Physiopathologie du récepteur de type 2 à l'angiotensine II (AT2R) dans le développement du diabète et de ses conséquences cardiovasculaires

Marc-Antoine Begorre

▶ **To cite this version:**

Marc-Antoine Begorre. Physiopathologie du récepteur de type 2 à l'angiotensine II (AT2R) dans le développement du diabète et de ses conséquences cardiovasculaires. Pharmacologie. Université d'Angers, 2013. Français. NNT : . tel-01024122

HAL Id: tel-01024122
https://theses.hal.science/tel-01024122

Submitted on 15 Jul 2014

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

l'université nantes angers le mans
PÔLE DE RECHERCHE ET D'ENSEIGNEMENT SUPÉRIEUR

université angers

Thèse de Doctorat

Marc-Antoine BEGORRE

Mémoire présenté en vue de l'obtention du
grade de Docteur de l'Université d'Angers
sous le label de L'Université Nantes Angers Le Mans

École doctorale : *Biologie Santé*

Discipline : *66*

Unité de recherche : *Laboratoire de Biologie Neurovasculaire et Mitochondriale intégrée (BNMI) – UMR CNRS 6214 INSERM U1083 – Faculté de Médecine, 49045 ANGERS CEDEX*

Soutenue le *09/12/2013*
Thèse N° : *1381*

Physopathologie du récepteur de type 2 à l'angiotensine II (AT2R) dans le développement du diabète et de ses conséquences cardiovasculaires

JURY

Présidente :	**Dr Françoise LENFANT, Directrice de recherche,** INSERM U1048- I2MC, Toulouse
Rapporteurs :	**Dr Chantal BOULANGER**, Directrice de recherche, INSERM UMR970, Paris **Dr Bertrand BLONDEAU**, Maître de conférences, INSERM U872, Université de Paris VI, Paris
Examinateurs :	**Dr Soazig LE LAY**, Chargée de recherche, INSERM U1063, Angers
Membre du jury :	**Dr Céline FASSOT,** Chargée de recherche, UMR CNRS 6214 – INSERM U1083, Angers
Directeur de Thèse :	**Dr Daniel HERION, Directeur de recherche,** UMR CNRS 6214 – INSERM U1083, Angers

UNIVERSITE D'ANGERS **Année 2013**

N° d'ordre **

RÔLE DU RECEPTEUR DE TYPE 2 (AT2R) DE L'ANGIOTENSINE II DANS LES COMPLICATIONS VASCULAIRES INDUITES PAR LE DIABETE

THÈSE DE DOCTORAT

Spécialité : **Physiologie et physiopharmacologie**

École doctorale **"Biologie santé" - ED 502**

Présentée et soutenue publiquement

Le **********

À **Angers**

Par **Marc-Antoine BEGORRE**

Devant le jury ci-dessous:

Directeur de thèse: **Dr Daniel HENRION**, Université d'Angers

Laboratoire de biologie neurovasculaire et mitochondriale intégrée

UMR CNRS 6214 INSERM 1083

Faculté de médecine

Rue haute de reculée

49045 Angers

Remerciements

Aux Dr Chantal Boulanger et Bertrand Blondeau pour votre lecture et commentaires sur ce manuscrit, ainsi qu'à l'ensemble du jury pour votre présence et vos observations sur ce travail ;

A Daniel, pour votre accueil au sein du laboratoire, votre confiance durant ces trois années et tout le travail d'accompagnement que vous avez réalisé pendant cette thèse. J'ai beaucoup appris auprès de vous, sur la culture scientifique et générale et garderai un très bon souvenir de notre travail ensemble ;

A Céline, tes conseils ont été précieux, les moments passés ensemble encore plus. Il va maintenant falloir m'habituer à être « formaté » comme toi, ce qui ne devrait pas être bien difficile. Nos rendez-vous gastronomiques, musicaux et sportifs ont encore de beaux jours devant eux et je m'en réjouis ;

A tous les membres du laboratoire et toutes les personnes qui m'ont apporté leur aide technique et leur soutien pendant cette thèse. Je remercie en particulier mes collègues de myographe et d'artériographe dont les oreilles auront enduré bien des supplices au fil du temps. Mais je rappellerai que vous avez souvent été complices (en particulier Gilles) ; je vous laisse mes souris, produits pharmacos et autres, vous les utiliserez en mémoire de moi (je voudrais bien mettre la référence bibliographique de cette phrase, mais elle ne cesse de m'échapper, surement publiée dans un journal peu connu) ;

Aux stagiaires avec qui j'ai eu le plaisir de travailler, et à mes collègues doctorants. Une pensée spéciale pour mes co-équipiers Geoffrey et Antoine, tous les militaires et les chanteurs morts qui nous regardent ;

Aux membres de ce bureau un peu bruyant selon des sources proches du dossier, et surtout complètement pec (pour les amoureux du Béarn !). Nous aurons passé de très bons moments dans cette pièce, je vous souhaite de continuer même sans moi (et la responsabilité ne sera alors plus attribuée) ;

A tous mes partenaires non officiels durant ces trois ans : les sandwicheries, restaurants, boulangeries, fast-food, sites d'organisation de planning et consorts… cette thèse n'aurait pas été pareille sans eux ;

A ma famille et amis, pour votre soutien sans faille durant ces trois années. Les moments que nous avons passés ensemble entre Angers, Bordeaux, les montagnes et la mer m'ont beaucoup apporté ;

A tous mes collègues handballeurs, tennismen, footballeurs. Que serait une thèse sans sport ? Je suis heureux de ne pas avoir eu à le découvrir. Merci pour les bons moments sur les terrains et en dehors ;

A Marie, je t'ai promis de faire mieux que pour ma thèse d'exercice dans ces remerciements, j'ajouterai donc trois ans de bonheur et un certain 22 septembre.

Table des matières

Table des matières

Remerciements 2

Table des matières 3

Table des figures 3

Liste des abréviations 7

Sommaire des figures et tableaux 9

Introduction 11

Structure et fonction du système vasculaire 13

1. La circulation sanguine 13
2. Le vaisseau sanguin 14
   - 2.1. L'intima 15
     - 2.1.1. Les facteurs vasorelaxants dérivés de l'endothélium 15
       - a) Le monoxyde d'azote (NO) 15
       - b) Les dérivés prostanoïdes vasorelaxants : la prostacycline (PGI_2) 18
       - c) L'EDHF, endothelium-derived hyperpolarizing factor 20
     - 2.1.2. Les facteurs vasoconstricteurs dérivés de l'endothélium 21
       - a) L'endothéline (ET-1) 21
       - b) Les espèces réactives dérivées de l'oxygène (EROs, ou ROS) 21
       - c) Les prostanoïdes vasoconstricteurs 22
   - 2.2. La média 23
     - A. Le système rénine-angiotensine régulateur du tonus vasculaire 24
       - a) Synthèse de l'angiotensine II et ses principaux récepteurs 24
       - b) L'autre effecteur du SRA : l'aldostérone 27
       - c) SRA et pathologies cardiovasculaires 28
   - 2.3. L'adventice 28

Physiopathologie du système vasculaire 28

1. L'influence du genre au niveau du système cardiovasculaire 28
2. Le remodelage vasculaire 30

2.1. Les différents types de remodelage 30
2.2. Le remodelage dans le diabète 33
3. La dysfonction endothéliale 33
4. Le cas du diabète 35
4.1. Physiopathologie des diabètes de type 1 et 2 35
4.2. Complications cardiovasculaires liées au diabète 37
4.3. SRA et Diabète 37
5. Objectifs de thèse 38
Matériels et méthodes 39
1. Induction du diabète 40
1.1. Diabète de type 1 40
1.2. Diabète de type 2 40
2. Etudes *in vivo* 40
2.1. Cages à métabolisme 40
2.2. Tests de glycémie forcée et de tolérance à l'insuline 40
3. Prélèvements et devenir des tissus 40
3.1. Devenir des artères 41
3.2. Analyses pancréatiques 41
4. Etudes de réactivité vasculaire 41
5. Analyses moléculaires 42
6. Histologie 43
6.1. Préparation des échantillons pour inclusion 43
6.2. Coupes 43
6.3. Traitement des coupes 44
6.3.1. Histomorphologie 44
6.3.2. Marquage des ROS 44
6.3.3. Traitement d'images 44
7. Analyses statistiques 44
Résultats 46
1. Article 48

1.1. Manuscrit soumis pour publication 48
1.2. Données complémentaires 68
1.2.1. Expression génique de la eNOS chez les souris WT et AT2R$^{-/-}$ 68
1.2.2. Réactivité sur aortes 68
1.2.3. Immunohistochimie 68
1.3. Conclusions 69
2. Etude parallèle réalisée chez les souris femelles 69
2.1. Etudes chez les souris femelles WT 69
2.1.1. Réactivité des artères mésentériques 69
2.1.2. Réactivité des aortes 70
2.1.3. Expression des gènes des voies de relaxation impliquées 71
2.2. Etudes chez les souris femelles AT2R$^{-/-}$ 71
2.2.1. Réactivité des artères mésentériques 71
2.2.2. Réactivité des aortes 72
2.2.3. Expression des gènes des voies de relaxation impliquées 73
2.3. Histologie 73
2.4. Conclusions 74
3. Rôle d'AT2R dans le métabolisme et l'induction du diabète 75
3.1. Caractéristiques générales des souches FVB/N et AT2R$^{-/-}$ 75
3.1.1. Poids et glycémie à jeun des souris 75
3.1.2. Comportement alimentaire et métabolisme 75
3.1.3. Test de glycémie forcée 76
3.1.4. Test de tolérance à l'insuline 76
3.1. Contenus pancréatiques en insuline 77
3.2. Induction et développement du diabète de type 1 77
3.3. Induction et développement du diabète de type 2 79
3.3.1. Comportement alimentaire 79
3.3.2. Induction et développement du diabète 79
3.4. Conclusions 81
Discussion 82

1. AT2R protecteur dans l'induction et le développement du diabète 84
2. Mais AT2R vasoconstricteur lorsque le diabète est établi 86
3. AT2R et NO dans le diabète.....87
4. AT2R participe au remodelage constrictif induit par le diabète. 88
5. AT2R dans les complications du diabète de type 2 89
Conclusions 91
Bibliographie 93

Liste des abréviations

AA : Acide arachidonique

AC : Adénylate-cyclase

ACh : Acétylcholine

AGEs : « *advanced glycation end products* » ou produits de glycation avancés

AMPc : Adénosine monophosphate cyclique

Ang I : Angiotensine I

Ang II : Angiotensine II

APA : Aminopeptidase A

APN : Aminopeptidase N

AT1R : Récepteur de type 1 à l'angiotensine II

AT2R : Récepteur de type 2 à l'angiotensine II

ATP : Adénosine triphosphate

BH_4 : 5,6,7,8-tétrahydrobioptérine

BK_{Ca} : canaux potassiques de grande conductance dépendants du calcium

cGKI : isoformes de protéines kinases G

CE(s) : Cellule(s) endothéliale(s)

CML(s) : Cellule(s) musculaire(s) lisse(s)

