded COST ADMIRE network (BM1301), ANR MRFOCUS (ANR-15-CE14-0032-02), the Fight-HF Avenir investment program (ANR-15-RHUS-0004), the French Programme Hospitalier de Recherche Clinique, and a research grant from Bayer (12127a10), NL-A was supported by a Miguel Servet contract CP13/00221 from the “Instituto de Salud Carlos III-FEDER”.

Conflict of Interest

Peter Kolkhof is an employee of BAYER AG.

NOVELTY AND SIGNIFICANCE

What Is New?

- NGAL mediates Aldosterone-induced cardiac fibrosis in human cardiac fibroblasts.
- The increase in cardiac NGAL levels is dependent on MR activation.
- NGAL blockade protects against cardiac fibrosis, inflammation and dysfunction after MI.
- NGAL exerts its profibrotic effects through NF κ B activation.
- NGAL is associated with lower LVEF in post-MI patients

What Is Relevant?

- The data demonstrate the beneficial effects of NGAL blockade after three months of experimental MI and could be a new biotarget in pathological situations in which MR is involved, such as in MI.

Summary

This study demonstrated that NGAL levels increase a short time after MI and play an important role in the cardiac remodeling associated with MI. This may have important consequences for cardiac function. The inhibition of NGAL decreased cardiac fibrosis in experimental MI, as well as aldosterone-induced collagen synthesis in human cardiac fibroblasts.

FIGURE LEGENDS

Figure 1. NGAL deletion improves hemodynamics and reduces cardiac fibrosis three months after myocardial infarction.

LV end-systolic pressure (LVESP) and pressure–volume relationship (LVESPVR) (**A**) and LV end-diastolic pressure (LVEDP) and pressure–volume relationship (LVEDPVR) (**B**) in WT-Sham, WT-MI, and NGAL KO-MI mice. Representative microphotographs and quantification of interstitial fibrosis in WT-Sham, WT-MI, and NGAL KO-MI mice (**C**). Histogram bars represent the mean \pm SEM. ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$ vs. WT-Sham; † $p < 0.05$; †† $p < 0.01$; ††† $p < 0.001$ vs. WT-MI.

Figure 2. NGAL mediates the profibrotic actions of aldosterone in human cardiac fibroblasts.

Effects of aldosterone (Aldo; 10^{-8} M) and finerenone (Fine; 10^{-6} M) on the intracellular expression of NGAL (**A**) and collagen type I secretion (**B**) at 24 hours. Effects of NGAL (500 ng/mL) on collagen type I (**C**) and collagen type III (**D**) protein synthesis at 24 hours. Effect of aldosterone on NGAL-silenced cells on collagen type I (**E**) and collagen type III (**F**) protein synthesis. All conditions were performed at least in triplicate. Histogram bars represent the mean \pm SEM in arbitrary units normalized to β -actin. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$ vs. Control. † $p < 0.05$; †† $p < 0.01$; ††† $p < 0.001$ vs. Aldo.

Figure 3. NF κ B mediates the profibrotic actions of NGAL in human cardiac fibroblasts.

Phosphorylation of ERK 1/2 (**A**), NF κ B (**B**), and STAT-3 (**C**) in human cardiac fibroblasts treated with NGAL (500 ng/mL) for 5, 10, 30, and 60 minutes. Effects of the ERK 1/2 inhibitor, PD98059 (**D**), and the NF κ B inhibitor, BAY 11-7082 (**E**), on collagen type I protein synthesis

induced by NGAL or aldosterone **(F)**. Histogram bars represent the mean \pm SEM in arbitrary units normalized to total ERK 1/2, total NF κ B, total STAT-3 or β -actin. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$ vs. Control; †† $p < 0.01$ vs. NGAL or Aldo.

Figure 4. NF κ B phosphorylation seven days after myocardial infarction.

NF κ B phosphorylation in WT-Sham, WT-MI, and MI NGAL KO mice **(A)**. Histogram bars represent the mean \pm SEM in arbitrary units normalized to total NF κ B. * $p < 0.05$ vs. Sham; † $p < 0.05$ vs. MI. **(B)** Scheme illustrating the possible mechanism involved in the profibrotic effects of NGAL.

FIGURES

Variables	Univariable		Adjusted on ST segment		Multivariable*	
	$\beta \pm \text{SD}$	p	$\beta \pm \text{SD}$	p	$\beta \pm \text{SD}$	p
NGAL changes (per 10 ng/mL)	-0.78 \pm 0.20	0.0002	-0.82 \pm 0.20	<.0001	-0.82 \pm 0.22	0.0003
Baseline NGAL (per 10 ng/mL)	-0.68 \pm 0.24	0.0046	-0.76 \pm 0.24	0.0016	-0.82 \pm 0.25	0.001
Anterior ST segment			-2.307 \pm 1.140	0.0453	-2.591 \pm 1.204	0.0336
BNP at v1 (per 10 pg/mL)					0.05 \pm 0.04	0.2381
Total infarct size at v1 (per 1 %)					-0.060 \pm 0.046	0.2028
LVEF at v1 (%)	-0.239 \pm 0.066	0.0005	-0.264 \pm 0.067	0.0001	-0.273 \pm 0.079	0.0008

Table 1. Linear regression evaluating the association of NGAL levels with LVEF recovery assessed by cardiac magnetic resonance in 119 patients following myocardial infarction

BNP: B-type natriuretic peptide; LVEF: Left ventricular ejection fraction

Parameter	WT-Sham	WT-MI	NGAL KO-MI
Infarct size, %	...	34±3	39±4
SBP, mm Hg	86.6±1.9	83.6±4.4	85.8±3.5
DBP, mm Hg	51.7±5.5	58.5±3.28	57.1±2.2
LVESD, mm	2.14±0.12	4.84±0.16***	4.01±0.33†
LVEDD, mm	3.37±0.08	5.80±0.14***	5.28±0.32
FS, %	36.6±2.5	16.7±1.4***	24.4±3.4
Heart rate, bpm	429±17	415±10	389±13
Stroke volume, mL/beat	0.092±0.003	0.069±0.003**	0.094±0.009††
Cardiac output, mL/min	39.4±1.8	28.9±1.4**	36.6±3.5†
+dP/dt, mm Hg/s	5219±528	3747±412*	4958±257†
-dP/dt, mm Hg/s	-4873±550	-2807±358**	-3864±320†
BW, g	34.0±0.7	31.1±0.8*	31.3±0.5*
HW/TL, mg/mm	8.54±0.41	11.32±0.56**	9.89±0.38
LVW/TL, mg/mm	6.25±0.30	8.37±0.34**	7.13±0.27

Table 2. LV remodeling and functional parameters three months after myocardial infarction

SBP: systolic blood pressure; DBP: diastolic blood pressure; +dP/dt: the first derivative of LV pressure rise over time; -dP/dt: the first derivative of LV pressure decline over time; BW: body weight; HW: heart weight; LVW: left ventricular weight; TL: tibia length. *p < 0.05; **p < 0.01 vs. WT-Sham; †p < 0.05; ††p < 0.01 vs. WT-MI.

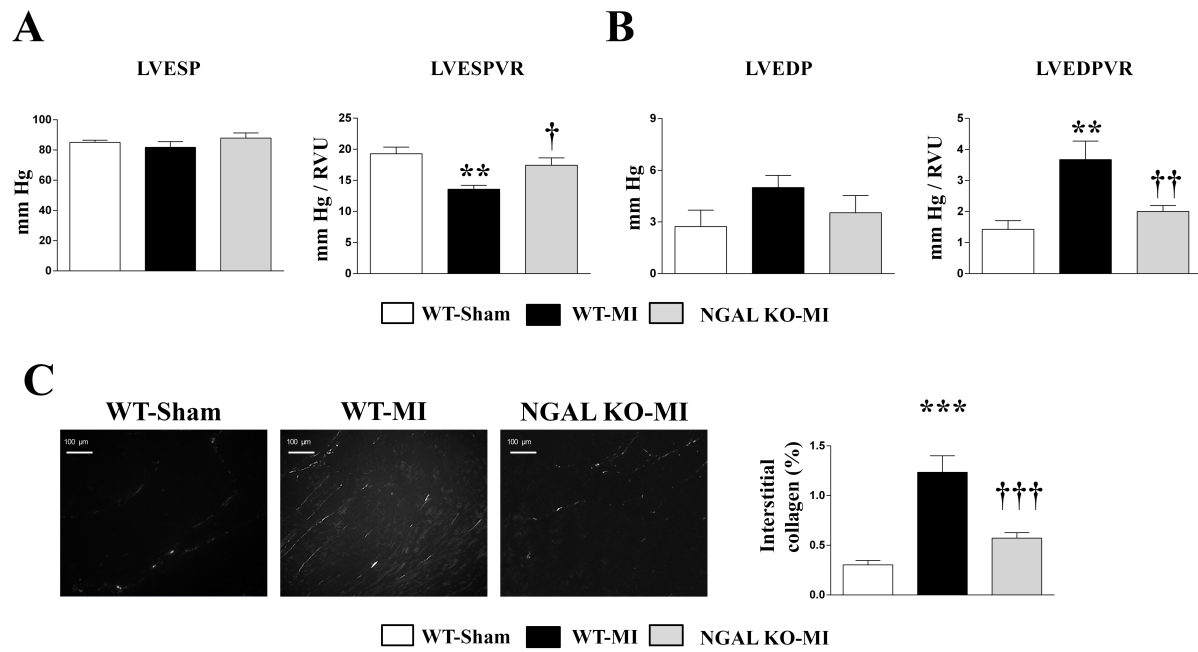


Figure 1. NGAL deletion improves hemodynamics and reduces cardiac fibrosis three months after myocardial infarction.

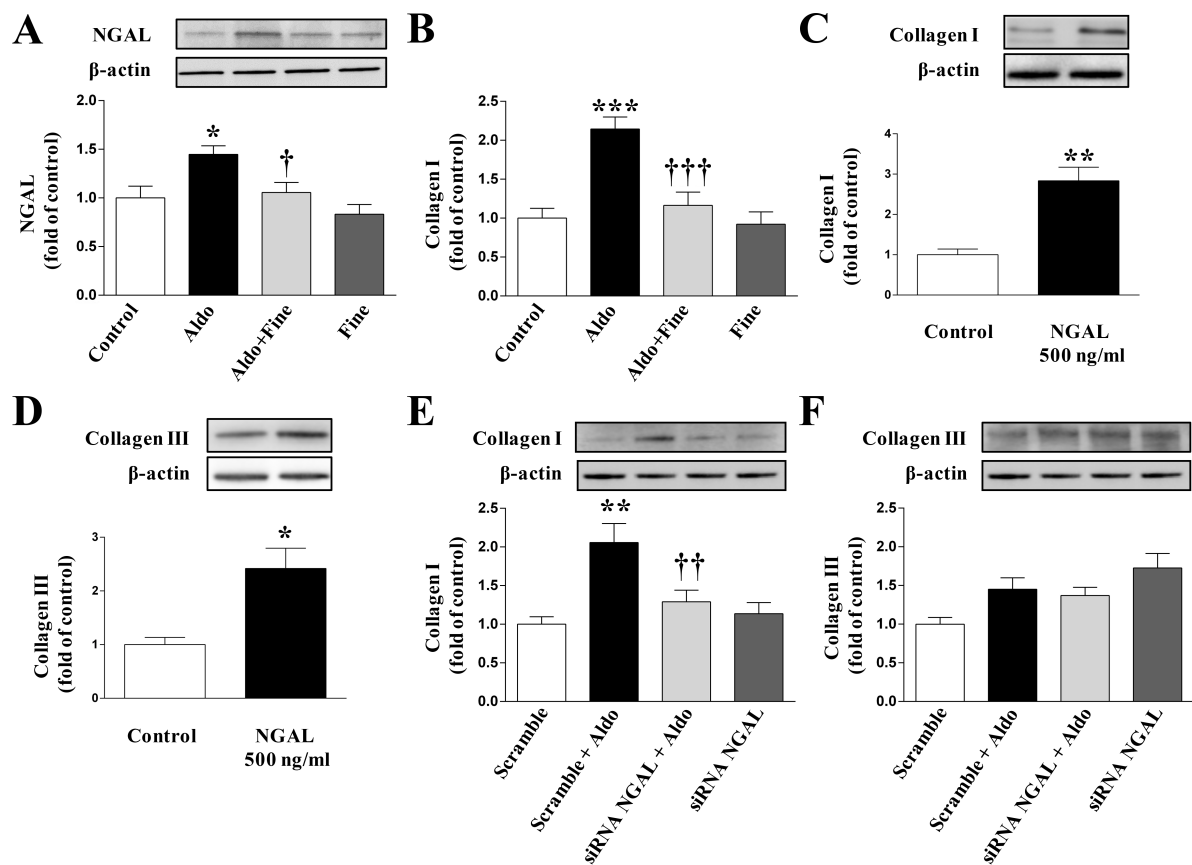


Figure 2. NGAL mediates the profibrotic actions of aldosterone in human cardiac fibroblasts.

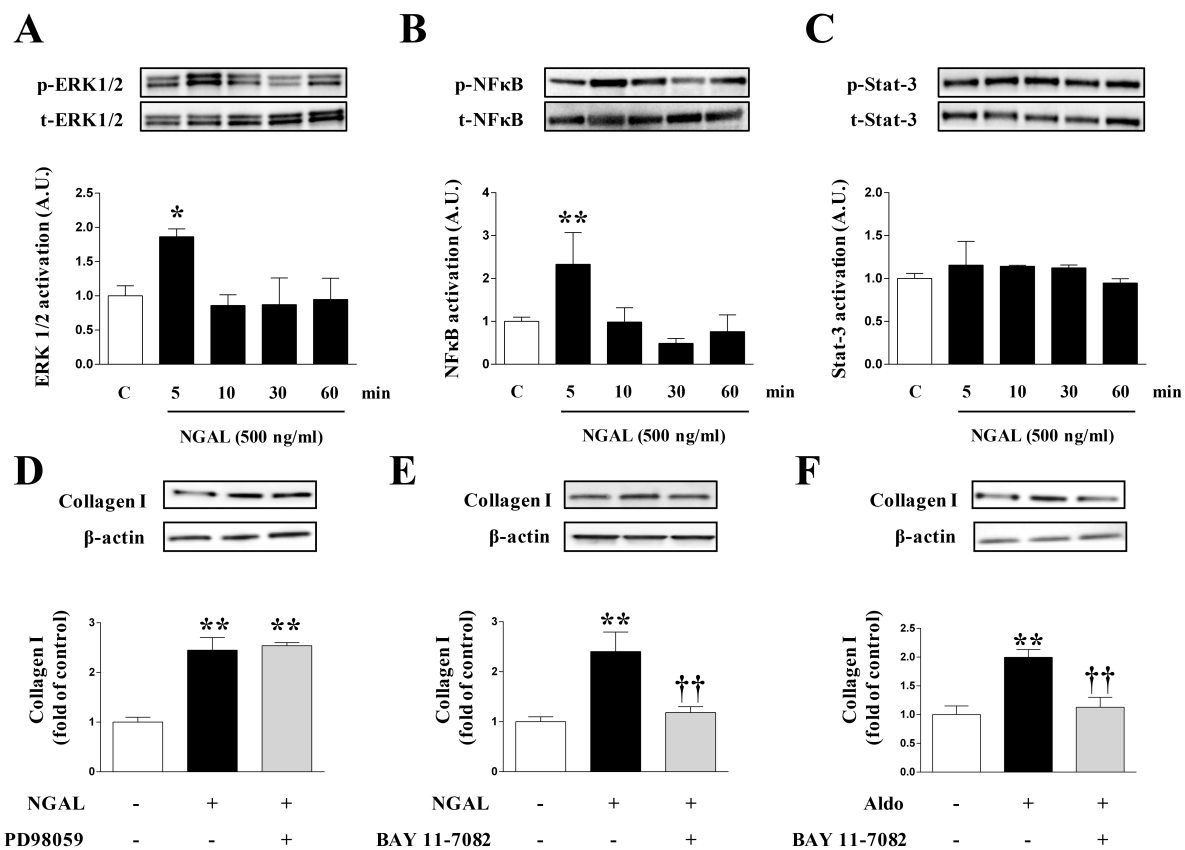


Figure 3. NFκB mediates the profibrotic actions of NGAL in human cardiac fibroblasts.

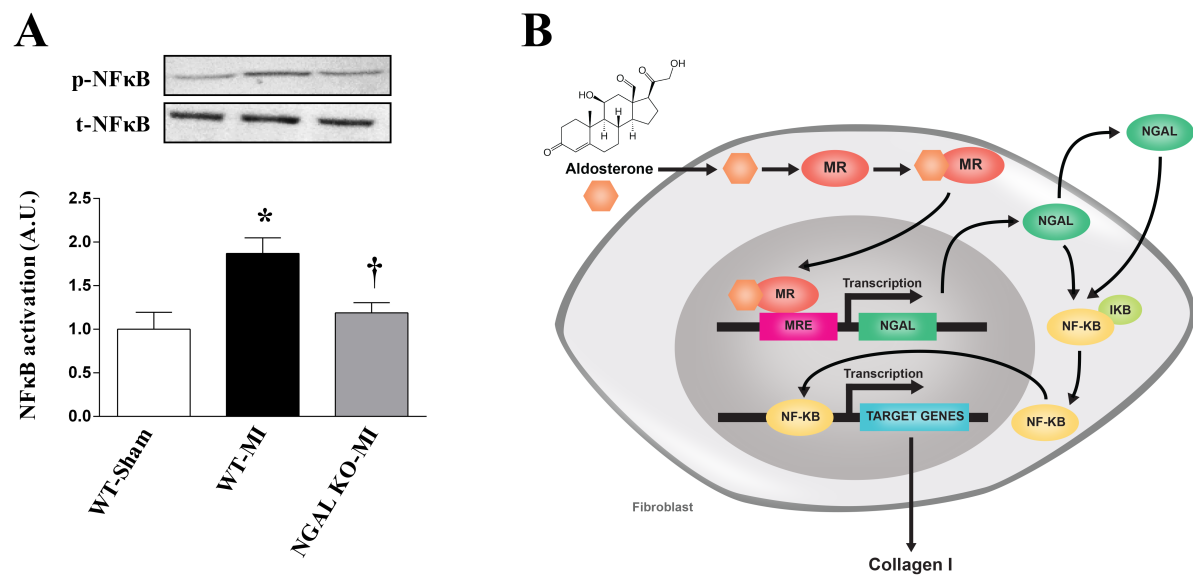


Figure 4. NFκB phosphorylation seven days after myocardial infarction.

ONLINE SUPPLEMENT

The aldosterone target NGAL is involved in cardiac remodeling after myocardial infarction through NFκB pathway

Ernesto Martínez-Martínez¹, Mathieu Buonaïne¹, Ines Boukhalfa², Jaime Ibarrola³, Amaya Fernández-Celis³, Peter Kolkhof⁴, Patrick Rossignol⁵, Nicolas Girerd⁵, Paul Mulder², Natalia López-Andrés^{3,5}, Antoine Ouvrard-Pascaud^{*2}, Frédéric Jaisser^{*1}.

¹INSERM, UMRS 1138, Team 1, Centre de Recherche des Cordeliers, Pierre et Marie Curie University, Paris Descartes University, Paris, France. ²Inserm U1096, UFR Médecine-Pharmacie, Rouen, France. ³Cardiovascular Translational Research. Navarrabiomed (Miguel Servet Foundation), Instituto de Investigación Sanitaria de Navarra (IdiSNA), Pamplona. Spain. ⁴BAYER AG, Cardiology Research, Wuppertal, Germany. ⁵INSERM, Centre d'Investigations Cliniques-Plurithématique 1433, UMR 1116 Université de Lorraine, CHRU de Nancy, French-Clinical Research Infrastructure Network (F-CRIN) INI-CRCT, Nancy, France.

*Both authors contributed equally to this work.

Corresponding author: Dr. Frédéric Jaisser. INSERM U1138, Centre de Recherche de Cordeliers, Team 1. 15 rue de l'Ecole de Médecine, 75006, Paris, France. Tel:

+33144278106. Fax: +33144276421

E-mail: frederic.jaisser@inserm.fr

SUPPLEMENTAL METHODS

Post-myocardial infarction cohort

The study population was comprised of 119 patients who were successfully reperfused following a first acute STEMI, included in a prospective monocentric cohort study (Relation Between Aldosterone and Cardiac Remodeling After Myocardial Infarction - REMI Study), performed in a university hospital between April 2010 and December 2013.¹ Patients underwent cardiac magnetic resonance (CMR) during the first four days of the acute event and at the six-month follow-up. The study was approved by an institutional review committee and the subjects gave informed consent. It was sponsored by the Nancy CHRU.

Myocardial infarction

Experiments conformed to the 2010/63 directive of the EU and the *Guide for Care and Use of Laboratory Animals* of the US National Institute of Health (No.85-23). Left coronary artery ligations were performed in eight-week-old male NGAL KO C57BL/6J mice (NGAL KO-MI, n = 6-13) and wild type littermates (WT-MI; n = 6-13) under anesthesia (3.6mg/kg xylazine, IP, plus 2% isoflurane). Analgesia was induced using buprenorphine (0.05 mg/kg, SC) just after induction of anesthesia and after 6, 12, 24, and 48 h following coronary artery ligation. The snare was not tied for sham-operated mice (WT-Sham; n=6-9). Finerenone (1 mg/kg/day) was administered as a food additive for seven days, starting the day after MI (Fine-MI).

LV Hemodynamics

Mice were anesthetized (Inactin 50mg.kg⁻¹, IP) and the carotid artery cannulated with a pressure-volume catheter (SPR839, Millar-Instruments, USA) to record arterial pressure (mmHg) and heart rate, after which the catheter was advanced into the LV. Pressure-volume

loops were recorded at baseline, and during loading, by gently occluding the abdominal aorta with a cotton swab, allowing the calculation of dP/dt_{\max} and dP/dt_{\min} (mmHg/s), LV end-systolic and end-diastolic pressures (mmHg), and LV end-systolic and end-diastolic pressure-volume relations as indicators of load-independent LV passive compliance and contractility, respectively, using IOXTM software (EMKA, France).

Echocardiography

Mouse echocardiography was performed at three months post-MI in isoflurane anesthetized closed-chest mice (1%; 1.5 mL/min; Baxter), using a Vivid 7 ultrasound echograph equipped with a M12L linear probe, operating at 14 MHz, and fitted out with Echopac PC software (GE medical). In brief, a two-dimensional short axis view of the LV was obtained at the level of the papillary muscle, and the M-mode tracing was recorded. LV Diastolic and Systolic Diameters (LVDD; LVSD) were measured by the leading-edge method, according to the American Society of Echocardiography guidelines. Fractional Shortening (FS) was calculated as previously described.² In addition, a pulsed Doppler of the LV outflow was performed to obtain heart rate and time velocity integral (TVI) to calculate stroke volume (mL/beat) and cardiac output (mL/min).

Cardiac magnetic resonance (CMR)

Imaging was performed on a General Electric 3T system (General Electric 3T signa hdxt). Cine imaging for cardiac morphology and function was performed using the steady-state free precession technique. To evaluate LV ejection fraction (LVEF), the outline of the endocardial border of the left ventricle was manually traced on all slices of each phase, in the short axis view, by an experienced cardiologist or radiologist using standard software (Mass Research software, version V2013-EXP, Leiden University Medical Center). Volumes were computed

using Simpson's method of disk summation, whereby the sum of cross-sectional areas was multiplied by slice thickness. The quantitative determination of EF was calculated using left ventricular end-diastolic volume (LVEDV) and left ventricular end-systolic volume (LVESV) estimates as follows: $LVEF = (LVEDV - LVESV) / LVEDV$.

Histology

Mice were sacrificed by cervical disruption at seven days or three months post-MI. Hearts were rapidly excised and arrested in ice-cold saturated KCl buffer. The LV was dissected before being snap-frozen in liquid nitrogen for Western-blot analyses or embedded in Tissue-Tek for histological analyses. Infarct size [total infarction perimeter/(epicardial LV perimeter + endocardial LV perimeter) x100] and LV fibrosis (evaluated as the percentage under polarized light at a magnification of x20) were calculated in 6-10 μ m-thick mid-LV frozen sections stained with Sirius Red using Image Pro-Plus (version 6.3) software. For myocyte cross sectional area, mid-LV cryosections (6–10 μ m) were fixed in acetone and stained according to standard protocols using wheat germ agglutinin WGA-A488 (1:100; Invitrogen). Photographs were taken at x20 magnification using fluorescence microscope (AxioImager Z1; Carl-Zeiss). Mean cross sectional area were measured using Image Pro-Plus 6.3 in 6-8 fields / heart and an average of 16 cardiomyocytes / field.

Cell culture

Human cardiac fibroblasts were obtained from Promocell and maintained in medium (Fibroblast Media 3). Cells were cultured according to the manufacturer's instructions and used between passages 5 and 7. Cells were stimulated with aldosterone (10^{-8} M, Sigma), finerenone (10^{-6} M, Bayer), or recombinant hNGAL (500 ng/mL, R&D Systems) for 24 h for protein analysis. The doses were chosen based on previous studies.^{3, 4}

For the study of the intracellular pathways, cells were treated with recombinant hNGAL for 5, 10, 30, and 60 min. The chemical inhibitors PD98059 (Sigma Aldrich) and BAY 11-7082 (Sigma Aldrich) were added at 10^{-5} mol/L 1 h prior to NGAL stimulation.

Transfection of cells with siRNA

Cells were seeded into 6-well plates at 70% confluence and transfected with a pool of three NGAL target-specific siRNAs (GeneCust) using MATra-si (IBA), according to the manufacturer's recommendations. Cells were allowed to recover for 24 h before stimulation. Scrambled siRNAs were used as a control.

Western blot analysis

Total protein aliquots of 20 µg were prepared from either cell extracts or cardiac non-infarcted homogenates and electrophoresed on SDS polyacrylamide gels and transferred to Hybond-c Extra nitrocellulose membranes (Amersham Biosciences). Membranes were incubated with primary antibodies for: NGAL (Abcam; dilution 1:500), CD 3 (Santa Cruz; dilution 1:100), CD45 (Santa Cruz; dilution 1:100), CD68 (Abcam; dilution 1:100), CD80 (Santa Cruz; dilution 1:100), α -SMA (Santa Cruz; dilution 1:250), Collagen type I (Santa Cruz; dilution 1:500), Collagen type III (Santa Cruz; dilution 1:500), ERK1/2 and ERK1/2-P (Thr202/Tyr204) at 1/1000 (Cell Signaling), NF κ B and NF κ B-P (Ser536) at 1/1000 (Cell Signaling), STAT3 and STAT3-P (Tyr705) at 1/1500 (Cell Signaling) and β -actin (Sigma; dilution 1:1000) as a loading control. After washing, the blots were incubated with peroxidase-conjugated secondary antibody, and binding revealed by ECL chemiluminescence (Amersham). After densitometric analyses, optical density values were expressed as arbitrary units. Results are expressed as an n-fold increase over the values of the control group in densitometric arbitrary units. All Western Blots were performed at least in triplicate for each experimental condition.

ELISA

Aldosterone plasma levels, cardiac NGAL protein levels, IL-6 and collagen type I in cell supernatants were measured by ELISA according to the manufacturer's instructions (Diagnostic Biochem Canada and R&D Systems).

Statistics

Data are presented as the means \pm SEM. Student's t test (2-tailed) was used to compare paired groups of independent samples. ANOVA with Bonferroni adjustment for post-hoc tests was used for multiple comparisons.

Continuous data from the REMI cohort are presented either as the means + SD or the median (25-75 percentile). A paired t-test was used to compare values obtained at baseline and six months. The associations between baseline NGAL levels and changes in NGAL levels with LVEF recovery were evaluated using multivariable linear regression models. The outcome variable of this model was the change in the LVEF between baseline and six months, expressed as a continuous variable. Thus, a positive Beta value provided by the linear regression model indicates greater LVEF recovery (i.e. an increased LVEF within six months of the baseline evaluation). Adjustment variables were selected *a priori* based on their known association with post-myocardial infarction remodeling.

Data analysis was performed using GraphPad Prism V6.01 (GraphPad Software, San Diego, CA) Software Inc and SAS version 9.3 (SAS Institute Inc., Cary, N.C., USA). The predetermined significance level was $P < 0.05$.

SUPPLEMENTAL TABLES

Parameter	WT-Sham	NGAL KO-Sham
SBP, mm Hg	86.6±1.9	82.7±4.3
DBP, mm Hg	51.7±5.5	51.0±6.6
+dP/dt, mm Hg/s	5219±528	5079±613
-dP/dt, mm Hg/s	-4873±550	-4608±352
LVESP, mm Hg	85.05±1.39	82.87±4.70
LVESPVR, mm Hg/RVU	19.29±1.05	21.16±1.15
LVEDP, mm Hg	2.73±0.95	3.13±0.46
LVEDPVR, mm Hg/RVU	1.43±0.28	1.35±0.14
BW, g	34.0±0.7	33.0±1.4
HW/TL, mg/mm	8.54±0.41	8.20±0.35
LVW/TL, mg/mm	6.25±0.30	5.95±0.29
MCSA (A.U.)	40.21±1.8	42.67±1.3
LV collagen density, %	2.30±0.6	3.02±0.4

Table S1: LV remodeling and functional parameters three months after myocardial infarction in WT-Sham and NGAL KO-Sham mice

SBP: systolic blood pressure; DBP: diastolic blood pressure; +dP/dt: the first derivative of LV pressure rise over time; -dP/dt: the first derivative of LV pressure decline over time; LVESP: LV end-systolic pressure; LVESPVR: LV end-systolic pressure–volume relation; LVEDP: LV end-diastolic pressure; LVEDPVR: LV end-systolic pressure–volume relation; BW: body weight; HW: heart weight; LVW: left ventricular weight; TL: tibia length. MCSA: myocyte cross sectional area.

Parameter	WT-Sham	WT-MI	NGAL KO-MI	NGAL KO-Sham
BW, g	29.8±0.4	25.9±0.8***	27.6±0.5*	29.6±0.7
LVEDS, mm	2.8±0.1	4.5±0.2***	3.6±0.2**†	2.4±0.1
LVEDD, mm	4.1±0.1	5.2±0.2***	4.5±0.1†	3.8±0.1
FS, %	32.8±1.1	13.9±1.6***	18.6±2.0***	39.3±1.9
SV, mL/beat	0.09 ±0.003	0.079±0.005	0.086±0.004	0.089±0.004
CO, mL/min	44.0±1.4	40.4±2.5	43.2±2.1	46.5±1.4

Table S2: Echocardiography data at seven days post-MI.

BW: body weight. LVEDS and LVEDD: LV end-systolic and end-diastolic diameters. FS: Fractional Shortening. SV: Stroke volume. CO: Cardiac output. *p<0.05; **p < 0.01;***p < 0.001 vs. WT-Sham; †p < 0.05 vs. WT-MI.

SUPPLEMENTAL FIGURES

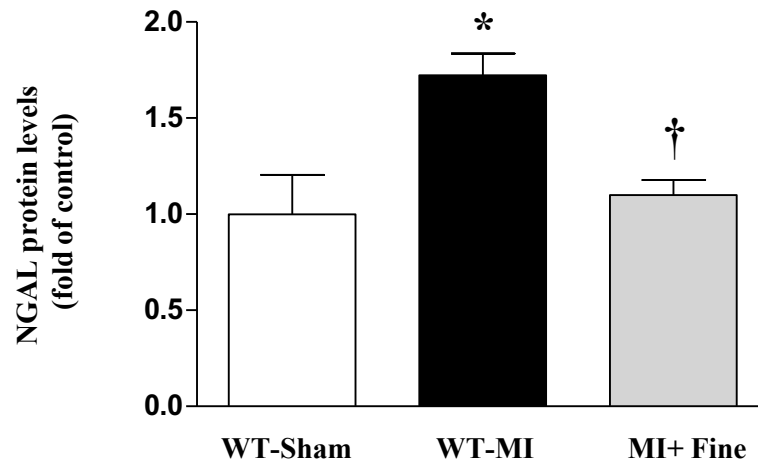


Figure S1: NGAL protein levels in WT-Sham, WT-MI and MI treated with finerenone mice.

Histogram bars represent the mean \pm SEM. * $p < 0.05$ vs. WT-Sham; † $p < 0.05$ vs. WT-MI.

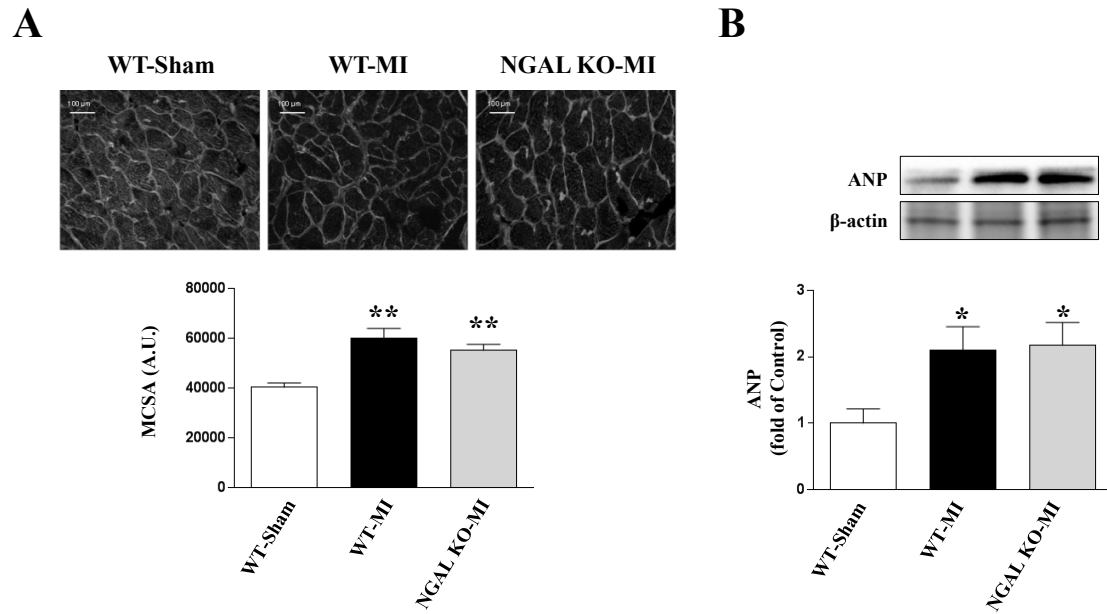


Figure S2: Myocyte cross sectional area (MCSA) (**A**) and atrial natriuretic peptide (ANP) (**B**) protein levels at three months post-MI in WT-Sham, WT-MI, and MI NGAL KO mice. Scale bar 100 μ m. Histogram bars represent the mean \pm SEM in arbitrary units. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$ vs. WT-Sham.