CO : Monoxide de carbone

CO_2 : Dioxide de carbone

COX : cycloxygénase

E2 : 17β-oestradiol

ECA : Enzyme de conversion de l'angiotensine

ECE : Enzyme de conversion de l'endothéline

EDHF : Factor hyperpolarisant dérivé de l'endothélium

EDRF : Facteur relaxant dérivé de l'endothélium

EETs : Acides epoxyeicosatriénoïques

EGF : « *epidermal growth factor* »

eNOS : NO synthase endothéliale

ET-1 : Endothéline-1

GCs : Guanylate-cyclase soluble

GMPc : Guanosine monophosphate cyclique

GTP : Guanosine triphosphate

HNO^- : anions nitroxyles

HOX : Hème-oxygénase

HTA : Hypertension artérielle

HTAP : Hypertension artérielle pulmonaire

IGF : « *insulin-like growth factor* »

iNOS : NO synthase inductible

ICAM : Molécule d'adhésion des cellules inflammatoires

IP_3 : inositol triphosphate

IP_3R : Récepteur à l'IP_3

IRAG : substrat de la cGKI associé au récepteur à l'IP_3

LOX : Lipoxygénase

MLC : Chaînes légères de la myosine

MLCK : Kinase des chaînes légères de la myosine

MLCP : Phosphatase des chaînes légères de la myosine

MBS : Sous-unité de liaison de la myosine

nNOS : NO synthase neuronale

NO : Monoxide d'azote

NOS : NO synthaseO_2 : Dioxygène

NOX : NADPH oxydase

$O_2^{\cdot-}$: Anions superoxyde

$ONOO^-$: anions peroxynitrites

PGI_2 : Prostacycline

PKA : Protéine kinase A

PLC : phospholipase C

RCPG : Récepteur couplé aux protéines G

RGS : Régulateur de signalisation par les protéines G

SK_{Ca} : Canaux potassiques de basse conductance dépendants du calcium

SOD : Superoxyde dismutase

SRA : Système rénine-angiotensine

TGF-β : « *Transforming growth factor-β* »

TXA2 : Thromboxane-A_2

VCAM : Molécule d'adhésion des cellules vasculaires

VEGF : « *Vascular endothelial growth factor* »

Sommaire des figures et tableaux

Figure 1 : Systèmes vasculaires sanguin et lymphatique. 13
Figure 2 : Histologie du vaisseau sanguin.. 14
Figure 3 : Mécanismes de régulation de l'activité de la eNOS. 16
Figure 4 : structures de la eNOS à l'état couplé et découplé 16
Figure 5 : Mécanisme d'action du guanosine monophosphate cyclique dans la cellule musculaire lisse. ..17
Figure 6 : Voie de métabolisme de l'acide arachidonique et de synthèse des prostanoïdes 19
Figure 7 : Relaxation de la cellule musculaire lisse (CML) par la prostacycline (PGI2). 19
Figure 8 : Origines des facteurs hyperpolarisants dérivés de l'endothélium 20
Figure 9 : Synthèse et dégradation des ROS. 22
Figure 10 : Facteurs vasoconstricteurs dérivés de l'endothélium. 23
Figure 11 : Vue d'ensemble simplifiée du système rénine-angiotensine. 25
Figure 12 : Signalisation intracellulaire du récepteur AT1R. 26
Figure 13 : Voies de signalisation intracellulaire du récepteur AT2R. 27
Figure 14 : Action des œstrogènes sur l'endothélium. 29
Figure 15 : Effets des œstrogènes au niveau des CMLs. 30
Figure 16 : Différents types de remodelage artériel 31
Figure 17 : Facteurs participant au remodelage artériel sous l'action du récepteur de type 1 (AT1-R) à l'angiotensine II (AII). 32
Figure 18 : Action de l'hème-oxygénase et synthèse du monoxyde de carbone (CO). 34
Figure 19 : Différentes phases du diabète de type 1 36
Figure 20 : Illustration des paramètres histologiques mesurés sur artères mésentériques pressurisées ..44
Figure 21 : Niveaux d'expression de la eNOS chez les souris WT (WT) et AT2R$^{-/-}$ (AT2R$^{-/-}$). 68
Figure 22 : Marquage des ROS au DCFDA sur coupe d'artère mésentérique non fixée. 69
Figure 23 : Relaxation endothélium-dépendante chez les souris WT femelles. 70
Figure 24 : Courbes de contraction à la phényléphrine (Phe), et de relaxation au nitroprussiate de sodium (SNP) chez les souris WT femelles. 70
Figure 25 : Niveaux d'expression des gènes codant pour AT1R (Agtr1a), AT2R (Agtr2), eNOS (NOS 3), COX-1 et COX-2, la SOD (MnSOD), et les sous-unités NADPH-oxidase (p22phox, p67phox et Gp91) chez les souris WT femelles. 71
Figure 26 : Relaxation endothélium dépendante chez les souris AT2R$^{-/-}$ femelles. 72
Figure 27 : Courbes de contraction à la phényléphrine (Phe), et de relaxation au nitroprussiate de sodium (SNP) chez les souris AT2R$^{-/-}$ femelles. 72
Figure 28 : Niveaux d'expression des gènes codant pour AT1R (Agtr1a), AT2R (Agtr2), COX-1 et COX-2, les sous-unités NADPH-oxidase (p22phox, p67phox et Gp91), et la SOD (MnSOD) chez les souris AT2R$^{-/-}$ femelles. 73
Figure 29 : Données histomorphologiques des souris femelles. 74
Figure 30 : Comportement alimentaire et excrétoire des souris mâles et femelles WT et AT2R$^{-/-}$. 76

Figure 31 : Test de tolérance au glucose. 76
Figure 32 : Test de tolérance à l'insuline.....77
Figure 33 : Contenu en insuline pancréatique.....77
Figure 34 : Induction du diabète.....78
Figure 35 : Glycémies mesurées à J1, J5, J10 et J45 après l'injection de streptozotocine. 78
Figure 36 : Perte de poids chez les souris diabétiques. 79
Figure 37 : Consommation en aliment et en eau des souris soumises au régime enrichi en graisses. 79
Figure 38 : Pourcentages d'induction du diabète chez les souris mâles alimentées par un régime enrichi en graisses. 80
Figure 39 : Prise de poids et glycémies mesurées chez les souris mâles WT et $AT2R^{-/-}$ alimentés par un régime enrichi en graisses. 80

Introduction

Le système rénine-angiotensine est un régulateur majeur de l'homéostasie cellulaire. Son action se fait principalement par l'action de l'angiotensine sur ses deux récepteurs : le récepteur de type 1 (AT1R) et le récepteur de type 2 (AT2R).

Au niveau vasculaire, les effets du récepteur AT1R ont été étudiés de façon assez complète depuis ces trente dernières années : il entraîne une production d'espèces réactives dérivées de l'oxygène, une dysfonction endothéliale, conduisant à l'établissement progressif d'une hypertension artérielle. De son côté, le récepteur AT2R a été décrit comme ayant des effets qui s'opposent à AT1R. Sa signalisation implique l'action de monoxyde d'azote qui est un facteur vasculo-protecteur majeur. Cependant, il a déjà été décrit qu'AT2R induit une vasoconstriction chez des rats hypertendus ou en vieillissement. Egalement, il a été montré chez des rats diabétiques obèses (ZDF) que la relaxation AT2R-dépendante était réduite par la production de ROS et de dérivés prostanoïdes.

Au niveau pancréatique, des études ont montré la présence de tous les composants du système rénine-angiotensine. Ces études ont montré qu'un traitement par de l'angiotensine en présence d'un antagoniste du récepteur AT1R induit une prolifération des cellules β pancréatiques ainsi qu'une production accrue d'insuline. Ces effets ont été retrouvés plus récemment : le développement des cellules β et la synthèse d'insuline ont été diminués en bloquant AT2. Ces différentes études ont prouvé l'intérêt de l'étude du récepteur AT2R dans le contexte du diabète.

Au cours de cette thèse, nous avons donc cherché à déterminer le rôle d'AT2R dans un modèle de diabète de type 1 dans un premier temps (injection de streptozotocine, drogue cytotoxique pour les cellules β du pancréas) puis dans un modèle de diabète de type 2 (alimentation par un régime enrichi en graisses). Pour cela, nous avons utilisé deux souches de souris : un groupe de souris WT, et un groupe de souris pour lequel le gène codant pour AT2R a été invalidé ($AT2R^{-/-}$). D'autre part, étant donné que le profil d'expression d'AT2R est différent selon le genre, nous avons effectué ces études aussi bien chez des souris mâles que des souris femelles.

Les résultats obtenus durant cette thèse montrent pour la première fois un rôle d'AT2R dans le développement du diabète et de ses principales complications cardiovasculaires : dysfonction endothéliale et remodelage vasculaire. Nous montrons également des différences dues au genre dans les résultats obtenus.

Ces résultats ouvrent de nouvelles perspectives, notamment dans la prise en charge du patient diabétique.

Structure et fonction du système vasculaire

1. La circulation sanguine

Le maintien de l'alimentation des organes et donc de leur bon fonctionnement se fait par l'apport de nutriments et d'oxygène (O_2), et par l'acheminement des catabolites et du dioxyde de carbone (CO_2) vers leurs lieux d'excrétion (reins, poumons). Ce sont les systèmes vasculaires sanguin et lymphatique qui assurent ces deux fonctions.

Le cœur, véritable moteur du système cardiovasculaire, envoie vers les poumons via les artères pulmonaires un sang pauvre en dioxygène (O_2) et riche en dioxyde de carbone (CO_2) qui revient des organes par le système veineux. Le sang chargé en O_2 retourne au cœur par les veines pulmonaires. Ce circuit s'appelle la circulation pulmonaire ou « petite circulation » en opposition avec la circulation systémique ou « grande circulation ». Le rôle de celle-ci est d'acheminer ce sang riche en O_2 et en nutriments aux organes via le système artériel et ses principales branches : les artères carotides qui irriguent le cerveau, les artères coronaires qui irriguent le cœur, et l'aorte qui irrigue les organes périphériques. Au niveau des organes, les échanges sont réalisés au niveau du système capillaire, le sang s'appauvrit au niveau des artérioles, et se charge en catabolites au niveau des veinules. Le système lymphatique reverse alors dans la circulation veineuse la lymphe, liquide contenant les excédents en protéines, lipides ou cellules immunitaires (figure 1).

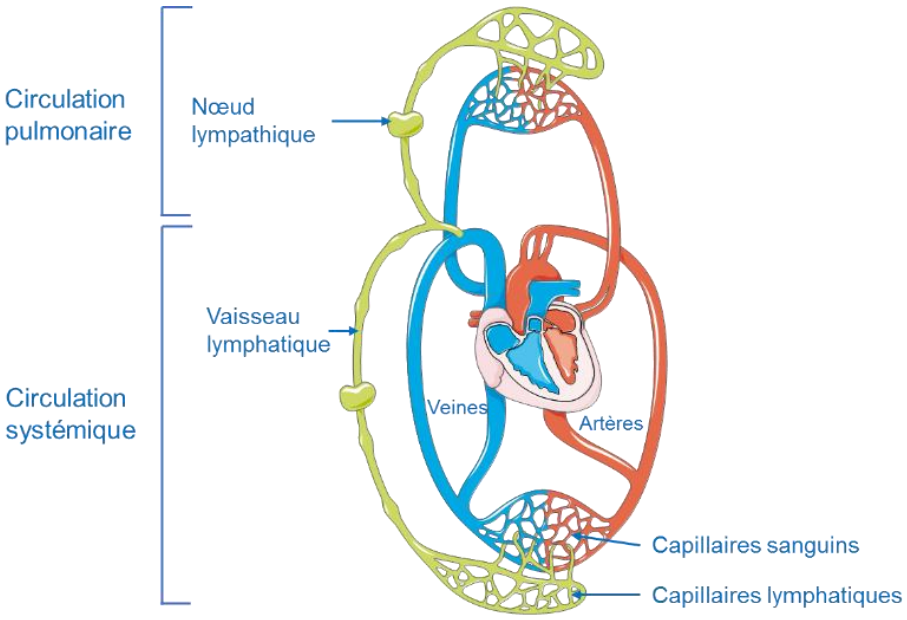

Figure 1 : Systèmes vasculaires sanguin et lymphatique (modifié d'après banque d'images SERVIER).