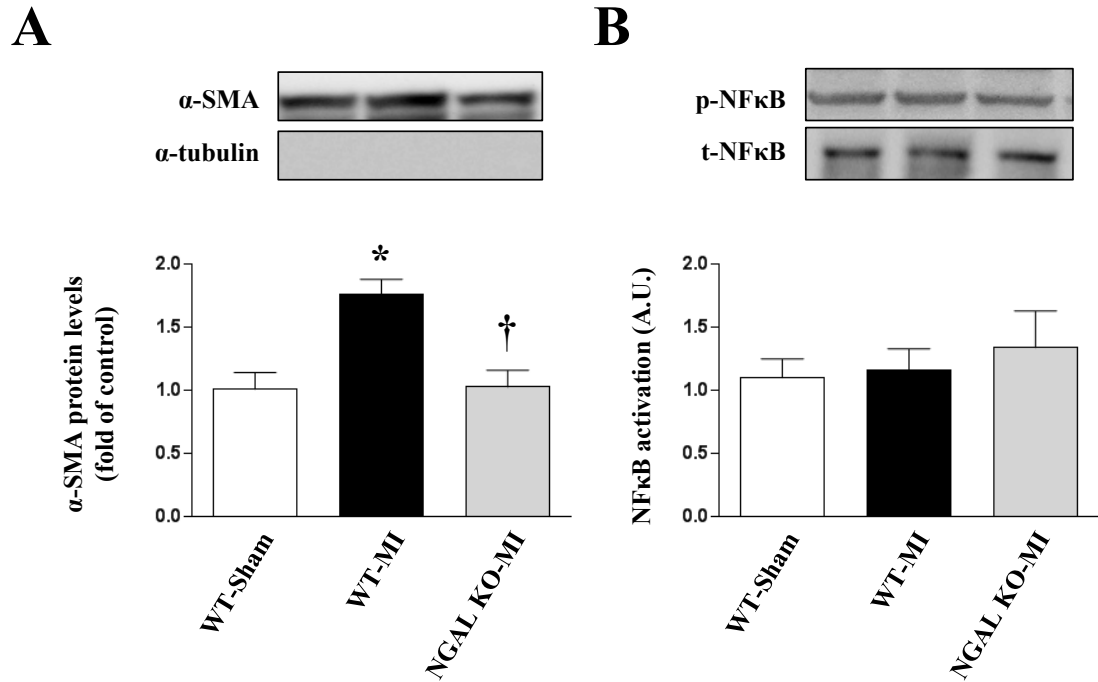


Figure S3: Alpha-smooth muscle actin (α -SMA) (**A**) and phosphorylation of NF κ B (**B**) protein levels at three months post-MI in WT-Sham, WT-MI, and MI NGAL KO mice. Histogram bars represent the mean \pm SEM in arbitrary units. * $p < 0.05$ vs. WT-Sham; † $p < 0.05$ vs. WT-MI.

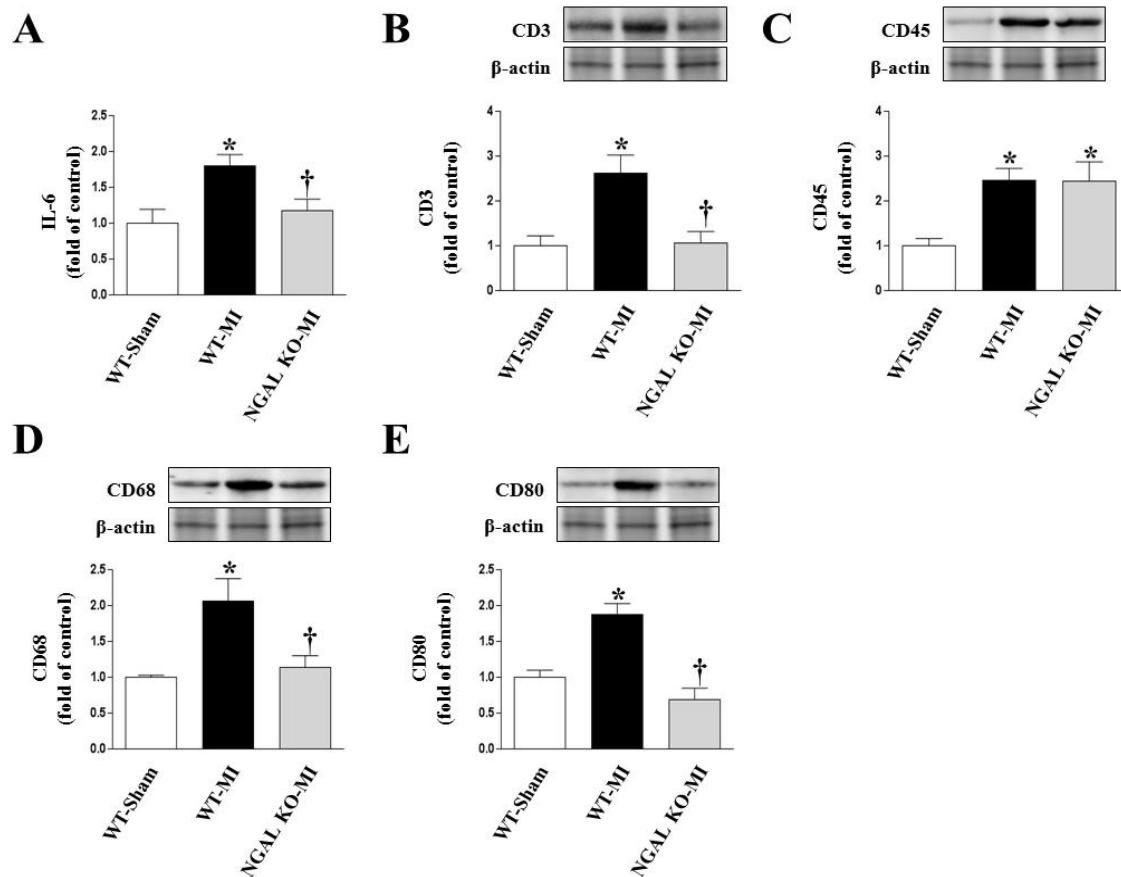


Figure S4. NGAL deletion improves cardiac inflammation three months after myocardial infarction. IL-6 (A), CD3 (B), CD45 (C), CD68 (D) and CD80 (E) in WT-Sham, WT-MI, and NGAL KO-MI mice. Histogram bars represent the mean \pm SEM in arbitrary units normalized to β -actin. * $p < 0.05$ vs. WT-Sham; † $p < 0.05$ vs. WT-MI.

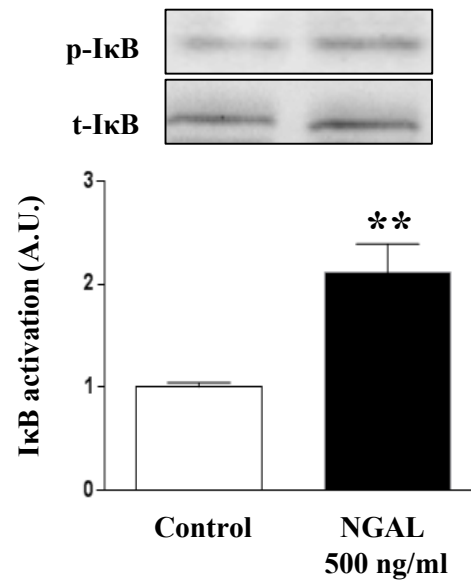


Figure S5: Phosphorylation of IκB in human cardiac fibroblasts treated with NGAL (500 ng/mL). Histogram bars represent the mean \pm SEM in arbitrary units normalized to total IκB. ** $p < 0.01$ vs. Control.

REFERENCES

1. Iraqi W, Rossignol P, Angioi M, Fay R, Nuee J, Ketelslegers JM, Vincent J, Pitt B, Zannad F. Extracellular cardiac matrix biomarkers in patients with acute myocardial infarction complicated by left ventricular dysfunction and heart failure: insights from the Eplerenone Post-Acute Myocardial Infarction Heart Failure Efficacy and Survival Study (EPHESUS) study. *Circulation*. 2009;119:2471-2479.
2. Sutton MG, Sharpe N. Left ventricular remodeling after myocardial infarction: pathophysiology and therapy. *Circulation*. 2000;101:2981-2988.
3. Rogerson FM, Fuller PJ. Mineralocorticoid action. *Steroids*. 2000;65:61-73.
4. Lopez-Andres N, Martin-Fernandez B, Rossignol P, Zannad F, Lahera V, Fortuno MA, Cachofeiro V, Diez J. A role for cardiotrophin-1 in myocardial remodeling induced by aldosterone. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2011;301:H2372-2382.
5. Briet M, Schiffrin EL. Aldosterone: effects on the kidney and cardiovascular system. *Nat Rev Nephrol*. 2010;6:261-273.
6. Martinez-Martinez E, Calvier L, Fernandez-Celis A, Rousseau E, Jurado-Lopez R, Rossoni LV, Jaisser F, Zannad F, Rossignol P, Cachofeiro V, Lopez-Andres N. Galectin-3 blockade inhibits cardiac inflammation and fibrosis in experimental hyperaldosteronism and hypertension. *Hypertension*. 2015;66:767-775.
7. Reddy NM, Mahajan UB, Patil CR, Agrawal YO, Ojha S, Goyal SN. Eplerenone attenuates cardiac dysfunction and oxidative stress in beta-receptor stimulated myocardial infarcted rats. *Am J Transl Res*. 2015;7:1602-1611.
8. Pitt B, Remme W, Zannad F, Neaton J, Martinez F, Roniker B, Bittman R, Hurley S, Kleiman J, Gatlin M, Eplerenone Post-Acute Myocardial Infarction Heart Failure E, Survival Study I. Eplerenone, a selective aldosterone blocker, in patients with left ventricular dysfunction after myocardial infarction. *N Engl J Med*. 2003;348:1309-1321.
9. Beygui F, Labbe JP, Cayla G, Ennezat PV, Motreff P, Roubille F, Silvain J, Barthelemy O, Delarche N, Van Belle E, Collet JP, Montalescot G. Early mineralocorticoid receptor blockade in primary percutaneous coronary intervention for ST-elevation myocardial infarction is associated with a reduction of life-threatening ventricular arrhythmia. *Int J Cardiol*. 2013;167:73-79.
10. Gueret A, Harouki N, Favre J, Galmiche G, Nicol L, Henry JP, Besnier M, Thuillez C, Richard V, Kolkhof P, Mulder P, Jaisser F, Ouvrard-Pascaud A. Vascular Smooth Muscle

- Mineralocorticoid Receptor Contributes to Coronary and Left Ventricular Dysfunction After Myocardial Infarction. *Hypertension*. 2016;67:717-723.
11. Latouche C, El Moghrabi S, Messaoudi S, Nguyen Dinh Cat A, Hernandez-Diaz I, Alvarez de la Rosa D, Perret C, Lopez Andres N, Rossignol P, Zannad F, Farman N, Jaisser F. Neutrophil gelatinase-associated lipocalin is a novel mineralocorticoid target in the cardiovascular system. *Hypertension*. 2012;59:966-972.
 12. Tarjus A, Martinez-Martinez E, Amador C, Latouche C, El Moghrabi S, Berger T, Mak TW, Fay R, Farman N, Rossignol P, Zannad F, Lopez-Andres N, Jaisser F. Neutrophil Gelatinase-Associated Lipocalin, a Novel Mineralocorticoid Biotarget, Mediates Vascular Profibrotic Effects of Mineralocorticoids. *Hypertension*. 2015;66:158-166.
 13. Gilet A, Zou F, Boumenir M, Fripiat JP, Thornton SN, Lacolley P, Ropars A. Aldosterone up-regulates MMP-9 and MMP-9/NGAL expression in human neutrophils through p38, ERK1/2 and PI3K pathways. *Exp Cell Res*. 2015;331:152-163.
 14. Flower DR, North AC, Sansom CE. The lipocalin protein family: structural and sequence overview. *Biochim Biophys Acta*. 2000;1482:9-24.
 15. Grzyb J, Latowski D, Strzalka K. Lipocalins - a family portrait. *J Plant Physiol*. 2006;163:895-915.
 16. Huttin O, Marie PY, Benichou M, Bozec E, Lemoine S, Mandry D, Juilliere Y, Sadoul N, Micard E, Duarte K, Beaumont M, Rossignol P, Girerd N, Selton-Suty C. Temporal deformation pattern in acute and late phases of ST-elevation myocardial infarction: incremental value of longitudinal post-systolic strain to assess myocardial viability. *Clin Res Cardiol*. 2016;105:815-826.
 17. Helanova K, Littnerova S, Kubena P, Ganovska E, Pavlusova M, Kubkova L, Jarkovsky J, Pavkova Goldbergova M, Lipkova J, Gottwaldova J, Kala P, Toman O, Dastych M, Spinar J, Parenica J. Prognostic impact of neutrophil gelatinase-associated lipocalin and B-type natriuretic in patients with ST-elevation myocardial infarction treated by primary PCI: a prospective observational cohort study. *BMJ Open*. 2015;5:e006872.
 18. Sahinarslan A, Kocaman SA, Bas D, Akyel A, Ercin U, Zengin O, Timurkaynak T. Plasma neutrophil gelatinase-associated lipocalin levels in acute myocardial infarction and stable coronary artery disease. *Coron Artery Dis*. 2011;22:333-338.
 19. Zografos T, Haliassos A, Korovesis S, Giazitzoglou E, Voridis E, Katritsis D. Association of neutrophil gelatinase-associated lipocalin with the severity of coronary artery disease. *Am J Cardiol*. 2009;104:917-920.

20. Lindberg S, Pedersen SH, Mogelvang R, Jensen JS, Flyvbjerg A, Galatius S, Magnusson NE. Prognostic utility of neutrophil gelatinase-associated lipocalin in predicting mortality and cardiovascular events in patients with ST-segment elevation myocardial infarction treated with primary percutaneous coronary intervention. *J Am Coll Cardiol*. 2012;60:339-345.
21. Singer E, Marko L, Paragas N, Barasch J, Dragun D, Muller DN, Budde K, Schmidt-Ott KM. Neutrophil gelatinase-associated lipocalin: pathophysiology and clinical applications. *Acta Physiol (Oxf)*. 2013;207:663-672.
22. Di Grande A, Giuffrida C, Carpinteri G, Narbone G, Pirrone G, Di Mauro A, Calandra S, Noto P, Le Moli C, Alongi B, Nigro F. Neutrophil gelatinase-associated lipocalin: a novel biomarker for the early diagnosis of acute kidney injury in the emergency department. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*. 2009;13:197-200.
23. Choi KM, Lee JS, Kim EJ, Baik SH, Seo HS, Choi DS, Oh DJ, Park CG. Implication of lipocalin-2 and visfatin levels in patients with coronary heart disease. *Eur J Endocrinol*. 2008;158:203-207.
24. Daniels LB, Barrett-Connor E, Clopton P, Laughlin GA, Ix JH, Maisel AS. Plasma neutrophil gelatinase-associated lipocalin is independently associated with cardiovascular disease and mortality in community-dwelling older adults: The Rancho Bernardo Study. *J Am Coll Cardiol*. 2012;59:1101-1109.
25. van Deursen VM, Damman K, Voors AA, van der Wal MH, Jaarsma T, van Veldhuisen DJ, Hillege HL. Prognostic value of plasma neutrophil gelatinase-associated lipocalin for mortality in patients with heart failure. *Circ Heart Fail*. 2014;7:35-42.
26. Yndestad A, Landro L, Ueland T, Dahl CP, Flo TH, Vinge LE, Espevik T, Froland SS, Husberg C, Christensen G, Dickstein K, Kjekshus J, Oie E, Gullestad L, Aukrust P. Increased systemic and myocardial expression of neutrophil gelatinase-associated lipocalin in clinical and experimental heart failure. *Eur Heart J*. 2009;30:1229-1236.
27. Sutton MS, Keane MG. Reverse remodelling in heart failure with cardiac resynchronisation therapy. *Heart*. 2007;93:167-171.
28. Funaro S, La Torre G, Madonna M, Galiuto L, Scara A, Labbadia A, Canali E, Mattatelli A, Fedele F, Alessandrini F, Crea F, Agati L, Investigators A. Incidence, determinants, and prognostic value of reverse left ventricular remodelling after primary percutaneous coronary intervention: results of the Acute Myocardial Infarction Contrast Imaging (AMICI) multicenter study. *Eur Heart J*. 2009;30:566-575.

29. Spinelli L, Morisco C, Assante di Panzillo E, Izzo R, Trimarco B. Reverse left ventricular remodeling after acute myocardial infarction: the prognostic impact of left ventricular global torsion. *Int J Cardiovasc Imaging*. 2013;29:787-795.
30. Eilenberg W, Stojkovic S, Piechota-Polanczyk A, Kaun C, Rauscher S, Groger M, Klinger M, Wojta J, Neumayer C, Huk I, Demjanets S. Neutrophil Gelatinase-Associated Lipocalin (NGAL) is Associated with Symptomatic Carotid Atherosclerosis and Drives Pro-inflammatory State In Vitro. *Eur J Vasc Endovasc Surg*. 2016;51:623-631.
31. Tarin C, Fernandez-Garcia CE, Burillo E, Pastor-Vargas C, Llamas-Granda P, Castejon B, Ramos-Mozo P, Torres-Fonseca MM, Berger T, Mak TW, Egido J, Blanco-Colio LM, Martin-Ventura JL. Lipocalin-2 deficiency or blockade protects against aortic abdominal aneurysm development in mice. *Cardiovasc Res*. 2016;111:262-273.
32. Hemdahl AL, Gabrielsen A, Zhu C, Eriksson P, Hedin U, Kastrup J, Thoren P, Hansson GK. Expression of neutrophil gelatinase-associated lipocalin in atherosclerosis and myocardial infarction. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2006;26:136-142.
33. Sung HK, Chan YK, Han M, Jahng JW, Song E, Eric D, Berger T, Mak TW, Sweeney G. Lipocalin-2 (NGAL) Attenuates Autophagy to Exacerbate Cardiac Apoptosis Induced by Myocardial Ischemia. *J Cell Physiol*. 2016.
34. Cheng L, Xing H, Mao X, Li L, Li X, Li Q. Lipocalin-2 promotes m1 macrophages polarization in a mouse cardiac ischaemia-reperfusion injury model. *Scand J Immunol*. 2015;81:31-38.
35. Yang B, Fan P, Xu A, Lam KS, Berger T, Mak TW, Tse HF, Yue JW, Song E, Vanhoutte PM, Sweeney G, Wang Y. 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;4:60-71.
36. Kolkhof P, Delbeck M, Kretschmer A, Steinke W, Hartmann E, Barfacker L, Eitner F, Albrecht-Kupper B, Schafer S. Finerenone, a novel selective nonsteroidal mineralocorticoid receptor antagonist protects from rat cardiorenal injury. *J Cardiovasc Pharmacol*. 2014;64:69-78.
37. Van der Heiden K, Cuhlmann S, Luong le A, Zakkar M, Evans PC. Role of nuclear factor kappaB in cardiovascular health and disease. *Clin Sci (Lond)*. 2010;118:593-605.
38. Cummins EP, Berra E, Comerford KM, Ginouves A, Fitzgerald KT, Seeballuck F, Godson C, Nielsen JE, Moynagh P, Pouyssegur J, Taylor CT. Prolyl hydroxylase-1 negatively regulates IκB kinase-beta, giving insight into hypoxia-induced NFκB activity. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006;103:18154-18159.

39. Yin H, Li P, Hu F, Wang Y, Chai X, Zhang Y. IL-33 attenuates cardiac remodeling following myocardial infarction via inhibition of the p38 MAPK and NF-kappaB pathways. *Mol Med Rep.* 2014;9:1834-1838.
40. He Q, Zhou W, Xiong C, Tan G, Chen M. Lycopene attenuates inflammation and apoptosis in post-myocardial infarction remodeling by inhibiting the nuclear factor-kappaB signaling pathway. *Mol Med Rep.* 2015;11:374-378.
41. Onai Y, Suzuki J, Maejima Y, Haraguchi G, Muto S, Itai A, Isobe M. Inhibition of NF-{kappa}B improves left ventricular remodeling and cardiac dysfunction after myocardial infarction. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2007;292:H530-538.
42. Xu D, Wang A, Jiang F, Hu J, Zhang X. Effects of interleukin-37 on cardiac function after myocardial infarction in mice. *Int J Clin Exp Pathol.* 2015;8:5247-5251.
43. Frantz S, Hu K, Bayer B, Gerondakis S, Strotmann J, Adamek A, Ertl G, Bauersachs J. Absence of NF-kappaB subunit p50 improves heart failure after myocardial infarction. *FASEB J.* 2006;20:1918-1920.

SUPPLEMENTAL REFERENCES

1. Huttin O, Marie PY, Benichou M, Bozec E, Lemoine S, Mandry D, Juilliere Y, Sadoul N, Micard E, Duarte K, Beaumont M, Rossignol P, Girerd N, Selton-Suty C. Temporal deformation pattern in acute and late phases of ST-elevation myocardial infarction: incremental value of longitudinal post-systolic strain to assess myocardial viability. *Clin Res Cardiol.* 2016;105:815-826.
2. Banquet S, Gomez E, Nicol L, Edwards-Levy F, Henry JP, Cao R, Schapman D, Dautreux B, Lallemand F, Bauer F, Cao Y, Thuillez C, Mulder P, Richard V, Brakenhielm E. Arteriogenic therapy by intramyocardial sustained delivery of a novel growth factor combination prevents chronic heart failure. *Circulation.* 2011;124:1059-1069.
3. Tarjus A, Martinez-Martinez E, Amador C, Latouche C, El Moghrabi S, Berger T, Mak TW, Fay R, Farman N, Rossignol P, Zannad F, Lopez-Andres N, Jaisser F. Neutrophil Gelatinase-Associated Lipocalin, a Novel Mineralocorticoid Biotarget, Mediates Vascular Profibrotic Effects of Mineralocorticoids. *Hypertension.* 2015;66:158-166.
4. Martinez-Martinez E, Calvier L, Fernandez-Celis A, Rousseau E, Jurado-Lopez R, Rossoni LV, Jaisser F, Zannad F, Rossignol P, Cachofeiro V, Lopez-Andres N. Galectin-3 blockade inhibits cardiac inflammation and fibrosis in experimental hyperaldosteronism and hypertension. *Hypertension.* 2015;66:767-775.

2 – Mécanismes de l'implication de NGAL dans les effets de l'activation du MR

Les résultats présentés dans ce chapitre sont actuellement soumis pour publication dans le journal *Clinical Science* et sont résumés ici en français. L'article est inséré dans les pages suivantes. Ce travail a été réalisé en étroite collaboration avec une équipe espagnole (Natalia Lopez-Andres, Pampelune).

Nous avons émis l'hypothèse que la production de NGAL par les cellules immunitaires pourrait être impliquée dans l'inflammation et la fibrose cardio-rénale induites par l'activation du MR. Afin de tester cette hypothèse, nous avons généré, par transfert de moelle osseuse (MO), des souris chimériques présentant une déplétion de NGAL dans leur moelle osseuse (MO KO). L'irradiation et la greffe de moelle osseuse (cf. Matériel et Méthodes) ont été réalisées par la plateforme technique de l'animalerie de la Pitié-Salpêtrière. Ces souris MO KO présentaient donc une déplétion de NGAL dans leurs cellules immunitaires. Après une étape de pré-sélection (cf. Matériel et Méthodes), nous les avons soumises au challenge NAS.

Chez les souris WT, le challenge NAS induisait le recrutement de différentes populations de cellules immunitaires au niveau des nœuds lymphatiques (granulocytes, LB, LT CD8⁺), traduisant un effet pro-inflammatoire systémique de l'Aldo. De plus, le challenge NAS était capable d'induire l'expression de NGAL par les cellules immunitaires *in vivo*. En effet, les macrophages, les cellules dendritiques et les PBMCs provenant de la rate de souris soumises au challenge NAS présentaient une expression de NGAL augmentée par rapport à celles provenant de souris témoins.

Les souris MO WT soumises au challenge NAS présentaient une fibrose périvasculaire cardiaque associée à une augmentation cardiaque de l'expression de marqueurs de remodelage (Col-1, Col-3 et α -SMA). Ces effets étaient prévenus par la déplétion de NGAL dans les cellules immunitaires chez les souris MO KO. L'inflammation induite par le challenge NAS

chez les souris MO WT, mise en évidence par une augmentation de l'immunomarquage pour divers marqueurs pro-inflammatoires (MCP-1, Ostéopontine, TNF- α , CD3, CD68, CD80), était également prévenu chez les souris MO KO. De manière intéressante, les souris MO KO, soumises ou non au challenge NAS, présentaient une expression cardiaque de NGAL diminuée par rapport aux souris MO WT, suggérant le NGAL immunitaire comme source importante de NGAL cardiaque.

Au niveau rénal, la déplétion de NGAL dans les cellules immunitaires était également bénéfique. Les souris MO KO étaient protégées contre l'hypertrophie rénale et glomérulaire, la fibrose interstitielle ainsi que l'inflammation rénale induites par le challenge NAS.

Par ailleurs, le traitement de fibroblastes cardiaques humains en culture avec de la NGAL recombinante a confirmé le rôle profibrotique direct de NGAL (induction de Col-1 et Gal-3) et démontré un rôle pro-inflammatoire (induction d'IL-6 et d'IL-1 β) et prolifératif de NGAL dans ce modèle cellulaire.

Article 2

Neutrophil Gelatinase-Associated Lipocalin from immune cells in aldosterone-induced cardiorenal remodeling and inflammation.



Manuscript # CS-2017-1238

Neutrophil Gelatinase-Associated Lipocalin from immune cells in aldosterone-induced cardiorenal remodeling and inflammation.

Mathieu Buonafine^{1#} MSc, Ernesto Martínez-Martínez^{1#} PhD, Cristian Amador² PhD, Basile Gravez¹ PhD, Jaime Ibarrola³ MSc, Amaya Fernández-Celis³, Soumaya El Moghrabi¹ PhD, Patrick Rossignol⁴ MD, PhD, Natalia López-Andrés³ PhD, Frédéric Jaisser^{1,4} MD, PhD.

¹INSERM, UMRS 1138, Centre de Recherche des Cordeliers, Pierre et Marie Curie University, Paris Descartes University, Paris, France. ²Centro de Investigación Biomédica, Universidad Autónoma de Chile, Santiago, Chile. ³Cardiovascular Translational Research, Navarrabiomed (Miguel Servet Foundation), Instituto de Investigación Sanitaria de Navarra (IdiSNA), Pamplona, Spain. ⁴INSERM, Clinical Investigation Centre 1433, French-Clinical Research Infrastructure Network (F-CRIN) INI-CRCT, Nancy, France.

[#]Both authors contributed equally to this work.

Corresponding author:

Dr. Frédéric Jaisser

INSERM U1138, Centre de Recherche de Cordeliers

15 rue de l'Ecole de Médecine, 75006, Paris, France

Tel: +33144278106

Fax: +3314427642

E-mail: frederic.jaisser@inserm.fr

ABSTRACT

Immune system activation is involved in cardiovascular (CV) and renal inflammation and fibrosis, following activation of the mineralocorticoid receptor (MR). We previously showed that Neutrophil Gelatinase-Associated Lipocalin (NGAL) is a novel target of MR signaling in CV tissue and plays a critical role in aldosterone/MR-dependent hypertension and fibrosis. We hypothesized that the production of NGAL by immune cells may play an important part in the mediation of these deleterious mineralocorticoid-induced effects. We analyzed the effect of aldosterone on immune cell recruitment and NGAL expression *in vivo*. We then studied the role of NGAL produced by immune cells in aldosterone-mediated cardiorenal inflammation and remodeling using mice depleted for NGAL in their immune cells by bone marrow transplantation and subjected to mineralocorticoid challenge NAS (Nephrectomy, Aldosterone 200µg/kg/day, Salt 1%). NAS treatment induced the recruitment of various immune cell populations to lymph nodes (granulocytes, B lymphocytes, activated CD8⁺ T lymphocytes) and the induction of NGAL expression in macrophages, dendritic cells, and PBMCs. Mice depleted for NGAL in their immune cells were protected against NAS-induced cardiac and renal remodeling and inflammation.

We conclude that NGAL produced by immune cells plays a pivotal role in cardiac and renal damage under mineralocorticoid excess. Our data further stressed a pathogenic role of NGAL in cardiac and renal damages, besides its relevance as a biomarker of renal injury.

Keywords: Aldosterone, MR, immune cells, NGAL, cardiovascular, fibrosis, Inflammation.

INTRODUCTION

Aldosterone is a key regulator of blood pressure and electrolyte homeostasis, via the activation of the mineralocorticoid receptor (MR).¹ A growing body of evidence, in both animal models and clinical studies, suggests that MR activation plays an important pathophysiological role in cardiac and renal remodeling and inflammation,^{2,3} leading to organ failure. However, the precise mechanism by which MR activation leads to cardiac and renal damage is still unclear.

We previously identified Neutrophil Gelatinase–Associated Lipocalin (NGAL, also known as 24p3, siderocalin, lipocalin 2) as a novel MR target in the cardiovascular system.⁴ NGAL is a 25-kDa glycoprotein of the lipocalin superfamily⁵ which is expressed by a variety of cell types, including renal cells,⁶ endothelial cells,^{7,8} smooth muscle cells,⁸ cardiomyocytes⁴, and various immune cell populations, such as neutrophils,⁹ macrophages,^{8,10} and dendritic cells.¹¹ NGAL is a potent biomarker of renal injury.¹² Based on association studies, NGAL was proposed to be pathogenic in cardiovascular disease and high NGAL plasma levels have been associated with mortality in heart failure patients,¹³ independent of renal dysfunction¹⁴. Consistent with these observations, we recently demonstrated an important role for NGAL in aldosterone-induced cardiovascular injury.¹⁵ However, the cell type involved in NGAL production in mineralocorticoid-induced organ damage was not clearly determined.

The implication of immune cells in the mediation of cardiac and renal injuries^{16,17} is now well described and the role of MR from immune cells in cardiovascular diseases is emerging.¹⁸ Interestingly, increased plasma NGAL levels were found in response to pro-inflammatory stimuli in animal models^{19–21} and in patients suffering from acute or chronic inflammatory diseases,²² suggesting a role of NGAL in pro-inflammatory processes.²³ We therefore hypothesized that NGAL production by immune cells could be involved in the cardiac and renal damages induced by mineralocorticoid excess.

In the present study, we demonstrate the importance of NGAL production by immune cells in

aldosterone-induced cardiac and renal injuries using a model of mice depleted for NGAL in their immune cells by bone marrow transplantation.

MATERIAL & METHODS

Detailed methods are available in the online supplement.

Mice

Animals with bone marrow (BM) specific inactivation of NGAL (NGAL KO) were generated by irradiating (two irradiations of 5 Greys at 5-hours intervals with a Faxitron irradiator) three-month-old male C57BL/6 wild type mice (WT) (JANVIER LABS, Le Genest-Saint-Isle, France). Irradiated mice were then injected with 10 million BM cells in the penile vein. Three-month-old male mice with constitutively inactivated NGAL (Knock Out, KO) (for KO BM animals)¹⁵ and WT littermates (for WT BM animals) were used as bone marrow donors. Two months after the transplantation, mice were uninephrectomized. Osmotic minipumps (Charles River Laboratory, L'Arbresle, France) delivering aldosterone (200 µg/kg per day; Sigma-Aldrich, St-Quentin-Fallavier, France) were implanted subcutaneously in treated animals (NAS) and their drinking water was supplemented with 1% saline. All mice were maintained on normal chow and sacrificed 6 weeks later.

For cell counting and sorting experiments, three-month-old male C57BL/6 wild type mice (WT) were randomized into a Sham group (where the kidney was exposed but not removed) and the NAS group (uninephrectomy, 200 µg/kg/day aldosterone, and 1% NaCl in the drinking water). All mice were maintained on normal chow and sacrificed 28 days later.

Animals were housed in a climate-controlled facility with a 12-hours/12-hours light/dark cycle and provided free access to food and water. Experiments were approved by the Darwin ethics committee of Pierre et Marie Curie University, and conducted according to the INSERM animal care and use committee guidelines.

Flow cytometry and cell sorting

For cell counting experiments, superficial cervical, axillary, brachial, mesenteric, and inguinal lymph nodes from WT-Sham and WT-NAS mice were harvested, pooled, dispersed in RPMI 1640 medium at 4°C, and filtered through 40 µm nylon mesh (BD Biosciences). Macrophages (Mφ), Dendritic cells (DCs), granulocytes, B lymphocytes, and activated T-CD4⁺ and T-CD8⁺ lymphocytes were detected using the following antibodies and dilutions: B220-FITC (1/100), CD3-PE (1/1000), CD4-PeCy5 (1/200), CD69-PE (1/200), CD8-APC (1/200), CD11b-APC-Cy7 (1/100), CD11c-PE-Cy7 (1/1600), F4/80-PE-Cy5 (1/200), and Gr-1-PE (1/200). Fluorescence data from at least 20,000 events were collected from the live gate using a BD FACSCanto II (BD Bioscience). All data were processed and analyzed using WinMDI software.

For cell sorting experiments, whole spleen from Sham and NAS mice were harvested, dispersed in PBS at 4°C, and filtered through 40 µm nylon mesh (BD Biosciences). Erythrocytes were lysed with ACK lysis buffer. Cells were collected by centrifugation (1800 rpm for 6 min at RT), washed in PBS, 2% FBS, and stained for the specific sorting of Mφ, DCs, B lymphocytes, and CD4⁺-T, and CD8⁺-T lymphocytes using the same antibodies as mentioned above, as well as anti-MHC class II-FITC (1/100) for the detection of DCs. Fluorescence data from 1x10⁶ events were sorted from the live gate using a BD FACS Aria II (BD Bioscience). After separation, the purity of cell populations was verified and certified with a value > 94% in all cases. PBMCs were collected from ACK-lysis-treated mouse blood, using Ficoll columns, and washed with PBS.

Culture of human fibroblasts

Human fibroblasts (Promocell, Heidelberg, Germany) were cultured in fibroblast media 3 (Promocell), according to the manufacturer's instructions, and used between passages 5 and 7.

Cells were incubated for 12, 24, or 48 hours with recombinant hNGAL (500 ng/mL; R&D Systems).

Statistics

All analyses were performed using GraphPad Prism V6.01 (GraphPad Software, San Diego, CA). The two-tailed significance level was set to $p < 0.05$. Results are expressed as the mean \pm SEM. Data were analyzed using the Mann-Whitney nonparametric test (two groups), 2-way ANOVA test followed by Bonferroni post hoc test (four groups: two genotypes and two treatments), or Kruskal-Wallis test followed by Dunn's multiple comparisons test (more than two conditions).

RESULTS

NAS treatment induces a systemic pro-inflammatory state

As previously described, mice challenged with NAS had a higher blood pressure than untreated mice (WT-NAS vs. WT-Sham: 123.01 ± 3.66 mmHg vs. 100.89 ± 6.07 mmHg, $n = 5$ to 8 $p < 0.001$) and cardiac and renal hypertrophy, demonstrated by a higher heart and kidney weight/tibia length ratio (Table S1).

Lymph nodes are secondary lymphoid organs where immune cells are recruited and activated. We analyzed the recruitment of various immune cell types to five lymph nodes, distributed throughout the body, to explore whether the pro-hypertensive NAS treatment was associated with a systemic pro-inflammatory state. Flow cytometry revealed that NAS challenge induced the recruitment of granulocytes ($CD11b^+Gr-1^+$ cells, Figure 1A), B lymphocytes ($CD11b-CD11c-B220^+$ cells, Figure 1A), and activated $CD8^+$ T cells ($CD8^+CD69^+$ cells, Figure 1A), relative to the Sham group. There was also a trend for the recruitment of $M\phi$, DCs, and activated- $CD4^+$ T cells in lymph nodes (Figure 1A), but the differences from the Sham group were not statistically significant.

NAS treatment induces NGAL expression in immune cells

We characterized the effect of the NAS challenge on NGAL expression by immune cells. $M\phi$ s ($CD11b^+F4/80^+$ gate), DCs ($MHC-class-II^+CD11c^{high}$ gate), B lymphocytes ($B220^+$ gate), and $CD4^+$ T cells and $CD8^+$ T cells ($CD3^+CD4^+$ and $CD3^+CD8^+$ populations, respectively) were isolated by cell sorting from Sham and NAS mouse spleens. The quality of the selected populations was verified and was from 94-97% (data not shown). The NGAL mRNA level positively correlated with the MR mRNA level ($r^2 = 0.32$, $p < 0.01$, Figure S1) in all cell populations at basal state. The abundance of NGAL mRNA in $M\phi$, PBMCs, and DCs from

NAS mice was significantly higher than in that in Sham mice (Figure 1B). NGAL mRNA levels in B lymphocytes and CD4⁺ and CD8⁺ T lymphocytes of NAS treated mice did not differ from those of Sham mice (Figure 1B).