Ce système artériel est aussi bien au centre de nombreuses pathologies cardiovasculaires (hypertension artérielle (HTA), athérosclérose, ischémie), qu'une cible secondaire dans d'autres pathologies à fort impact cardiovasculaire (diabètes, cancers). D'après les dernières statistiques de l'OMS (2008), ces pathologies sont selon les dernières statistiques de l'OMS (2008) la première cause de décès dans le monde avec 17,3 millions de morts (soit 30% de la mortalité mondiale).

2. Le vaisseau sanguin

L'histologie des vaisseaux sanguins diffère selon leur taille. Ainsi, les plus petits capillaires sont constitués uniquement d'un lit de cellules endothéliales (CEs) directement au contact du sang et d'une membrane basale qui les recouvre (figure 2). Dans les vaisseaux plus gros, de type artère ou veine, ce lit endothélial est associé à différentes couches successives appelées tuniques. Ensemble ils forment la paroi vasculaire. Au niveau artériel, on retrouve tout d'abord la tunique la plus interne appelée intima qui est composée d'une monocouche de cellules endothéliales. Viennent ensuite la tunique moyenne ou media qui est formée par une multicouche de cellules musculaires lisses (CMLs) puis la tunique la plus externe : l'adventice composée notamment d'élastine et de collagène. Chaque tunique est séparée de la suivante par une lame élastique : « interne » entre l'intima et la média et « externe » entre la média et l'adventice. (Dolosi, 2010) figure 2).

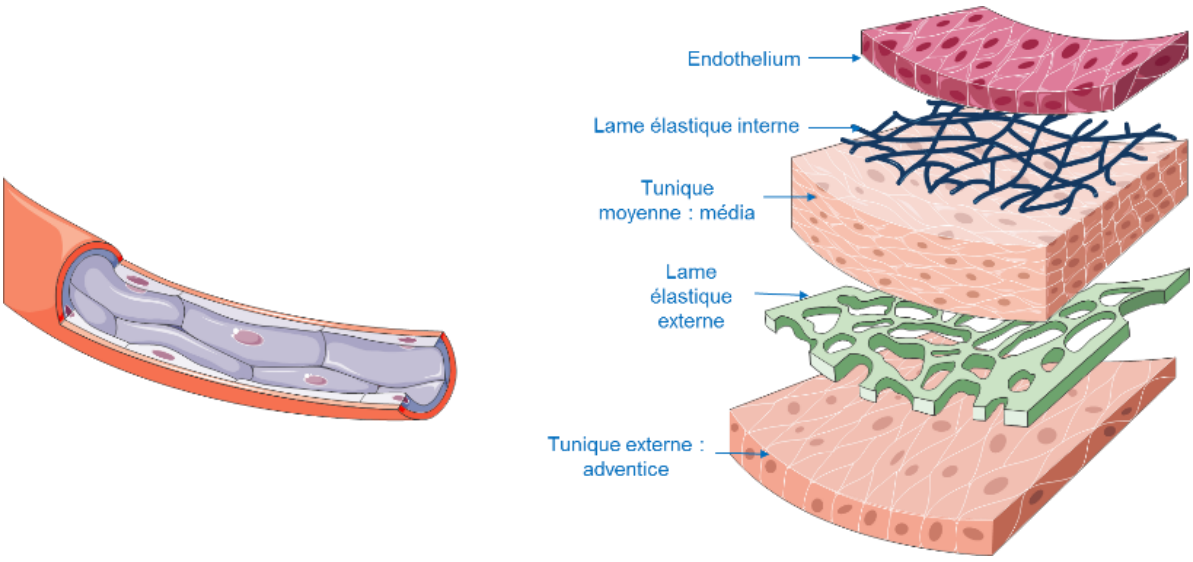

Figure 2 : Histologie du vaisseau sanguin. A gauche, un capillaire, à droit une artère (modifié d'après banque d'images Servier).

Les artères sont classées en différentes catégories suivant leur taille et leur composition: les artères élastiques de très gros calibre dites de compliance comme l'aorte, très riches en fibres élastiques et présentant une forte élasticité associée de faibles résistances afin d'amortir la pulsatilité sanguine à la sortie du cœur ; les artères beaucoup plus petites dites de résistance comme les artères mésentériques ou

les artérioles rénales beaucoup plus riches en CMLs et présentant des résistances plus élevées afin de réguler le flux sanguin au niveau local.

2.1. L'intima

L'intima, composée de l'endothélium, est la tunique la plus interne du vaisseau, directement en contact avec le sang. Cela lui donne deux propriétés principales : une grande dépendance aux facteurs circulants, et une grande influence sur l'intégrité et le comportement du vaisseau en réponse à ces facteurs.
L'endothélium est constitué d'une monocouche de cellules endothéliales, longues d'environ 100 µm sur 10 µm de largeur et 0.5 µm d'épaisseur (Clark and Glagov, 1976). A sa découverte, l'endothélium a d'abord été considéré comme une barrière physiologique entre le sang et les tissus. La découverte du rôle prépondérant d'un facteur relaxant dérivé de l'endothélium (ou EDRF) (Furchgott and Zawadzki, 1980) a abouti à de multiples études plus approfondies sur le rôle de cette tunique. En parallèle, il a été montré que des dérivés de nitroglycérine induisaient la libération d'un gaz vasorelaxant : le NO (Katsuki et al., 1977). Quelques années plus tard, il a été démontré que ce gaz était en fait l'EDRF décrit plus tôt (Gruetter et al., 1980). Grâce à ces études sur l'endothélium, cette tunique est connue aujourd'hui pour avoir un rôle majeur dans la régulation de l'homéostasie par la libération de facteurs vasoactifs ou de cytokines.
D'autre part, l'endothélium est au centre de l'activité vasomotrice des CMLs de la média par la libération de nombreux facteurs vasorelaxants ou vasoconstricteurs selon le récepteur stimulé au niveau de la cellule endothéliale. Un grand nombre de ces facteurs peuvent être libérés sous l'action des contraintes imposées par le débit sanguin ou forces de cisaillement (« shear stress »). Celles-ci entraînent une réponse très majoritairement vasorelaxante.

2.1.1. Les facteurs vasorelaxants dérivés de l'endothélium

La vasorelaxation induite par l'endothélium fait intervenir trois principaux facteurs : le NO, la prostacycline (PGI_2), et l'EDHF (endothelium-derived hyperpolirazing factor).

a) Le monoxyde d'azote (NO)

Le NO est depuis les années 1980 considéré comme le facteur vasorelaxant et vasculoprotecteur majeur de l'organisme. Celui-ci est synthétisé par la NO-Synthase (NOS) qui existe sous trois isoformes. La NOS-1 ou nNOS (NOS neuronale) se trouve principalement au niveau du système nerveux, la NOS-2 ou iNOS est l'isoforme inductible rencontrée dans les macrophages et autres cellules immunitaires de type inflammatoires, et enfin la NOS-3 ou eNOS (NOS endothéliale) rencontrée au niveau des cellules endothéliales vasculaires principalement.
Au niveau de l'endothélium, divers stimuli sont capables d'activer la libération des stocks de calcium du réticulum endoplasmique. Son couplage avec la calmoduline active la eNOS. Elle synthétise alors du NO à partir des stocks de L-arginine cytoplasmiques et la L-citrulline formée repart dans le cycle de l'urée. L'activité de la eNOS est régulée par de nombreux stimuli mécaniques ou chimiques (figure 3 (Flammer and Luscher, 2010)).

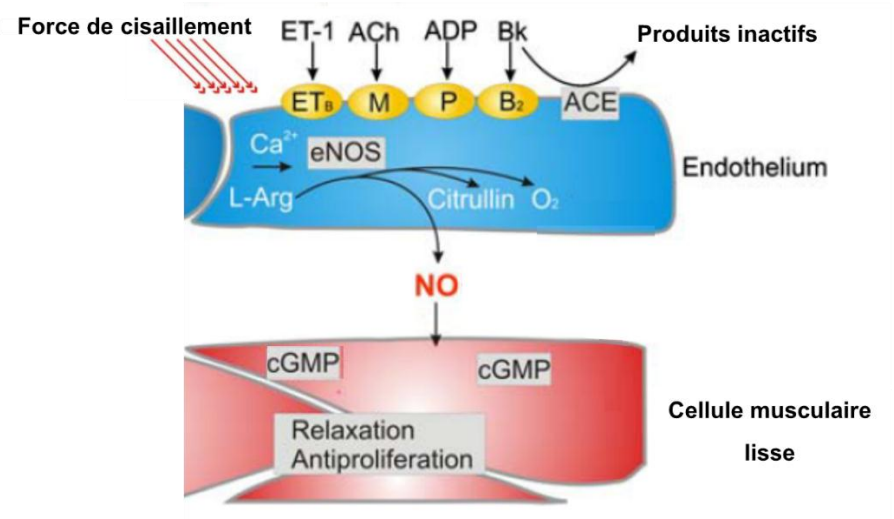

Figure 3 : Mécanismes de régulation de l'activité de la eNOS. Les récepteurs de type B (ETB) à l'endothéline (ET-1), muscariniques 3 (M) à l'acétylcholine (ACh), purinergiques (P) à l'adénosin0e diphosphate (ADP) ou B2 à la bradykinine (Bk) peuvent stimuler l'activité de la eNOS. Les forces de cisaillement (shear stress) peuvent également stimuler de façon mécanique l'activité de l'enzyme (Modifié d'après Flammer and Luscher, 2010).

Cette régulation se fait sous le contrôle de plusieurs cofacteurs (molécules régulant l'activité d'une enzyme par modification de la conformation de leur site allostérique par exemple) essentiels de la NOS : la 5,6,7,8-tétrahydrobioptérine (BH_4), et la cavéoline-1.

Le rôle de la BH_4 est d'assurer le bon transfert d'électrons depuis le NADPH vers le site de fixation de la L-arginine qui donnera le NO et la L-citrulline. En conditions de manque de BH_4, le site de fixation n'est plus disponible pour la L-Arginine, le surplus d'électrons est capté par de l'O_2 qui deviendra un anion superoxyde $O_2^{-\cdot}$ (figure 4 (Schmidt and Alp, 2007). On parle alors de découplage de la NOS.

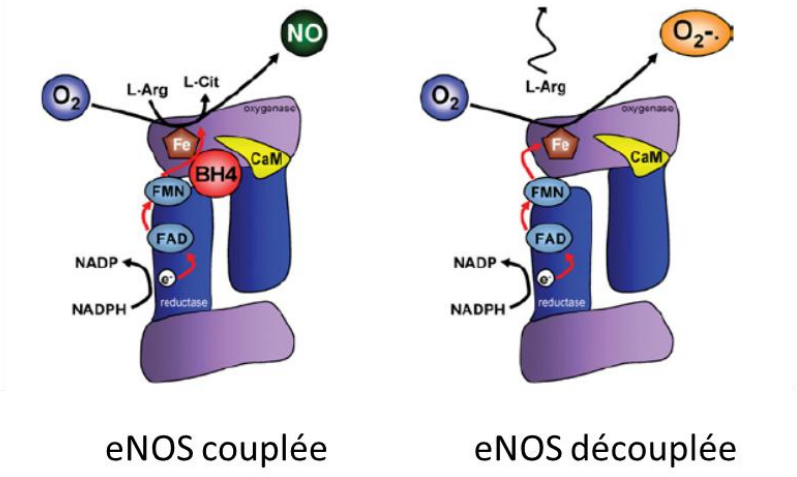

Figure 4 : structures de la eNOS à l'état couplé et découplé (Schmidt and Alp, 2007)

La cavéoline-1, quant à elle, est une enzyme (agent facilitateur d'une réaction do nnée et qui est régénérée à la fin de ladite réaction) qui régule de façon négative la synthèse de NO. Sa liaison sur les domaines de phosphorylation de la eNOS permet de diminuer son activité. Il a été montré qu'un déficit en cavéoline-1 peut entraîner des dysfonctions endothéliales par excès d'activité de la eNOS menant à une hypertension artérielle pulmonaire (HTAP, (Zhao et al., 2009).

Le NO synthétisé par la eNOS diffuse à travers la membrane de la cellule endothéliale pour aller se fixer au niveau de la CML sur la guanylate-cylase soluble (GCs) (Hofmann, 2005)). Le mécanisme de relaxation de la CML résulte simultanément d'une baisse de concentration intracellulaire en calcium et d'une désensibilisation de l'appareil contractile de la cellule au calcium (figure 5).

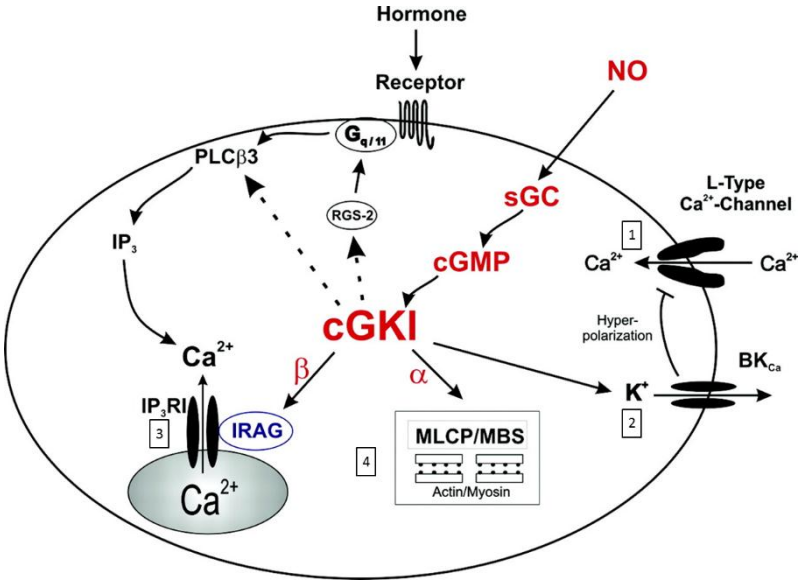

Figure 5 : Mécanisme d'action du guanosine monophosphate cyclique dans la cellule musculaire lisse. Le guanosine monophosphate cyclique (cGMP) induit la relaxation de la cellule en induisant une diminution de concentration en calcium cytosolique et en diminuant la sensibilité de l'appareil contractile au calcium. (1) Diminution de l'influx calcique via les canaux calciques de type L. (2) Le cGMP peut aussi induire l'hyperpolarisation de la cellule par l'activation des canaux potassique dépendants du calcium (BK_{Ca}), ou (3) par inhibition du relargage du calcium du réticulum via les récepteurs à l'IP3 (inositol triphosphate). (4) Le cGMP diminue la sensibilité de l'appareil contractile au Calcium probablement par une activation de phosphate des chaînes légères de la myosine. Modifié d'après (Hofmann, 2005)

Cette voie de relaxation est impliquée dans de nombreux processus pathologiques par sa dérégulation, surtout par son inhibition ou le découplage de la eNOS comme dans le diabète, l'hypertension artérielle systémique ou pulmonaire, ainsi que dans l'hypercholestérolémie (Schmidt and Alp, 2007). Le NO possède un fort impact sur la régulation de processus de prolifération cellulaire, d'agrégation plaquettaire, d'adhésion des leucocytes (Tomasian et al., 2000), ce qui le place comme l'un des principaux, si ce n'est le principal, facteurs vasculoprotecteurs.

b) Les dérivés prostanoïdes vasorelaxants : la prostacycline (PGI_2)

Certaines des plus importantes molécules vasoactives appelées prostanoïdes dérivent du métabolisme de l'acide arachidonique (AA). Cet acide gras polyinsaturé à vingt atomes de carbone subit plusieurs métabolisations successives pour former trois familles différentes de composés : les leucotriènes qui ont un rôle principalement inflammatoire, les thromboxanes que l'on retrouve dans l'agrégation plaquettaire et dont le principal agent, le thromboxane A2 (TXA_2) est un agent vasoconstricteur important, et enfin les prostaglandines qui sont plus hétérogènes, avec des agents vasoconstricteurs (PGE_2, $PGF_{2\text{-alpha}}$) mais également un facteur vasorelaxant puissant la prostacycline (PGI_2). Les enzymes prépondérantes de ce métabolisme sont les cyclooxygénases (COX), avec deux isoformes : COX-1 et COX-2.

Ces deux isoformes se distinguent par des modifications de leurs sites actifs impliquant leurs différences physiologiques. La séparation COX-1/COX-2 s'est opérée au début des années 1990, au moment où la COX-1 a été décrite comme étant l'isoforme constitutive et la COX-2 l'isoforme inductible sous l'influence de facteurs pro-inflammatoires comme le « *tumor necrosis factor* α » (TNFα) et l'interleukine-1 (IL-1). Au niveau cellulaire on les retrouve toutes deux au niveau du réticulum endoplasmique et au niveau de l'enveloppe nucléaire où COX-2 est plus fortement présent. Enfin, leur stimulation par l'acide arachidonique se révèle également concentration dépendante, avec une meilleur affinité pour COX-2 pour des concentrations inférieures à 2,5 µmol/L (Morita, 2002).

La première étape de cette cascade métabolique est la formation d'AA par la phospholipase A_2 (PLA_2). La régulation post-transcriptionnelle de cette enzyme se fait par l'action de différents facteurs comme les cytokines pro-inflammatoires ou des facteurs de croissance (Alberghina, 2010). L'AA a alors trois voies métaboliques possibles : celle des COX, celle des lipoxygénases (LOX) ou celle du cytochrome P450. La synthèse de la PGI_2 et du TXA_2, prostanoïdes sur lesquels se concentrera mon travail de thèse, se fait à partir de PGH_2 par l'action de la PGI_2 synthase ou de la thromboxane synthase (figure 6 d'après (Bogatcheva et al., 2005)).

Pendant longtemps, la synthèse de la prostacycline a été attribuée uniquement à COX-1, plusieurs études ont plus récemment prouvé que COX-2 participe également à la synthèse de la PGI2 en conditions physiologiques et pathologiques (Morita, 2002). Il a même été très récemment suggéré qu'en cas de large excès, la PGI2 pourrait se fixer sur le récepteur TP du TXA2 pour induire une vasoconstriction (Liu et al., 2013).

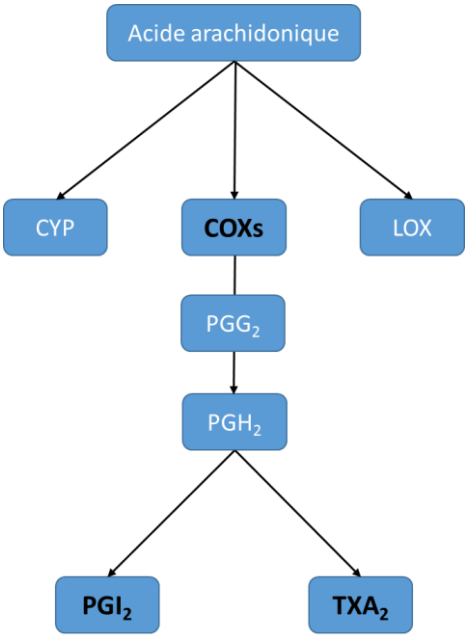

Figure 6 : Voie de métabolisme de l'acide arachidonique et de synthèse des prostanoïdes d'après Bogatcheva et al, 2005. L'acide arachidonique est métabolisé par les cycloxygénases (COX) en PGH2. La prostacycline synthase oriente la PGH2 vers la prostacycline PGI2, la thromboxane synthase vers le thromboxane A2 (TXA2).

Au niveau de la CML, la PGI_2 se fixe sur son récepteur IP qui va activer la voie de l'AMPc via l'adénylate cyclase, induisant sa relaxation par activation de la protéine kinase AMPc dépendante (PKA). Cela entraîne une phosphorylation des chaînes légères de la myosine (MLC) et donc la relaxation de la cellule (figure 7 d'après (Landry Y., 2009)).

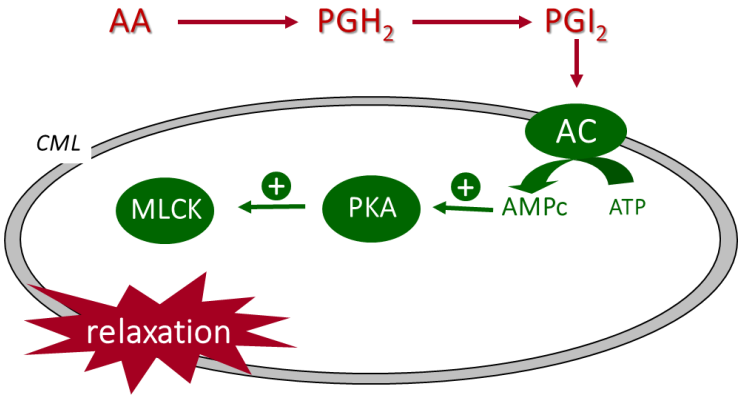

Figure 7 : Relaxation de la cellule musculaire lisse (CML) par la prostacycline (PGI2). La PGH_2 qui résulte de la dégradation de l'acide arachidonique (AA) est métabolisée en PGI_2 par la prostacycline synthase. La fixation de la PGI_2 sur l'adénylate cyclase (AC) entraîne la cyclisation de l'adénosine triphosphate (ATP) en adénosine monophosphate cyclique (AMPc). L'AMPc active la protéine kinase A (PKA) qui induit l'activité de la kinase des chaînes légères de la myosine (MLCK).

c) L'EDHF, endothelium-derived hyperpolarizing factor

Dès les années 1970, il a été mis en évidence que la stimulation d'artères mésentériques par l'acétylcholine (ACh) pouvait induire soit une hyperpolarisation des CMLs (Kitamura and Kuriyama, 1979). Après les études de Furchgott et Zawadski, il est devenu évident que l'hyperpolarisation observée ne pouvait être associée au NO et qu'il existait donc un facteur hyperpolarisant dérivé de l'endothélium (EDHF).

Plus tard, il a été démontré que l'action de l'EDHF pouvait être inhibée par un mélange d'apamine et de charybdotoxine (bloqueurs des canaux potassiques sensibles au calcium, à faible ou haute conductance SK_{Ca} et BK_{Ca}). Au niveau du vaisseau, il est finalement supposé que la stimulation des cellules endothéliales entraine la libération d'un ensemble de facteurs hyperpolarisants plutôt qu'un unique EDHF. Ces facteurs hyperpolarisants sont capables d'activer les canaux potassiques et provoquer l'hyperpolarisation de la cellule musculaire lisse (figure 8 (Edwards et al., 2010).