Immune-cell NGAL depletion prevents NAS-induced cardiac remodeling and inflammation

We studied the specific involvement of NGAL produced by immune cells in the deleterious cardiorenal effects of aldosterone by carrying out a bone marrow transplant protocol to obtain mice with a genetic deletion of NGAL in immune cells only. NGAL protein levels were substantially lower in the spleens of KO BM mice than those of WT BM mice (Figure S2A). The NAS challenge in WT BM mice induced an increase in cardiac NGAL protein levels. NGAL protein levels were significantly lower in the hearts of KO BM mice than those of WT BM mice, both in control and NAS conditions (Figure S2B). NAS challenge induced cardiac hypertrophy as shown by the increase in cardiac weight/tibia length ratio (Table S2) which was not prevented in KO BM mice. NAS treatment induced an increase in systolic blood pressure in WT BM mice. In KO BM animals, this effect was partly blunted but the systolic blood pressure remained higher in NAS compared to non-treated mice (Table S2).

WT BM mice subjected to NAS challenge presented cardiac perivascular fibrosis (Figure 2A). This was associated with increased cardiac protein levels of extracellular matrix (ECM) remodeling markers such as collagen I, collagen III, and α -SMA (Figure 2B). These effects were fully prevented by NGAL depletion in the mice immune cells.

NAS challenge also induced increased levels of pro-inflammatory markers in the hearts of WT BM mice, including monocyte chemoattractant protein 1 (MCP-1), osteopontin (OPN), and tumor necrosis factor alpha (TNF- α), as shown by immunostaining (Figure 2C). This effect was blunted (for MCP-1) or prevented (for TNF- α) by NGAL inactivation in immune cells.

OPN expression was higher in the KO BM control group than in WT BM mice and was unchanged by NAS challenge (Figure 2C). Additionally, we found a similar staining pattern for various other pro-inflammatory markers (CD3, CD68, CD80) in the heart of the mice (Figure S3A).

Immune-cell NGAL depletion prevents NAS-induced renal remodeling and inflammation.

NAS challenge induced renal hypertrophy as shown by the increase in kidney weight/tibia length ratio (Table S2) which was fully prevented in KO BM mice subjected to NAS. Kidney NGAL protein levels were not modified by the bone marrow transplant.

WT BM mice subjected to NAS challenge showed glomerular hypertrophy (Figure 3A) and interstitial fibrosis (Figure 3B) in the kidney, accompanied by increased protein levels of collagen I, collagen IV, and α -SMA (Figure 3C). KO BM mice were protected against the deleterious effects of MR activation by aldosterone: interstitial fibrosis was blunted (Figure 3B) and glomerular hypertrophy and increased expression of markers of ECM remodeling upon NAS challenge were fully prevented (Figure 3A and 3C).

NAS challenge also induced strong immunostaining for MCP-1, OPN, and TNF- α in the kidneys of WT BM mice (Figure 3D). The increase in inflammatory marker expression was fully prevented in the KO BM NAS animals. The same pattern was found for various other pro-inflammatory markers (CD3, CD68, CD80) in the kidney (Figure S3B).

NGAL has pro-inflammatory, pro-fibrotic, and proliferative effects on cultured human fibroblasts

We assessed the direct pro-fibrotic and pro-inflammatory roles of NGAL by analyzing the effects of recombinant NGAL on cultured human fibroblasts. NGAL showed both pro-

inflammatory and pro-fibrotic effects on treated fibroblasts, as shown by increased protein levels of the pro-inflammatory markers IL-6 (Figure 4A) and IL-1 β (Figure 4B) and the pro-fibrotic markers collagen I (Figure 4C) and galectin 3 (Figure 4D), with a peak of expression at 24 hours. Furthermore, the addition of recombinant NGAL induced increased proliferation of the fibroblasts over time (Figure 4E), consistent with the role of NGAL in extracellular matrix remodeling.

DISCUSSION

NGAL is a biomarker of renal injury and its role as a mediator of renal injury has been highlighted.^{24,25} It is also a predictor of poor prognosis in patients with acute myocardial infarction, heart failure, or stroke,²⁶ and recent studies reported that the correlation between serum NGAL and CV risks is independent of renal dysfunction,¹⁴ suggesting a direct role for NGAL in CV diseases. Consistent with this role, we and others have accumulated preclinical data suggesting a broad pathogenic role of NGAL in CV diseases.^{8,15,27–32}

Specific production of NGAL by immune cells may play an important role in the mediation of mineralocorticoid-induced hypertension and cardiac injuries, since NGAL is a direct MR target and is found to be increased in various inflammatory situations.^{19–23} Indeed, the role of immune cells in hypertensive,^{33,34} cardiac,³⁵ and renal¹⁶ pathologies is now very well documented. Recent studies have also demonstrated the implication of MR from immune cells in these pathologies.^{18,36–38} We show in the present study that NAS challenge induced the recruitment of various populations of immune cells to the lymph nodes, secondary lymphoid organs where immune cells are recruited and activated, thus highlighting the systemic pro-inflammatory role of aldosterone. NAS challenge induced increased NGAL expression in M ϕ , PBMCs, and DCs, revealing a role for aldosterone in NGAL production by these immune cell populations. We tested the role of inflammatory NGAL production on aldosterone-mediated cardiac and renal injury by generating chimeric mice in which NGAL was specifically depleted from their immune cells and analyzing the impact of mineralocorticoid excess. Cardiac NGAL levels were lower in mice lacking NGAL in their immune cells than in wild type mice, revealing immune cells as a major source of NGAL in the heart under both basal and mineralocorticoid-stimulated conditions. However, NGAL protein levels were not significantly modified in the kidney of KO BM mice relative to WT BM mice. This is most likely due to the accumulation of NGAL in the

kidney upon injury, as NGAL has been described to be highly reabsorbed in the proximal tubule.³⁹

We previously uncovered a key role of NGAL in mineralocorticoid-induced CV injury.¹⁵ Constitutive and global deletion of NGAL in mice prevented the increase in blood pressure and cardiovascular ECM remodeling induced by the mineralocorticoid challenge NAS. In the present study, we extend these findings and demonstrate that specific NGAL production by immune cells plays a pivotal role in mediating mineralocorticoid-induced cardiac and renal injuries. Mice with specific depletion of NGAL in their immune cells showed a moderate increase in blood pressure, but were protected against the cardiac and renal fibrosis and inflammation induced by the NAS challenge.

NAS challenge increased immune cell infiltration of the hearts and kidneys of WT BM mice, shown by immunostaining of CD3, CD68, and CD80, but not in KO BM mice. This suggests that NGAL production by immune cells creates a pro-inflammatory environment (shown by increased expression of the pro-inflammatory markers MCP-1, OPN, and TNF- α) that leads to the recruitment of more inflammatory cells to the inflamed organs and organ damage. This is consistent with a previous study that highlighted a role for NGAL in the recruitment of immune cells to the site of inflammation: Aigner *et al.* showed that immune-cell recruitment to the hearts of mice subjected to ischemia-reperfusion (IR) was significantly prevented in NGAL KO mice.⁴⁰ Impaired recruitment of immune cells in NGAL KO mice has been associated with reduced levels of chemokines that promote infiltration⁴¹ and adhesion of pro-inflammatory cells.⁴² Finally, NGAL neutralization using anti-NGAL monoclonal antibodies has also been shown to decrease the recruitment of M ϕ after myocardial IR injury and suppress local expression of various pro-inflammatory markers.⁴³

We have reported that NGAL played pro-fibrotic effects in cultured fibroblasts.¹⁵ Here, we extend this result and show a pro-inflammatory role for NGAL in fibroblasts as well. NGAL

produced by immune cells could therefore locally participate in organ inflammation and remodeling, a mechanism already proposed by Eilenberg *et al.* in the pro-inflammatory context of atherosclerotic plaques.⁸ We also showed that NGAL exerted a proliferative role in cultured fibroblasts. This effect has been described in ischemic kidneys, where tubular cell proliferation was induced by NGAL injection *in vivo*.^{39,44} Since proliferation is known to play an important role in tissue remodeling,⁴⁵ the proliferative effects of NGAL could also be involved in pathological organ remodeling upon mineralocorticoid challenge.

In conclusion, our study shows that NGAL is an important mediator of aldosterone-induced cardiac and renal damage through pro-inflammatory and pro-fibrotic properties. The importance of immune-cell production of NGAL in these mechanisms highlight the pivotal role of NGAL in mediating inflammatory processes under mineralocorticoid excess. NGAL could therefore represent a novel therapeutic target in diseases that involve cardiac and renal remodeling and inflammation.

Perspectives

We demonstrate in this study that NGAL produced by immune cells plays a key role in the increased blood pressure and cardio-renal injuries induced by mineralocorticoid challenge. Further study should aim to elucidate whether a specific immune cell type plays a prominent role in NGAL effects.

Acknowledgments

We would like to thank Bocar Kane and the team of the CEF of Pitié-Salpêtrière Hospital for their technical assistance concerning the bone marrow transplant experiment and the team of the CEF of the Cordeliers Research Center for their support with animal care. We are grateful

to Thorsten Berger and Tak W. Mak (University of Toronto, Canada) for kindly sharing the NGAL KO mice.

Sources of funding

This work was funded by grants from the *Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale*, the *Centre de Recherche Industrielle et Technique*, the European Fibro-Targets Project (grant agreement No. SP7#602904), the FP7-funded COST ADMIRE network (BM1301), ANR MRFOCUS (ANR-15-CE14-0032-02), the Fight-HF Avenir investment program (ANR-15-RHUS-0004). NL-A was supported by a Miguel Servet contract CP13/00221 from the “Instituto de Salud Carlos III-FEDER”. MB was supported by a PhD grant from Region Ile de France COORDIM.

Conflict of interest

No conflict of interest.

NOVELTY AND SIGNIFICANCE

What Is New?

- Production of NGAL by immune cells is an important source of NGAL in the heart.
- NGAL plays a direct proliferative and pro-inflammatory role in cultured fibroblasts.
- Invalidation of NGAL from immune cells protects against mineralocorticoid-induced cardio-renal remodeling and inflammation.

What Is Relevant?

NGAL from immune cells plays an important role in cardiac and renal damages through pro-fibrotic and pro-inflammatory properties, making NGAL a potential target in pathologies with cardio-renal remodeling and inflammation.

Summary

This study shows the pro-inflammatory action of aldosterone in vivo leading to the recruitment of immune cells and induction of NGAL expression in M ϕ , DCs and PBMCs. Furthermore, these data support the pro-fibrotic and pro-inflammatory properties of NGAL and the important role of NGAL produced by immune cells in mediating cardiac and renal damages induced by mineralocorticoid challenge.

FIGURES LEGENDS

Figure 1. NAS challenge induces systemic inflammation and NGAL expression by immune cells.

(A) Flow cytometry analysis of the recruitment of Monocytes/Macrophages (M ϕ), Dendritic cells (DCs), granulocytes, B lymphocytes, activated CD4⁺ T cells and activated CD8⁺ T cells, after NAS treatment. (B) NGAL mRNA abundance in M ϕ , DCs, B lymphocytes, CD4⁺ T and CD8⁺ T cells, after cell sorting from WT-Sham and WT-NAS mouse spleen. Mean \pm SEM (n = 3 to 6). *p < 0.05, **p < 0.01 vs. Sham group.

Figure 2. Immune-cell NGAL depletion prevents NAS-induced cardiac remodeling and inflammation.

(A) Histological analysis and quantification of cardiac perivascular fibrosis. (B) Protein expression quantification by WB of cardiac remodeling markers Collagen I, Collagen III, and α -SMA. (C) Immunostaining image and quantification of the pro-inflammatory markers MCP-1, OPN, and TNF- α in the heart. Mean \pm SEM (n = 10 to 12). *p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001, ****p < 0.0001.

Figure 3. Immune-cell NGAL depletion prevents NAS-induced renal remodeling and inflammation.

Histological analysis and quantification of (A) glomerular hypertrophy and (B) renal fibrosis. (C) Protein expression quantification by WB of renal remodeling Collagen I, Collagen III and α -SMA. (D) Immunostaining image and quantification of the pro-inflammatory markers MCP-1, OPN, and TNF- α in the kidney. Mean \pm SEM (n = 10 to 12). *p < 0.05, **p < 0.01, ****p < 0.0001.

Figure 4. NGAL has a direct pro-inflammatory, pro-fibrotic, and proliferative effects on cultured fibroblasts.

Quantification of protein expression of pro-fibrotic markers Collagen I and Galectin 3 by western blot (A), pro-inflammatory markers IL-6 and IL-1 β by ELISA (B) and quantification of proliferation in cultured fibroblasts treated with NGAL (500ng/mL) for 12, 24, or 48h. Mean \pm SEM (n = 6). *p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001, ****p < 0.0001 vs. control.

FIGURES

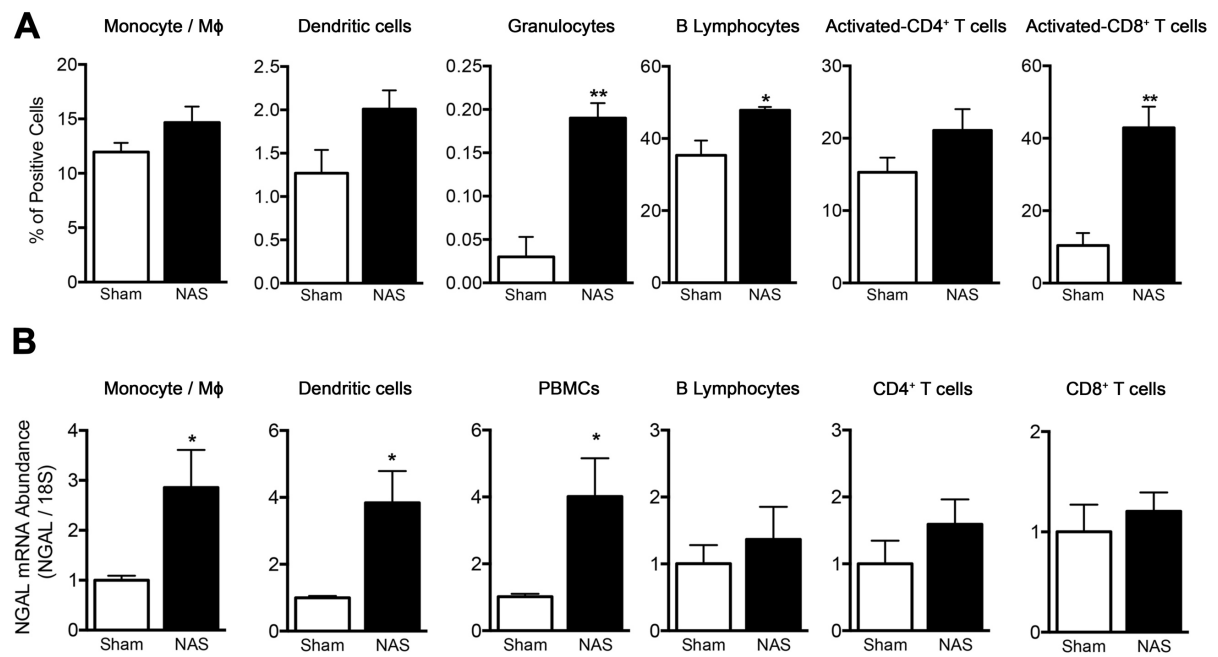


Figure 1. NAS challenge induces systemic inflammation and NGAL expression by immune cells.

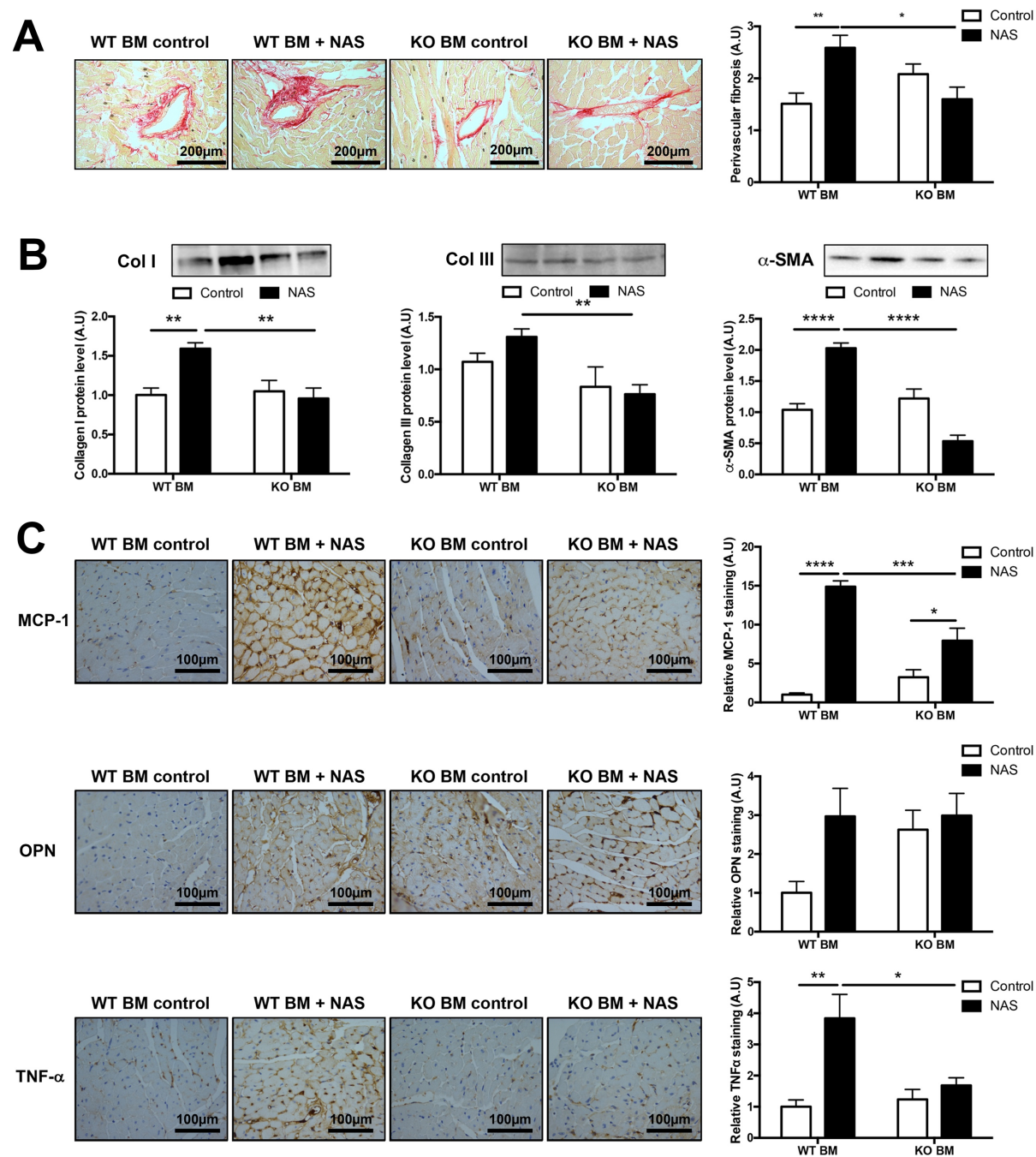


Figure 2. Immune-cell NGAL depletion prevents NAS-induced cardiac remodeling and inflammation.

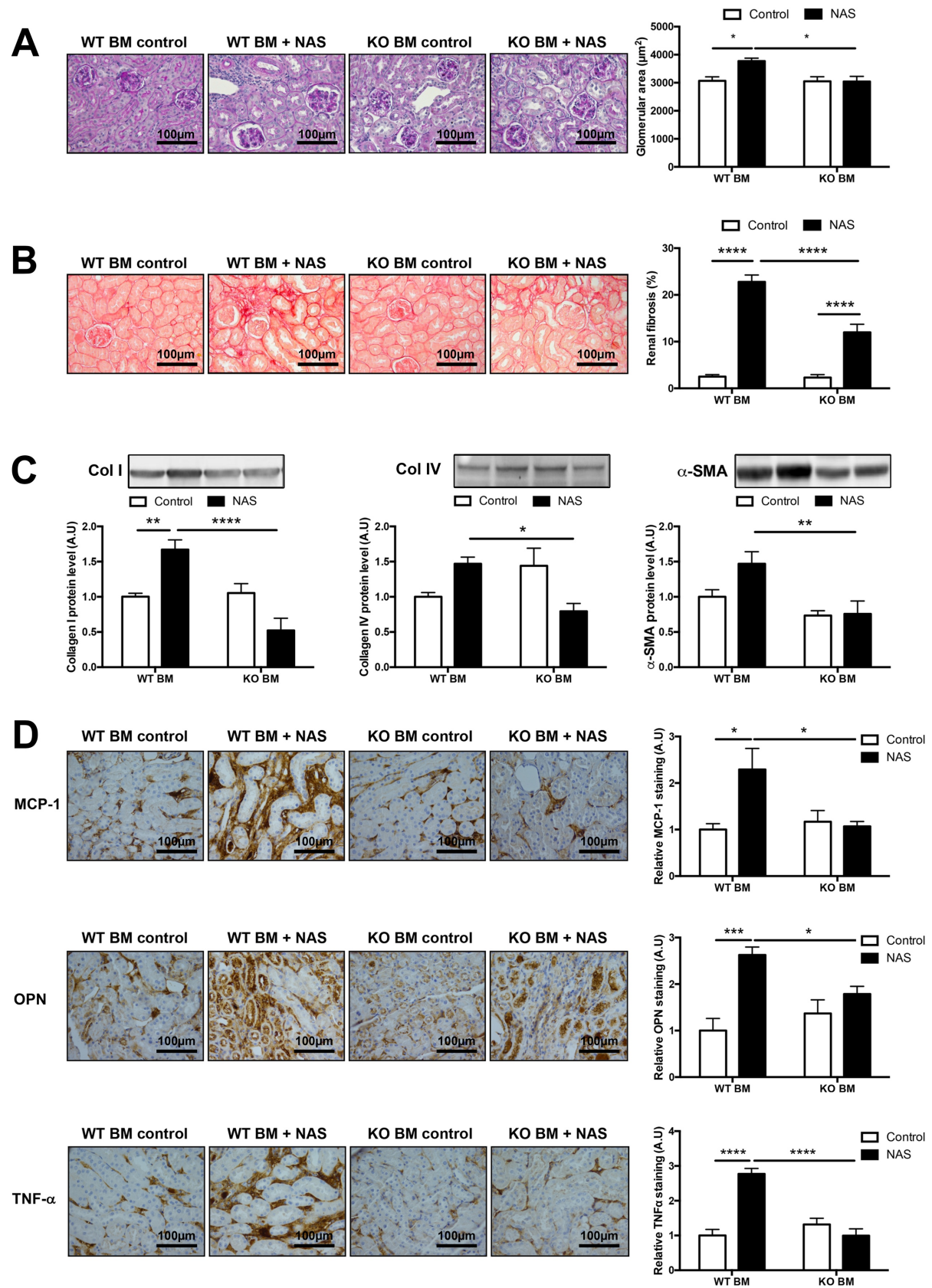


Figure 3. Immune-cell NGAL depletion prevents NAS-induced renal remodeling and inflammation.

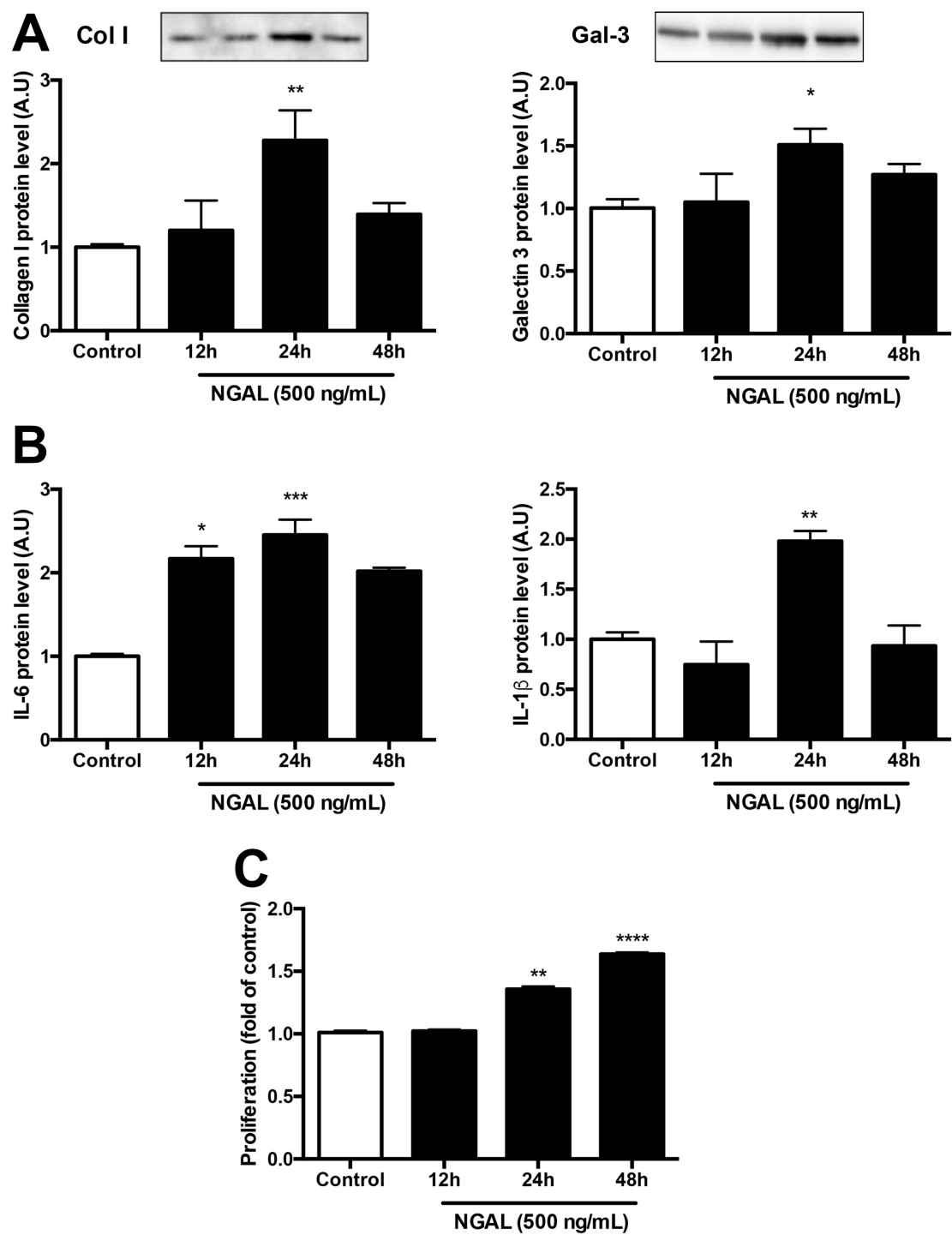


Figure 4. NGAL has a direct pro-inflammatory, pro-fibrotic, and proliferative effects on cultured fibroblasts.

ONLINE SUPPLEMENT

Neutrophil Gelatinase-Associated Lipocalin from immune cells in aldosterone-induced cardiorenal inflammation and remodeling.

Mathieu Buonafine^{1#} MSc, Ernesto Martínez-Martínez^{1#} PhD, Cristian Amador² PhD, Basile Gravez¹ PhD, Jaime Ibarrola³ MSc, Amaya Fernández-Celis³, Soumaya El Moghrabi¹ PhD, Patrick Rossignol⁴ MD, PhD, Natalia López-Andrés³ PhD, Frédéric Jaisser^{1,4} MD, PhD.

¹INSERM, UMRS 1138, Team Jaisser, Centre de Recherche des Cordeliers, Pierre et Marie Curie University, Paris Descartes University, Paris, France. ²Centro de Investigación Biomédica, Universidad Autónoma de Chile, Santiago, Chile. ³Cardiovascular Translational Research, Navarrabiomed (Miguel Servet Foundation), Instituto de Investigación Sanitaria de Navarra (IdiSNA), Pamplona, Spain.

⁴INSERM, Clinical Investigation Centre 1433, French-Clinical Research Infrastructure Network (F-CRIN) INI-CRCT, Nancy, France.

[#]Both authors contributed equally to this work.

Short title: NGAL from immune cells in mineralocorticoid-induced cardiorenal injury

Corresponding author:

Dr. Frédéric Jaisser

INSERM U1138, Centre de Recherche de Cordeliers

15 rue de l'Ecole de Médecine, 75006, Paris, France

Tel: +33144278106

Fax: +3314427642

E-mail: frederic.jaisser@inserm.fr

SUPPLEMENTARY MATERIAL & METHODS

Blood pressure measurements

Systolic blood pressure was measured by tail cuff plethysmography in trained conscious mice. Ten measurements per mouse were taken every day between 10 am and 12 pm for five days using a BP2000 Visitech model (Bioseb, Vitrolles, France).

Tissue sampling

Hearts and kidneys were rinsed in cold PBS (Phosphate Buffer Solution), weighed and cut into 3 sections (transversal cut). The base and apex were used for biochemical studies and the middle section for morphological studies. Left tibia length was used for organ weight normalization.

Histological analysis

Tissue staining was performed on transversal sections of heart and kidney. Samples were dehydrated, embedded in paraffin, and cut into 5 μ m-thick sections. Slides were treated with H₂O₂ for 10 min to block peroxidase activity. All sections were blocked with 5% normal goat serum in PBS for 1 h and incubated overnight with antibodies against MCP-1, OPN, TNF- α , CD3, CD45, CD68, CD80, washed three times, and then incubated for 30 min with horseradish peroxidase-labeled secondary antibodies (Dako Cytomation, Carpinteria, CA). The signal was revealed using the DAB Substrate Kit (BD Pharmingen).

Sirius red and Periodic Acid Schiff (PAS) staining were performed on 5- μ m thick sections of organs that had been fixed in 4% paraformaldehyde for 24 h and embedded in paraffin. Image acquisition was performed using a Leica DM4000B microscope and Leica Application Suite software (Leica Microsystems, Nanterre, France). Images were analyzed using ImageJ software.

ELISA

NGAL, IL-6, and IL-1 β protein levels were measured by ELISA (R&D Systems). ELISA were performed according the manufacturer's instructions.

MTT proliferation assay

Fibroblasts were seeded in 96-wells plates. The cells were stimulated with NGAL and 12, 24, or 48 h later, incubated with 10 μ L MTT labeling reagent (Sigma-Aldrich, St-Quentin-Fallavier, France) (final concentration 0.5 mg/mL) at 37°C for another 4 h. Then, 100 μ L solubilization solution (Sigma-Aldrich, St-Quentin-Fallavier, France) was added to dissolve the formazan crystals and the absorbance was measured in a microplate reader at 595 nm.

Western blot analysis

Aliquots of 20 μ g total protein were prepared from cardiac or kidney homogenates or cell lysates, separated by SDS polyacrylamide gel electrophoresis, and transferred to Hybond-c Extra nitrocellulose membranes (Amersham Biosciences). Membranes were incubated with primary antibodies for: collagen type I (Santa Cruz; dilution 1:500), collagen type III (Santa Cruz; dilution 1:500), collagen type IV (Santa Cruz; dilution 1:500), α -smooth muscle actin (α -SMA; Sigma; dilution 1:2000), or galectin-3 (Gal-3; Thermo Scientific, dilution 1/500). Stain free detection was used as a loading control. After washing, the blots were incubated with peroxidase-conjugated secondary antibody, and developed using an ECL chemiluminescence kit (Amersham) for protein detection. After densitometric analysis, optical density values were converted to arbitrary units. Results are expressed as an n-fold increase over the values of the control group in densitometric arbitrary units. All western blots were performed at least in triplicate for each experimental condition.

Total RNA isolation and real-time RT-PCR

Total RNA from sorted cells was extracted using TRIzol, according to the manufacturer's instructions. cDNA was produced from 2 µg RNA using the Superscript II reverse transcriptase kit[®]. Real-time PCR reactions were performed and transcript levels detected using the SYBR Green method. The following NGAL primers were used: 18S, (F) 5'-CGCCGCTAGAGGTGAAATTC-3', (R) 5'-TCTTGGCAAATGCTTTCGC-3'; NGAL, (F) 5'-GGACCAGGGCTGTCGCTACT-3', (R) 5'-GGTGGCCACTTGACATTGT-3'. All PCR products were subjected to a melting curve program to confirm amplification specificity. The results were analyzed according to the standard curve method, and NGAL mRNA abundance was calculated relative to 18S mRNA abundance.

SUPPLEMENTARY FIGURES

Parameters	WT Sham	WT NAS
Body weight (g)	26.7±0.87	25.5±1.48
Tibia length (mm)	16.5±0.09	16.58±0.27
HW/TL ratio (mg/mm)	7.59±0.89	8.46±0.75*
KW/TL ratio (mg/mm)	9.32±0.43	16.53±1.01***
Systolic blood pressure (mmHg)	100.89±6.07	123.01±3.66***

Table S1. Physiological parameters of mice after NAS challenge.

HW, heart weight; KW, kidney weight; TL, tibia length. Mean ± SEM (n = 5 to 8).

*p < 0.05, ***p < 0.001 vs. Sham.

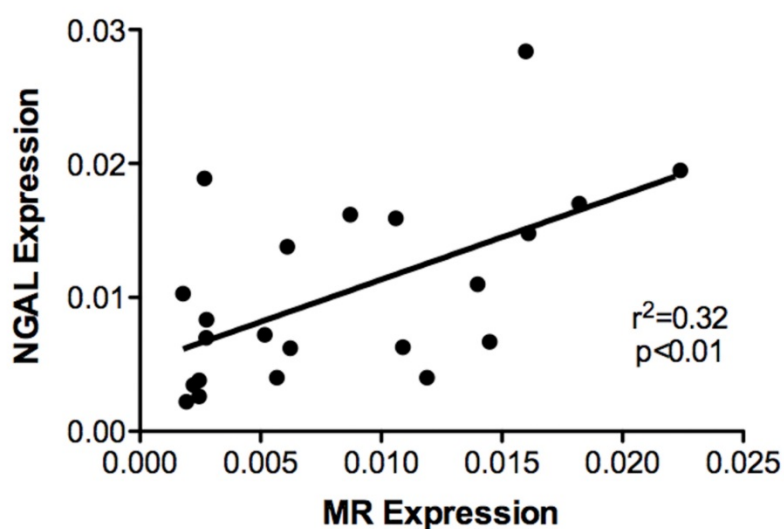


Figure S1. NGAL expression in immune cells positively correlates with MR expression.

Linear regression analysis of NGAL vs MR mRNA abundance in each sorted immune cell population at basal state.