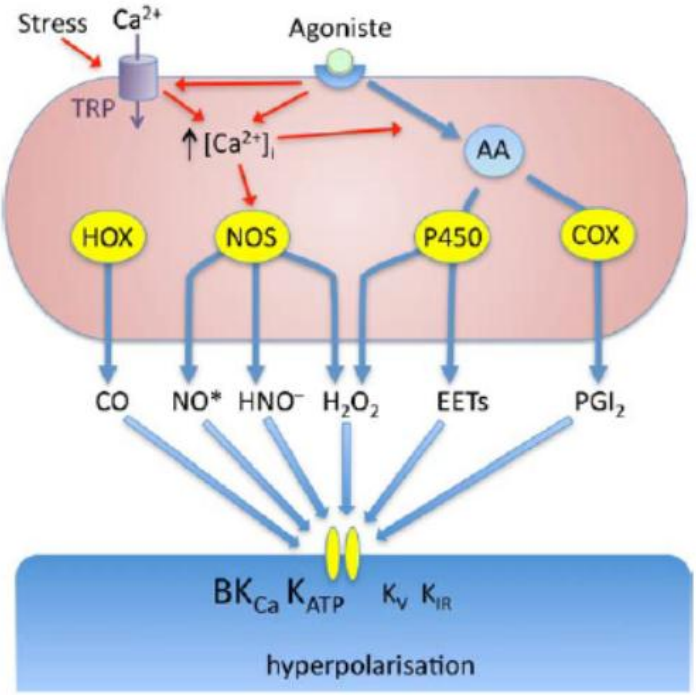

Figure 8 : Origines des facteurs hyperpolarisants dérivés de l'endothélium qui activent les canaux BK_{Ca} ou K_{ATP}. L'augmentation de calcium (Ca2+) intracellulaire ou l'activation du métabolisme de l'AA entraînent la libération de NO, d'anions nitroxyles HNO^-, d'acides epoxyeicosatriénoïques (EETs) et de PGI_2. Le monoxyde de carbone (CO) synthétisé par l'hème-oxygénase (HOX) peut donner des effets similaires. D'après (Edwards et al., 2010)

L'importance de la voie de signalisation de l'EDHF augmente lorsque la taille des vaisseaux diminue : son impact sera donc plus faible au niveau de vaisseaux comme l'aorte et une plus forte influence dans les artères de résistance (Edwards et al., 2010).

2.1.2. Les facteurs vasoconstricteurs dérivés de l'endothélium

a) L'endothéline (ET-1)

L'endothéline est un peptide de 21 acides aminés qui existe sous trois isoformes, ET-1, ET-2 et ET-3. Cependant, seule l'ET-1 est reconnue à l'heure actuelle pour ses effets biologiques. Au niveau cardiovasculaire, c'est l'un des plus puissants vasoconstricteurs endogènes et elle possède également une action inotrope positive (augmentation de la force de contraction cardiaque).

La synthèse de l'endothéline se fait dans plusieurs types cellulaires, notamment au niveau endothélial. La pro-endothéline (ou « big endothelin ») est clivée en endothéline-1 sous l'action de l'enzyme de conversion de l'endothéline (ECE) (figure 10 (Virdis et al., 2010).

L'endothéline-1 agit sur la CML via les récepteurs ETA entraînant une vasoconstriction, et sur les cellules endothéliales via les récepteurs ETB avec stimulation de la eNOS (voir paragraphe 2.1.1). Les effets de l'endothéline-1 résultent donc de la balance entre sa fixation sur ces deux récepteurs. Il faut toutefois se souvenir ici que cette balance penche fortement en faveur d'une activité vasoconstrictrice et pro-inflammatoire. Ceci explique le rôle d'ET-1 dans de nombreuses pathologies cardiovasculaires où notamment sa synthèse peut être majorée par l'action de l'Ang II (Virdis et al., 2010). A l'inverse, des donneurs de NO, notamment inhalés, peuvent diminuer la synthèse d'ET-1 (Wagner et al., 2004).

b) Les espèces réactives dérivées de l'oxygène (EROs, ou ROS)

Les espèces réactives dérivées de l'oxygène (ROS) sont des espèces radicalaires issues des diverses étapes du métabolisme de l'O_2. Ils possèdent un rôle prépondérant de régulation de l'intégrité cardiaque et vasculaire en condition physiologique, mais sont en excès dans des pathologies comme l'HTA, le diabète ou l'athérosclérose (Touyz and Schiffrin, 2004).

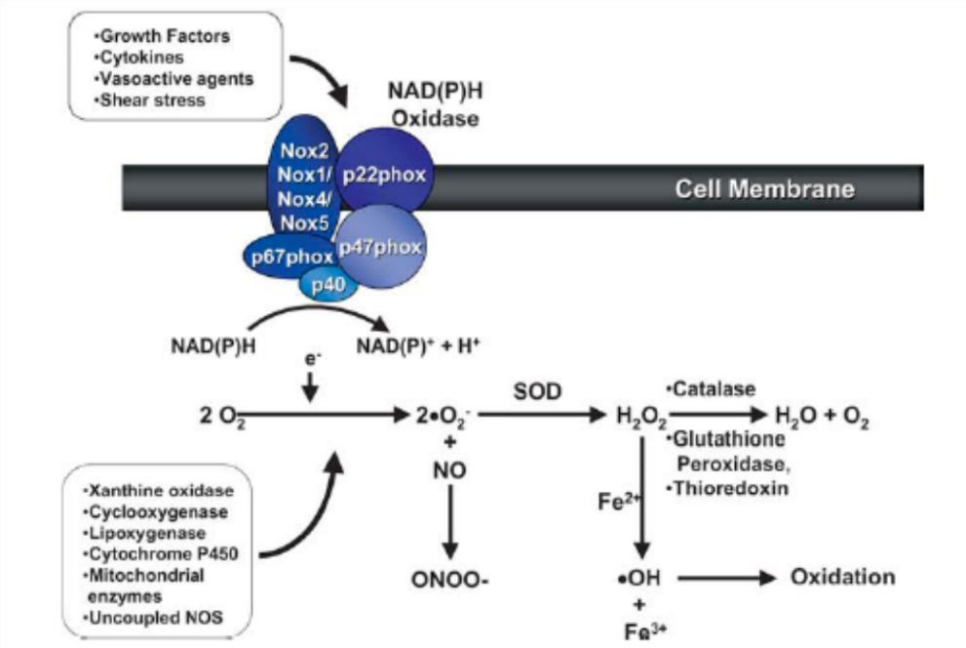

Figure 9 : Synthèse et dégradation des ROS. La NADPH Oxydase peut être activée par divers facteurs de croissance, cytokines, agents vasoactifs ou le shear stress. D'après (Touyz and Schiffrin, 2004)

Les principaux ROS rencontrés sont l'anion superoxyde O_2^-, le peroxyde d'hydrogène H_2O_2, le radical hydroxyle $HO^·$,les peroxynitrites $ONOO^-$. Le NO, bien qu'étant une espèce radicalaire, n'est pas inclus dans la famille des ROS. La production de ROS se fait principalement sous l'action de trois enzymes : la NADPH oxydases (Nox), la eNOS lorsqu'elle est découplée et la iNOS en forte conditions inflammatoires. Les ROS sont dégradés par la superoxyde dismutase (SOD) qui métabolise les anions superoxydes en peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) ,qui est métabolisé en H_2O et O_2 par la catalase (figure 9 (Touyz and Schiffrin, 2004). Leur effet principalement vasoconstricteur (car H_2O_2 possède un effet vasodilatateur à faible dose) et pro-inflammatoire s'explique au niveau cellulaire par leur interaction avec le NO, imposant une baisse de la biodisponibilité de celui-ci (avec formation de $ONOO^-$).

Malgré leur importance en condition pathologique, les ROS restent des agents indispensables au maintien de l'intégrité vasculaire car ils activent deux mécanismes protecteurs : ils font partie des EDHF (voir paragraphes précédents) mais ils activent également la voie du monoxyde de carbone (CO) via la diminution du rapport gluthation/gluthation oxydé (GSH/GSSG) (Li et al., 2003).

c) Les prostanoïdes vasoconstricteurs

Comme décrit plus tôt, parmi les prostanoïdes, certains possèdent des effets vasoconstricteurs comme le TXA_2. Les récepteurs au TXA_2 (TP) sont des récepteurs couplés aux protéines G orientés vers la vasoconstriction, l'adhésion cellulaire, l'agrégation plaquettaire et l'inflammation. De nombreuses pathologies impliquent un déséquilibre de la balance PGI2/TXA2 en faveur de ce dernier, comme dans le diabète (Retailleau et al., 2010) ou dans l'HTA (Jiang et al., 2007).

D'autres facteurs peuvent également participer à la vasoconstriction (figure 10 (Virdis et al., 2010)).

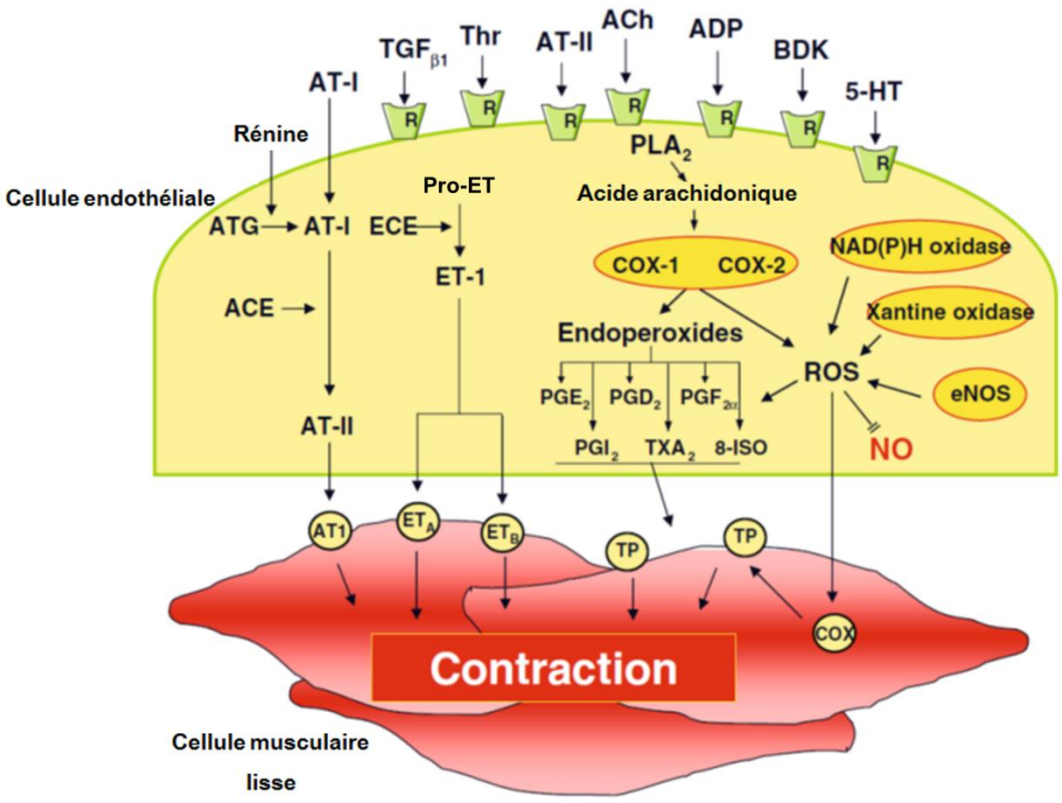

Figure 10 : Facteurs vasoconstricteurs dérivés de l'endothélium. ATG : angiotensinogène ; ACE : enzyme de conversion de l'angiotensine ; AT-I : angiotensine I ; AT-II : angiotensine II ; AT1 : récepteur de type 1 à l'angiotensine II ; Thr : Thrombine ; Pro-ET : proendothéline ; ECE : enzyme de conversion de l'endothéline ; ET-1 : endothéline-1 ; ETA, ETB : récepteurs de type A et B à l'endothéline-1 ; ACh : Acétylcholine ; PLA2 : Phopholipase A2 ; ADP : Adénosine diphosphate; BDK : bradykinine ; 5-HT : sérotonine ; COX-1, COX-2 : cycloxygénases 1 et 2 ; ROS : espèces réactives dérivées de l'oxygène ; NO : monoxyde d'azote ; eNOS : NO Synthase endothéliale ; PGI2 : Prostacycline ; TXA2 : Thromboxane A2 ; 8-ISO : 8-isoprostane ; TP : récepteur TP aux prostanoïdes. D'après (Virdis et al., 2010)

2.2. La média

La media est la couche la plus épaisse du vaisseau. Elle est délimitée par deux lames élastiques, les limitantes élastiques interne et externe. Elle est constituée de cellules musculaires lisses de forme allongée d'environ 35 µm de long et 5 µm de diamètre formant des couches successives, entourées par une matrice extracellulaire dense composée principalement de fibres élastiques et de collagène .

La structure de cette couche dépend du territoire vasculaire et du type de vaisseau. Ainsi, les artères élastiques, type aorte ou carotides, seront constituées de plusieurs lames élastiques entre lesquelles se situent les CMLs. Plus le diamètre du vaisseau est grand, plus il y aura de lames successives. Le terme de structure lamellaire est utilisé pour définir l'association des CMLs et des lames élastiques. Par contre, dans des artères de diamètre plus petit comme les artères de résistance (artères mésentériques, rénales par exemple), les fibres élastiques sont en proportion plus faible par rapport aux CMLs. La media est composée

des limitantes élastiques interne et externe et de quelques lamelles élastiques entre les différentes couches de CMLs (Clark and Glagov, 1985).

La contractilité de la CML est régulée plus principalement par la concentration intracellulaire en calcium (Ca^{2+}). Celui-ci peut provenir du milieu extracellulaire via les canaux ioniques et pompes d'efflux mais également des stocks présents dans la cellule surtout au niveau du réticulum. Cette régulation est assurée par divers médiateurs.

Si les facteurs dérivés de l'endothélium sont majoritairement vasodilatateurs, ceux libérés par les CMLs sont très majoritairement vasoconstricteurs (le NO fait exception lorsqu'il est synthétisé au niveau de la CML par la iNOS). Il est classique qu'un même médiateur entraîne une vasodilatation s'il se fixe sur ses récepteurs endothéliaux et une vasoconstriction s'il se fixe au niveau des cellules musculaires lisses. C'est le cas de l'endothéline-1, dont les récepteurs ETB induisent une vasorelaxation au niveau de l'endothélium, mais une vasoconstriction au niveau de la CML (Virdis et al., 2010).

A. Le système rénine-angiotensine régulateur du tonus vasculaire

Parmi les médiateurs agissant principalement au niveau de la média, nous nous intéresserons plus principalement au système rénine-angiotensine (SRA).

Le SRA est l'un des systèmes régulateurs de l'homéostasie cellulaire et du tonus vasculaire les plus importants de l'organisme. Dans ce dernier secteur, il agit aussi bien par la régulation des résistances vasculaires périphériques par l'angiotensine que par le volume sanguin via l'aldostérone.

Le SRA a d'abord été montré comme étant localisé uniquement au niveau rénal où il a été découvert, avant que de nombreuses études ne démontrent sa présence dans d'autres tissus (Cheng and Leung, 2011; Dzau, 1984; Ganten and Speck, 1978; Inagami, 1998). Il a été également montré que le SRA se retrouve aussi bien au niveau mitochondrial (Abadir et al., 2011) que nucléaire (Gwathmey et al., 2012).

a) Synthèse de l'angiotensine II et ses principaux récepteurs

L'angiotensine II (Ang II) est le principal effecteur du système rénine-angiotensine. Cet octapeptide est métabolisé en plusieurs étapes. L'angiotensinogène, précurseur decapeptidique libéré au niveau hépatique, est dégradé sur sa partie N-terminale par la rénine pour donner l'angiotensine I (Ang I) qui est ensuite clivée par l'enzyme de conversion de l'angiotensine (ECA) pour former l'Ang II (Skeggs et al., 1967). Si l'Ang II est l'effecteur principal du système, elle peut toutefois être métabolisée elle-même en angiotensine III par l'action de l'aminopeptidase A (APA) puis en angiotensine IV suite à l'hydrolyse réalisée par l'aminopeptidase N (APN) (Landry Y., 2009). Les effets de l'Ang II se font via plusieurs récepteurs membranaires. Ses deux principaux sont les récepteurs de type 1 et 2 à l'Ang II, respectivement AT1R et AT2R. Un autre récepteur, AT4R, a été cloné mais son implication dans les effets du SRA est très faible car il ne lie que l'angiotensine IV (de Gasparo et al., 2000). De même, le récepteur Mas est activable par l'angiotensine 1-7, heptapeptide dérivé de l'action de l'ECA2. Récemment, un nouvel agent du SRA a été caractérisé : l'alamandine (Lautner et al., 2013). La figure 11 résume les différents acteurs du SRA.

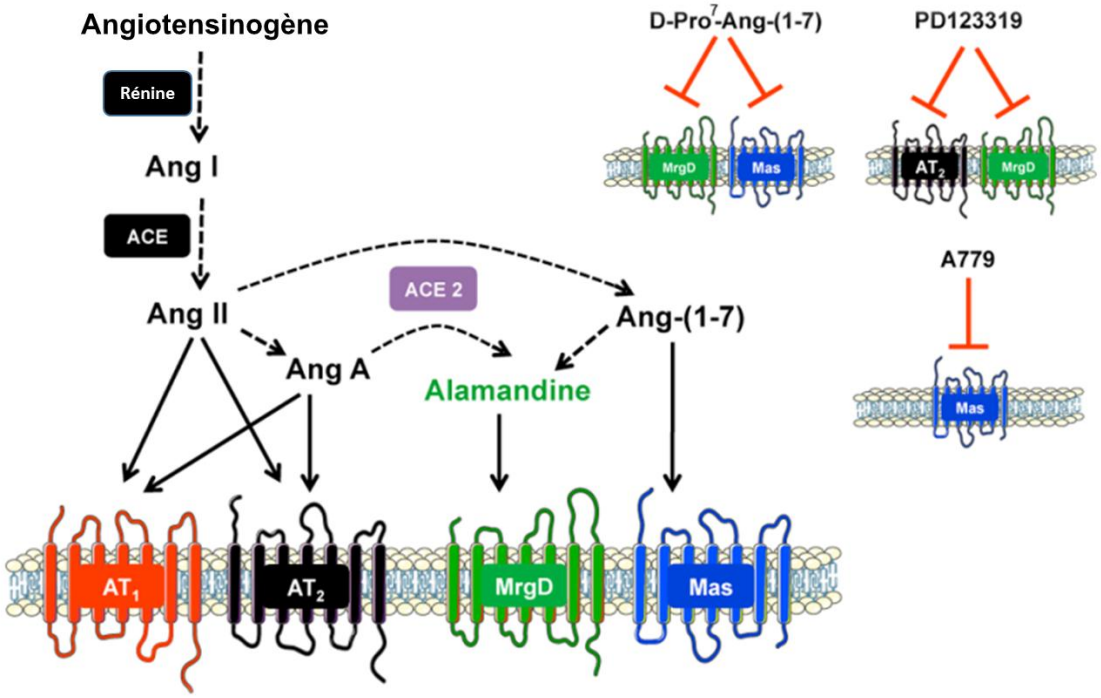

Figure 11 : Vue d'ensemble simplifiée du système rénine-angiotensine. Ang I : angiotensine I ; ACE : enzyme de conversion de l'angiotensine ; Ang II : angiotensine II ; ACE 2 : enzyme de conversion de l'angiotenine 2 ; Ang-(1-7) : angiotensine 1-7 ; AT1 : récepteur AT1R ; AT2 : récepteur AT2R ; MrgD : Récepteur couplé à une protéine G apparenté au récepteur Mas ; Mas : récepteur Mas ; D-Pro7-Ang-(1-7) : antagonist de l'angiotensine A-7 ; PD123319 : antagoniste du récepteur AT2R ; A779 : antagoniste sélectif de l'angiotensine 1-7.

Le récepteur AT1R est le récepteur majoritairement exprimé dans l'organisme et ce de façon ubiquitaire. C'est un récepteur de la famille des récepteurs à sept domaines transmembranaires couplés aux protéines G (RCPG), qui est couplé à une protéine G_q. Sa signalisation intracellulaire fait intervenir les voies des MAP-kinases qui orientent vers un rôle pro-inflammatoire, les voies Akt/PKB qui conduisent à une migration et une adhésion cellulaire (facteurs participant au remodelage vasculaire), ou vers les voies STATs qui induisent la survie et une hypertrophie cellulaire, enfin vers la contraction des cellules musculaires lisses et la production de ROS, facteurs pouvant conduire à des pathologies comme l'HTA (figure 12, (Touyz, 2005).

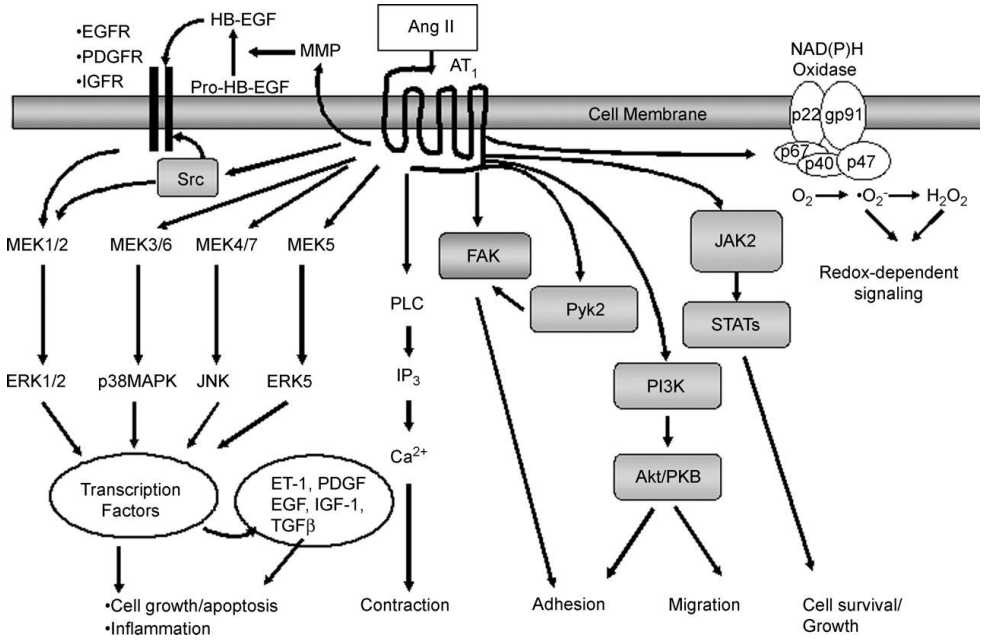

Figure 12 : Signalisation intracellulaire du récepteur AT1R. Ang II : angiotensine II ; AT1 : récepteur AT1R ; PLC : phospholipas C ; IP3 : inositol triphosphate ; ET-1 : endothéline-1 ; PDGF : « *platelet-derived growth factor* »; EGF : « *epidermal growth factor* »; IGF : « *insulin-like growth factor* »; TGF-β : « *transforming growth factor β* ». D'après (Touyz, 2005)

Ce récepteur est la cible de nombreuses molécules thérapeutiques appelées sartans, ou plus anciennement ARA II (pour « Antagonistes des récepteurs à l'angiotensine II) à l'époque où la communauté scientifique ne pensait qu'à ce récepteur pour médier les effets vasculaires de l'Ang II.