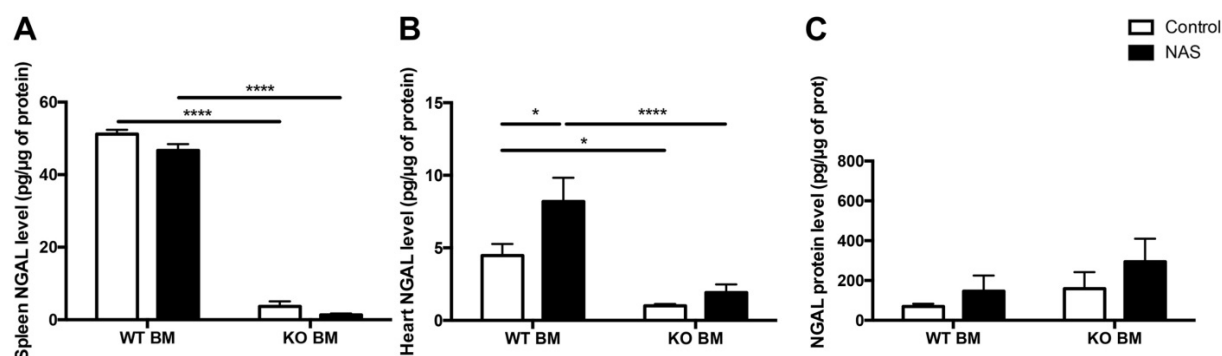


Figure S2. Relative NGAL levels in the spleen, the heart and the kidney.

Quantification of protein expression by ELISA of NGAL in (A) the spleen, (B) heart, and (C) kidney. Mean \pm SEM (n = 10 to 12). *p < 0.05, ****p < 0.0001.

Parameters	WT BM Control	WT BM NAS	KO BM Control	KO BM NAS
Body weight (g)	27.0 \pm 1.69	23.75 \pm 1.35	27.27 \pm 1.44	21.75 \pm 2.84
Tibia length (mm)	15.97 \pm 0.71	15.47 \pm 0.65	16.14 \pm 0.48	15.43 \pm 0.42
HW/TL ratio (mg/mm)	7.00 \pm 0.19	9.72 \pm 0.31****	7.08 \pm 0.19	9.67 \pm 0.43****
KW/TL ratio (mg/mm)	11.81 \pm 1.26	14.69 \pm 1.45****	12.05 \pm 1.66	11.75 \pm 2.35†
SBP (mmHg)	102.9 \pm 11.58	133.1 \pm 11.8****	100.4 \pm 9.53	115.8 \pm 12.6*†

Table S2. Physiological parameters of WT BM and KO BM after NAS challenge.

HW, Heart Weight; KW, Kidney Weight; TL, Tibia Length; SBP, Systolic Blood Pressure. Mean \pm SEM (n = 10 to 12). *p < 0.05, ****p < 0.0001 vs. relative Control group. † p < 0.05 vs. WT BM NAS group.

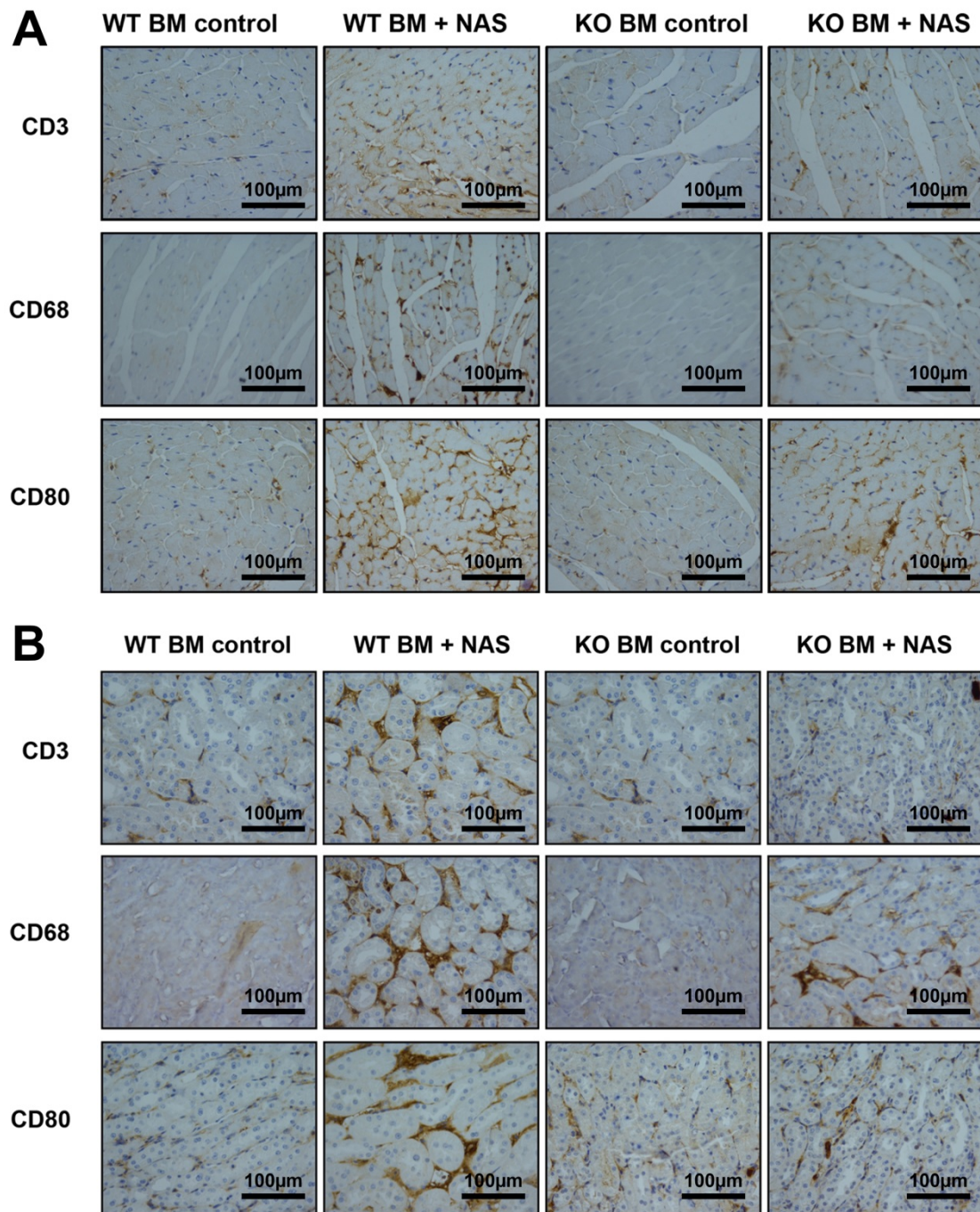


Figure S3. Immune cell specific NGAL inactivation prevents NAS-induced infiltration of immune cells in the heart and kidney.

Immunostaining picture of immune cells markers CD3, CD68 and CD80 in the heart (**A**) and in the kidney (**B**) of WT BM and KO BM mice after NAS challenge. Mean \pm SEM (n = 10 to 12).

REFERENCES

1. Rogerson FM, Fuller PJ. Mineralocorticoid action. *Steroids*. 2000;65:61–73.
2. Briet M, Schiffrin EL. Aldosterone: effects on the kidney and cardiovascular system. *Nat Rev Nephrol*. 2010;6:261–273.
3. Cachofeiro V, Miana M, de las Heras N, Martín-Fernández B, Ballesteros S, Fernández-Tresguerres J, Lahera V. Aldosterone and the vascular system. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 2008;109:331–335.
4. Latouche C, El Moghrabi S, Messaoudi S, Nguyen Dinh Cat A, Hernandez-Diaz I, Alvarez de la Rosa D, Perret C, López Andrés N, Rossignol P, Zannad F, Farman N, Jaisser F. Neutrophil gelatinase-associated lipocalin is a novel mineralocorticoid target in the cardiovascular system. *Hypertension*. 2012;59:966–972.
5. Schmidt-Ott KM, Mori K, Li JY, Kalandadze A, Cohen DJ, Devarajan P, Barasch J. Dual Action of Neutrophil Gelatinase-Associated Lipocalin. *J Am Soc Nephrol*. 2007;18:407–413.
6. Liu F, Yang H, Chen H, Zhang M, Ma Q. High expression of neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL) in the kidney proximal tubules of diabetic rats. *Adv Med Sci*. 2015;60:133–138.
7. Hamzic N, Blomqvist A, Nilsberth C. Immune-Induced Expression of Lipocalin-2 in Brain Endothelial Cells: Relationship with Interleukin-6, Cyclooxygenase-2 and the Febrile Response. *J Neuroendocrinol*. 2013;25:271–280.
8. Eilenberg W, Stojkovic S, Piechota-Polanczyk A, Kaun C, Rauscher S, Gröger M, Klinger M, Wojta J, Neumayer C, Huk I, Demyanets S. Neutrophil Gelatinase-Associated Lipocalin (NGAL) is Associated with Symptomatic Carotid Atherosclerosis and Drives Pro-inflammatory State In Vitro. *Eur J Vasc Endovasc Surg*. 2016;51:623–631.
9. Kjeldsen L, Johnsen AH, Sengelov H, Borregaard N. Isolation and primary structure of NGAL, a novel protein associated with human neutrophil gelatinase. *J Biol Chem*. 1993;268:10425–10432.
10. Flo TH, Smith KD, Sato S, Rodriguez DJ, Holmes MA, Strong RK, Akira S, Aderem A. Lipocalin 2 mediates an innate immune response to bacterial infection by sequestering iron. *Nature*. 2004;432:917–921.
11. Floderer M, Prchal-Murphy M, Vizzardelli C. Dendritic Cell-Secreted Lipocalin2 Induces CD8+ T-Cell Apoptosis, Contributes to T-Cell Priming and Leads to a TH1 Phenotype. *PLoS ONE*. 2014;9:e101881.

12. Devarajan P. Neutrophil gelatinase-associated lipocalin: a promising biomarker for human acute kidney injury. *Biomark Med.* 2010;4:265–280.
13. van Deursen VM, Damman K, Voors AA, van der Wal MH, Jaarsma T, van Veldhuisen DJ, Hillege HL. Prognostic value of plasma neutrophil gelatinase-associated lipocalin for mortality in patients with heart failure. *Circ Heart Fail.* 2014;7:35–42.
14. Wu G, Li H, Fang Q, Jiang S, Zhang L, Zhang J, Hou X, Lu J, Bao Y, Xu A, others. Elevated circulating lipocalin-2 levels independently predict incident cardiovascular events in men in a population-based cohort. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2014;ATVBAHA–114.
15. Tarjus A, Martínez-Martínez E, Amador C, Latouche C, El Moghrabi S, Berger T, Mak TW, Fay R, Farman N, Rossignol P, others. Neutrophil Gelatinase–Associated Lipocalin, a Novel Mineralocorticoid Biotarget, Mediates Vascular Profibrotic Effects of Mineralocorticoids. *Hypertension.* 2015;66:158–166.
16. Imig JD, Ryan MJ. Immune and Inflammatory Role in Renal Disease [Internet]. In: Terjung R, editor. *Comprehensive Physiology*. Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc.; 2013 [cited 2017 Mar 20]. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/cphy.c120028>
17. Montecucco F, Liberale L, Bonaventura A, Vecchiè A, Dallegri F, Carbone F. The Role of Inflammation in Cardiovascular Outcome. *Curr Atheroscler Rep* [Internet]. 2017 [cited 2017 Mar 20];19. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s11883-017-0646-1>
18. Bene NC, Alcaide P, Wortis HH, Jaffe IZ. Mineralocorticoid receptors in immune cells: Emerging role in cardiovascular disease. *Steroids.* 2014;91:38–45.
19. Han M, Li Y, Liu M, Li Y, Cong B. Renal neutrophil gelatinase associated lipocalin expression in lipopolysaccharide-induced acute kidney injury in the rat. *BMC Nephrol.* 2012;13:25.
20. Ip JP, Noçon AL, Hofer MJ, Lim SL, Müller M, Campbell IL. Lipocalin 2 in the central nervous system host response to systemic lipopolysaccharide administration. *J Neuroinflammation.* 2011;8:1.
21. Shashidharamurthy R, Machiah D, Aitken JD, Putty K, Srinivasan G, Chassaing B, Parkos CA, Selvaraj P, Vijay-Kumar M. Differential Role of Lipocalin 2 During Immune Complex-Mediated Acute and Chronic Inflammation in Mice: Lipocalin 2 During Immune Complex-Mediated Inflammation. *Arthritis Rheum.* 2013;65:1064–1073.
22. Rubinstein T, Pitashny M, Putterman C. The novel role of neutrophil gelatinase-B associated lipocalin (NGAL)/Lipocalin-2 as a biomarker for lupus nephritis. *Autoimmun Rev.* 2008;7:229–234.
23. Chakraborty S, Kaur S, Guha S, Batra SK. The multifaceted roles of neutrophil

- gelatinase associated lipocalin (NGAL) in inflammation and cancer. *Biochim Biophys Acta BBA - Rev Cancer*. 2012;1826:129–169.
24. Viau A, El Karoui K, Laouari D, Burtin M, Nguyen C, Mori K, Pillebout E, Berger T, Mak TW, Knebelmann B, Friedlander G, Barasch J, Terzi F. Lipocalin 2 is essential for chronic kidney disease progression in mice and humans. *J Clin Invest*. 2010;120:4065–4076.
 25. El Karoui K, Viau A, Dellis O, Bagattin A, Nguyen C, Baron W, Burtin M, Broueilh M, Heidet L, Mollet G, Druilhe A, Antignac C, Knebelmann B, Friedlander G, Bienaimé F, Gallazzini M, Terzi F. Endoplasmic reticulum stress drives proteinuria-induced kidney lesions via Lipocalin 2. *Nat Commun*. 2016;7:10330.
 26. Helanova K, Spinar J, Parenica J. Diagnostic and Prognostic Utility of Neutrophil Gelatinase-Associated Lipocalin (NGAL) in Patients with Cardiovascular Diseases - Review. *Kidney Blood Press Res*. 2014;39:623–629.
 27. Yndestad A, Landrø L, Ueland T, Dahl CP, Flo TH, Vinge LE, Espevik T, Frøland SS, Husberg C, Christensen G, Dickstein K, Kjekshus J, Øie E, Gullestad L, Aukrust P. Increased systemic and myocardial expression of neutrophil gelatinase-associated lipocalin in clinical and experimental heart failure. *Eur Heart J*. 2009;30:1229–1236.
 28. Yang B, Fan P, Xu A, Lam KS, Berger T, Mak TW, Tse H-F, Yue JW, Song E, Vanhoutte PM, others. 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* [Internet]. 2012 [cited 2016 Sep 6];Available from: <http://hub.hku.hk/handle/10722/159686>
 29. Tarín C, Fernandez-Garcia CE, Burillo E, Pastor-Vargas C, Llamas-Granda P, Castejón B, Ramos-Mozo P, Torres-Fonseca MM, Berger T, Mak TW, Egido J, Blanco-Colio LM, Martín-Ventura JL. Lipocalin-2 deficiency or blockade protects against aortic abdominal aneurysm development in mice. *Cardiovasc Res*. 2016;111:262–273.
 30. Hemdahl A-L. Expression of Neutrophil Gelatinase-Associated Lipocalin in Atherosclerosis and Myocardial Infarction. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2006;26:136–142.
 31. Sung HK, Chan YK, Han M, Jahng JWS, Song E, Eric D, Berger T, Mak TW, Sweeney G. Lipocalin-2 (NGAL) Attenuates Autophagy to Exacerbate Cardiac Apoptosis Induced by Myocardial Ischemia: LIPOCALIN-2, AUTOPHAGY AND CELL DEATH. *J Cell Physiol* [Internet]. 2017 [cited 2017 Apr 11];Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/jcp.25672>
 32. Cheng L, Xing H, Mao X, Li L, Li X, Li Q. Lipocalin-2 Promotes M1 Macrophages Polarization in a Mouse Cardiac Ischaemia-Reperfusion Injury Model. *Scand J Immunol*.

2015;81:31–38.

33. Harrison DG, Guzik TJ, Lob HE, Madhur MS, Marvar PJ, Thabet SR, Vinh A, Weyand CM. Inflammation, Immunity, and Hypertension. *Hypertension*. 2011;57:132–140.

34. Schiffrin EL. The Immune System: Role in Hypertension. *Can J Cardiol*. 2013;29:543–548.

35. Mortensen RM. Immune Cell Modulation of Cardiac Remodeling. *Circulation*. 2012;125:1597–1600.

36. Rickard AJ, Morgan J, Tesch G, Funder JW, Fuller PJ, Young MJ. Deletion of Mineralocorticoid Receptors From Macrophages Protects Against Deoxycorticosterone/Salt-Induced Cardiac Fibrosis and Increased Blood Pressure. *Hypertension*. 2009;54:537–543.

37. Sun XN, Li C, Liu Y, Du L-J, Zeng M-R, Zheng XJ, Zhang WC, Liu Y, Zhu M, Kong D, Zhou L, Lu L, Shen Z-X, Yi Y, Du L, Qin M, Liu X, Hua Z, Sun S, Yin H, Zhou B, Yu Y, Zhang Z, Duan S-Z. T Cell Mineralocorticoid Receptor Controls Blood Pressure by Regulating Interferon Gamma. *Circ Res*. 2017;CIRCRESAHA.116.310480.

38. Amador CA, Barrientos V, Peña J, Herrada AA, González M, Valdés S, Carrasco L, Alzamora R, Figueroa F, Kalergis AM, Michea L. Spironolactone decreases DOCA-salt-induced organ damage by blocking the activation of T helper 17 and the downregulation of regulatory T lymphocytes. *Hypertens Dallas Tex 1979*. 2014;63:797–803.

39. Mori K, Lee HT, Rapoport D, Drexler IR, Foster K, Yang J, Schmidt-Ott KM, Chen X, Li JY, Weiss S, Mishra J, Cheema FH, Markowitz G, Suganami T, Sawai K, Mukoyama M, Kunis C, D'Agati V, Devarajan P, Barasch J. Endocytic delivery of lipocalin-siderophore-iron complex rescues the kidney from ischemia-reperfusion injury. *J Clin Invest*. 2005;115:610–621.

40. Aigner F, Maier HT, Schwelberger HG, Wallnöfer EA, Amberger A, Obrist P, Berger T, Mak TW, Maglione M, Margreiter R, Schneeberger S, Troppmair J. Lipocalin-2 Regulates the Inflammatory Response During Ischemia and Reperfusion of the Transplanted Heart. *Am J Transplant*. 2007;7:779–788.

41. Sickinger S, Maier H, König S, Vallant N, Kofler M, Schumpp P, Schwelberger H, Hermann M, Obrist P, Schneeberger S, Margreiter R, Troppmair J, Pratschke J, Aigner F. Lipocalin-2 as mediator of chemokine expression and granulocyte infiltration during ischemia and reperfusion. *Transpl Int*. 2013;26:761–769.

42. Schroll A, Eller K, Feistritzer C, Nairz M, Sonnweber T, Moser PA, Rosenkranz AR, Theurl I, Weiss G. Lipocalin-2 ameliorates granulocyte functionality: Innate immunity. *Eur J Immunol*. 2012;42:3346–3357.

43. Gilet A, Zou F, Boumenir M, Frippiat J-P, Thornton SN, Lacolley P, Ropars A. Aldosterone up-regulates MMP-9 and MMP-9/NGAL expression in human neutrophils through p38, ERK1/2 and PI3K pathways. *Exp Cell Res*. 2015;331:152–163.
44. Mishra J. Amelioration of Ischemic Acute Renal Injury by Neutrophil Gelatinase-Associated Lipocalin. *J Am Soc Nephrol*. 2004;15:3073–3082.
45. Fan D, Takawale A, Lee J, Kassiri Z. Cardiac fibroblasts, fibrosis and extracellular matrix remodeling in heart disease. *Fibrogenesis Tissue Repair*. 2012;5:15.

IV. DISCUSSION

L'implication du MR dans le développement des pathologies CV et rénales est aujourd'hui bien décrite [28–30]. Afin de mieux comprendre les mécanismes impliqués dans ces effets délétères, notre laboratoire a identifié NGAL comme une nouvelle cible génomique du MR dans le système CV [191]. NGAL est surtout connue comme un biomarqueur de lésion rénale utilisé en clinique [192] mais c'est également un prédicteur de mauvais pronostic chez les patients souffrant d'insuffisance cardiaque (IC) ou ayant subi un infarctus du myocarde (IM) ou un accident vasculaire cérébral [340]. Au-delà de son rôle de biomarqueur, de plus en plus de données indiquent que NGAL pourrait jouer un rôle pathologique dans les maladies CV [206, 215, 266, 277, 317, 319, 321, 341] et rénales [288, 289, 342], en particulier en raison de son implication dans les mécanismes inflammatoires [193, 259, 260, 279, 343].

Une étude récente de notre laboratoire, utilisant des souris KO NGAL soumises au challenge NAS, a permis de mettre en évidence le rôle crucial de NGAL dans la médiation des effets délétères de l'activation du MR dans le système CV [323]. L'invalidation génique de NGAL protège les souris de l'hypertension, de la fibrose et de l'inflammation induites par une surcharge minéralocorticoïde [323].

Le travail de thèse présenté ici consistait à poursuivre l'étude du rôle de NGAL dans les effets CV et rénaux de l'activation du MR. Le premier objectif visait à étudier l'implication potentielle de NGAL dans divers modèles de fibrose cardiaque afin d'évaluer sa **spécificité** vis-à-vis de la signalisation minéralocorticoïde. Le second objectif était ensuite de mieux définir les **mécanismes** mis en jeu dans les effets pathologiques de NGAL et, en particulier, son implication dans les mécanismes hypertenseurs, profibrotiques et pro-inflammatoires.

1 – Spécificité de l'implication de NGAL dans les modèles de pathologie CV

1.1 Impact de l'invalidation génique de NGAL dans les effets CV de l'AngII

NGAL jouant un rôle crucial dans les effets profibrotiques de l'activation du MR dans le challenge NAS, nous avons voulu étudier l'implication potentielle de NGAL dans les effets profibrotiques d'un traitement chronique à l'AngII. Nous avons donc traité des souris WT et KO NGAL avec de l'AngII pendant 3 jours et pendant 3 semaines. Après 3 jours de traitement, les souris présentaient une augmentation de pression artérielle qui n'était pas prévenue par l'invalidation génique de NGAL ainsi qu'une induction de marqueurs pro-inflammatoires et profibrotiques qui n'étaient pas significativement prévenus par l'invalidation de NGAL. Après 3 semaines de traitement à l'AngII, les souris WT présentaient une hypertension ainsi qu'une augmentation de l'expression cardiaque de marqueurs de remodelage associée à une importante fibrose. Cependant, aucune différence dans les effets de l'AngII n'a pu être observée entre les souris KO NGAL et WT traitées. NGAL ne semble donc pas impliquée dans la médiation des effets pathologiques de l'AngII (Figure 21). Par ailleurs, les souris WT traitées à l'AngII ne présentaient pas d'augmentation de l'expression de NGAL après 3 semaines de traitement, ce qui indique que l'expression de NGAL observée après 3 jours de traitement est perdue après 3 semaines. Ceci est en accord avec l'induction transitoire et précoce de l'expression de NGAL par l'AngII observée par nos collaborateurs des Pays-Bas. En outre, aucune augmentation des marqueurs de l'inflammation n'a pu être identifiée chez les souris traitées après 3 semaines de traitement, traduisant également une perte du statut pro-inflammatoire cardiaque observé après 3 jours d'AngII.

Ces résultats mettent en évidence une différence importante entre les mécanismes profibrotiques et hypertensifs à l'œuvre dans le challenge NAS et dans le traitement à l'AngII. Il est d'ailleurs intéressant de noter que cette différence a également été observée récemment

par une équipe de Hong Kong (uniquement documentée pour le moment sous la forme d'un abstract) [341].

Cette implication différentielle de NGAL est relativement inattendue, puisque de nombreuses études ont montré un effet protecteur de l'antagonisme du MR dans les effets de l'AngII *in vivo*, soulignant le rôle du MR dans la médiation des effets de l'AngII [344–347]. Cela pose donc la question des différences physiopathologiques entre le modèle de challenge NAS et de traitement chronique à l'AngII.

1.1.1 Effets de l'AngII indépendants du MR

Dans la majorité des modèles expérimentaux de traitement à l'AngII, l'utilisation d'antagonistes du MR préviennent les effets délétères de l'AngII, mais seulement partiellement [344–347]. L'hypertension induite par l'AngII n'est, par exemple, jamais complètement prévenue par le blocage du MR [344–347]. De plus, dans une étude de Di Zhang *et al.*, l'antagonisme du MR n'était pas capable de prévenir la fibrose induite par un traitement chronique à l'AngII [17]. Ces données laissent penser que le MR est impliqué dans la médiation de certains effets de l'AngII *in vivo* mais que d'autres mécanismes pathologiques son également à l'œuvre. Les effets délétères de l'AngII passent également par des mécanismes *a priori* indépendants du MR. L'activation de l'AT1R dans les CML vasculaires, les cellules endothéliales et les cardiomyocytes, est à l'origine de nombreux mécanismes pathologiques tels que la vasoconstriction, l'hypertension, le stress oxydant, l'inflammation, la dysfonction endothéliale, et la fibrose [348]. Ces effets de l'AngII, au moins en partie indépendants du MR, pourraient donc représenter une différence entre les modèles pathologiques induits par un traitement à l'AngII et le modèle de surcharge minéralocorticoïde NAS, pouvant potentiellement expliquer la différence d'implication de NGAL entre ces deux modèles.

1.1.2 Complexité des interactions entre les signalisations de l'AngII et du MR

De nombreuses études ont démontré un lien important entre les signalisations de l'AngII et du MR [17, 346, 349, 350]. D'après la physiologie classique de la cascade du SRAA, l'AngII va activer son récepteur AT1R et induire la production surrénalienne d'Aldo, cette dernière activant ensuite le MR. *In vivo*, les choses ne sont pourtant pas si simples. Après un traitement chronique avec de l'AngII, les niveaux plasmatiques d'Aldo ne sont par exemple pas augmentés [17], suggérant l'existence d'autres mécanismes de régulation ou de compensation de sa production. En outre, les interactions entre les voies du MR et de l'AngII sont bien plus complexes que la schématique cascade du SRAA. Il a été montré, par exemple, que l'AngII était capable d'activer le MR de manière indépendante de la production d'Aldo. En effet, dans une étude de Jaffe *et al.* réalisée avec des CML vasculaires en culture, l'AngII était capable d'induire la translocation nucléaire du MR et d'activer un rapporteur d'expression présentant une région de réponse au MR [349]. Cet effet était bloqué par le traitement avec du Losartan, un inhibiteur de l'AT1R, mais pas par le blocage de l'Aldo synthase. Dans ce contexte, l'activation du MR par l'AngII semblait donc passer par l'AT1R mais pas par la production d'Aldo [349]. Il a été montré ensuite que cette activation directe du MR par l'AngII faisait intervenir la protéine Rac1. Dans le rein de souris transgéniques surexprimant l'AngII traitées avec un régime riche sel, la translocation nucléaire du MR et l'expression de son gène cible SGK1 étaient augmentées indépendamment du niveau d'Aldo plasmatique [346]. Ces effets étaient associés à une augmentation de l'activité de Rac1 et étaient prévenus par l'utilisation d'un inhibiteur de Rac1, soulignant son rôle dans l'activation du MR par l'AngII [346].

Ces études mettent en évidence des mécanismes multiples d'activation du MR, dépendant ou indépendant de l'Aldo. On peut donc imaginer que les conséquences fonctionnelles pourraient varier selon le type d'activation. Ceci pourrait donc représenter une autre divergence entre l'AngII et le NAS, pouvant expliquer l'implication différentielle de

NGAL entre ces modèles. De manière intéressante, il a par exemple été montré récemment que Gal-3, une autre cible du MR dans le système CV, était impliquée dans les effets de l'AngII [351], ce qui contraste avec nos résultats concernant NGAL. Il est d'ailleurs intéressant de noter que, contrairement à NGAL, l'expression de Gal-3 était augmentée dans le cœur de nos souris après 3 semaines de traitement à l'AngII (données non présentées). Ceci illustre bien une expression hétérogène des différentes cibles du MR après un traitement chronique à l'AngII.

1.1.3 Impact potentiel du contexte inflammatoire sur l'implication de NGAL

Dans notre étude, ni l'expression de NGAL, ni l'expression de marqueurs inflammatoires (TGF β , MCP-1, CD-68) n'étaient augmentées après 3 semaines de traitement à l'AngII. Les propriétés pro-inflammatoires de l'AngII sont connues [352], et nous avons en effet observé une induction cardiaque de marqueurs pro-inflammatoires après 3 jours de traitement à l'AngII. Cependant, nos données indiquent que le traitement à l'AngII n'induit pas de statut pro-inflammatoire chronique dans le cœur puisque ces marqueurs ne sont plus induits après 3 semaines. Les données de nos collaborateurs des Pays-Bas vont dans le même sens. L'infiltration immunitaire dans le cœur des souris traitées avec de l'AngII était augmentée de manière précoce mais n'était pas maintenue après plusieurs semaines. Ceci avait d'ailleurs également été décrit dans l'étude de Di Zhang *et al.* dans laquelle les souris ne présentaient pas d'infiltration de macrophages ou d'induction de certains marqueurs inflammatoire (CD68, TNF- α , ICAM et VCAM) après un traitement chronique à l'AngII [17].

Ceci pourrait représenter une différence de taille avec le contexte profibrotique induit par le challenge NAS dans lequel l'inflammation et l'induction de NGAL sont maintenues, même après 4 semaines (Tarjus et al., 2015). Cette hypothèse est également renforcée par de nombreuses données de la littérature suggérant l'existence d'un cercle vicieux dans lequel NGAL serait surexprimée en conditions inflammatoires et capable de potentialiser

l'inflammation grâce à l'induction de l'expression de médiateurs pro-inflammatoires (cf. chapitre 3.6 et Figure 9). Cette boucle d'amplification de NGAL en conditions inflammatoires pourrait donc expliquer l'absence d'induction de NGAL après 3 semaines d'AngII et son implication différentielle entre les modèles de traitement à l'AngII et de challenge NAS.

2 – Impact de l'invalidation génique de NGAL dans les effets CV de l'Iso

Nous avons ensuite voulu étudier l'implication potentielle de NGAL dans les effets profibrotiques d'un traitement à l'Iso. Nous avons d'abord réalisé plusieurs traitements chroniques mais aucune des doses testées ne nous a permis d'induire de fibrose cardiaque chez la souris C57Bl6. Nous avons alors décidé d'utiliser un modèle profibrotique induit par un traitement aigu à l'Iso, décrit récemment par Vergaro *et al.* [339]. Nous avons injecté des souris WT et KO NGAL avec de très fortes doses d'Iso sur un temps court (2 injections par jour d'Iso à 150 mg/kg/injection pendant 2 jours). Quatre semaines après injection, le cœur des souris traitées avec de l'Iso présentait une légère augmentation de l'expression de NGAL et de marqueurs profibrotiques (Col-1 et TGF- β) ainsi qu'une fibrose interstitielle. Cependant, aucun de ces effets n'était prévenu par l'invalidation génique de NGAL chez les souris KO. NGAL ne semble donc pas impliquée dans les mécanismes profibrotiques induits par l'Iso (Figure 21). L'exploration de l'expression de marqueurs pro-inflammatoires ne nous a par ailleurs pas permis d'identifier de statut inflammatoire dans le cœur des souris traitées avec de l'Iso 4 semaines après injection.

Comme pour l'AngII, de nombreuses études ont montré un lien entre le MR et les effets de l'Iso *in vivo* grâce à l'utilisation d'antagonistes du MR. Chez le rat, le traitement chronique à l'Iso induit une dysfonction cardiaque, une hypertrophie et une fibrose cardiaque associée à une expression de marqueurs profibrotiques (Col-1, Col-3, CTGF, α -SMA, TGF- β) et pro-

inflammatoires (TNF- α et IL1 β), ainsi qu'une vasoconstriction et une dysfonction endothéliale [353–359]. De plus, il a été rapporté que l'Iso induisait une activation de l'expression cardiaque de SGK1 *in vivo* [356], suggérant une activation du MR par l'Iso. Tous ces effets délétères sont prévenus par l'utilisation d'antagonistes du MR, soulignant donc bien l'implication de ce dernier dans la physiopathologie de l'activation β -adrénergique par l'Iso [353–359].

Plusieurs différences sont à noter entre notre modèle expérimental et celui utilisé pour analyser les effets de l'antagonisme du MR dans les effets de l'Iso. D'abord, une majorité de ces études est réalisée chez le rat, animal modèle beaucoup plus sensible à la fibrose que la souris, *a fortiori* sur fond C57Bl6. En effet, les doses d'Iso utilisées dans la littérature pour induire de la fibrose chez le rat vont de 0,3 à 5 mg/kg/jour [353–359]. A titre de comparaison, l'utilisation de doses allant jusqu'à 60 mg/kg/jour (soit 10x plus) chez la souris C57Bl6 n'ont pas permis d'induire de fibrose cardiaque dans nos conditions expérimentales. Une autre différence de poids est la durée et l'intensité du traitement. Les études réalisées sur les rats utilisent généralement des traitements chroniques à l'Iso durant de 1 à 2 semaines, là où notre protocole consistait en seulement 2 jours d'injections. Finalement, les doses utilisées sont sans comparaison, nos injections apportant environ 100 fois plus d'Iso par jour que les traitements utilisés chez le rat. Tous ces éléments rendent donc difficile la comparaison entre nos résultats et ceux obtenus dans ces différentes études.

L'étude récente de Vergaro *et al.* était réalisée chez la souris et utilisait un protocole proche du notre, rendant la comparaison plus facile. Les souris utilisées dans cette étude présentaient cependant une surexpression cardiaque de l'Aldo synthase, ce qui constitue tout de même une différence notable. Cette étude était d'autant plus intéressante qu'elle s'intéressait au rôle de Gal-3, une autre cible du MR, dans les effets de l'Iso. Leurs résultats indiquent que

le blocage pharmacologique du MR ou de Gal-3 protègent contre la dysfonction cardiaque et la fibrose induites par l'Iso. De manière intéressante, le blocage combiné de ces deux voies présentait un effet protecteur plus important que le blocage du MR ou de Gal-3 uniquement. Cela suggère un effet profibrotique de Gal-3 indépendant de la signalisation du MR ainsi qu'un effet délétère de l'activation du MR ne passant pas par Gal-3. Il a été montré *in vitro*, par exemple, que la signalisation du MR permettait de potentialiser les effets de l'Iso [360], ce qui pourrait expliquer une partie des effets protecteurs des antagonistes du MR dans les modèles de traitement à l'Iso.

Les effets de l'activation du MR sont donc multiples et ne sont probablement pas tous médiés par une seule voie de signalisation (NGAL, Gal-3, etc.). Ceci pourrait donc expliquer les différences observées entre l'antagonisme du MR et l'invalidation de NGAL dans les effets de l'Iso. Par ailleurs, comme pour l'AngII, l'absence de statut inflammatoire chronique dans notre modèle de traitement à l'Iso pourrait expliquer que NGAL ne soit pas impliquée dans les effets délétères de l'Iso.

3 – Impact de l'invalidation génique de NGAL dans les effets CV de l'infarctus du myocarde

Le dernier modèle profibrotique que nous avons utilisé est un modèle d'infarctus du myocarde (IM) par ligature coronaire gauche. De nombreuses études ont montré un effet bénéfique de l'utilisation des antagonistes du MR dans les effets néfastes de l'IM, à la fois dans des modèles animaux [45–47] et en clinique humaine [51, 52], suggérant un rôle important de l'activation du MR dans la physiopathologie de l'IM. Par ailleurs, il a été montré que l'expression de NGAL était augmentée dans le plasma de patients ayant subi un IM [304, 361, 362]. NGAL étant un biomarqueur de lésion rénale [219, 363], il est toutefois difficile de dissocier la modulation de NGAL directement due aux lésions CV de celle expliquée par la dysfonction rénale souvent associée aux maladies CV. Cependant, certaines études ont montré

un lien entre NGAL et maladies CV indépendant de la fonction rénale. Chez des patients souffrant de maladie coronarienne, les niveaux plasmatiques de NGAL étaient élevés, malgré l'absence de dysfonction rénale [364], et étaient corrélés à la gravité de la maladie [365]. De plus, NGAL est un prédicteur de mortalité et de maladie CV chez des patients âgés sans maladie rénale [312] ainsi que chez des patients insuffisant cardiaque après un IM [266, 307]. Des niveaux élevés de NGAL ont également été décrits dans le cœur de rongeurs ayant subi un IM [206, 266, 277, 321] ainsi que dans d'autres modèles d'ischémie cardiaque [277, 317]. En accord avec ces données, les souris de notre première étude (Martinez-Martinez *et al.*) présentaient une augmentation de l'expression cardiaque de NGAL 7 jours après l'IM. Cette augmentation de l'expression de NGAL était par ailleurs prévenue par le blocage du MR par la finérénone, soulignant le rôle de l'activation du MR dans l'induction de NGAL dans ce contexte.