A l'opposé, le récepteur AT2R est décrit comme possédant des actions vasodilatatrices et antitrophiques. Il est retrouvé principalement chez le fœtus au niveau central où il possède un rôle essentiel dans le développement (notamment vasculaire). Son expression diminue rapidement mais on le retrouve chez l'adulte impliqué dans le remodelage tissulaire, la vasodilatation et la transmission neuronale (Lemarie and Schiffrin, 2010).

Si la signalisation intracellulaire du récepteur AT2R n'est pas aussi bien connue que celle d'AT1R, il est admis qu'il est lui aussi un RCPG, mais couplé à une protéine G_i (Zhang and Pratt, 1996). Cependant, il a aussi été démontré que l'activation d'AT2R est associée à une augmentation de concentration de GMPc via la bradykinine et son récepteur B2, tout comme une activation de la sérine/thréonine phosphatase 2A (PP2A), de la protéine SHP-1 ou MKP-1 (figure 13 (de Gasparo et al., 2000; Lemarie and Schiffrin, 2010). Le rôle du récepteur AT2R en conditions pathologiques est pour l'instant mal maitrisé.

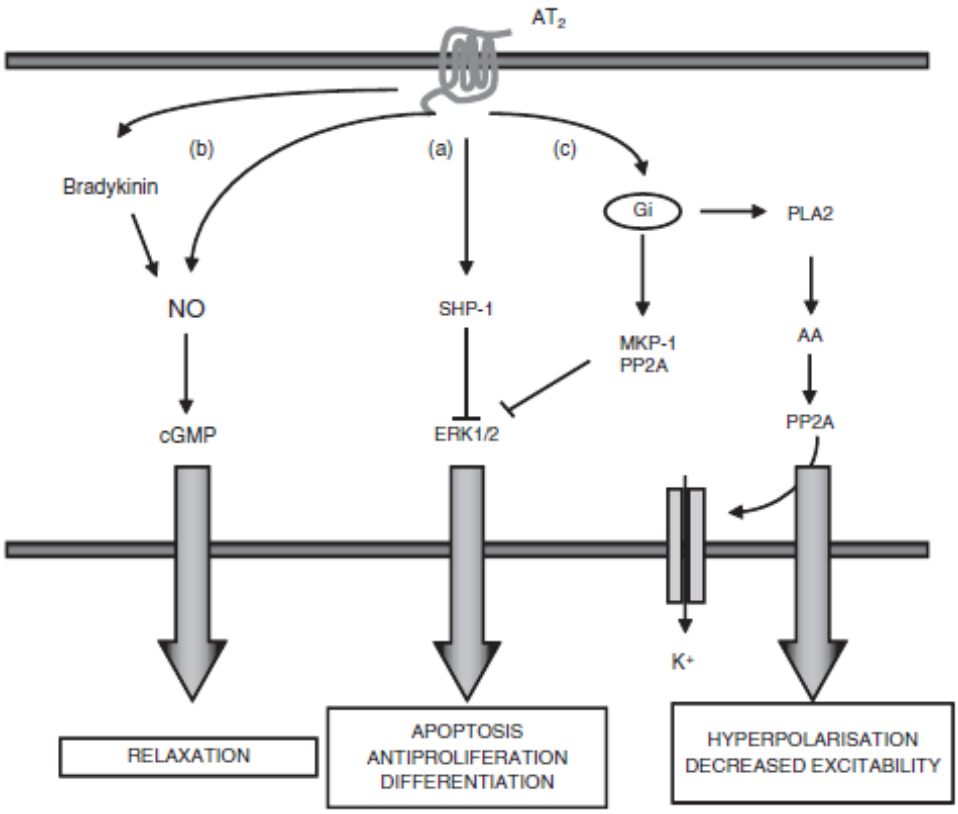

Figure 13 : Voies de signalisation intracellulaire du récepteur AT2R. AT2 : récepteur AT2R ; NO : monoxyde d'azote ; cGMP : guanosine monophosphate cyclique ; PLA2 : phospholipase A2 ; AA : acide arachidonique ; PP2A : protéine phosphatase 2A. D'après (Lemarie and Schiffrin, 2010).

b) L'autre effecteur du SRA : l'aldostérone

Le SRA peut aussi agir par un autre de ces effecteurs bien qu'indirect, l'aldostérone. Elle est synthétisée à partir du cholestérol, principalement au niveau du cortex de la médullo-surrénale, suite à une cascade enzymatiques initiée par l'action de l'Ang II au niveau surrénalien. Son importance physiologique dans le maintien de l'équilibre hydro-sodé en période de privation en sodium est connu depuis de nombreuses années (Patel and Mehta, 2012). Son action se fait par sa fixation sur le récepteur aux minéralocorticoïdes (MR).

Au niveau rénal, après fixation de l'aldostérone sur son récepteur, celui-ci se dimérise au niveau nucléaire pour réguler l'expression de gènes et activer des facteurs de transcription de la pompe à sodium ou Na^+/K^+-ATPase et provoque un effet antidiurétique (Shah et al., 2006).

Au niveau central, il est accepté depuis longtemps que l'activation du MR entraîne des perturbations de la régulation de la pression artérielle de façon simultanée avec des actions sur le cœur ou les vaisseaux. Cela conduit à de l'hypertension. L'antagonisme du MR au niveau central est devenu un enjeu important du traitement de l'HTA (Gomez Sanchez, 2009).

c) SRA et pathologies cardiovasculaires

Le SRA a un rôle majeur dans de nombreuses pathologies cardiovasculaires, principalement par les actions directes de l'Ang II sur AT1R et avec une participation plus faible par l'aldostérone et AT2R.

Les actions vasoconstrictrices et trophiques de l'angiotensine II via son récepteur AT1R lui confèrent un rôle majeur dans la mise en place et le maintien de phénomènes physiopathologiques comme la dysfonction endothéliale, le stress oxydant, le remodelage et l'inflammation vasculaire. Ce sont des phénomènes aboutissant à des pathologies comme l'HTA, l'athérosclérose, les complications vasculaires du diabète, ou les accidents vasculaires cérébraux (Mehta and Griendling, 2007).

Concernant AT2R, son rôle peut différer en fonction des conditions physiopathologiques : il induit une vasoconstriction lors du vieillissement vasculaire (Pinaud et al., 2007) ou dans l'hypertension (Matrougui et al., 2000; You et al., 2005), chez des rats ZDF (Retailleau et al., 2010) ou chez des patients hypertendus non traités (Savoia et al., 2007). Il prend alors un rôle opposé à celui décrit chez le sujet sain. Outre les sartans présentés plus haut, une autre classe médicamenteuse occupe une place importante dans la régulation du SRA, il s'agit des inhibiteurs de l'enzyme de conversion (IEC) de l'angiotensine. L'aldostérone possède également une gamme d'inhibiteurs et bloqueurs avec notamment la spironolactone, utilisé seul ou associé à d'autres diurétiques. AT2R lui n'est pour l'instant ciblé que par une unique molécule à visée thérapeutique, le C21, dont la sélectivité reste cependant discutable (Henrion, 2012).

2.3. L'adventice

L'adventice est la tunique la plus externe du vaisseau sanguin. Elle est peu développée au niveau des artères élastiques. On y retrouve toutefois un réseau de collagène dérivé de la lame élastique externe, les vaisseaux formant les vasa vasorum et les terminaisons nerveuses.

Dans les artères de résistance, cette tunique est beaucoup plus développée. Elle se compose alors d'élastine, de collagène, de cellules immunitaires (macrophages, mastocytes, fibroblastes) ainsi que des terminaisons nerveuses. Elle se poursuit par un tissu conjonctif qui permet la fixation du vaisseau aux tissus proches. C'est le rôle principal de l'adventice : assurer le maintien entre les artères et les organes environnant. Ceci s'observe de façon évidente au niveau du mésentère.

Physiopathologie du système vasculaire

1. L'influence du genre au niveau du système cardiovasculaire

Il est connu depuis plusieurs années que l'incidence de pathologies comme l'hypertension ou les atteintes coronaires est plus forte chez les hommes de 30 à 50 ans par rapport aux femmes du même âge (Orshal and Khalil, 2004). Il a également été démontré que les pathologies cardiovasculaires touchent plus les femmes ménopausées que les femmes préménopausées (Gerhard and Ganz, 1995). Au niveau vasculaire, le tonus vasculaire qui correspond au niveau de contraction d'un vaisseau par rapport à son niveau

maximum de contraction théorique présente des modifications dépendantes du genre, aussi bien chez l'animal que chez l'homme (Stallone et al., 1991). Ces différents phénomènes sont depuis le début de leur étude reliés aux hormones.

Parmi les hormones sexuelles, celles qui semblent exercer le plus d'effets sur la sphère vasculaire sont les œstrogènes. En effet, de nombreuses études leur ont attribué un rôle vasculo-protecteur qui expliquerait la faible incidence des pathologies cardiovasculaires chez les femmes non-ménopausées.

Les œstrogènes et leur représentant principal, le 17β-estradiol (E2), agissent par l'intermédiaire de leurs récepteurs α et β (ER-α et ER-β). Ces récepteurs sont exprimés au niveau membranaire et nucléaire des CMLs et des cellules endothéliales. Leurs effets peuvent être : génomiques par action directe au niveau du noyau où les hormones peuvent pénétrer après translocation du récepteur au niveau nucléaire ; mais aussi non-génomiques par fixation sur des récepteurs membranaires (Orshal and Khalil, 2004; Tostes et al., 2003). Au niveau de l'endothélium, l'activation des récepteurs aux œstrogènes entraîne d'une part une surexpression de la eNOS et une diminution d'expression de certaines sous-unités de la NADPH-oxydase, et d'autre part la libération de médiateurs relaxants sur la CML dont le NO, la PGI_2, et l'EDHF (Tostes et al., 2003)(figure 14).

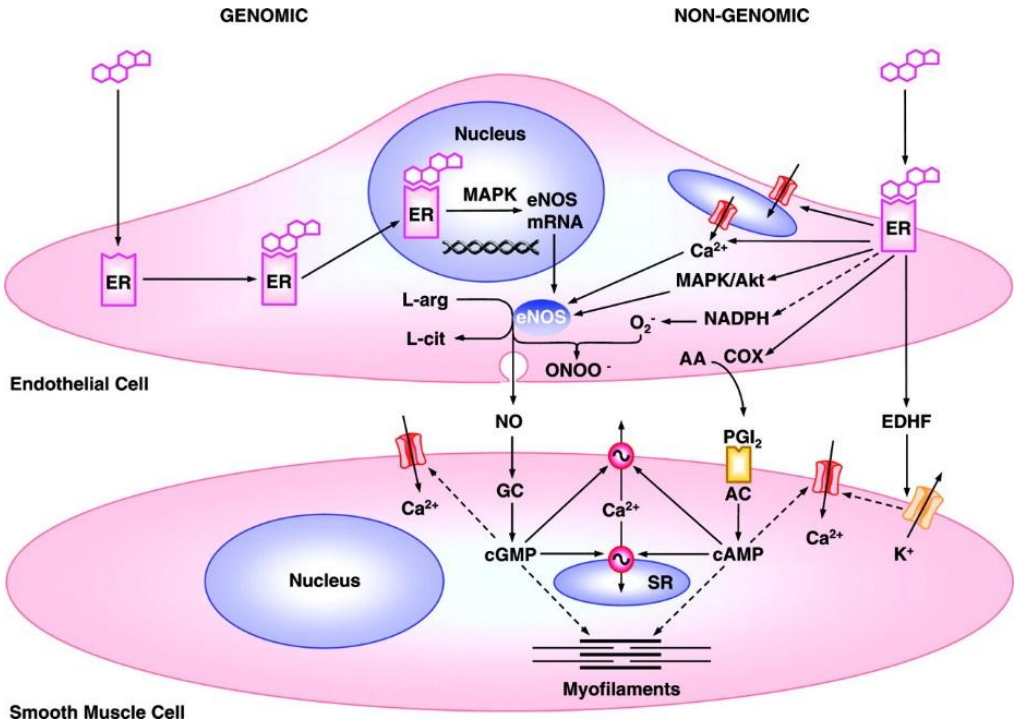

Figure 14 : Action des œstrogènes sur l'endothélium. ER : récepteur aux estrogènes ; eNOS : NO synthase endothéliale ; NO : monoxyde d'azote ; GC : guanylate cyclase ; cGMP : guanosine-monophosphate cyclique ; AA : acide arachidonique ; COX : cyclo-oxygénases ; PGI2 : prostacycline ; AC : adénylate cyclase ; cAMP : adénosine monophosphate cyclique ; SR : réticulum sarcoplasmique ; EDHF : facteur hyperpolarisant dérivé de l'endothélium. D'après(Orshal and Khalil, 2004)