L'implication de NGAL dans les effets délétères de l'ischémie cardiaque a été étudiée chez la souris KO NGAL. Dans un modèle de cœur isolé perfusé, les souris KO NGAL présentaient une meilleure fonction contractile cardiaque que les souris WT après un épisode d'I/R, ainsi qu'une taille d'infarctus réduite [317]. Par ailleurs, une étude récente de Sung *et al.* a montré que les souris KO NGAL soumises à un IM présentait une diminution de l'apoptose et une fonction cardiaque préservée 24h après l'infarctus [321].

Le modèle de ligature coronaire réalisé par nos collaborateurs de Rouen avait pour objectif d'étudier le rôle de NGAL dans les effets chroniques de l'IM sur la fonction et le remodelage cardiaque. Leurs analyses de la fonction cardiaque des souris ligaturées ont révélé un effet bénéfique de l'invalidation génique de NGAL sur la dysfonction cardiaque induite par l'IM, 3 mois après la ligature. Ceci révèle donc un effet protecteur durable de l'invalidation de NGAL sur la fonction cardiaque en plus de la protection précoce déjà décrite par Sung *et al.* [321]. Par ailleurs, les souris KO NGAL présentaient une diminution de la fibrose et de

l'inflammation cardiaque induites par l'IM. Ceci pourrait d'ailleurs expliquer en partie l'amélioration de la fonction cardiaque observée chez les souris KO NGAL après l'IM, puisque le remodelage pathologique cardiaque participe à la dégradation de la fonction cardiaque après un IM [366–368].

Les résultats de cette étude mettent en évidence un rôle important de NGAL dans les mécanismes inflammatoires et fibrotiques induits par l'IM, ce qui contraste avec les résultats que nous avons obtenus dans les modèles de traitement à l'AngII et à l'Iso (Figure 21). Comme proposé précédemment, cette différence dans l'implication de NGAL pourrait résider dans le contexte inflammatoire chronique observée dans le cœur des souris soumises à un IM.

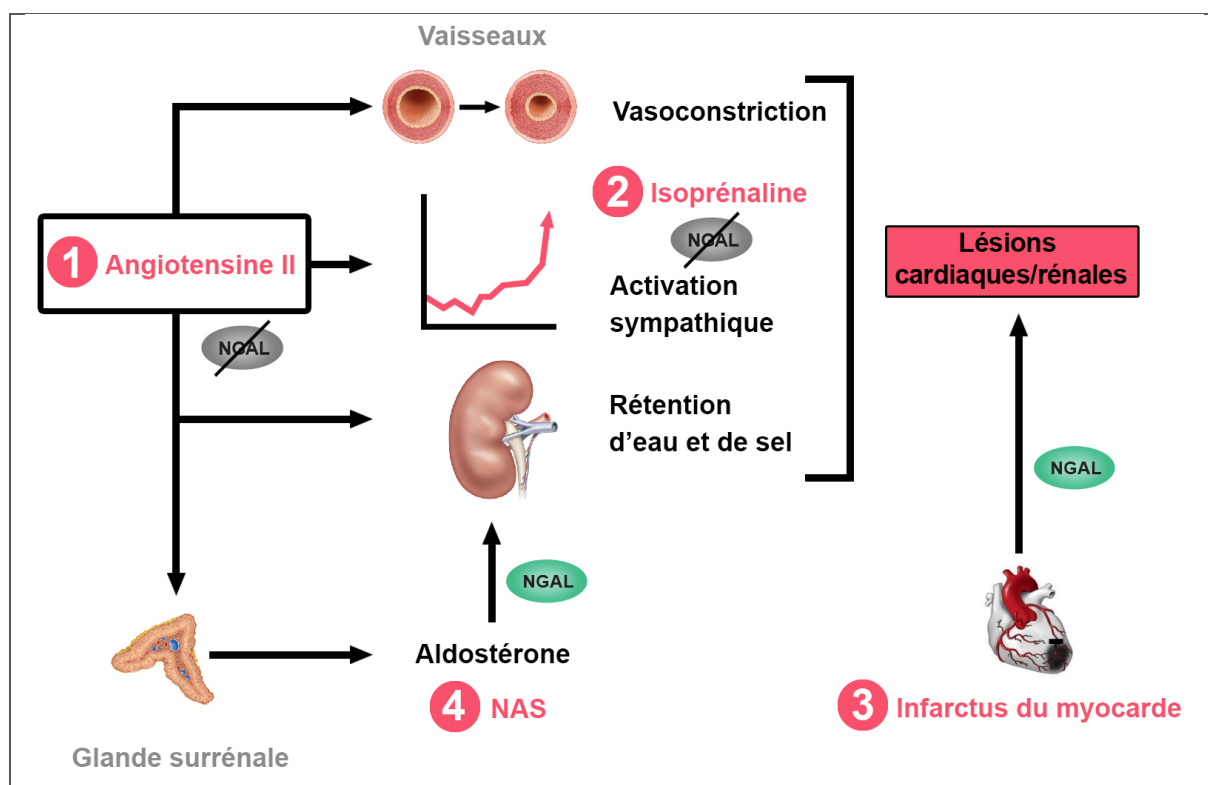


Figure 21 – Implication de NGAL dans certains modèles profibrotiques

NGAL est impliquée (en vert) dans les effets pathologiques de l'infarctus du myocarde et du challenge NAS, mais pas (en gris) du traitement à l'AngII ou à l'Iso.

2 – Mécanismes impliqués dans les effets pathologiques de NGAL

Le travail de Tarjus *et al.* a permis de mettre en évidence le rôle crucial de NGAL dans la médiation des effets délétères de l'activation du MR dans le système CV [323]. Cependant, la source de NGAL impliquée dans ces effets néfastes n'a pas été clairement identifiée. Le rôle important des cellules immunitaires dans les pathologies hypertensives [166, 187], cardiaques [165, 331] et rénales [170] est maintenant bien établi. De plus, un nombre croissant d'études décrivent le rôle du MR exprimé par les cellules immunitaires dans l'évolution des maladies CV [173]. NGAL étant décrite comme une protéine inflammatoire [193, 332–334], nous avons émis l'hypothèse que la production de NGAL par les cellules immunitaires pourrait être impliquée dans les lésions cardiaques et rénales induites par l'activation du MR.

Afin de tester cette hypothèse, nous avons généré, par transfert de moelle osseuse (MO), des souris chimériques présentant une déplétion de NGAL dans leurs cellules immunitaires (MO KO). Nous avons ensuite soumis ces souris au challenge NAS afin d'évaluer le rôle de la NGAL produite par les cellules immunitaires dans les effets pathologiques de l'activation du MR.

Chez les souris WT, le challenge NAS induisait le recrutement de différentes populations immunitaires au niveau des nœuds lymphatiques, organes lymphoïdes secondaires dans lesquels les cellules immunitaires sont recrutées et activées, mettant donc en évidence un rôle pro-inflammatoire systémique de l'Aldo. De plus, le challenge NAS induisait une augmentation de l'expression de NGAL dans les M ϕ , les PBMCs, et les DCs, révélant un rôle de l'Aldo dans la production de NGAL dans ces populations immunitaires *in vivo*.

Les souris MO KO soumises au challenge NAS présentaient une pression artérielle légèrement augmentée, mais significativement plus basse que celle des souris témoins. De plus, elles étaient protégées contre la fibrose et l'inflammation cardiaque et rénale induites par le challenge NAS. Ces données mettent donc en évidence un rôle primordial de la production de

NGAL par les cellules immunitaires dans la médiation des effets néfastes de l'activation du MR *in vivo* (Figure 21). Elles suggèrent en outre une implication de la NGAL produite par les cellules immunitaires à la fois dans l'hypertension, la fibrose et l'inflammation induites par l'Aldo.

2.1 Implication de NGAL dans les mécanismes inflammatoires

L'expression de NGAL est décrite dans divers types de populations immunitaires [211, 215, 217, 218]. De plus, des niveaux élevés de NGAL ont été identifiés dans de nombreuses situations inflammatoires chez l'animal [245, 279] et chez l'homme [254–258, 278]. Nous avons donc décidé d'étudier l'implication spécifique de la NGAL produite par les cellules immunitaires dans les effets cardiaques et rénaux d'une surcharge minéralocorticoïde. Nos résultats révèlent un rôle majeur de cette source de NGAL dans les effets de l'activation du MR *in vivo*, renforçant encore ce lien entre NGAL et mécanismes inflammatoires.

2.1.1 Implication de NGAL dans l'amplification de l'inflammation

Il a été décrit que NGAL pouvait être induite par une activation de la voie NFκB [205, 214, 243, 244, 263, 265, 267, 271–275] et par divers stimuli pro-inflammatoires [213, 214, 259–262, 264, 266, 269, 270]. A l'inverse, NGAL est elle-même capable d'induire l'expression de médiateurs pro-inflammatoires [215, 232, 276]. De plus, les données *in vitro* de notre première étude sur des fibroblastes cardiaques mettent en évidence la capacité de NGAL à activer la voie NFκB également, ce qui avait déjà été montré dans d'autres types cellulaires [237, 369, 370]. Tous ces éléments suggèrent l'existence d'une boucle d'amplification dans laquelle NGAL serait surexprimée en conditions inflammatoires et capable de potentialiser l'inflammation grâce à l'induction de médiateurs pro-inflammatoires.

Dans notre seconde étude (Buonafine *et al.*), le traitement de fibroblastes cardiaques en culture avec de la NGAL recombinante induisait l'expression de cytokines pro-inflammatoires (IL-6, IL1- β) illustrant un rôle pro-inflammatoire direct de NGAL sur ces cellules cardiaques. Il est donc possible que NGAL soit produite par les cellules immunitaires directement au niveau des organes enflammés et qu'elle participe localement à l'amplification de l'inflammation et au recrutement de nouvelles cellules immunitaires (Figure 22). En accord avec cette hypothèse, nous avons observé une augmentation de l'infiltration immunitaire (immunomarquage de CD3, CD68, et CD80) et de l'expression de marqueurs pro-inflammatoires (immunomarquage de MCP-1, OPN et TNF- α) dans le cœur et le rein des souris MO WT soumises au challenge NAS mais pas dans ceux des souris MO KO. Cela suggère que la production de NGAL par les cellules immunitaires au niveau de l'organe enflammé induit un environnement pro-inflammatoire qui amplifie le recrutement immunitaire au niveau de l'organe, aggravant ainsi les lésions tissulaires (Figure 22). Ces données sont en accord avec plusieurs études mettant en évidence une diminution de l'infiltration des neutrophiles et macrophages après un épisode d'I/R dans le cœur des souris KO NGAL ou traitées avec des anticorps anti-NGAL [223, 277, 371]. Cette altération du recrutement immunitaire chez les souris KO NGAL est de plus associée à une diminution de l'expression de marqueurs pro-inflammatoires et, en particulier, des chimiokines favorisant l'infiltration et l'adhésion des cellules inflammatoires [231, 371].

Comme mentionné précédemment, cette boucle d'amplification de NGAL pourrait expliquer en partie les différences d'implication de NGAL entre les divers protocoles profibrotiques que nous avons réalisés. Dans le NAS, l'inflammation induite par l'activation du MR est chronique, comme en atteste l'augmentation des marqueurs pro-inflammatoires dans le cœur et le rein des souris MO WT soumises au NAS. De même, chez les souris soumises à une ligature coronaire, les marqueurs inflammatoires étaient augmentés 3 mois après l'IM chez les

souris WT-IM mais pas chez les souris KO-IM. A l'inverse, dans nos conditions, les souris traitées avec de l'AngII ou de l'Iso ne présentaient pas de statut inflammatoire cardiaque après plusieurs semaines.

Par ailleurs, une donnée intéressante est que, lors du protocole d'irradiation et de transplantation de moelle osseuse, la mortalité des souris transplantées avec de la moelle osseuse KO NGAL était moins importante (environ 4x moins, cf. Matériel & Méthodes) que chez les souris transplantées avec de la moelle WT. Nous pouvons donc faire l'hypothèse que ces souris MO KO présentaient moins d'inflammation délétère induite par l'irradiation et/ou par la greffe, comme ce qui est retrouvé dans des modèles animaux d'allogreffe de cœur par exemple [223].

2.1.2 Source cellulaire de NGAL au site de lésion inflammatoire

Les stimuli pro-inflammatoires sont capables d'induire l'expression de NGAL dans différents types cellulaires [213, 214, 259–261, 264]. De plus, nos résultats démontrent la capacité de l'Aldo à induire l'expression de NGAL dans les fibroblastes cardiaques *in vitro* (Martinez-Martinez *et al.*) et dans les M ϕ , les PBMCs, et les DCs *in vivo* (Buonafine *et al.*). Cette multiplicité des sources possibles de NGAL soulève donc la question de l'origine cellulaire de la NGAL impliquée dans l'inflammation et le remodelage des organes lésés.

L'abolition de l'expression de NGAL dans les cellules immunitaires prévient le remodelage et l'inflammation cardiaque et rénale induites par le NAS. Ceci met donc en évidence le rôle crucial de la NGAL produite par les cellules immunitaires dans les processus délétères induits par l'activation du MR dans les organes. De plus, les souris KO MO, soumises ou non au challenge NAS, présentaient une expression diminuée de NGAL cardiaque, révélant les cellules immunitaires comme une source majeure de NGAL cardiaque. L'inflammation

cardiaque induite par le NAS est donc à l'origine d'une infiltration de cellules immunitaires qui vont libérer de la NGAL localement, elle-même à l'origine d'une amplification de l'inflammation. A l'inverse, l'expression rénale de NGAL n'était pas différente chez les souris KO MO en comparaison des souris témoins. Ceci est probablement dû à une accumulation rénale de NGAL, qui est hautement réabsorbée dans le tubule proximal [222] et produite par les cellules du tubule distal [285]. Les souris KO MO étaient cependant protégées de l'inflammation et du remodelage rénal induits par le NAS, ce qui suggère que cet effet protecteur serait indépendant du niveau total de NGAL rénal.

L'implication rénale de la NGAL produite par les cellules immunitaires pourrait donc être indirecte ou dépendre de sa localisation rénale. Il a été montré récemment dans un modèle de souris spontanément protéinurique que l'expression de NGAL était induite au niveau des tubules mais pas au niveau du glomérule rénal [342]. L'invalidation génique de NGAL dans ce modèle permettait de diminuer la gravité des lésions tubulaires rénales mais pas des lésions glomérulaires, indiquant bien une importance de la localisation de la production/sécrétion de NGAL dans la médiation de ses effets délétères [342].

L'implication pathologique de NGAL au niveau rénal pourrait également faire intervenir des mécanismes de spécificité octroyant à la NGAL produite par les cellules immunitaires des effets différents de la NGAL produite par les autres types cellulaires, et en particulier par les cellules rénales. Il a par exemple été montré que les neutrophiles sécrétaient principalement NGAL sous forme dimérique alors que les cellules épithéliales la sécrètent sous forme monomérique [372]. Ceci pourrait avoir un effet sur son activité ou sa stabilité, la NGAL monomérique étant plus rapidement éliminée de la circulation que la NGAL dimérique [221]. Par ailleurs, il a été montré que l'état de polyamination ou de désamidation de NGAL jouait un rôle important dans sa stabilité et dans la médiation de ses effets [325]. La désamidation de NGAL diminue l'excrétion de NGAL, ce qui favorise son accumulation dans les vaisseaux et

l'induction de processus pathologiques tels que l'hypertension, l'inflammation et la dysfonction endothéliale [325]. Enfin, la liaison de NGAL à un complexe sidérophore-fer a également été impliquée dans la régulation de son internalisation cellulaire et de l'induction de certaines voies de signalisation [281, 373]. Quoiqu'il en soit, cette potentielle spécificité de la NGAL produite par les cellules immunitaires reste à être étudiée.

2.1.3 Populations immunitaires impliquées dans la production de NGAL

Nos résultats mettent évidence le rôle primordial de la NGAL produite par les cellules immunitaires dans les effets cardiaques et rénaux de l'activation du MR. Cependant, nous n'avons pas identifié si une population immunitaire en particulier était impliquée de manière prédominante dans cette production. NGAL a d'abord été décrite dans les neutrophiles [211] et observée plus tard dans d'autres types de cellules immunitaires telles que les macrophages [215, 217] et les cellules dendritiques [218]. La production de NGAL par l'un ou plusieurs de ces types cellulaires pourrait donc être impliquée dans les effets néfastes de l'activation du MR.

2.1.3.1 Macrophages

L'invalidation génique du MR dans les cellules myéloïdes (M ϕ , DCs et neutrophiles) prévient l'inflammation et la fibrose dans de nombreux modèles profibrotiques cardiaques et rénaux [90, 178, 182, 183] et, en particulier, dans le modèle DOCA-sel [180, 181]. Par ailleurs, il a été montré que le MR exprimé par les cellules myéloïdes contrôlait la polarisation des macrophages vers un phénotype pro-inflammatoire M1 [176–178], connu pour son rôle dans les processus inflammatoires et fibrotiques [374]. L'implication de NGAL dans ce mécanisme a également été mise en évidence *in vitro* et *in vivo* [277]. Il est donc parfaitement concevable que la polarisation des macrophages induite par l'activation du MR exprimé par les cellules myéloïdes soit médiée par NGAL. Ceci pourrait être démontré *in vitro* en utilisant des

macrophages invalidés pour NGAL (provenant de souris KO NGAL par exemple) et traitées avec de l'Aldo afin d'évaluer l'impact de l'absence de NGAL sur la polarisation des macrophages induite par l'activation du MR (mise en évidence par Usher *et al.* [178]).

Dans notre étude, l'expression de NGAL était augmentée *in vivo* dans les macrophages des souris soumises au challenge NAS. De plus, les souris MO WT soumises aux NAS présentaient une infiltration macrophagique cardiaque et rénale (marqueur CD68) augmentée, ce qui n'était pas le cas des souris MO KO. Cela suggère que la production de NGAL par les macrophages pourrait jouer un rôle important dans la médiation des effets cardio-rénaux de l'activation du MR. De plus, les souris MO WT soumises au NAS présentaient une induction des marqueurs MCP-1, TNF- α et CD80 qui sont considérés comme des marqueurs de macrophages M1 [176, 375, 376]. Cette induction n'était cependant pas retrouvée chez les souris MO KO, ce qui laisse penser que la production de NGAL par les cellules immunitaires serait impliquée dans la polarisation des macrophages *in vivo*, participant à l'inflammation et aux lésions tissulaires. Ce dernier point mériterait d'être exploré en plus grands détails.

2.1.3.2 Cellules dendritiques

Il a été montré que les DCs étaient impliquées dans l'hypertension et l'inflammation vasculaire induites par le challenge DOCA-sel [377]. De plus, il est décrit que ce challenge minéralocorticoïde induit la polarisation des LT vers un phénotype pro-inflammatoire Th1/Th17, via l'activation du MR exprimé par les DCs [175]. Cette polarisation pourrait être un élément important des effets de l'activation du MR car l'effet protecteur des antagonistes du MR dans le DOCA-sel est associé à une inhibition de la polarisation Th17 des LT [175, 186]. En outre, cette polarisation médiée par le MR des DCs pourrait faire intervenir NGAL. Il a en effet été montré que la NGAL sécrétée par les DCs était impliquée dans l'activation et la polarisation des LT [218]. De plus, des données non publiées de notre laboratoire indiquent que

le traitement de DCs avec de l'Aldo *in vitro* entraîne l'expression de cytokines impliquées dans l'activation des LT et que cette induction est perdue lorsque les DCs n'expriment pas NGAL (DCs provenant de souris KO NGAL). Une étude de co-culture de LT et de DCs avec ou sans ajout de NGAL est également en cours de réalisation par des collaborateurs du Chili afin de déterminer l'importance de la NGAL exogène dans l'activation des LT par les DCs.

En accord avec cette implication potentielle de la NGAL produite par les DCs dans les effets des minéralocorticoïdes, les données de notre étude révèlent une augmentation de l'expression de NGAL *in vivo* dans les DCs provenant de souris soumises au NAS.

2.1.3.3 *Granulocytes neutrophiles*

Les granulocytes neutrophiles sont également connus comme une source importante de NGAL [209, 271] et leur implication dans les processus physiopathologiques cardio-rénaux a été démontrée [378, 379]. Gilet *et al.* ont montré que l'activation du MR exprimé par les neutrophiles humains par l'Aldo induisait la production de NGAL en complexe avec la MMP-9 [380]. Par ailleurs, Aigner *et al.* ont identifié les neutrophiles comme la source principale de NGAL libérée au moment de l'infiltration immunitaire dans le cœur de souris après un épisode d'I/R. Nos données indiquent un recrutement important de neutrophiles au niveau des nœuds lymphatiques des souris soumises au NAS, soulignant leur activation dans ce contexte inflammatoire. Nous n'avons cependant pas pu évaluer l'expression de NGAL dans cette population cellulaire.

2.2 Implication de NGAL dans les mécanismes hypertensifs

De plus en plus de données décrivent le rôle des cellules immunitaires dans l'hypertension [166, 187, 188] et une étude récente a mis en évidence l'implication du MR exprimé par les LT dans ce mécanisme, via la régulation de l'expression de l'IFN- γ [185]. Par

ailleurs, il a été montré que l'IFN- γ était capable d'activer la réabsorption de sodium au niveau du néphron distal, jouant ainsi sur la régulation de la pression artérielle [381, 382]. Le rôle de NGAL dans les mécanismes hypertensifs a également été mis en évidence dans des modèles animaux d'obésité, les souris KO NGAL étant protégées contre l'hypertension, l'inflammation et la dysfonction cardio-métabolique induites par un régime riche en graisse [317, 324–326]. En clinique, la présence de polymorphismes dans le promoteur de NGAL a été associée à des modifications de la pression artérielle [383]. De plus, chez des patients souffrant d'hypertension essentielle, le niveau plasmatique de NGAL était plus important que chez des sujets sains et était corrélé au niveau de pression artérielle [384]. Le rôle direct de NGAL sur le contrôle de la pression artérielle a en outre été mis en évidence par l'administration conjointe de NGAL recombinante et d'acide linoléique chez la souris, ce qui induisait une augmentation de la pression des souris [325].

L'étude de Tarjus *et al.* a montré que l'inactivation génique complète de NGAL prévenait totalement l'augmentation de pression artérielle induite par le challenge NAS [323]. En comparaison, nos données indiquent que l'inactivation de NGAL dans les cellules immunitaires uniquement ne permet de reproduire cette protection que de manière partielle. Les souris MO KO soumises aux NAS présentaient une pression artérielle significativement diminuée par rapport aux souris MO WT traitées, mais tout de même augmentée par rapport aux souris non traitées. Cela suggère donc que la NGAL produite par les cellules immunitaires est importante pour les effets hypertensifs de l'activation du MR, mais que d'autres sources de NGAL sont également impliquées. Des données non publiées de notre laboratoire indiquent que NGAL est impliquée dans la modulation de la réabsorption rénale de sodium et dans la modulation de la pression artérielle. Cet effet pourrait donc être médié en partie par la NGAL inflammatoire, mais faire intervenir également la NGAL produite localement par le rein.

Comme évoqué précédemment, la source de NGAL pourrait avoir un impact sur son activité et donc sur son rôle dans ces mécanismes.

2.3 Implication de NGAL dans les mécanismes profibrotiques

Les mécanismes profibrotiques sont étroitement liés aux mécanismes inflammatoires et hypertensifs. Au niveau du cœur, l'hypertension artérielle induit une surcharge mécanique du ventricule gauche qui est associée à une augmentation de la sécrétion de collagène et à la mise en place d'une fibrose [385]. Dans le rein, l'hypertension artérielle systémique est à l'origine d'une augmentation de la pression artérielle intra-rénale qui favorise le remodelage et la fibrose tubulo-interstitiel [386]. Cependant, il a également été démontré que le développement de la fibrose pouvait être indépendant des modifications de pression artérielle [385]. Dans la néphropathie hypertensive, l'antagonisme du MR réduit les modifications vasculaires observées dans une variété de modèles murins sans qu'il n'y ait de diminution de la pression artérielle, ce qui indique un effet protecteur non hémodynamique du blocage du MR [100, 112–115]. En particulier, l'invalidation du MR dans les cellules endothéliales [97], ou l'utilisation de faibles doses d'antagonistes du MR [387], sont sans effet sur l'augmentation de pression artérielle induite par le challenge DOCA-sel mais protègent les souris de la fibrose cardiaque, probablement grâce à une limitation de l'inflammation. L'inflammation joue en effet un rôle important dans les mécanismes profibrotiques, notamment via l'activation des myofibroblastes qui participent activement à la production de MEC et à la mise en place de la fibrose [148, 149]. Il est aujourd'hui bien décrit que l'activation chronique du MR est associée aux mécanismes de remodelage de la MEC, de croissance cellulaire et de fibrose qui participent au développement des maladies CV et rénales [42, 43, 45, 151–155]. Le rôle de NGAL comme médiateur potentiel de ces effets est une piste encore neuve. L'implication de NGAL dans les mécanismes profibrotiques a tout d'abord été suggérée par l'identification de sa liaison avec la MMP-9,

protéine impliquée dans les mécanismes de remodelage tissulaire [198]. Par la suite, cette implication a été montrée dans un modèle de CKD chez la souris dans lequel l'invalidation génique de NGAL prévenait le développement de la fibrose rénale [289]. Plus récemment, Tarjus *et al.* ont démontré le rôle crucial de NGAL dans les effets profibrotiques de l'activation du MR dans le challenge NAS [323]. Dans notre étude, l'invalidation de NGAL dans les cellules immunitaires protégeait les souris du remodelage cardiaque et rénal induit par le NAS. Nos données confirment donc le rôle majeur de NGAL dans la fibrose induite par l'activation du MR *in vivo* et mettent en évidence l'importance de la production de NGAL par les cellules immunitaires dans la médiation de ces effets.

Les mécanismes par lesquels NGAL induit la fibrose sont probablement multiples. Sa liaison à la MMP-9 pourrait en constituer un, même si l'existence du complexe NGAL/MMP-9 chez la souris reste controversé. Il est, par ailleurs, envisageable que NGAL se lie à d'autres molécules capables de moduler la fibrose. Il a été montré, par exemple, que NGAL pouvait se lier et réguler négativement l'activité du HGF (*Hepathocyte Growth Factor*), un peptide connu pour ses propriétés antifibrotiques [388]. De manière intéressante, les données *in vitro* de nos deux études mettent en évidence un rôle profibrotique direct de NGAL sur les fibroblastes cardiaques en culture. Elles indiquent de plus que NGAL sert de médiateur aux effets profibrotiques de l'Aldo. En effet, le traitement des fibroblastes avec de l'Aldo induit l'expression de NGAL et du Col-1. Cependant, l'inhibition de l'expression de NGAL par un siRNA entraîne la perte d'induction de l'expression de Col-1 par l'Aldo. Ceci suggère que NGAL pourrait agir comme un médiateur des effets profibrotiques de l'Aldo *in vivo*. Il est donc possible que NGAL soit produite par les cellules immunitaires en réponse à l'Aldo et qu'elle participe directement aux processus de remodelage et d'inflammation localement.

Par ailleurs, les données de notre seconde étude indiquent une action de NGAL sur la prolifération des fibroblastes *in vitro*. Cet effet prolifératif de NGAL avait déjà été décrit *in vivo*

dans des modèles d'I/R rénales dans lesquelles l'injection de NGAL recombinante induisait une prolifération des cellules tubulaires [222, 287] ainsi que dans un modèle d'IRC chez la souris, dans lequel les souris KO NGAL présentaient à l'inverse une prolifération tubulaire réduite [289]. Etant donné le rôle clé de la prolifération (des myofibroblastes en particulier) dans les mécanismes de remodelage et de fibrose [389], les effets prolifératifs de NGAL pourraient également être impliqués dans le remodelage pathologique des organes dans le contexte d'une surcharge minéralocorticoïde.

Enfin, il est intéressant de noter que des études ont montré un rôle de NGAL dans l'activation de la transition épithélio-mésenchymateuse *in vivo* et *in vitro* [233, 237]. Ce dernier effet de NGAL pourrait également être important dans la médiation des effets profibrotiques de NGAL, via l'activation des myofibroblastes.

2.4 Voies de signalisations impliquées dans les effets pathologiques de NGAL

2.4.1 Voie NFκB

Un grand nombre d'études ont mis en évidence l'implication de la voie NFκB dans l'expression de NGAL [205, 214, 243, 244, 263, 265, 267, 271–275]. A l'inverse, certaines études ont montré que NGAL était elle-même capable d'activer la voie NFκB [237, 369, 370], ce qui est de première importance étant donné l'implication majeure de cette voie de signalisation dans les mécanismes inflammatoires et fibrotiques [390, 391], et en particulier dans le système CV. Dans un modèle de cellules surexprimant NGAL, Wang *et al.* ont par exemple montré que NGAL activait la voie NFκB via l'augmentation des niveaux de fer et de ROS intracellulaires [370]. En accord avec cela, les données de notre première étude indiquent que NGAL est capable d'activer la voie NFκB dans les cellules cardiaques, *in vivo* et *in vitro*. Le traitement de fibroblastes cardiaques avec de la NGAL recombinante induisait en effet une activation de la voie NFκB et le blocage de cette voie prévenait la production de Col-1 induite

par NGAL. Cela met donc évidence l'importance de la voie NFκB dans la médiation des effets profibrotiques directs de NGAL. Chez les souris ayant subi un IM, la voie NFκB était activée chez les souris WT sept jours après l'IM, mais ce n'était pas le cas chez les souris KO NGAL, soulignant l'importance de NGAL dans l'activation de cette voie *in vivo*. La voie NFκB semble donc impliquée dans les effets profibrotiques cardiaques de la cascade Aldo/MR/NGAL.

2.4.2 Voie Erk1/2

Une autre voie de signalisation dans laquelle NGAL a été décrite est la voie de signalisation ERK1/2. Cette voie de signalisation est connue en particulier pour son implication dans les processus de prolifération et de mort cellulaire [392]. Il a été montré que l'Aldo induisait le complexe NGAL/MMP-9 dans des neutrophiles humains en culture, et que cet effet était prévenu par l'utilisation d'un inhibiteur de la voie ERK1/2 [380]. Ce rôle de la voie ERK1/2 dans l'induction de NGAL a également été décrit dans des cellules épithéliales intestinales en réponse à une toxine bactérienne [393]. De manière intéressante, la voie NFκB n'était pas impliquée dans l'induction de NGAL dans ce contexte [393], ce qui souligne la diversité des voies d'inductions de NGAL en fonctions des situations. Il est intéressant de noter que l'expression du récepteur de NGAL 24p3R était induite par l'IL-1β dans des cellules mésangiales humaines en culture et qu'elle passait également par l'activation de la voie de signalisation ERK1/2 [394].

De nombreuses études ont, à l'inverse, montré que NGAL était capable d'activer la voie de signalisation ERK1/2 et que cette voie était impliquée dans les effets cellulaires de NGAL. Le traitement de cellules épithéliales en culture avec de la NGAL induisait une activation de la voie ERK1/2 ainsi qu'une induction de la migration cellulaire qui était perdue par l'inhibition de cette voie de signalisation [241]. De même, le traitement de neutrophiles humains en culture avec de la NGAL recombinante stimulait la migration cellulaire et l'expression de cytokines

pro-inflammatoires via le récepteur 24p3R et l'induction de la voie signalisation ERK1/2 [232]. Dans des modèles de cellules cancéreuses d'œsophage [234] ou de prostate [395], la surexpression de NGAL ou le traitement avec de la NGAL recombinante activait la voie ERK1/2 et le blocage de cette voie bloquait la migration et les propriétés invasives des cellules favorisées par NGAL.

Dans notre première étude, le traitement de fibroblastes cardiaques avec de la NGAL recombinante induisait une activation de la voie ERK1/2. Cependant, l'inhibition de cette voie n'était pas capable de prévenir la production de Col-1 induite par NGAL. La voie ERK1/2 ne semble donc pas impliquée dans les effets profibrotiques directs de NGAL sur les cellules cardiaques. Par contre, l'activation de la voie ERK1/2 par NGAL laisse penser qu'elle pourrait participer aux effets prolifératifs de NGAL identifiés dans notre seconde étude, et qu'elle pourrait ainsi jouer un rôle dans le remodelage tissulaire pathologique induit par l'activation du MR.

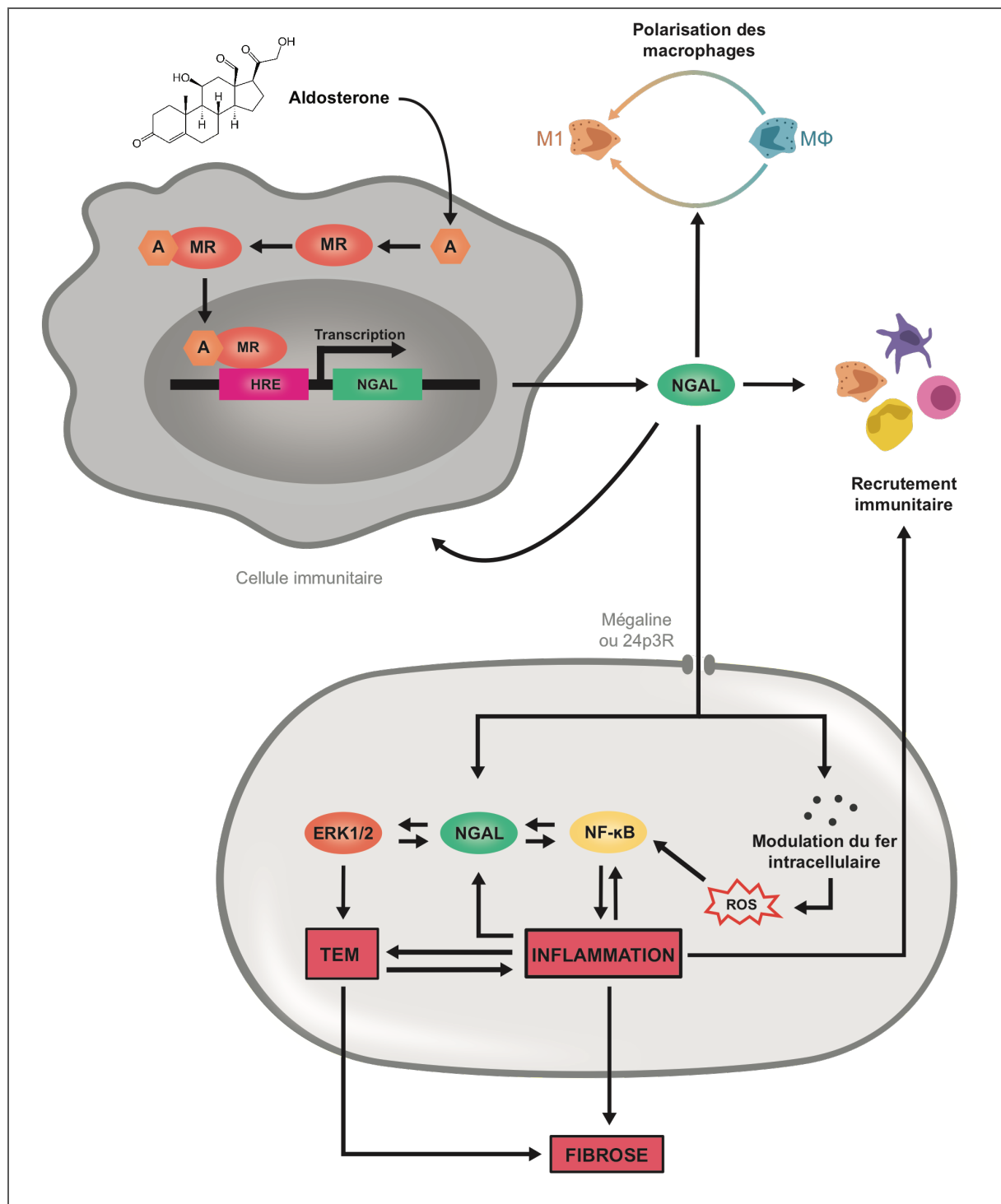


Figure 22 – Mécanismes impliqués dans les effets pathologiques de NGAL

La NGAL produite par les cellules immunitaires joue un rôle important dans les effets délétères de l'activation du MR. Les différents mécanismes possibles mis en jeu dans ces effets sont illustrés ici. TEM : Transition Epithelio-Mésenchymateuse, MΦ : Macrophage, M1 : Macrophage pro-inflammatoire M1

3 – Conclusion et perspectives

Les travaux de Tarjus *et al.* ont mis en évidence le rôle crucial de NGAL dans l'hypertension, l'inflammation et la fibrose induites par l'activation du MR dans le modèle de surcharge minéralocorticoïde NAS [323]. Le travail de thèse présenté ici avait pour objectif d'étudier la spécificité de l'implication de NGAL dans la médiation des effets profibrotiques de l'activation du MR dans le système CV et de déterminer les mécanismes mis en œuvre dans ces effets. Nos résultats indiquent que l'implication de NGAL dans les mécanismes délétères de l'activation du MR n'est pas universelle et qu'elle pourrait dépendre du contexte pathologique. En effet, NGAL ne semble pas impliquée dans les effets profibrotiques de l'AngII ou de l'Iso, alors que l'invalidation d'autres cibles du MR ou son antagonisme pharmacologique sont protecteurs dans ces modèles [339, 351, 353–359]. Par contre, NGAL joue un rôle important dans la fibrose, l'inflammation et la dysfonction cardiaque induites par un IM. Cette différence pourrait être expliquée par l'inflammation chronique observée dans le modèle d'IM et dans le challenge NAS. Cette hypothèse est renforcée par l'importance de la NGAL produite par les cellules immunitaires dans les effets de l'activation du MR mise en évidence dans notre seconde étude. La NGAL inflammatoire joue en effet un rôle majeur dans l'inflammation et la fibrose cardio-rénale induites par le challenge NAS. NGAL présente de plus des propriétés pro-inflammatoires, profibrotiques et prolifératives *in vitro*, notamment via l'activation de la voie NFκB, ce qui suggère qu'elle pourrait jouer un rôle direct dans les lésions inflammatoire induites par l'activation du MR ainsi qu'un rôle indirect par amplification de l'inflammation (Figure 22).

Nos travaux n'ont cependant pas permis d'élucider si une population immunitaire était impliquée de manière prépondérante dans la médiation des effets de NGAL. Il est envisageable que plusieurs types de cellules immunitaires soit mis en jeu et notamment les macrophages, les cellules dendritiques et les neutrophiles. Des études plus poussées devront être réalisées afin

de disséquer plus finement le rôle spécifique de ces différentes populations dans les effets de NGAL.

Par ailleurs, nos données indiquent un rôle seulement partiel de la NGAL produite par les cellules immunitaires dans la régulation de l'hypertension induite dans le challenge NAS, ce qui suggèrent qu'une autre source (probablement rénale) serait impliquée dans ces mécanismes. Cela pose, de plus, la question des processus mis en jeu dans la régulation de la pression artérielle par NGAL. Des données non publiées de notre laboratoire indiquent que cette régulation pourrait passer par une action de NGAL sur la réabsorption rénale du sodium.

En conclusion, NGAL apparait comme un médiateur important des effets délétères cardio-rénaux de l'activation du MR, en particulier du fait de son rôle dans l'amplification de l'inflammation. NGAL pourrait, de ce fait, représenter une cible thérapeutique intéressante dans les maladies CV et rénales présentant une composante inflammatoire importante. Dans cette optique, des molécules inhibitrices anti-NGAL ont été identifiées *in silico* par une entreprise pharmaceutique puis testées *in vitro* par Ernesto Martinez-Martinez, post-doctorant au laboratoire. A l'heure actuelle, plusieurs de ces molécules se sont montrées efficaces pour bloquer les effets de NGAL sur des fibroblastes cardiaques en culture (induction de l'expression de Col-1, IL-6, OPN, Gal-3 et activation de la prolifération cellulaire). Certaines de ces molécules seront donc prochainement testées *in vivo* dans des modèles profibrotiques chez l'animal.

REFERENCES

1. Heras MM, Rodríguez N del C, González JFN (2012) The Renin-Angiotensin-Aldosterone System in Renal and Cardiovascular Disease and the Effects of its Pharmacological Blockade. *J Diabetes Metab*. doi: 10.4172/2155-6156.1000171
2. Benigni A, Cassis P, Remuzzi G (2010) Angiotensin II revisited: new roles in inflammation, immunology and aging: Angiotensin II in inflammation, immunology, aging. *EMBO Mol Med* 2:247–257. doi: 10.1002/emmm.201000080
3. Lothar A, Moser M, Bode C, et al (2015) Mineralocorticoids in the Heart and Vasculature: New Insights for Old Hormones. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 55:289–312. doi: 10.1146/annurev-pharmtox-010814-124302
4. Gomez-Sanchez CE, Zhou MY, Cozza EN, et al (1996) Corticosteroid synthesis in the central nervous system. *Endocr Res* 22:463–470.
5. Takeda Y, Miyamori I, Yoneda T, et al (1996) Regulation of aldosterone synthase in human vascular endothelial cells by angiotensin II and adrenocorticotropin. *J Clin Endocrinol Metab* 81:2797–2800. doi: 10.1210/jcem.81.8.8768832
6. Funder JW (2005) The Nongenomic Actions of Aldosterone. *Endocr Rev* 26:313–321. doi: 10.1210/er.2005-0004
7. Grossmann C, Gekle M (2009) New aspects of rapid aldosterone signaling. *Mol Cell Endocrinol* 308:53–62. doi: 10.1016/j.mce.2009.02.005
8. Mazak I (2004) Aldosterone Potentiates Angiotensin II-Induced Signaling in Vascular Smooth Muscle Cells. *Circulation* 109:2792–2800. doi: 10.1161/01.CIR.0000131860.80444.AB
9. Viengchareun S, Le Menuet D, Martinerie L, et al (2007) The mineralocorticoid receptor: insights into its molecular and (patho)physiological biology. *Nucl Recept Signal* 5:e012. doi: 10.1621/nrs.05012
10. Farman N, Rafestin-Oblin M-E (2001) Multiple aspects of mineralocorticoid selectivity. *Am J Physiol-Ren Physiol* 280:F181–F192.
11. Messaoudi S, Gravez B, Tarjus A, et al (2013) Aldosterone-Specific Activation of Cardiomyocyte Mineralocorticoid Receptor In Vivo Novelty and Significance. *Hypertension* 61:361–367.
12. Lombes M, Kenouch S, Souque A, et al (1994) The mineralocorticoid receptor discriminates aldosterone from glucocorticoids independently of the 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase. *Endocrinology* 135:834–840. doi: 10.1210/endo.135.3.8070376
13. Hellal-Levy C, Fagart J, Souque A, Rafestin-Oblin M-E (2000) Mechanistic aspects of mineralocorticoid receptor activation. *Kidney Int* 57:1250–1255.
14. Trapp T, Holsboer F (1996) Heterodimerization between mineralocorticoid and glucocorticoid receptors increases the functional diversity of corticosteroid action. *Trends Pharmacol Sci* 17:145–149.
15. Nagase M, Fujita T (2013) Role of Rac1–mineralocorticoid-receptor signalling in renal and cardiac disease. *Nat Rev Nephrol* 9:86–98. doi: 10.1038/nrneph.2012.282
16. Stanišić V, Lonard DM, O'Malley BW (2010) Modulation of Steroid Hormone Receptor Activity. In: *Prog. Brain Res*. Elsevier, pp 153–176
17. Di Zhang A, Cat AND, Soukaseum C, et al (2008) Cross-Talk Between Mineralocorticoid and Angiotensin II Signaling for Cardiac Remodeling. *Hypertension* 52:1060–1067. doi: 10.1161/HYPERTENSIONAHA.108.117531
18. Jain G, Campbell RC, Warnock DG (2009) Mineralocorticoid Receptor Blockers and Chronic Kidney Disease. *Clin J Am Soc Nephrol* 4:1685–1691. doi: 10.2215/CJN.01340209
19. Montezano AC, Touyz RM (2008) Networking Between Systemic Angiotensin II and

- Cardiac Mineralocorticoid Receptors. *Hypertension* 52:1016–1018. doi: 10.1161/HYPERTENSIONAHA.108.121269
20. Rautureau Y, Paradis P, Schifffrin EL (2011) Cross-talk between aldosterone and angiotensin signaling in vascular smooth muscle cells. *Steroids*. doi: 10.1016/j.steroids.2011.02.015
 21. Hernández-Díaz I, Giraldez T, Arnau MR, et al (2010) The Mineralocorticoid Receptor Is a Constitutive Nuclear Factor in Cardiomyocytes due to Hyperactive Nuclear Localization Signals. *Endocrinology* 151:3888–3899. doi: 10.1210/en.2010-0099
 22. Jiménez-Canino R, Lorenzo-Díaz F, Jaisser F, et al (2016) Histone Deacetylase 6–Controlled Hsp90 Acetylation Significantly Alters Mineralocorticoid Receptor Subcellular Dynamics But Not its Transcriptional Activity. *Endocrinology* 157:2515–2532. doi: 10.1210/en.2015-2055
 23. Garty H, Palmer LG (1997) Epithelial sodium channels: function, structure, and regulation. *Physiol Rev* 77:359–396.
 24. Jeggle P, Callies C, Tarjus A, et al (2013) Epithelial sodium channel stiffens the vascular endothelium in vitro and in Liddle mice. *Hypertens Dallas Tex* 1979 61:1053–1059. doi: 10.1161/HYPERTENSIONAHA.111.199455
 25. Warnock DG, Kusche-Vihrog K, Tarjus A, et al (2014) Blood pressure and amiloride-sensitive sodium channels in vascular and renal cells. *Nat Rev Nephrol* 10:146–157. doi: 10.1038/nrneph.2013.275
 26. Palmer BF (2015) Regulation of Potassium Homeostasis. *Clin J Am Soc Nephrol* 10:1050–1060. doi: 10.2215/CJN.08580813
 27. Wadei HM, Textor SC (2012) The role of the kidney in regulating arterial blood pressure. *Nat Rev Nephrol* 8:602–609. doi: 10.1038/nrneph.2012.191
 28. Messaoudi S, Azibani F, Delcayre C, Jaisser F (2012) Aldosterone, mineralocorticoid receptor, and heart failure. *Mol Cell Endocrinol* 350:266–272. doi: 10.1016/j.mce.2011.06.038
 29. McGraw AP, McCurley A, Preston IR, Jaffe IZ (2013) Mineralocorticoid Receptors in Vascular Disease: Connecting Molecular Pathways to Clinical Implications. *Curr Atheroscler Rep*. doi: 10.1007/s11883-013-0340-x
 30. Shibata S, Ishizawa K, Uchida S (2016) Mineralocorticoid receptor as a therapeutic target in chronic kidney disease and hypertension. *Hypertens. Res*.
 31. Feraco A, Armani A, Mammi C, et al (2013) Role of mineralocorticoid receptor and renin–angiotensin–aldosterone system in adipocyte dysfunction and obesity. *J Steroid Biochem Mol Biol* 137:99–106. doi: 10.1016/j.jsbmb.2013.02.012
 32. Zhao M, Célérier I, Bousquet E, et al (2012) Mineralocorticoid receptor is involved in rat and human ocular chorioretinopathy. *J Clin Invest* 122:2672–2679. doi: 10.1172/JCI61427
 33. Sainte Marie Y, Toulon A, Paus R, et al (2007) Targeted Skin Overexpression of the Mineralocorticoid Receptor in Mice Causes Epidermal Atrophy, Premature Skin Barrier Formation, Eye Abnormalities, and Alopecia. *Am J Pathol* 171:846–860. doi: 10.2353/ajpath.2007.060991
 34. Pitt B, Zannad F, Remme WJ, et al (1999) The effect of spironolactone on morbidity and mortality in patients with severe heart failure. Randomized Aldactone Evaluation Study Investigators. *N Engl J Med* 341:709–717. doi: 10.1056/NEJM199909023411001
 35. Kolkhof P, Borden SA (2012) Molecular pharmacology of the mineralocorticoid receptor: Prospects for novel therapeutics. *Mol Cell Endocrinol* 350:310–317. doi: 10.1016/j.mce.2011.06.025
 36. Pitt B, Remme W, Zannad F, et al (2003) Eplerenone, a selective aldosterone blocker, in patients with left ventricular dysfunction after myocardial infarction. *N Engl J Med* 348:1309–1321. doi: 10.1056/NEJMoa030207

37. Zannad F, McMurray JJV, Krum H, et al (2011) Eplerenone in patients with systolic heart failure and mild symptoms. *N Engl J Med* 364:11–21. doi: 10.1056/NEJMoa1009492
38. Rossignol P, Dobre D, McMurray JJV, et al (2014) Incidence, Determinants, and Prognostic Significance of Hyperkalemia and Worsening Renal Function in Patients With Heart Failure Receiving the Mineralocorticoid Receptor Antagonist Eplerenone or Placebo in Addition to Optimal Medical Therapy. *Circ Heart Fail* 7:51–58. doi: 10.1161/CIRCHEARTFAILURE.113.000792
39. Bauersachs J (2013) The ARTS of third-generation mineralocorticoid receptor antagonists: achieving cardiovascular benefit with minimized renal side effects? *Eur Heart J* 34:2426–2428. doi: 10.1093/eurheartj/ehu235
40. Ruilope LM, Tamargo J (2017) Renin–angiotensin system blockade: Finerenone. *Néphrologie Thérapeutique* 13:S47–S53. doi: 10.1016/j.nephro.2017.02.003
41. Brilla CG (2000) Aldosterone and myocardial fibrosis in heart failure. *Herz* 25:299–306.
42. Brilla CG, Maisch B, Weber KT (1993) Renin-angiotensin system and myocardial collagen matrix remodeling in hypertensive heart disease: in vivo and in vitro studies on collagen matrix regulation. *Clin Investig* 71:S35–41.
43. Brilla CG, Weber KT (1992) Mineralocorticoid excess, dietary sodium, and myocardial fibrosis. *J Lab Clin Med* 120:893–901.
44. Kuster GM (2005) Mineralocorticoid Receptor Inhibition Ameliorates the Transition to Myocardial Failure and Decreases Oxidative Stress and Inflammation in Mice With Chronic Pressure Overload. *Circulation* 111:420–427. doi: 10.1161/01.CIR.0000153800.09920.40
45. Galuppo P, Bauersachs J (2012) Mineralocorticoid receptor activation in myocardial infarction and failure: recent advances: MR ACTIVATION IN CARDIAC ISCHAEMIA AND FAILURE. *Eur J Clin Invest* 42:1112–1120. doi: 10.1111/j.1365-2362.2012.02676.x
46. Gueret A, Harouki N, Favre J, et al (2016) Vascular Smooth Muscle Mineralocorticoid Receptor Contributes to Coronary and Left Ventricular Dysfunction After Myocardial Infarction Novelty and Significance. *Hypertension* 67:717–723.
47. Wang D, Liu Y-H, Yang X-P, et al (2004) Role of a selective aldosterone blocker in mice with chronic heart failure. *J Card Fail* 10:67–73. doi: 10.1016/S1071-9164(03)00578-5
48. Ohtani T, Ohta M, Yamamoto K, et al (2006) Elevated cardiac tissue level of aldosterone and mineralocorticoid receptor in diastolic heart failure: beneficial effects of mineralocorticoid receptor blocker. *AJP Regul Integr Comp Physiol* 292:R946–R954. doi: 10.1152/ajpregu.00402.2006
49. Pitt B, Pfeffer MA, Assmann SF, et al (2014) Spironolactone for Heart Failure with Preserved Ejection Fraction. *N Engl J Med* 370:1383–1392. doi: 10.1056/NEJMoa1313731
50. Pfeffer MA, Claggett B, Assmann SF, et al (2014) Regional variation in patients and outcomes in the Treatment of Preserved Cardiac Function Heart Failure With an Aldosterone Antagonist (TOPCAT) trial. *Circulation* CIRCULATIONAHA-114.
51. Beygui F, Labbé J-P, Cayla G, et al (2013) Early mineralocorticoid receptor blockade in primary percutaneous coronary intervention for ST-elevation myocardial infarction is associated with a reduction of life-threatening ventricular arrhythmia. *Int J Cardiol* 167:73–79. doi: 10.1016/j.ijcard.2011.11.076
52. Montalescot G, Pitt B, Lopez de Sa E, et al (2014) Early eplerenone treatment in patients with acute ST-elevation myocardial infarction without heart failure: The Randomized Double-Blind Reminder Study. *Eur Heart J* 35:2295–2302. doi: 10.1093/eurheartj/ehu164
53. Funder JW (2009) Reconsidering the Roles of the Mineralocorticoid Receptor. *Hypertension* 53:286–290. doi: 10.1161/HYPERTENSIONAHA.108.119966
54. Güder G, Hammer F, Deutschbein T, et al (2015) Prognostic Value of Aldosterone and

- Cortisol in Patients Hospitalized for Acutely Decompensated Chronic Heart Failure With and Without Mineralocorticoid Receptor Antagonism. *J Card Fail* 21:208–216. doi: 10.1016/j.cardfail.2014.12.011
55. Guder G, Bauersachs J, Frantz S, et al (2007) Complementary and Incremental Mortality Risk Prediction by Cortisol and Aldosterone in Chronic Heart Failure. *Circulation* 115:1754–1761. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.106.653964
 56. Ambrosine M-L, Favre J, Oliviero P, et al (2007) Aldosterone-Induced Coronary Dysfunction in Transgenic Mice Involves the Calcium-Activated Potassium (BKCa) Channels of Vascular Smooth Muscle Cells. *Circulation* 116:2435–2443. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.107.722009
 57. Garnier A (2004) Cardiac Specific Increase in Aldosterone Production Induces Coronary Dysfunction in Aldosterone Synthase-Transgenic Mice. *Circulation* 110:1819–1825. doi: 10.1161/01.CIR.0000142858.44680.27
 58. Azibani F, Devaux Y, Coutance G, et al (2012) Aldosterone Inhibits the Fetal Program and Increases Hypertrophy in the Heart of Hypertensive Mice. *PLoS ONE* 7:e38197. doi: 10.1371/journal.pone.0038197
 59. Azibani F, Benard L, Schlossarek S, et al (2012) Aldosterone inhibits antifibrotic factors in mouse hypertensive heart. *Hypertension* 59:1179–1187.
 60. Fiebeler A (2005) Aldosterone Synthase Inhibitor Ameliorates Angiotensin II-Induced Organ Damage. *Circulation* 111:3087–3094. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.104.521625
 61. Lea WB, Kwak ES, Luther JM, et al (2009) Aldosterone antagonism or synthase inhibition reduces end-organ damage induced by treatment with angiotensin and high salt. *Kidney Int* 75:936–944. doi: 10.1038/ki.2009.9
 62. Lalevee N, Rebsamen M, Barrerelemaire S, et al (2005) Aldosterone increases T-type calcium channel expression and in vitro beating frequency in neonatal rat cardiomyocytes. *Cardiovasc Res* 67:216–224. doi: 10.1016/j.cardiores.2005.05.009
 63. Rossier MF, Lenglet S, Vetterli L, et al (2008) Corticosteroids and Redox Potential Modulate Spontaneous Contractions in Isolated Rat Ventricular Cardiomyocytes. *Hypertension* 52:721–728. doi: 10.1161/HYPERTENSIONAHA.108.114223
 64. Gomez AM, Rueda A, Sainte-Marie Y, et al (2009) Mineralocorticoid Modulation of Cardiac Ryanodine Receptor Activity Is Associated With Downregulation of FK506-Binding Proteins. *Circulation* 119:2179–2187. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.108.805804
 65. Ouvrard-Pascaud A (2005) Conditional Mineralocorticoid Receptor Expression in the Heart Leads to Life-Threatening Arrhythmias. *Circulation* 111:3025–3033. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.104.503706
 66. De Mello WC (2006) Beneficial effect of eplerenone on cardiac remodelling and electrical properties of the failing heart. *J Renin Angiotensin Aldosterone Syst* 7:40–46.
 67. Qu J, Volpicelli FM, Garcia LI, et al (2009) Gap Junction Remodeling and Spironolactone-Dependent Reverse Remodeling in the Hypertrophied Heart. *Circ Res* 104:365–371. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.108.184044
 68. Stein M, Boulaksil M, Jansen JA, et al (2010) Reduction of fibrosis-related arrhythmias by chronic renin-angiotensin-aldosterone system inhibitors in an aged mouse model. *AJP Heart Circ Physiol* 299:H310–H321. doi: 10.1152/ajpheart.01137.2009
 69. Lavall D, Selzer C, Schuster P, et al (2014) The Mineralocorticoid Receptor Promotes Fibrotic Remodeling in Atrial Fibrillation. *J Biol Chem* 289:6656–6668. doi: 10.1074/jbc.M113.519256
 70. Kimura S, Ito M, Tomita M, et al (2011) Role of mineralocorticoid receptor on atrial structural remodeling and inducibility of atrial fibrillation in hypertensive rats. *Hypertens Res* 34:584–591.
 71. Dartsch T, Fischer R, Gapelyuk A, et al (2013) Aldosterone induces electrical

- remodeling independent of hypertension. *Int J Cardiol* 164:170–178. doi: 10.1016/j.ijcard.2011.06.100
72. Deshmukh PA, Bellary SR, Schwender FT, et al (2011) Spironolactone prevents the inducibility of ventricular tachyarrhythmia in rats with aldosteronism. *J Cardiovasc Pharmacol* 58:487–491. doi: 10.1097/FJC.0b013e31822a78c1
 73. Milliez P, Girerd X, Plouin P-F, et al (2005) Evidence for an increased rate of cardiovascular events in patients with primary aldosteronism. *J Am Coll Cardiol* 45:1243–1248. doi: 10.1016/j.jacc.2005.01.015
 74. Goette A, Hoffmanns P, Enayati W, et al (2001) Effect of successful electrical cardioversion on serum aldosterone in patients with persistent atrial fibrillation. *Am J Cardiol* 88:906–909.
 75. Tsai C-T, Chiang F-T, Tseng C-D, et al (2010) Increased Expression of Mineralocorticoid Receptor in Human Atrial Fibrillation and a Cellular Model of Atrial Fibrillation. *J Am Coll Cardiol* 55:758–770. doi: 10.1016/j.jacc.2009.09.045
 76. De-An P, Li L, Zhi-Yun X, et al (2010) Increased Expression of Mineralocorticoid Receptor and 11 β -Hydroxysteroid Dehydrogenase Type 2 in Human Atria During Atrial Fibrillation. *Clin Cardiol* 33:23–29. doi: 10.1002/clc.20689
 77. Chung Y-W, Yang Y-H, Wu C-K, et al (2016) Spironolactone is associated with reduced risk of new-onset atrial fibrillation in patients receiving renal replacement therapy. *Int J Cardiol* 202:962–966. doi: 10.1016/j.ijcard.2015.05.167
 78. Simopoulos V, Tagarakis G, Hatziefthimiou A, et al (2015) Effectiveness of aldosterone antagonists for preventing atrial fibrillation after cardiac surgery in patients with systolic heart failure: a retrospective study. *Clin Res Cardiol* 104:31–37. doi: 10.1007/s00392-014-0754-7
 79. Williams RS, deLemos JA, Dimas V, et al (2011) Effect of Spironolactone on Patients With Atrial Fibrillation and Structural Heart Disease. *Clin Cardiol* 34:415–419. doi: 10.1002/clc.20914
 80. Wei J, Ni J, Huang D, et al (2010) The Effect of Aldosterone Antagonists for Ventricular Arrhythmia: A Meta-Analysis. *Clin Cardiol* 33:572–577. doi: 10.1002/clc.20762
 81. Adel H, Taye A, Khalifa MMA (2014) Spironolactone improves endothelial dysfunction in streptozotocin-induced diabetic rats. *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 387:1187–1197. doi: 10.1007/s00210-014-1048-3
 82. Schafer N, Lohmann C, Winnik S, et al (2013) Endothelial mineralocorticoid receptor activation mediates endothelial dysfunction in diet-induced obesity. *Eur Heart J* 34:3515–3524. doi: 10.1093/eurheartj/ehd095
 83. Sartorio CL, Fraccarollo D, Galuppo P, et al (2007) Mineralocorticoid Receptor Blockade Improves Vasomotor Dysfunction and Vascular Oxidative Stress Early After Myocardial Infarction. *Hypertension* 50:919–925. doi: 10.1161/HYPERTENSIONAHA.107.093450
 84. Lacolley P (2002) Increased Carotid Wall Elastic Modulus and Fibronectin in Aldosterone-Salt-Treated Rats: Effects of Eplerenone. *Circulation* 106:2848–2853. doi: 10.1161/01.CIR.0000039328.33137.6C
 85. Fujimura N, Noma K, Hata T, et al (2012) Mineralocorticoid Receptor Blocker Eplerenone Improves Endothelial Function and Inhibits Rho-Associated Kinase Activity in Patients With Hypertension. *Clin Pharmacol Ther* 91:289–297. doi: 10.1038/clpt.2011.227
 86. Gross E, Rothstein M, Dombek S, Juknis HI (2005) Effect of Spironolactone on Blood Pressure and the Renin-Angiotensin-Aldosterone System in Oligo-Anuric Hemodialysis Patients. *Am J Kidney Dis* 46:94–101. doi: 10.1053/j.ajkd.2005.03.005
 87. Shavit L, Lifschitz MD, Epstein M (2012) Aldosterone blockade and the mineralocorticoid receptor in the management of chronic kidney disease: current concepts and

emerging treatment paradigms. *Kidney Int* 81:955–968.

88. Vukusich A, Kunstmann S, Varela C, et al (2010) A Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled Trial of Spironolactone on Carotid Intima-Media Thickness in Nondiabetic Hemodialysis Patients. *Clin J Am Soc Nephrol CJASN* 5:1380–1387. doi: 10.2215/CJN.09421209
89. Garg R, Rao AD, Baimas-George M, et al (2015) Mineralocorticoid Receptor Blockade Improves Coronary Microvascular Function in Individuals With Type 2 Diabetes. *Diabetes* 64:236–242. doi: 10.2337/db14-0670
90. Bienvenu LA, Reichelt ME, Delbridge LMD, Young MJ (2013) Mineralocorticoid receptors and the heart, multiple cell types and multiple mechanisms: a focus on the cardiomyocyte. *Clin Sci* 125:409–421. doi: 10.1042/CS20130050
91. Lothar A, Berger S, Gilsbach R, et al (2011) Ablation of Mineralocorticoid Receptors in Myocytes But Not in Fibroblasts Preserves Cardiac Function. *Hypertension* 57:746–754. doi: 10.1161/HYPERTENSIONAHA.110.163287
92. Rickard AJ, Morgan J, Bienvenu LA, et al (2012) Cardiomyocyte Mineralocorticoid Receptors Are Essential for Deoxycorticosterone/Salt-Mediated Inflammation and Cardiac Fibrosis Novelty and Significance. *Hypertension* 60:1443–1450.
93. Fraccarollo D, Berger S, Galuppo P, et al (2011) Deletion of cardiomyocyte mineralocorticoid receptor ameliorates adverse remodeling after myocardial infarction. *Circulation CIRCULATIONAHA*–110.
94. McCurley A, Pires PW, Bender SB, et al (2012) Direct regulation of blood pressure by smooth muscle cell mineralocorticoid receptors. *Nat Med* 18:1429–1433. doi: 10.1038/nm.2891
95. Galmiche G, Pizard A, Gueret A, et al (2014) Smooth Muscle Cell Mineralocorticoid Receptors Are Mandatory for Aldosterone-Salt to Induce Vascular Stiffness. *Hypertension* 63:520–526. doi: 10.1161/HYPERTENSIONAHA.113.01967
96. Cat AND, Griol-Charhbili V, Loufrani L, et al (2010) The endothelial mineralocorticoid receptor regulates vasoconstrictor tone and blood pressure. *FASEB J* 24:2454–2463. doi: 10.1096/fj.09-147926
97. Rickard AJ, Morgan J, Chrissobolis S, et al (2014) Endothelial Cell Mineralocorticoid Receptors Regulate Deoxycorticosterone/Salt-Mediated Cardiac Remodeling and Vascular Reactivity But Not Blood Pressure Novelty and Significance. *Hypertension* 63:1033–1040.
98. Conn JW, Knopf RF, Nesbit RM (1964) CLINICAL CHARACTERISTICS OF PRIMARY ALDOSTERONISM FROM AN ANALYSIS OF 145 CASES. *Am J Surg* 107:159–172.
99. Greene EL, Kren S, Hostetter TH (1996) Role of aldosterone in the remnant kidney model in the rat. *J Clin Invest* 98:1063.
100. Kobayashi N, Hara K, Tojo A, et al (2005) Eplerenone Shows Renoprotective Effect by Reducing LOX-1-Mediated Adhesion Molecule, PKC -MAPK-p90RSK, and Rho-Kinase Pathway. *Hypertension* 45:538–544. doi: 10.1161/01.HYP.0000157408.43807.5a
101. Chrysostomou A, Becker G (2001) Spironolactone in addition to ACE inhibition to reduce proteinuria in patients with chronic renal disease. *N Engl J Med* 345:925–926. doi: 10.1056/NEJM200109203451215
102. Gullulu M, Akdag I, Kahvecioglu S, et al (2006) Aldosterone Blockage in Proliferative Glomerulonephritis Prevents Not Only Fibrosis, but Proliferation as Well. *Ren Fail* 28:509–514. doi: 10.1080/08860220600779033
103. Quan ZY, Walser M, Hill GS (1992) Adrenalectomy ameliorates ablative nephropathy in the rat independently of corticosterone maintenance level. *Kidney Int* 41:326–333.
104. Bianchi S, Bigazzi R, Campese VM (2006) Long-term effects of spironolactone on proteinuria and kidney function in patients with chronic kidney disease. *Kidney Int* 70:2116–

2123. doi: 10.1038/sj.ki.5001854

105. Bomback AS, Kshirsagar AV, Amamoo MA, Klemmer PJ (2008) Change in Proteinuria After Adding Aldosterone Blockers to ACE Inhibitors or Angiotensin Receptor Blockers in CKD: A Systematic Review. *Am J Kidney Dis* 51:199–211. doi: 10.1053/j.ajkd.2007.10.040

106. Furumatsu Y, Nagasawa Y, Tomida K, et al (2008) Effect of renin-angiotensin-aldosterone system triple blockade on non-diabetic renal disease: addition of an aldosterone blocker, spironolactone, to combination treatment with an angiotensin-converting enzyme inhibitor and angiotensin II receptor blocker. *Hypertens Res* 31:59–67.

107. Sato A, Hayashi K, Saruta T (2005) Antiproteinuric effects of mineralocorticoid receptor blockade in patients with chronic renal disease. *Am J Hypertens* 18:44–49. doi: 10.1016/j.amjhyper.2004.06.029

108. Tylicki L, Rutkowski P, Renke M, et al (2008) Triple Pharmacological Blockade of the Renin-Angiotensin-Aldosterone System in Nondiabetic CKD: An Open-Label Crossover Randomized Controlled Trial. *Am J Kidney Dis* 52:486–493. doi: 10.1053/j.ajkd.2008.02.297

109. Nakhoul F, Khankin E, Yaccob A, et al (2008) Eplerenone potentiates the antiproteinuric effects of enalapril in experimental nephrotic syndrome. *AJP Ren Physiol* 294:F628–F637. doi: 10.1152/ajprenal.00524.2007

110. Monrad SU, Killen PD, Anderson MR, et al (2008) The role of aldosterone blockade in murine lupus nephritis. *Arthritis Res Ther* 10:R5.

111. Aldigier JC (2005) Regression of Existing Glomerulosclerosis by Inhibition of Aldosterone. *J Am Soc Nephrol* 16:3306–3314. doi: 10.1681/ASN.2004090804

112. Chun T-Y, Chander PN, Kim J-W, et al (2008) Aldosterone, but not angiotensin II, increases profibrotic factors in kidney of adrenalectomized stroke-prone spontaneously hypertensive rats. *Am J Physiol - Endocrinol Metab* 295:E305–E312. doi: 10.1152/ajpendo.00512.2007

113. Rocha R, Rudolph AE, Frierdich GE, et al (2002) Aldosterone induces a vascular inflammatory phenotype in the rat heart. *Am J Physiol - Heart Circ Physiol* 283:H1802–H1810. doi: 10.1152/ajpheart.01096.2001

114. Rocha R, Stier Jr CT, Kifor I, et al (2000) Aldosterone: a mediator of myocardial necrosis and renal arteriopathy 1. *Endocrinology* 141:3871–3878.

115. Whaley-Connell A, Habibi J, Wei Y, et al (2009) Mineralocorticoid receptor antagonism attenuates glomerular filtration barrier remodeling in the transgenic Ren2 rat. *Am J Physiol - Ren Physiol* 296:F1013–F1022. doi: 10.1152/ajprenal.90646.2008

116. Taira M, Toba H, Murakami M, et al (2008) Spironolactone exhibits direct renoprotective effects and inhibits renal renin–angiotensin–aldosterone system in diabetic rats. *Eur J Pharmacol* 589:264–271. doi: 10.1016/j.ejphar.2008.06.019

117. Guo C, Ricchiuti V, Lian BQ, et al (2008) Mineralocorticoid Receptor Blockade Reverses Obesity-Related Changes in Expression of Adiponectin, Peroxisome Proliferator-Activated Receptor- γ , and Proinflammatory Adipokines. *Circulation* 117:2253–2261. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.107.748640

118. Fujisawa G, Okada K, Muto S, et al (2004) Spironolactone prevents early renal injury in streptozotocin-induced diabetic rats. *Kidney Int* 66:1493–1502.

119. Yuan J, Jia R, Bao Y (2007) Beneficial effects of spironolactone on glomerular injury in streptozotocin-induced diabetic rats. *J Renin-Angiotensin-Aldosterone Syst JRAAS* 8:118. doi: 10.3317/jraas.2007.014

120. Han S-Y (2006) Spironolactone Prevents Diabetic Nephropathy through an Anti-Inflammatory Mechanism in Type 2 Diabetic Rats. *J Am Soc Nephrol* 17:1362–1372. doi: 10.1681/ASN.2005111196

121. Lee S, Park J-Y, Lee W-H, et al (2009) Lipocalin-2 Is an Autocrine Mediator of

- Reactive Astrocytosis. *J Neurosci* 29:234–249. doi: 10.1523/JNEUROSCI.5273-08.2009
122. Nishiyama A, Yao L, Fan Y, et al (2005) Involvement of Aldosterone and Mineralocorticoid Receptors in Rat Mesangial Cell Proliferation and Deformability. *Hypertension* 45:710–716. doi: 10.1161/01.HYP.0000154681.38944.9a
123. Sato A, Hayashi K, Naruse M, Saruta T (2003) Effectiveness of Aldosterone Blockade in Patients With Diabetic Nephropathy. *Hypertension* 41:64–68. doi: 10.1161/01.HYP.0000044937.95080.E9
124. Schjoedt KJ, Rossing K, Juhl TR, et al (2006) Beneficial impact of spironolactone on nephrotic range albuminuria in diabetic nephropathy. *Kidney Int* 70:536–542. doi: 10.1038/sj.ki.5001580
125. Schjoedt KJ, Rossing K, Juhl TR, et al (2005) Beneficial impact of spironolactone in diabetic nephropathy. *Kidney Int* 68:2829–2836.
126. Barrera-Chimal J, Pérez-Villalva R, Rodríguez-Romo R, et al (2013) Spironolactone prevents chronic kidney disease caused by ischemic acute kidney injury. *Kidney Int* 83:93–103. doi: 10.1038/ki.2012.352
127. Lattenist L, Lechner SM, Messaoudi S, et al (2017) Nonsteroidal Mineralocorticoid Receptor Antagonist Finerenone Protects Against Acute Kidney Injury-Mediated Chronic Kidney Disease: Role of Oxidative Stress. *Hypertens Dallas Tex* 1979 69:870–878. doi: 10.1161/HYPERTENSIONAHA.116.08526
128. Mejia-Vilet JM, Ramirez V, Cruz C, et al (2007) Renal ischemia-reperfusion injury is prevented by the mineralocorticoid receptor blocker spironolactone. *AJP Ren Physiol* 293:F78–F86. doi: 10.1152/ajprenal.00077.2007
129. Sanchez-Pozos K, Barrera-Chimal J, Garzon-Muvdi J, et al (2012) Recovery from ischemic acute kidney injury by spironolactone administration. *Nephrol Dial Transplant* 27:3160–3169. doi: 10.1093/ndt/gfs014
130. Barrera-Chimal J, André-Grégoire G, Nguyen dinh Cat A, et al (2017) Benefit of Mineralocorticoid Receptor Antagonism in AKI: Role of Vascular Smooth Muscle Rac1. *J Am Soc Nephrol* 28:1216–1226. doi: 10.1681/ASN.2016040477
131. Barrera-Chimal J, Pérez-Villalva R, Ortega JA, et al (2015) Mild ischemic Injury Leads to Long-Term Alterations in the Kidney: Amelioration by Spironolactone Administration. *Int J Biol Sci* 11:892–900. doi: 10.7150/ijbs.11729
132. Bobadilla NA, Gamba G (2007) New insights into the pathophysiology of cyclosporine nephrotoxicity: a role of aldosterone. *AJP Ren Physiol* 293:F2–F9. doi: 10.1152/ajprenal.00072.2007
133. Perez-Rojas JM (2005) Renocortical mRNA expression of vasoactive factors during spironolactone protective effect in chronic cyclosporine nephrotoxicity. *AJP Ren Physiol* 289:F1020–F1030. doi: 10.1152/ajprenal.00166.2005
134. Feria I, Pichardo I, Juárez P, et al (2003) Therapeutic benefit of spironolactone in experimental chronic cyclosporine A nephrotoxicity. *Kidney Int* 63:43–52.
135. Perez-Rojas J, Blanco JA, Cruz C, et al (2006) Mineralocorticoid receptor blockade confers renoprotection in preexisting chronic cyclosporine nephrotoxicity. *AJP Ren Physiol* 292:F131–F139. doi: 10.1152/ajprenal.00147.2006
136. Waanders F, Rienstra H, Boer MW, et al (2009) Spironolactone ameliorates transplant vasculopathy in renal chronic transplant dysfunction in rats. *AJP Ren Physiol* 296:F1072–F1079. doi: 10.1152/ajprenal.90643.2008
137. Amador CA, Bertocchio J-P, Andre-Gregoire G, et al (2016) Deletion of mineralocorticoid receptors in smooth muscle cells blunts renal vascular resistance following acute cyclosporine administration. *Kidney Int* 89:354–362. doi: 10.1038/ki.2015.312
138. Yoshikawa T, Naito Y (2002) What is oxidative stress? *Jpn Med Assoc J* 45:271–276.
139. Queisser N, Schupp N (2012) Aldosterone, oxidative stress, and NF- κ B activation in

- hypertension-related cardiovascular and renal diseases. *Free Radic Biol Med* 53:314–327. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2012.05.011
140. Bayorh MA, Rollins-Hairston A, Adiyiah J, et al (2011) Eplerenone suppresses aldosterone/ salt-induced expression of NOX-4. *J Renin Angiotensin Aldosterone Syst* 12:195–201. doi: 10.1177/1470320310391330
 141. Brown NJ (2013) Contribution of aldosterone to cardiovascular and renal inflammation and fibrosis. *Nat Rev Nephrol* 9:459–469. doi: 10.1038/nrneph.2013.110
 142. Iwashima F, Yoshimoto T, Minami I, et al (2008) Aldosterone Induces Superoxide Generation via Rac1 Activation in Endothelial Cells. *Endocrinology* 149:1009–1014. doi: 10.1210/en.2007-0864
 143. Schupp N, Queisser N, Wolf M, et al (2010) Aldosterone Causes DNA Strand Breaks and Chromosomal Damage in Renal Cells, Which are Prevented by Mineralocorticoid Receptor Antagonists. *Horm Metab Res* 42:458–465. doi: 10.1055/s-0029-1243253
 144. Barrera-Chimal J, Prince S, Fadel F, et al (2016) Sulfenic Acid Modification of Endothelin B Receptor is Responsible for the Benefit of a Nonsteroidal Mineralocorticoid Receptor Antagonist in Renal Ischemia. *J Am Soc Nephrol JASN* 27:398–404. doi: 10.1681/ASN.2014121216
 145. Rude MK, Duhaney T-AS, Kuster GM, et al (2005) Aldosterone Stimulates Matrix Metalloproteinases and Reactive Oxygen Species in Adult Rat Ventricular Cardiomyocytes. *Hypertension* 46:555–561. doi: 10.1161/01.HYP.0000176236.55322.18
 146. Michea L, Villagran A, Urzua A, et al (2008) Mineralocorticoid Receptor Antagonism Attenuates Cardiac Hypertrophy and Prevents Oxidative Stress in Uremic Rats. *Hypertension* 52:295–300. doi: 10.1161/HYPERTENSIONAHA.107.109645
 147. Nagase M, Ayuzawa N, Kawarazaki W, et al (2012) Oxidative Stress Causes Mineralocorticoid Receptor Activation in Rat Cardiomyocytes: Role of Small GTPase Rac1. *Hypertension* 59:500–506. doi: 10.1161/HYPERTENSIONAHA.111.185520
 148. Wynn TA, Ramalingam TR (2012) Mechanisms of fibrosis: therapeutic translation for fibrotic disease. *Nat Med* 18:1028–1040. doi: 10.1038/nm.2807
 149. Wynn T (2008) Cellular and molecular mechanisms of fibrosis. *J Pathol* 214:199–210. doi: 10.1002/path.2277
 150. Borthwick LA, Wynn TA, Fisher AJ (2013) Cytokine mediated tissue fibrosis. *Biochim Biophys Acta BBA - Mol Basis Dis* 1832:1049–1060. doi: 10.1016/j.bbadis.2012.09.014
 151. Bauersachs J, Jaisser F, Toto R (2015) Mineralocorticoid receptor activation and mineralocorticoid receptor antagonist treatment in cardiac and renal diseases. *Hypertension* 65:257–263.
 152. Dooley R, Harvey BJ, Thomas W (2011) The regulation of cell growth and survival by aldosterone. *Front Biosci Landmark Ed* 16:440–457.
 153. Robert V, Van Thiem N, Cheav SL, et al (1994) Increased cardiac types I and III collagen mRNAs in aldosterone-salt hypertension. *Hypertension* 24:30–36.
 154. Thomas W, Dooley R, Harvey BJ (2010) Aldosterone as a renal growth factor. *Steroids* 75:550–554. doi: 10.1016/j.steroids.2009.09.008
 155. Young MJ, Rickard AJ (2012) Mechanisms of mineralocorticoid salt-induced hypertension and cardiac fibrosis. *Mol Cell Endocrinol* 350:248–255. doi: 10.1016/j.mce.2011.09.008
 156. Marney AM, Brown NJ (2007) Aldosterone and end-organ damage. *Clin Sci* 113:267–278. doi: 10.1042/CS20070123
 157. Fraccarollo D, Galuppo P, Schraut S, et al (2008) Immediate Mineralocorticoid Receptor Blockade Improves Myocardial Infarct Healing by Modulation of the Inflammatory Response. *Hypertension* 51:905–914. doi: 10.1161/HYPERTENSIONAHA.107.100941

158. Wang Q (2004) Chronic hyperaldosteronism in a transgenic mouse model fails to induce cardiac remodeling and fibrosis under a normal-salt diet. *AJP Ren Physiol* 286:F1178–F1184. doi: 10.1152/ajprenal.00386.2003
159. Calvier L, Martinez-Martinez E, Miana M, et al (2015) The Impact of Galectin-3 Inhibition on Aldosterone-Induced Cardiac and Renal Injuries. *JACC Heart Fail* 3:59–67. doi: 10.1016/j.jchf.2014.08.002
160. Iraqi W, Rossignol P, Angioi M, et al (2009) Extracellular Cardiac Matrix Biomarkers in Patients With Acute Myocardial Infarction Complicated by Left Ventricular Dysfunction and Heart Failure: Insights From the Eplerenone Post-Acute Myocardial Infarction Heart Failure Efficacy and Survival Study (EPHESUS) Study. *Circulation* 119:2471–2479. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.108.809194
161. Wong KYK, Wong SYS, McSwiggan S, et al (2013) Myocardial fibrosis and QTc are reduced following treatment with spironolactone or amiloride in stroke survivors: A randomised placebo-controlled cross-over trial. *Int J Cardiol* 168:5229–5233. doi: 10.1016/j.ijcard.2013.08.027
162. Pizarro M, Solís N, Quintero P, et al (2015) Beneficial effects of mineralocorticoid receptor blockade in experimental non-alcoholic steatohepatitis. *Liver Int* 35:2129–2138. doi: 10.1111/liv.12794
163. Maron BA, Oldham WM, Chan SY, et al (2014) Upregulation of Steroidogenic Acute Regulatory Protein by Hypoxia Stimulates Aldosterone Synthesis in Pulmonary Artery Endothelial Cells to Promote Pulmonary Vascular Fibrosis. *Circulation* 130:168–179. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.113.007690
164. Mitts TF, Bunda S, Wang Y, Hinek A (2010) Aldosterone and mineralocorticoid receptor antagonists modulate elastin and collagen deposition in human skin. *J Invest Dermatol* 130:2396–2406.
165. Mortensen RM (2012) Immune Cell Modulation of Cardiac Remodeling. *Circulation* 125:1597–1600. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.112.097832
166. Schiffrin EL (2013) The Immune System: Role in Hypertension. *Can J Cardiol* 29:543–548. doi: 10.1016/j.cjca.2012.06.009
167. Ueha S, Shand FHW, Matsushima K (2012) Cellular and Molecular Mechanisms of Chronic Inflammation-Associated Organ Fibrosis. *Front Immunol*. doi: 10.3389/fimmu.2012.00071
168. Akchurin OM, Kaskel F (2015) Update on Inflammation in Chronic Kidney Disease. *Blood Purif* 39:84–92. doi: 10.1159/000368940
169. Epelman S, Liu PP, Mann DL (2015) Role of innate and adaptive immune mechanisms in cardiac injury and repair. *Nat Rev Immunol* 15:117–129. doi: 10.1038/nri3800
170. Imig JD, Ryan MJ (2013) Immune and Inflammatory Role in Renal Disease. *Compr Physiol*. doi: 10.1002/cphy.c120028
171. Silverstein DM (2009) Inflammation in chronic kidney disease: role in the progression of renal and cardiovascular disease. *Pediatr Nephrol* 24:1445–1452. doi: 10.1007/s00467-008-1046-0
172. Gilbert KC, Brown NJ (2010) Aldosterone and inflammation. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes* 17:199.
173. Bene NC, Alcaide P, Wortis HH, Jaffe IZ (2014) Mineralocorticoid receptors in immune cells: Emerging role in cardiovascular disease. *Steroids* 91:38–45. doi: 10.1016/j.steroids.2014.04.005
174. Herrada AA, Campino C, Amador CA, et al (2011) Aldosterone as a modulator of immunity: implications in the organ damage. *J Hypertens* 29:1684–1692. doi: 10.1097/HJH.0b013e32834a4c75
175. Herrada AA, Contreras FJ, Marini NP, et al (2010) Aldosterone Promotes

- Autoimmune Damage by Enhancing Th17-Mediated Immunity. *J Immunol* 184:191–202. doi: 10.4049/jimmunol.0802886
176. Frieler RA, Meng H, Duan SZ, et al (2011) Myeloid-specific deletion of the mineralocorticoid receptor reduces infarct volume and alters inflammation during cerebral ischemia. *Stroke* 42:179–185.
 177. Martín-Fernández B, Rubio-Navarro A, Cortegano I, et al (2016) Aldosterone Induces Renal Fibrosis and Inflammatory M1-Macrophage Subtype via Mineralocorticoid Receptor in Rats. *PLOS ONE* 11:e0145946. doi: 10.1371/journal.pone.0145946
 178. Usher MG, Duan SZ, Ivaschenko CY, et al (2010) Myeloid mineralocorticoid receptor controls macrophage polarization and cardiovascular hypertrophy and remodeling in mice. *J Clin Invest* 120:3350–3364. doi: 10.1172/JCI41080
 179. Shen Z-X, Chen X-Q, Sun X-N, et al (2017) Mineralocorticoid Receptor Deficiency in Macrophages Inhibits Atherosclerosis by Affecting Foam Cell Formation and Efferocytosis. *J Biol Chem* 292:925–935. doi: 10.1074/jbc.M116.739243
 180. Rickard AJ, Morgan J, Tesch G, et al (2009) Deletion of Mineralocorticoid Receptors From Macrophages Protects Against Deoxycorticosterone/Salt-Induced Cardiac Fibrosis and Increased Blood Pressure. *Hypertension* 54:537–543. doi: 10.1161/HYPERTENSIONAHA.109.131110
 181. Shen JZ, Morgan J, Tesch GH, et al (2016) Cardiac Tissue Injury and Remodeling Is Dependent Upon MR Regulation of Activation Pathways in Cardiac Tissue Macrophages. *Endocrinology* 157:3213–3223. doi: 10.1210/en.2016-1040
 182. Li C, Zhang YY, Frieler RA, et al (2014) Myeloid Mineralocorticoid Receptor Deficiency Inhibits Aortic Constriction-Induced Cardiac Hypertrophy in Mice. *PLoS ONE* 9:e110950. doi: 10.1371/journal.pone.0110950
 183. Huang LL, Nikolic-Paterson DJ, Han Y, et al (2014) Myeloid Mineralocorticoid Receptor Activation Contributes to Progressive Kidney Disease. *J Am Soc Nephrol JASN* 25:2231–2240. doi: 10.1681/ASN.2012111094
 184. Li C, Sun X-N, Zeng M-R, et al (2017) Mineralocorticoid Receptor Deficiency in T Cells Attenuates Pressure Overload-Induced Cardiac Hypertrophy and Dysfunction Through Modulating T-Cell Activation. *Hypertension HYPERTENSIONAHA*–117.
 185. Sun XN, Li C, Liu Y, et al (2017) T Cell Mineralocorticoid Receptor Controls Blood Pressure by Regulating Interferon Gamma. *Circ Res CIRCRESAHA*.116.310480. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.116.310480
 186. Amador CA, Barrientos V, Peña J, et al (2014) Spironolactone decreases DOCA-salt-induced organ damage by blocking the activation of T helper 17 and the downregulation of regulatory T lymphocytes. *Hypertens Dallas Tex* 1979 63:797–803. doi: 10.1161/HYPERTENSIONAHA.113.02883
 187. Harrison DG, Guzik TJ, Lob HE, et al (2011) Inflammation, Immunity, and Hypertension. *Hypertension* 57:132–140. doi: 10.1161/HYPERTENSIONAHA.110.163576
 188. Harrison DG, Vinh A, Lob H, Madhur MS (2010) Role of the adaptive immune system in hypertension. *Curr Opin Pharmacol* 10:203–207. doi: 10.1016/j.coph.2010.01.006
 189. Lopez-Andres N, Martin-Fernandez B, Rossignol P, et al (2011) A role for cardiotrophin-1 in myocardial remodeling induced by aldosterone. *AJP Heart Circ Physiol* 301:H2372–H2382. doi: 10.1152/ajpheart.00283.2011
 190. López-Andrés N, Iñigo C, Gallego I, et al (2008) Aldosterone Induces Cardiotrophin-1 Expression in HL-1 Adult Cardiomyocytes. *Endocrinology* 149:4970–4978. doi: 10.1210/en.2008-0120
 191. Latouche C, El Moghrabi S, Messaoudi S, et al (2012) Neutrophil gelatinase-associated lipocalin is a novel mineralocorticoid target in the cardiovascular system. *Hypertension* 59:966–972. doi: 10.1161/HYPERTENSIONAHA.111.187872

192. Devarajan P (2010) Neutrophil gelatinase-associated lipocalin: a promising biomarker for human acute kidney injury. *Biomark Med* 4:265–280. doi: 10.2217/bmm.10.12
193. Chakraborty S, Kaur S, Guha S, Batra SK (2012) The multifaceted roles of neutrophil gelatinase associated lipocalin (NGAL) in inflammation and cancer. *Biochim Biophys Acta BBA - Rev Cancer* 1826:129–169. doi: 10.1016/j.bbcan.2012.03.008
194. Cruz DN, Gaiao S, Maisel A, et al (2012) Neutrophil gelatinase-associated lipocalin as a biomarker of cardiovascular disease: a systematic review. *Clin Chem Lab Med CCLM*. doi: 10.1515/cclm-2012-0307
195. Flower DR (2000) Beyond the superfamily: the lipocalin receptors. *Biochim Biophys Acta BBA-Protein Struct Mol Enzymol* 1482:327–336.
196. Candido S, Maestro R, Polesel J, et al (2014) Roles of neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL) in human cancer. *Oncotarget* 5:1576.
197. Goetz DH (2002) The neutrophil lipocalin NGAL is a bacteriostatic agent that interferes with siderophore-mediated iron acquisition. *Mol Cell* 10:1033–1043. doi: 10.1016/S1097-2765(02)00708-6
198. Yan L, Borregaard N, Kjeldsen L, Moses MA (2001) 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* 276:37258–37265. doi: 10.1074/jbc.M106089200
199. Chen Q, Jin M, Yang F, et al (2013) Matrix Metalloproteinases: Inflammatory Regulators of Cell Behaviors in Vascular Formation and Remodeling. *Mediators Inflamm* 2013:1–14. doi: 10.1155/2013/928315
200. Galis ZS, Khatri JJ (2002) Matrix metalloproteinases in vascular remodeling and atherogenesis. *Circ Res* 90:251–262.
201. Grzela K, Litwiniuk M, Zagorska W, Grzela T (2016) Airway Remodeling in Chronic Obstructive Pulmonary Disease and Asthma: the Role of Matrix Metalloproteinase-9. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)* 64:47–55. doi: 10.1007/s00005-015-0345-y
202. Halade GV, Jin Y-F, Lindsey ML (2013) Matrix metalloproteinase (MMP)-9: A proximal biomarker for cardiac remodeling and a distal biomarker for inflammation. *Pharmacol Ther* 139:32–40. doi: 10.1016/j.pharmthera.2013.03.009
203. Yabluchanskiy A, Ma Y, Iyer RP, et al (2013) Matrix Metalloproteinase-9: Many Shades of Function in Cardiovascular Disease. *Physiology* 28:391–403. doi: 10.1152/physiol.00029.2013
204. Triebel S, Blaser J, Reinke H, Tschesche H (1992) A 25[kDa] alpha 2-microglobulin-related protein is a component of the 125[kDa] form of human gelatinase. *FEBS Lett* 314:386–388. doi: 10.1016/0014-5793(92)81511-J
205. Bu D, Hemdahl A-L, Gabrielsen A, et al (2006) Induction of Neutrophil Gelatinase-Associated Lipocalin in Vascular Injury via Activation of Nuclear Factor- κ B. *Am J Pathol* 169:2245–2253. doi: 10.2353/ajpath.2006.050706
206. Anne-Louise Hemdahl AG (2006) Expression of neutrophil gelatinase-associated lipocalin in atherosclerosis and myocardial infarction. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 26:136–42. doi: 10.1161/01.ATV.0000193567.88685.f4
207. Leng X, Ding T, Lin H, et al (2009) Inhibition of Lipocalin 2 Impairs Breast Tumorigenesis and Metastasis. *Cancer Res* 69:8579–8584. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-09-1934
208. Xiao X, Yeoh BS, Vijay-Kumar M (2017) Lipocalin 2: An Emerging Player in Iron Homeostasis and Inflammation. *Annu Rev Nutr*. doi: 10.1146/annurev-nutr-071816-064559
209. Kjeldsen L, Cowland JB, Borregaard N (2000) Human neutrophil gelatinase-associated lipocalin and homologous proteins in rat and mouse. *Biochim Biophys Acta* 1482:272–283.

210. Kjeldsen L, Bainton DF, Sengeløv H, Borregaard N (1994) Identification of neutrophil gelatinase-associated lipocalin as a novel matrix protein of specific granules in human neutrophils. *Blood* 83:799–807.
211. Kjeldsen L, Johnsen AH, Sengelov H, Borregaard N (1993) Isolation and primary structure of NGAL, a novel protein associated with human neutrophil gelatinase. *J Biol Chem* 268:10425–10432.
212. Liu F, Yang H, Chen H, et al (2015) High expression of neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL) in the kidney proximal tubules of diabetic rats. *Adv Med Sci* 60:133–138. doi: 10.1016/j.advms.2015.01.001
213. Hamzic N, Blomqvist A, Nilsberth C (2013) Immune-Induced Expression of Lipocalin-2 in Brain Endothelial Cells: Relationship with Interleukin-6, Cyclooxygenase-2 and the Febrile Response. *J Neuroendocrinol* 25:271–280. doi: 10.1111/jne.12000
214. Borkham-Kamphorst E, Drews F, Weiskirchen R (2011) Induction of lipocalin-2 expression in acute and chronic experimental liver injury moderated by pro-inflammatory cytokines interleukin-1 β through nuclear factor- κ B activation: LCN2 induction in acute and chronic experimental liver injury. *Liver Int* 31:656–665. doi: 10.1111/j.1478-3231.2011.02495.x
215. Eilenberg W, Stojkovic S, Piechota-Polanczyk A, et al (2016) Neutrophil Gelatinase-Associated Lipocalin (NGAL) is Associated with Symptomatic Carotid Atherosclerosis and Drives Pro-inflammatory State In Vitro. *Eur J Vasc Endovasc Surg* 51:623–631. doi: 10.1016/j.ejvs.2016.01.009
216. Naudé PJW, Eisel ULM, Comijs HC, et al (2013) Neutrophil gelatinase-associated lipocalin: A novel inflammatory marker associated with late-life depression. *J Psychosom Res* 75:444–450. doi: 10.1016/j.jpsychores.2013.08.023
217. Flo TH, Smith KD, Sato S, et al (2004) Lipocalin 2 mediates an innate immune response to bacterial infection by sequestering iron. *Nature* 432:917–921. doi: 10.1038/nature03104
218. Floderer M, Prchal-Murphy M, Vizzardelli C (2014) Dendritic Cell-Secreted Lipocalin2 Induces CD8⁺ T-Cell Apoptosis, Contributes to T-Cell Priming and Leads to a TH1 Phenotype. *PLoS ONE* 9:e101881. doi: 10.1371/journal.pone.0101881
219. Di Grande A, Giuffrida C, Carpinteri G, et al (2009) Neutrophil gelatinase-associated lipocalin: a novel biomarker for the early diagnosis of acute kidney injury in the emergency department. *Eur Rev Med Pharmacol Sci* 13:197–200.
220. Parikh CR, Devarajan P (2008) New biomarkers of acute kidney injury. *Crit Care Med* 36:S159–165. doi: 10.1097/CCM.0b013e318168c652
221. Axelsson L, Bergenfeldt M, Ohlsson K (1995) Studies of the release and turnover of a human neutrophil lipocalin. *Scand J Clin Lab Invest* 55:577–588.
222. Mori K, Lee HT, Rapoport D, et al (2005) Endocytic delivery of lipocalin-siderophore-iron complex rescues the kidney from ischemia-reperfusion injury. *J Clin Invest* 115:610–621. doi: 10.1172/JCI200523056
223. Aigner F, Maier HT, Schwelberger HG, et al (2007) Lipocalin-2 Regulates the Inflammatory Response During Ischemia and Reperfusion of the Transplanted Heart. *Am J Transplant* 7:779–788. doi: 10.1111/j.1600-6143.2006.01723.x
224. Berger T, Togawa A, Duncan GS, et al (2006) Lipocalin 2-deficient mice exhibit increased sensitivity to *Escherichia coli* infection but not to ischemia-reperfusion injury. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103:1834–1839. doi: 10.1073/pnas.0510847103
225. Bao G, Clifton M, Hoette TM, et al (2010) Iron traffics in circulation bound to a siderocalin (Ngal)–catechol complex. *Nat Chem Biol* 6:602–609. doi: 10.1038/nchembio.402
226. Devireddy LR, Gazin C, Zhu X, Green MR (2005) A Cell-Surface Receptor for Lipocalin 24p3 Selectively Mediates Apoptosis and Iron Uptake. *Cell* 123:1293–1305. doi:

10.1016/j.cell.2005.10.027

227. Wang Y, Wu M, Al-Rousan R, et al (2011) Iron-Induced Cardiac Damage: Role of Apoptosis and Deferasirox Intervention. *J Pharmacol Exp Ther* 336:56–63. doi: 10.1124/jpet.110.172668
228. Kim J (2012) The Role of Iron Metabolism in Lung Inflammation and Injury. *J Allergy Ther*. doi: 10.4172/2155-6121.S4-004
229. Chen M, Cabantchik ZI, Chan S, et al (2014) Iron Overload and Apoptosis of HL-1 Cardiomyocytes: Effects of Calcium Channel Blockade. *PLoS ONE* 9:e112915. doi: 10.1371/journal.pone.0112915
230. Whittaker P, Hines FA, Robl MG, Dunkel VC (1996) Histopathological Evaluation of Liver, Pancreas, Spleen, and Heart from Iron-Overloaded Sprague-Dawley Rats* 1, 2. *Toxicol Pathol* 24:558–563.
231. Schroll A, Eller K, Feistritz C, et al (2012) Lipocalin-2 ameliorates granulocyte functionality: Innate immunity. *Eur J Immunol* 42:3346–3357. doi: 10.1002/eji.201142351
232. Shao S, Cao T, Jin L, et al (2016) Increased Lipocalin-2 Contributes to the Pathogenesis of Psoriasis by Modulating Neutrophil Chemotaxis and Cytokine Secretion. *J Invest Dermatol* 136:1418–1428. doi: 10.1016/j.jid.2016.03.002
233. Ding G, Fang J, Tong S, et al (2015) Over-expression of lipocalin 2 promotes cell migration and invasion through activating ERK signaling to increase SLUG expression in prostate cancer: LCN2/ERK/SLUG Axis Promotes PCa Aggression. *The Prostate* 75:957–968. doi: 10.1002/pros.22978
234. Du Z-P, Wu B-L, Xie Y-M, et al (2015) Lipocalin 2 promotes the migration and invasion of esophageal squamous cell carcinoma cells through a novel positive feedback loop. *Biochim Biophys Acta BBA - Mol Cell Res* 1853:2240–2250. doi: 10.1016/j.bbamer.2015.07.007
235. Leung L, Radulovich N, Zhu C-Q, et al (2012) Lipocalin2 Promotes Invasion, Tumorigenicity and Gemcitabine Resistance in Pancreatic Ductal Adenocarcinoma. *PLoS ONE* 7:e46677. doi: 10.1371/journal.pone.0046677
236. Mir SUR, Jin L, Craven RJ (2012) Neutrophil Gelatinase-associated Lipocalin (NGAL) Expression Is Dependent on the Tumor-associated Sigma-2 Receptor S2R^{Pgrmc1}. *J Biol Chem* 287:14494–14501. doi: 10.1074/jbc.M111.324921
237. Mongre R, Sodhi S, Sharma N, et al (2015) Epigenetic induction of epithelial to mesenchymal transition by LCN2 mediates metastasis and tumorigenesis, which is abrogated by NF-κB inhibitor BRM270 in a xenograft model of lung adenocarcinoma. *Int J Oncol*. doi: 10.3892/ijo.2015.3245
238. Yang J, McNeish B, Butterfield C, Moses MA (2013) Lipocalin 2 is a novel regulator of angiogenesis in human breast cancer. *FASEB J* 27:45–50. doi: 10.1096/fj.12-211730
239. Yang J, Bielenberg DR, Rodig SJ, et al (2009) Lipocalin 2 promotes breast cancer progression. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106:3913–3918. doi: 10.1073/pnas.0810617106
240. Schmidt-Ott KM, Mori K, Li JY, et al (2007) Dual Action of Neutrophil Gelatinase-Associated Lipocalin. *J Am Soc Nephrol* 18:407–413. doi: 10.1681/ASN.2006080882
241. Gwira JA, Wei F, Ishibe S, et al (2005) Expression of Neutrophil Gelatinase-associated Lipocalin Regulates Epithelial Morphogenesis in Vitro. *J Biol Chem* 280:7875–7882. doi: 10.1074/jbc.M413192200
242. Wang G, Ma N, Meng L, et al (2015) Activation of the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway is involved in lipocalin-2-promoted human pulmonary artery smooth muscle cell proliferation. *Mol Cell Biochem* 410:207–213. doi: 10.1007/s11010-015-2553-5
243. Iannetti A, Pacifico F, Acquaviva R, et al (2008) The neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL), a NF-κB-regulated gene, is a survival factor for thyroid neoplastic cells. *Proc Natl Acad Sci* 105:14058–14063.

244. Koh S, Lee K (2015) HGF mediated upregulation of lipocalin 2 regulates MMP9 through nuclear factor- κ B activation. *Oncol Rep*. doi: 10.3892/or.2015.4189
245. Ding L, Hanawa H, Ota Y, et al (2010) Lipocalin-2/Neutrophil Gelatinase-B Associated Lipocalin Is Strongly Induced in Hearts of Rats With Autoimmune Myocarditis and in Human Myocarditis. *Circ J* 74:523–530. doi: 10.1253/circj.CJ-09-0485
246. Langelueddecke C, Roussa E, Fenton RA, et al (2012) Lipocalin-2 (24p3/Neutrophil Gelatinase-associated Lipocalin (NGAL)) Receptor Is Expressed in Distal Nephron and Mediates Protein Endocytosis. *J Biol Chem* 287:159–169. doi: 10.1074/jbc.M111.308296
247. Dizin E, Hasler U, Nlandu-Khodo S, et al (2013) Albuminuria induces a proinflammatory and profibrotic response in cortical collecting ducts via the 24p3 receptor. *AJP Ren Physiol* 305:F1053–F1063. doi: 10.1152/ajprenal.00006.2013
248. Moestrup SK, Verroust PJ (2001) Megalin- and Cubilin-Mediated Endocytosis of Protein-Bound Vitamins, Lipids, and Hormones in Polarized Epithelia. *Annu Rev Nutr* 21:407–428. doi: 10.1146/annurev.nutr.21.1.407
249. Van Dijk A, Vermond RA, Krijnen PAJ, et al (2010) Intravenous clusterin administration reduces myocardial infarct size in rats: CLUSTERIN ADMINISTRATION REDUCES INFARCT SIZE. *Eur J Clin Invest* 40:893–902. doi: 10.1111/j.1365-2362.2010.02345.x
250. Miharada K, Hiroyama T, Sudo K, et al (2008) Lipocalin 2-mediated growth suppression is evident in human erythroid and monocyte/macrophage lineage cells. *J Cell Physiol* 215:526–537. doi: 10.1002/jcp.21334
251. Saito A, Pietromonaco S, Loo AK-C, Farquhar MG (1994) Complete cloning and sequencing of rat gp330/“ megalin,” a distinctive member of the low density lipoprotein receptor gene family. *Proc Natl Acad Sci* 91:9725–9729.
252. Leheste JR, Rolinski B, Vorum H, et al (1999) Megalin knockout mice as an animal model of low molecular weight proteinuria. *Am J Pathol* 155:1361–1370. doi: 10.1016/S0002-9440(10)65238-8
253. Hvidberg V, Jacobsen C, Strong RK, et al (2005) The endocytic receptor megalin binds the iron transporting neutrophil-gelatinase-associated lipocalin with high affinity and mediates its cellular uptake. *FEBS Lett* 579:773–777. doi: 10.1016/j.febslet.2004.12.031
254. Kumpers P, Hafer C, Lukasz A, et al (2010) Serum neutrophil gelatinase-associated lipocalin at inception of renal replacement therapy predicts survival in critically ill patients with acute kidney injury. *Crit Care* 14:R9.
255. Lindberg S, Jensen JS, Hoffmann S, et al (2016) Plasma Neutrophil Gelatinase-Associated Lipocalin Reflects Both Inflammation and Kidney Function in Patients with Myocardial Infarction. *Cardiorenal Med* 6:180–190. doi: 10.1159/000443846
256. Naudé PJW, Mommersteeg PMC, Gouweleeuw L, et al (2015) NGAL and other markers of inflammation as competitive or complementary markers for depressive symptom dimensions in heart failure. *World J Biol Psychiatry* 16:536–541. doi: 10.3109/15622975.2015.1062550
257. Oikonomou KA, Kapsoritakis AN, Theodoridou C, et al (2012) Neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL) in inflammatory bowel disease: association with pathophysiology of inflammation, established markers, and disease activity. *J Gastroenterol* 47:519–530. doi: 10.1007/s00535-011-0516-5
258. Yigit IP, Celiker H, Dogukan A, et al (2015) Can serum NGAL levels be used as an inflammation marker on hemodialysis patients with permanent catheter? *Ren Fail* 37:77–82. doi: 10.3109/0886022X.2014.975133
259. Han M, Li Y, Liu M, et al (2012) Renal neutrophil gelatinase associated lipocalin expression in lipopolysaccharide-induced acute kidney injury in the rat. *BMC Nephrol* 13:25.
260. Ip JP, Noçon AL, Hofer MJ, et al (2011) Lipocalin 2 in the central nervous system

- host response to systemic lipopolysaccharide administration. *J Neuroinflammation* 8:1.
261. Zhang J, Wu Y, Zhang Y, et al (2008) The Role of Lipocalin 2 in the Regulation of Inflammation in Adipocytes and Macrophages. *Mol Endocrinol* 22:1416–1426. doi: 10.1210/me.2007-0420
 262. Bonnemaïson ML, Marks ES, Boesen EI (2017) Interleukin-1 β as a driver of renal NGAL production. *Cytokine* 91:38–43. doi: 10.1016/j.cyto.2016.12.004
 263. Chang S-Y, Kim D-B, Ko S-H, et al (2013) Induction mechanism of lipocalin-2 expression by co-stimulation with interleukin-1 β and interferon- γ in RINm5F beta-cells. *Biochem Biophys Res Commun* 434:577–583. doi: 10.1016/j.bbrc.2013.03.117
 264. Cowland JB, Sorensen OE, Sehested M, Borregaard N (2003) Neutrophil Gelatinase-Associated Lipocalin Is Up-Regulated in Human Epithelial Cells by IL-1 , but Not by TNF-. *J Immunol* 171:6630–6639. doi: 10.4049/jimmunol.171.12.6630
 265. Sommer G, Weise S, Kralisch S, et al (2009) Lipocalin-2 is induced by interleukin-1 β in murine adipocytes in vitro. *J Cell Biochem* 106:103–108. doi: 10.1002/jcb.21980
 266. Yndestad A, Landrø L, Ueland T, et al (2009) Increased systemic and myocardial expression of neutrophil gelatinase-associated lipocalin in clinical and experimental heart failure. *Eur Heart J* 30:1229–1236. doi: 10.1093/eurheartj/ehp088
 267. Zhang Y, Foncea R, Deis JA, et al (2014) Lipocalin 2 Expression and Secretion Is Highly Regulated by Metabolic Stress, Cytokines, and Nutrients in Adipocytes. *PLoS ONE* 9:e96997. doi: 10.1371/journal.pone.0096997
 268. Shen F, Hu Z, Goswami J, Gaffen SL (2006) Identification of Common Transcriptional Regulatory Elements in Interleukin-17 Target Genes. *J Biol Chem* 281:24138–24148. doi: 10.1074/jbc.M604597200
 269. Zhao P, Elks CM, Stephens JM (2014) The Induction of Lipocalin-2 Protein Expression *in Vivo* and *in Vitro*. *J Biol Chem* 289:5960–5969. doi: 10.1074/jbc.M113.532234
 270. Naudé PJW, Nyakas C, Eiden LE, et al (2012) Lipocalin 2: Novel component of proinflammatory signaling in Alzheimer's disease. *FASEB J* 26:2811–2823. doi: 10.1096/fj.11-202457
 271. Cowland JB, Borregaard N (1997) Molecular characterization and pattern of tissue expression of the gene for neutrophil gelatinase-associated lipocalin from humans. *Genomics* 45:17–23. doi: 10.1006/geno.1997.4896
 272. Fritsche G, Nairz M, Libby SJ, et al (2012) Slc11a1 (Nramp1) impairs growth of *Salmonella enterica* serovar typhimurium in macrophages via stimulation of lipocalin-2 expression. *J Leukoc Biol* 92:353–359. doi: 10.1189/jlb.1111554
 273. Karlsen JR, Borregaard N, Cowland JB (2010) Induction of Neutrophil Gelatinase-associated Lipocalin Expression by Co-stimulation with Interleukin-17 and Tumor Necrosis Factor- Is Controlled by I B- but neither by C/EBP- nor C/EBP-. *J Biol Chem* 285:14088–14100. doi: 10.1074/jbc.M109.017129
 274. Li S-H, Hawthorne VS, Neal CL, et al (2009) Upregulation of Neutrophil Gelatinase-Associated Lipocalin by ErbB2 through Nuclear Factor- B Activation. *Cancer Res* 69:9163–9168. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-09-2483
 275. Mahadevan NR, Rodvold J, Almanza G, et al (2011) ER stress drives Lipocalin 2 upregulation in prostate cancer cells in an NF- κ B-dependent manner. *BMC Cancer* 11:229.
 276. Lin H-H, Liao C-J, Lee Y-C, et al (2011) Lipocalin-2-induced cytokine production enhances endometrial carcinoma cell survival and migration. *Int J Biol Sci* 7:74.
 277. Cheng L, Xing H, Mao X, et al (2015) Lipocalin-2 Promotes M1 Macrophages Polarization in a Mouse Cardiac Ischaemia-Reperfusion Injury Model. *Scand J Immunol* 81:31–38. doi: 10.1111/sji.12245
 278. Pitashny M, Schwartz N, Qing X, et al (2007) Urinary lipocalin-2 is associated with renal disease activity in human lupus nephritis. *Arthritis Rheum* 56:1894–1903. doi:

10.1002/art.22594

279. Shashidharamurthy R, Machiah D, Aitken JD, et al (2013) Differential Role of Lipocalin 2 During Immune Complex-Mediated Acute and Chronic Inflammation in Mice: Lipocalin 2 During Immune Complex-Mediated Inflammation. *Arthritis Rheum* 65:1064–1073. doi: 10.1002/art.37840
280. Mishra J (2003) Identification of Neutrophil Gelatinase-Associated Lipocalin as a Novel Early Urinary Biomarker for Ischemic Renal Injury. *J Am Soc Nephrol* 14:2534–2543. doi: 10.1097/01.ASN.0000088027.54400.C6
281. Schmidt-Ott KM, Mori K, Kalandadze A, et al (2006) Neutrophil gelatinase-associated lipocalin-mediated iron traffic in kidney epithelia. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 15:442–449.
282. Mishra J, Dent C, Tarabishi R, et al (2005) Neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL) as a biomarker for acute renal injury after cardiac surgery. *The Lancet* 365:1231–1238.
283. Bolignano D, Coppolino G, Lacquaniti A, et al (2008) Pathological and Prognostic Value of Urinary Neutrophil Gelatinase-Associated Lipocalin in Macroproteinuric Patients with Worsening Renal Function. *Kidney Blood Press Res* 31:274–279. doi: 10.1159/000151665
284. Ding H, He Y, Li K, et al (2007) Urinary neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL) is an early biomarker for renal tubulointerstitial injury in IgA nephropathy. *Clin Immunol* 123:227–234. doi: 10.1016/j.clim.2007.01.010
285. Paragas N, Qiu A, Zhang Q, et al (2011) The Ngal reporter mouse detects the response of the kidney to injury in real time. *Nat Med* 17:216–222. doi: 10.1038/nm.2290
286. Kanda J, Mori K, Kawabata H, et al (2015) An AKI biomarker lipocalin 2 in the blood derives from the kidney in renal injury but from neutrophils in normal and infected conditions. *Clin Exp Nephrol* 19:99–106. doi: 10.1007/s10157-014-0952-7
287. Mishra J (2004) Amelioration of Ischemic Acute Renal Injury by Neutrophil Gelatinase-Associated Lipocalin. *J Am Soc Nephrol* 15:3073–3082. doi: 10.1097/01.ASN.0000145013.44578.45
288. Pawar RD, Pitashny M, Gindea S, et al (2012) Neutrophil gelatinase-associated lipocalin is instrumental in the pathogenesis of antibody-mediated nephritis in mice. *Arthritis Rheum* 64:1620–1631. doi: 10.1002/art.33485
289. Viau A, El Karoui K, Laouari D, et al (2010) Lipocalin 2 is essential for chronic kidney disease progression in mice and humans. *J Clin Invest* 120:4065–4076. doi: 10.1172/JCI42004
290. Choi EK, Jung H, Kwak KH, et al (2017) Inhibition of Oxidative Stress in Renal Ischemia-Reperfusion Injury. *Anesth Analg* 124:204–213. doi: 10.1213/ANE.0000000000001565
291. Ferenbach DA, Kluth DC, Hughes J (2010) Hemeoxygenase-1 and Renal Ischaemia-Reperfusion Injury. *Nephron Exp Nephrol* 115:e33–e37. doi: 10.1159/000313828
292. Sponsel HT, Alfrey AC, Hammond WS, et al (1996) Effect of iron on renal tubular epithelial cells. *Kidney Int* 50:436–444. doi: 10.1038/ki.1996.334
293. Zager RA, Burkhart K (1997) Myoglobin toxicity in proximal human kidney cells: Roles of Fe, Ca²⁺, H₂O₂, and terminal mitochondrial electron transport. *Kidney Int* 51:728–738. doi: 10.1038/ki.1997.104
294. Bernardi RM, Constantino L, Machado RA, et al (2012) N-acetylcysteine and deferoxamine protects against acute renal failure induced by ischemia/reperfusion in rats. *Rev Bras Ter Intensiva* 24:219–223. doi: 10.1590/S0103-507X2012000300003
295. de Vries B, Walter SJ, von Bonsdorff L, et al (2004) Reduction of circulating redox-active iron by apotransferrin protects against renal ischemia-reperfusion injury.

Transplantation 77:669–675.

296. Ashraf MI, Schwelberger HG, Brendel KA, et al (2016) Exogenous Lipocalin 2 Ameliorates Acute Rejection in a Mouse Model of Renal Transplantation. *Am J Transplant Off J Am Soc Transplant Am Soc Transpl Surg* 16:808–820. doi: 10.1111/ajt.13521
297. Jung M, Sola A, Hughes J, et al (2012) Infusion of IL-10-expressing cells protects against renal ischemia through induction of lipocalin-2. *Kidney Int* 81:969–982.
298. Guiteras R, Sola A, Flaquer M, et al (2017) Macrophage Overexpressing NGAL Ameliorated Kidney Fibrosis in the UUO Mice Model. *Cell Physiol Biochem Int J Exp Cell Physiol Biochem Pharmacol* 42:1945–1960. doi: 10.1159/000479835
299. Wu Y, Su T, Yang L, et al (2010) Urinary neutrophil gelatinase-associated lipocalin: A potential biomarker for predicting rapid progression of drug-induced chronic tubulointerstitial nephritis. *Am J Med Sci* 339:537–542.
300. Nickolas TL, Forster CS, Sise ME, et al (2012) NGAL (Lcn2) monomer is associated with tubulointerstitial damage in chronic kidney disease. *Kidney Int* 82:718–722. doi: 10.1038/ki.2012.195
301. Zeng F, Singh AB, Harris RC (2009) The role of the EGF family of ligands and receptors in renal development, physiology and pathophysiology. *Exp Cell Res* 315:602–610. doi: 10.1016/j.yexcr.2008.08.005
302. Damman K, van Veldhuisen DJ, Navis G, et al (2008) Urinary neutrophil gelatinase associated lipocalin (NGAL), a marker of tubular damage, is increased in patients with chronic heart failure. *Eur J Heart Fail* 10:997–1000. doi: 10.1016/j.ejheart.2008.07.001
303. Shrestha K, Borowski AG, Troughton RW, et al (2012) Association Between Systemic Neutrophil Gelatinase-Associated Lipocalin and Anemia, Relative Hypochromia, and Inflammation in Chronic Systolic Heart Failure: NGAL and anemia in chronic heart failure. *Congest Heart Fail* 18:239–244. doi: 10.1111/j.1751-7133.2012.00287.x
304. Sahinarslan A, Kocaman SA, Bas D, et al (2011) Plasma neutrophil gelatinase-associated lipocalin levels in acute myocardial infarction and stable coronary artery disease. *Coron Artery Dis* 22:333–338. doi: 10.1097/MCA.0b013e3283472a71
305. Mortara A, Bonadies M, Mazzetti S, et al (2013) Neutrophil gelatinase-associated lipocalin predicts worsening of renal function in acute heart failure: methodological and clinical issues. *J Cardiovasc Med Hagerstown Md* 14:629–634. doi: 10.2459/JCM.0b013e3283629ca6
306. Bolignano D, Basile G, Parisi P, et al (2009) Increased plasma neutrophil gelatinase-associated lipocalin levels predict mortality in elderly patients with chronic heart failure. *Rejuvenation Res* 12:7–14. doi: 10.1089/rej.2008.0803
307. van Deursen VM, Damman K, Voors AA, et al (2014) Prognostic value of plasma neutrophil gelatinase-associated lipocalin for mortality in patients with heart failure. *Circ Heart Fail* 7:35–42.
308. Villacorta H, Martins Santos RA, Baco Marroig MA, et al (2015) Prognostic value of plasma neutrophil gelatinase-associated lipocalin in patients with heart failure. *Rev Port Cardiol Engl Ed* 34:473–478. doi: 10.1016/j.repce.2015.07.008
309. De Berardinis B, Gaggin HK, Magrini L, et al (2015) Comparison between admission natriuretic peptides, NGAL and sST2 testing for the prediction of worsening renal function in patients with acutely decompensated heart failure. *Clin Chem Lab Med* 53:613–621. doi: 10.1515/cclm-2014-0191
310. Hasegawa M, Ishii J, Kitagawa F, et al (2016) Plasma Neutrophil Gelatinase-Associated Lipocalin as a Predictor of Cardiovascular Events in Patients with Chronic Kidney Disease. *BioMed Res Int* 2016:1–7. doi: 10.1155/2016/8761475
311. Solak Y, Yilmaz MI, Siriopol D, et al (2015) Serum neutrophil gelatinase-associated lipocalin is associated with cardiovascular events in patients with chronic kidney disease. *Int*

Urol Nephrol 47:1993–2001. doi: 10.1007/s11255-015-1136-4

312. Daniels LB, Barrett-Connor E, Clopton P, et al (2012) Plasma Neutrophil Gelatinase–Associated Lipocalin Is Independently Associated With Cardiovascular Disease and Mortality in Community-Dwelling Older Adults. *J Am Coll Cardiol* 59:1101–1109. doi: 10.1016/j.jacc.2011.11.046

313. Katagiri M, Takahashi M, Doi K, et al (2015) Serum neutrophil gelatinase-associated lipocalin concentration reflects severity of coronary artery disease in patients without heart failure and chronic kidney disease. *Heart Vessels*. doi: 10.1007/s00380-015-0776-8

314. Wu G, Li H, Fang Q, et al (2014) Elevated circulating lipocalin-2 levels independently predict incident cardiovascular events in men in a population-based cohort. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 34:114–114.

315. Lindberg S, Jensen JS, Mogelvang R, et al (2014) Plasma Neutrophil Gelatinase-Associated Lipocalin in the General Population Association With Inflammation and Prognosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 34:2135–2142.

316. Eilenberg W, Stojkovic S, Kaider A, et al (2017) NGAL and MMP-9/NGAL as biomarkers of plaque vulnerability and targets of statins in patients with carotid atherosclerosis. *Clin Chem Lab Med CCLM*. doi: 10.1515/cclm-2017-0156

317. Yang B, Fan P, Xu A, et al (2012) 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.*

318. Folkesson M, Kazi M, Zhu C, et al (2007) Presence of NGAL/MMP-9 complexes in human abdominal aortic aneurysms. *Thromb Haemost*. doi: 10.1160/TH06-11-0638

319. Tarín C, Fernandez-Garcia CE, Burillo E, et al (2016) Lipocalin-2 deficiency or blockade protects against aortic abdominal aneurysm development in mice. *Cardiovasc Res* 111:262–273. doi: 10.1093/cvr/cvw112

320. Chan YK, Sung HK, Jahng JWS, et al (2016) Lipocalin-2 inhibits autophagy and induces insulin resistance in H9c2 cells. *Mol Cell Endocrinol* 430:68–76. doi: 10.1016/j.mce.2016.04.006

321. Sung HK, Chan YK, Han M, et al (2017) Lipocalin-2 (NGAL) Attenuates Autophagy to Exacerbate Cardiac Apoptosis Induced by Myocardial Ischemia: LIPOCALIN-2, AUTOPHAGY AND CELL DEATH. *J Cell Physiol*. doi: 10.1002/jcp.25672

322. Wang Y (2012) Small lipid-binding proteins in regulating endothelial and vascular functions: focusing on adipocyte fatty acid binding protein and lipocalin-2: Lipid chaperones in cardiovascular diseases. *Br J Pharmacol* 165:603–621. doi: 10.1111/j.1476-5381.2011.01528.x

323. Tarjus A, Martínez-Martínez E, Amador C, et al (2015) Neutrophil Gelatinase–Associated Lipocalin, a Novel Mineralocorticoid Biotarget, Mediates Vascular Profibrotic Effects of Mineralocorticoids. *Hypertension* 66:158–166.

324. Liu JT, Song E, Xu A, et al (2012) Lipocalin-2 deficiency prevents endothelial dysfunction associated with dietary obesity: role of cytochrome P450 2C inhibition: Lipocalin-2 and endothelial dysfunction. *Br J Pharmacol* 165:520–531. doi: 10.1111/j.1476-5381.2011.01587.x

325. Song E, Fan P, Huang B, et al (2014) Deamidated Lipocalin-2 Induces Endothelial Dysfunction and Hypertension in Dietary Obese Mice. *J Am Heart Assoc* 3:e000837–e000837. doi: 10.1161/JAHA.114.000837

326. Law IKM, Xu A, Lam KSL, et al (2010) Lipocalin-2 Deficiency Attenuates Insulin Resistance Associated With Aging and Obesity. *Diabetes* 59:872–882. doi: 10.2337/db09-1541

327. Jankowska EA, von Haehling S, Anker SD, et al (2013) Iron deficiency and heart failure: diagnostic dilemmas and therapeutic perspectives. *Eur Heart J* 34:816–829. doi:

10.1093/eurheartj/ehs224

328. Lapice E, Masulli M, Vaccaro O (2013) Iron Deficiency and Cardiovascular Disease: An Updated Review of the Evidence. *Curr Atheroscler Rep* 15:358. doi: 10.1007/s11883-013-0358-0
329. Xu G, Ahn J, Chang S, et al (2012) Lipocalin-2 induces cardiomyocyte apoptosis by increasing intracellular iron accumulation. *J Biol Chem* 287:4808–4817.
330. Wang Q, Domenighetti AA, Schafer SC, et al (2012) Impact of salt on cardiac differential gene expression and coronary lesion in normotensive mineralocorticoid-treated mice. *AJP Regul Integr Comp Physiol* 302:R1025–R1033. doi: 10.1152/ajpregu.00387.2011
331. Montecucco F, Liberale L, Bonaventura A, et al (2017) The Role of Inflammation in Cardiovascular Outcome. *Curr Atheroscler Rep*. doi: 10.1007/s11883-017-0646-1
332. Abella V, Scotece M, Conde J, et al (2015) The potential of lipocalin-2/NGAL as biomarker for inflammatory and metabolic diseases. *Biomarkers* 20:565–571. doi: 10.3109/1354750X.2015.1123354
333. Li C, Chan YR (2011) Lipocalin 2 regulation and its complex role in inflammation and cancer. *Cytokine* 56:435–441. doi: 10.1016/j.cyto.2011.07.021
334. Moschen AR, Adolph TE, Gerner RR, et al (2017) Lipocalin-2: A Master Mediator of Intestinal and Metabolic Inflammation. *Trends Endocrinol Metab*. doi: 10.1016/j.tem.2017.01.003
335. Sun Y, Weber KT (2005) Animal models of cardiac fibrosis. *Fibros Res Methods Protoc* 273–290.
336. Mahmud H, Candido WM, van Genne L, et al (2014) Cardiac Function and Architecture Are Maintained in a Model of Cardioresstricted Overexpression of the Prorenin-Renin Receptor. *PLoS ONE* 9:e89929. doi: 10.1371/journal.pone.0089929
337. Tang T, Lai NC, Wright AT, et al (2013) Adenylyl cyclase 6 deletion increases mortality during sustained β -adrenergic receptor stimulation. *J Mol Cell Cardiol* 60:60–67. doi: 10.1016/j.yjmcc.2013.04.005
338. Verma SK, Krishnamurthy P, Barefield D, et al (2012) IL 10 Treatment Attenuates Pressure Overload-Induced Hypertrophic Remodeling and Improves Heart Function via STAT3 Dependent Inhibition of NF κ B. *Circulation CIRCULATIONAHA*–112.
339. Vergaro G, Prud'homme M, Fazal L, et al (2016) Inhibition of Galectin-3 Pathway Prevents Isoproterenol-Induced Left Ventricular Dysfunction and Fibrosis in Mice Novelty and Significance. *Hypertension* 67:606–612.
340. Helanova K, Spinar J, Parenica J (2014) Diagnostic and Prognostic Utility of Neutrophil Gelatinase-Associated Lipocalin (NGAL) in Patients with Cardiovascular Diseases - Review. *Kidney Blood Press Res* 39:623–629. doi: 10.1159/000368474
341. Yang K, Luo C, Cheung BM, et al (2016) Lipocalin-2 Deficiency Protects against Aldosterone-Induced Hypertension and Organ Damages by Inhibiting Mineralocorticoid Receptor Signaling. *FASEB J* 30:942.6-942.6.
342. El Karoui K, Viau A, Dellis O, et al (2016) Endoplasmic reticulum stress drives proteinuria-induced kidney lesions via Lipocalin 2. *Nat Commun* 7:10330. doi: 10.1038/ncomms10330
343. Rubinstein T, Pitashny M, Putterman C (2008) The novel role of neutrophil gelatinase-B associated lipocalin (NGAL)/Lipocalin-2 as a biomarker for lupus nephritis. *Autoimmun Rev* 7:229–234. doi: 10.1016/j.autrev.2007.11.013
344. Fiebeler A, Schmidt F, Müller DN, et al (2001) Mineralocorticoid receptor affects AP-1 and nuclear factor- κ B activation in angiotensin II-induced cardiac injury. *Hypertension* 37:787–793.
345. Johar S (2006) Aldosterone mediates angiotensin II-induced interstitial cardiac fibrosis via a Nox2-containing NADPH oxidase. *FASEB J* 20:1546–1548. doi: 10.1096/fj.05-4642fje

346. Kawarazaki W, Nagase M, Yoshida S, et al (2012) Angiotensin II- and Salt-Induced Kidney Injury through Rac1-Mediated Mineralocorticoid Receptor Activation. *J Am Soc Nephrol* 23:997–1007. doi: 10.1681/ASN.2011070734
347. Zhao W (2006) ANG II-induced cardiac molecular and cellular events: role of aldosterone. *AJP Heart Circ Physiol* 291:H336–H343. doi: 10.1152/ajpheart.01307.2005
348. Mehta PK, Griendling KK (2006) Angiotensin II cell signaling: physiological and pathological effects in the cardiovascular system. *AJP Cell Physiol* 292:C82–C97. doi: 10.1152/ajpcell.00287.2006
349. Jaffe IZ (2005) Angiotensin II and Aldosterone Regulate Gene Transcription Via Functional Mineralocorticoid Receptors in Human Coronary Artery Smooth Muscle Cells. *Circ Res* 96:643–650. doi: 10.1161/01.RES.0000159937.05502.d1
350. Robert V, Heymes C, Silvestre J-S, et al (1999) Angiotensin AT1 Receptor Subtype as a Cardiac Target of Aldosterone : Role in Aldosterone-Salt–Induced Fibrosis. *Hypertension* 33:981–986. doi: 10.1161/01.HYP.33.4.981
351. González GE, Rhaleb N-E, D'Ambrosio MA, et al (2016) Cardiac-deleterious role of galectin-3 in chronic angiotensin II-induced hypertension. *Am J Physiol - Heart Circ Physiol* 311:H1287–H1296. doi: 10.1152/ajpheart.00096.2016
352. Suzuki Y, Ruiz-Ortega M, Lorenzo O, et al (2003) Inflammation and angiotensin II. *Int J Biochem Cell Biol* 35:881–900.
353. Cai J, Chen X, Chen X, et al (2017) Anti-Fibrosis Effect of Relaxin and Spironolactone Combined on Isoprenaline-Induced Myocardial Fibrosis in Rats via Inhibition of Endothelial–Mesenchymal Transition. *Cell Physiol Biochem* 41:1167–1178. doi: 10.1159/000464125
354. Gallego M, Espiña L, Vegas L, et al (2001) Spironolactone and captopril attenuates isoproterenol-induced cardiac remodelling in rats. *Pharmacol Res* 44:311–315. doi: 10.1006/phrs.2001.0865
355. Hori Y, Yoshioka K, Kanai K, et al (2011) Spironolactone decreases isoproterenol-induced ventricular fibrosis and matrix metalloproteinase-2 in rats. *Biol Pharm Bull* 34:61–65.
356. Martín-Fernández B, de las Heras N, Miana M, et al (2012) Spironolactone prevents alterations associated with cardiac hypertrophy produced by isoproterenol in rats: involvement of serum- and glucocorticoid-regulated kinase type 1: Isoproterenol-induced cardiac alterations. *Exp Physiol* 97:710–718. doi: 10.1113/expphysiol.2011.063230
357. Reddy NM, Mahajan UB, Patil CR, et al (2015) Eplerenone attenuates cardiac dysfunction and oxidative stress in β -receptor stimulated myocardial infarcted rats. *Am J Transl Res* 7:1602.
358. Victorio JA, Clerici SP, Palacios R, et al (2016) Spironolactone Prevents Endothelial Nitric Oxide Synthase Uncoupling and Vascular Dysfunction Induced by β -Adrenergic Overstimulation: Role of Perivascular Adipose Tissue. *Hypertens Dallas Tex* 1979 68:726–735. doi: 10.1161/HYPERTENSIONAHA.116.07911
359. Zhou H, Xi D, Liu J, et al (2016) Spirolactone provides protection from renal fibrosis by inhibiting the endothelial–mesenchymal transition in isoprenaline-induced heart failure in rats. *Drug Des Devel Ther* 1581. doi: 10.2147/DDDT.S100095
360. Christ M, Wehling M, Kirsch E, et al (2005) Enhancement of β -adrenergic cAMP-signaling by the mineralocorticoid receptor. *Mol Cell Endocrinol* 231:23–31. doi: 10.1016/j.mce.2004.12.004
361. Helanova K, Littnerova S, Kubena P, et al (2015) Prognostic impact of neutrophil gelatinase-associated lipocalin and B-type natriuretic in patients with ST-elevation myocardial infarction treated by primary PCI: a prospective observational cohort study. *BMJ Open* 5:e006872.

362. Lindberg S, Pedersen SH, Mogelvang R, et al (2012) Prognostic Utility of Neutrophil Gelatinase-Associated Lipocalin in Predicting Mortality and Cardiovascular Events in Patients With ST-Segment Elevation Myocardial Infarction Treated With Primary Percutaneous Coronary Intervention. *J Am Coll Cardiol* 60:339–345. doi: 10.1016/j.jacc.2012.04.017
363. Singer E, Markó L, Paragas N, et al (2013) Neutrophil gelatinase-associated lipocalin: pathophysiology and clinical applications. *Acta Physiol* 207:663–672. doi: 10.1111/apha.12054
364. Choi KM, Lee JS, Kim EJ, et al (2008) Implication of lipocalin-2 and visfatin levels in patients with coronary heart disease. *Eur J Endocrinol* 158:203–207. doi: 10.1530/EJE-07-0633
365. Zografos T, Haliassos A, Korovesis S, et al (2009) Association of neutrophil gelatinase-associated lipocalin with the severity of coronary artery disease. *Am J Cardiol* 104:917–920. doi: 10.1016/j.amjcard.2009.05.023
366. Janicki JS, Brower GL (2002) The role of myocardial fibrillar collagen in ventricular remodeling and function. *J Card Fail* 8:S319–S325. doi: 10.1054/jcaf.2002.129260
367. Pfeffer MA, Braunwald E (1990) Ventricular remodeling after myocardial infarction. Experimental observations and clinical implications. *Circulation* 81:1161–1172.
368. Woodiwiss AJ, Tsotetsi OJ, Sprott S, et al (2001) Reduction in myocardial collagen cross-linking parallels left ventricular dilatation in rat models of systolic chamber dysfunction. *Circulation* 103:155–160.
369. Lee S, Kim J-H, Kim J-H, et al (2011) Lipocalin-2 Is a Chemokine Inducer in the Central Nervous System: ROLE OF CHEMOKINE LIGAND 10 (CXCL10) IN LIPOCALIN-2-INDUCED CELL MIGRATION. *J Biol Chem* 286:43855–43870. doi: 10.1074/jbc.M111.299248
370. Wang H-H, Wu M-M, Chan MWY, et al (2014) Long-term low-dose exposure of human urothelial cells to sodium arsenite activates lipocalin-2 via promoter hypomethylation. *Arch Toxicol* 88:1549–1559. doi: 10.1007/s00204-014-1214-x
371. Sickinger S, Maier H, König S, et al (2013) Lipocalin-2 as mediator of chemokine expression and granulocyte infiltration during ischemia and reperfusion. *Transpl Int* 26:761–769. doi: 10.1111/tri.12116
372. Cai L, Rubin J, Han W, et al (2010) The origin of multiple molecular forms in urine of HNL/NGAL. *Clin J Am Soc Nephrol* 5:2229–2235.
373. Chan YK, Sung HK, Sweeney G (2015) Iron metabolism and regulation by neutrophil gelatinase-associated lipocalin in cardiomyopathy. *Clin Sci* 129:851–862. doi: 10.1042/CS20150075
374. Murray PJ, Wynn TA (2011) Protective and pathogenic functions of macrophage subsets. *Nat Rev Immunol* 11:723–737. doi: 10.1038/nri3073
375. Benoit M, Desnues B, Mege J-L (2008) Macrophage Polarization in Bacterial Infections. *J Immunol* 181:3733–3739. doi: 10.4049/jimmunol.181.6.3733
376. Italiani P, Boraschi D (2014) From Monocytes to M1/M2 Macrophages: Phenotypical vs. Functional Differentiation. *Front Immunol*. doi: 10.3389/fimmu.2014.00514
377. Vinh A, Chen W, Blinder Y, et al (2010) Inhibition and Genetic Ablation of the B7/CD28 T-Cell Costimulation Axis Prevents Experimental Hypertension. *Circulation* 122:2529–2537. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.109.930446
378. Wang X, Zhang G, Jiang X, et al (2014) Neutrophil to lymphocyte ratio in relation to risk of all-cause mortality and cardiovascular events among patients undergoing angiography or cardiac revascularization: A meta-analysis of observational studies. *Atherosclerosis* 234:206–213. doi: 10.1016/j.atherosclerosis.2014.03.003
379. DiGangi C (2016) Neutrophil-lymphocyte ratio: Predicting cardiovascular and renal

- complications in patients with diabetes: Neutrophil-lymphocyte ratio. *J Am Assoc Nurse Pract* 28:410–414. doi: 10.1002/2327-6924.12366
380. Gilet A, Zou F, Boumenir M, et al (2015) Aldosterone up-regulates MMP-9 and MMP-9/NGAL expression in human neutrophils through p38, ERK1/2 and PI3K pathways. *Exp Cell Res* 331:152–163. doi: 10.1016/j.yexcr.2014.11.004
381. Kamat NV, Thabet SR, Xiao L, et al (2015) Renal Transporter Activation During Angiotensin-II Hypertension is Blunted in Interferon- γ ^{-/-} and Interleukin-17A^{-/-} Mice Novelty and Significance. *Hypertension* 65:569–576. doi: 10.1161/HYPERTENSIONAHA.114.04975
382. Norlander AE, Saleh MA, Kamat NV, et al (2016) Interleukin-17A Regulates Renal Sodium Transporters and Renal Injury in Angiotensin II-Induced Hypertension Novelty and Significance. *Hypertension* 68:167–174. doi: 10.1161/HYPERTENSIONAHA.116.07493
383. Ong K-L, Tso AWK, Cherny SS, et al (2011) Role of Genetic Variants in the Gene Encoding Lipocalin-2 in the Development of Elevated Blood Pressure. *Clin Exp Hypertens* 33:484–491. doi: 10.3109/10641963.2010.549276
384. Park CG, Choi KM (2014) Lipocalin-2, A-FABP and inflammatory markers in relation to flow-mediated vasodilatation in patients with essential hypertension. *Clin Exp Hypertens* 36:478–483. doi: 10.3109/10641963.2013.863320
385. Cuspidi C, Ciulla M, Zanchetti A (2006) Hypertensive myocardial fibrosis. *Nephrol Dial Transplant* 21:20–23. doi: 10.1093/ndt/gfi237
386. BOFFA J, CHATZIANTONIOU C, DUSSAULE J (2004) Progression et régression de la fibrose rénale. *Actual Néphrologiques Jean Hambg* 67–78.
387. Brilla CG, Matsubara LS, Weber KT (1993) Anti-aldosterone treatment and the prevention of myocardial fibrosis in primary and secondary hyperaldosteronism. *J Mol Cell Cardiol* 25:563–575. doi: 10.1006/jmcc.1993.1066
388. Nakamura T, Mizuno S (2010) The discovery of Hepatocyte Growth Factor (HGF) and its significance for cell biology, life sciences and clinical medicine. *Proc Jpn Acad Ser B* 86:588–610. doi: 10.2183/pjab.86.588
389. Fan D, Takawale A, Lee J, Kassiri Z (2012) Cardiac fibroblasts, fibrosis and extracellular matrix remodeling in heart disease. *Fibrogenesis Tissue Repair* 5:15.
390. Lawrence T (2009) The Nuclear Factor NF- κ B Pathway in Inflammation. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 1:a001651–a001651. doi: 10.1101/cshperspect.a001651
391. van der Heiden K, Cuhlmann S, Luong LA, et al (2010) Role of nuclear factor κ B in cardiovascular health and disease. *Clin Sci* 118:593–605. doi: 10.1042/CS20090557
392. Mebratu Y, Tesfaigzi Y (2009) How ERK1/2 activation controls cell proliferation and cell death: Is subcellular localization the answer? *Cell Cycle* 8:1168–1175.
393. Ko SH, Jung J, Kim Y-J, et al (2013) *Bacteroides fragilis* enterotoxin upregulates lipocalin-2 expression in intestinal epithelial cells. *Lab Invest* 93:384.
394. Zhang (2011) Increased expression of neutrophil gelatinase-associated lipocalin receptor by interleukin-1 β in human mesangial cells via MAPK/ERK activation. *Int J Mol Med*. doi: 10.3892/ijmm.2011.613
395. Ding G, Fang J, Tong S, et al (2015) Over-expression of lipocalin 2 promotes cell migration and invasion through activating ERK signaling to increase SLUG expression in prostate cancer: LCN2/ERK/SLUG Axis Promotes PCa Aggression. *The Prostate* 75:957–968. doi: 10.1002/pros.22978

Rôle de la Neutrophil Gelatinase-Associated Lipocalin dans les effets cardiovasculaires et rénaux de l'activation du récepteur minéralocorticoïde

L'activation du récepteur minéralocorticoïde par l'aldostérone joue un rôle majeur dans le remodelage cardiovasculaire en participant à l'hypertension, à la fibrose et à l'inflammation. Notre laboratoire a récemment mis en évidence le rôle critique de la Neutrophil Gelatinase-Associated Lipocalin (NGAL), une nouvelle cible du MR, dans les effets délétères de son activation. Afin de mieux comprendre le rôle de NGAL dans ces effets, nous avons réalisé différents modèles profibrotiques chez des souris présentant une invalidation génique totale de NGAL ou une déplétion de NGAL dans leurs cellules immunitaires spécifiquement. Nos résultats démontrent un rôle primordial de la NGAL produite par les cellules immunitaires dans les lésions cardio-rénales induite par l'activation du MR. De plus, nos données suggèrent que le contexte inflammatoire pourrait être un élément déterminant de l'implication physiopathologique de NGAL.

Mot Clés : MR, NGAL, inflammation, fibrose, hypertension, cardiovasculaire, rein.

Role of the Neutrophil Gelatinase-Associated Lipocalin in the cardiovascular and renal effects of mineralocorticoid receptor activation

Mineralocorticoid receptor (MR) activation by aldosterone plays a major role in cardiovascular remodeling by participating in hypertension, fibrosis and inflammation. Our group has recently evidenced a critical implication of the Neutrophil Gelatinase-Associated Lipocalin (NGAL), a new target of the MR, in the deleterious effects of its activation. In order to better understand the role of NGAL in these effects, we carried out several models of fibrosis in mice presenting a genetic invalidation for NGAL or in mice lacking NGAL in their immune cells specifically. Our results demonstrate that NGAL produced by immune cells plays a pivotal role in MR mediated cardiac and renal damage. Furthermore, our data suggest that inflammatory context could represent a key factor in the pathophysiological implications of NGAL.

Keywords: MR, NGAL, inflammation, fibrosis, hypertension, cardiovascular, kidney.