Au niveau des CMLs, la présence des œstrogènes va entrainer une inhibition de la contraction par stimulation de canaux potassiques dépendants de l'ATP (K_{ATP}) mais sans action sur les BK_{Ca} et une diminution de concentration intracellulaire en calcium aussi bien par l'entrée que par le relargage de calcium depuis le réticulum sarcoplasmique (Tostes et al., 2003). Les effets génomiques sont caractérisés par une inhibition de la prolifération cellulaire via l'inhibition de la voie des MAP-kinases (pour « mitogen active proteins ») et des facteurs de transcription qui sont sous son contrôle (figure 15).

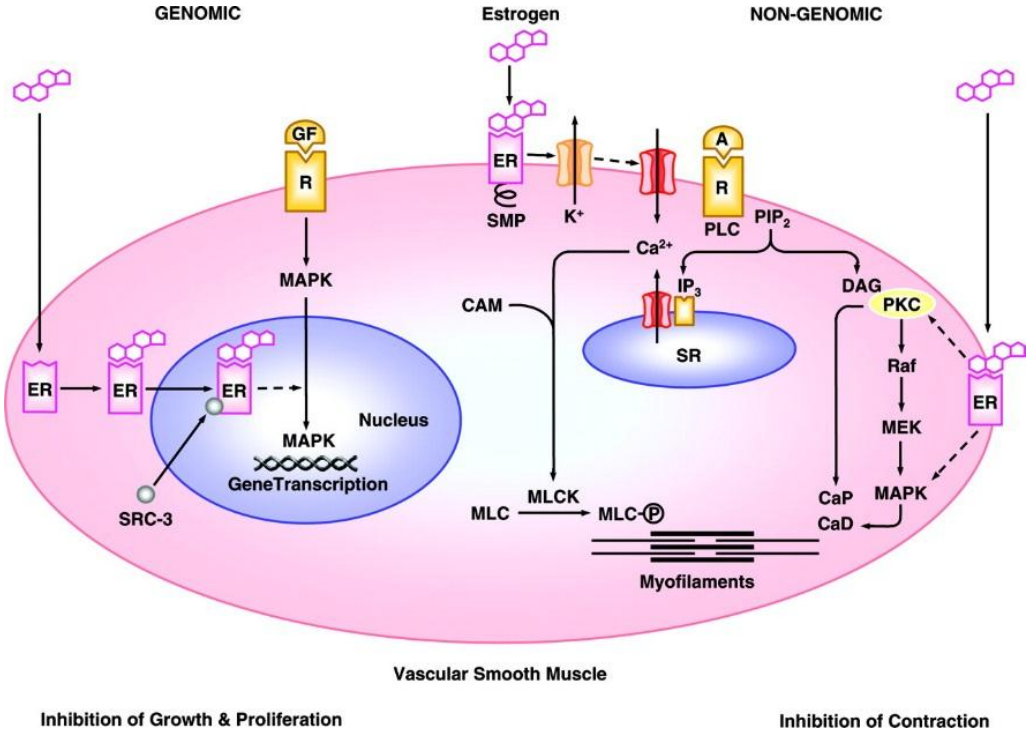

Figure 15 : Effets des œstrogènes au niveau des CMLs. ER : récepteur aux estrogènes ; PLC : phospholipas C ; IP3 : inositol triphosphate ; SR : réticulum sarcoplasmique ; PIP2 : phosphatidyl inositol biphosphate ; DAG : diacylglycérol ; PKC : protéine kinase C ; CAM : calmoduline ; MLCK : kinase des chaines légères de la myosine. D'après (Orshal and Khalil, 2004)

Au niveau vasculaire, ces différentes actions se traduisent par un effet vasculo-protecteur impliqué aussi bien au niveau de la réactivité vasculaire que du remodelage vasculaire où l'activation des ER-α est nécessaire dans le processus de remodelage en réponse à une augmentation chronique de débit sanguin (Tarhouni et al., 2013).

2. Le remodelage vasculaire

2.1. Les différents types de remodelage

Le remodelage vasculaire peut être aussi bien veineux qu'artériel. Au niveau artériel, il touche aussi bien les artères de compliance que les artères de résistance. C'est un phénomène qui correspond à la capacité du vaisseau à se « restructurer » en modifiant son diamètre et/ou son épaisseur et qui apparaît dans de

nombreuses situations physiologiques comme pathologiques. En effet, il survient lors de variations de flux mais il intervient aussi en cas d'hypertension, d'athérosclérose, ou de diabète par exemple (Ward et al., 2000).

Il existe plusieurs sortes de contraintes capables d'initier un remodelage vasculaire. En fonction de ces contraintes, différents types de remodelage sont décrits selon les modifications de flux rencontrées. Les deux caractéristiques principales du remodelage sont : la modification de la taille de la lumière du vaisseau et également l'épaississement de la masse pariétale. On parle de remodelage hypertrophique ou externe quand la masse pariétale est augmentée et de remodelage hypotrophique ou interne si elle se trouve diminuée.

Quant aux variations de diamètres, le remodelage expansif (« outward remodeling ») décrit une augmentation de diamètre du vaisseau et le remodelage constrictif (« inward remodeling ») une diminution de celui-ci. Les vaisseaux qui ne présentent que des modifications de diamètre sans évolution de leur masse pariétale font un remodelage dit eutrophique (figure 16 (Mulvany, 2002).

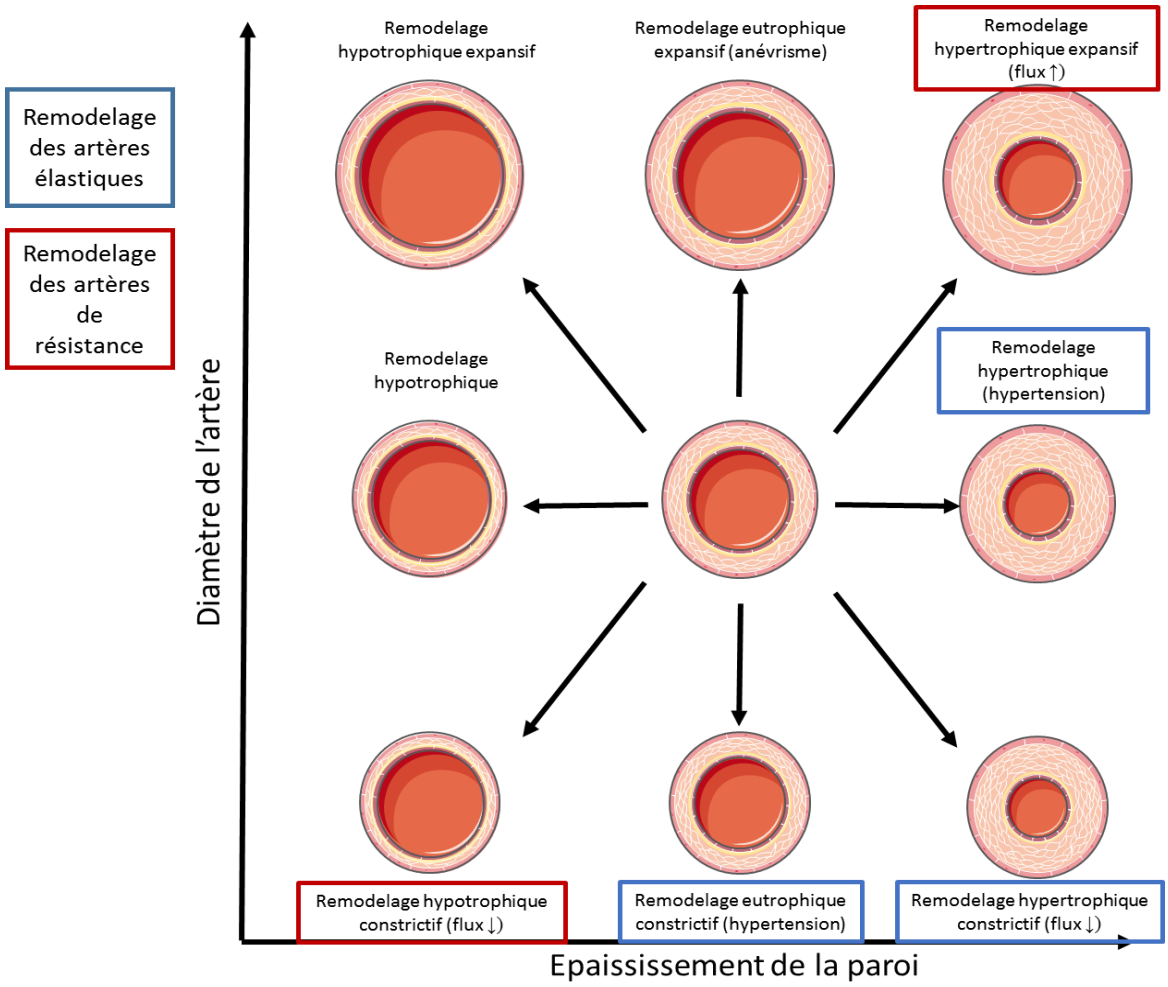

Figure 16 : Différents types de remodelage artériel, d'après Mulvany (Mulvany and Halpern, 1977)

Une augmentation de flux entraînera un remodelage qui est directement sous contrôle du NO endothélial activé par le les forces de cisaillement et des métalloprotéinases (MMP), principalement MMP-2 et MMP-9

(elles-mêmes activées par le NO, (Dumont et al., 2007). A l'inverse, une diminution du flux stimulera des facteurs comme le facteur de croissance produit par les plaquettes ou « *platelet-derived growth factor* » (PDGF), et le « *tranforming growth factor* » (TGF-β) entrainant un épaississement de la paroi artérielle (Ward et al., 2000).

Plusieurs systèmes régulateurs sont capables d'influencer ces facteurs pour aboutir au remodelage observé. Le SRA possède un rôle important dans le remodelage au flux. Il a été démontré, au sein du laboratoire, que plusieurs facteurs (ROS, eNOS notamment) nécessaires au remodelage observé dans des artères où le flux sanguin avait été augmenté de façon chronique, sont des facteurs classiquement dérivés de l'activation du SRA (Cousin et al., 2010). D'autres études ont montré que le remodelage hypertrophique est associé à une prolifération et une dédifférenciation cellulaire, qui sont là aussi deux effets classiques du récepteur AT1R (Buus et al., 2001). Les différentes voies de signalisation activées par l'Ang II sur son récepteur dans le remodelage sont présentées ci-dessous (figure 17, (Mulvany, 2002).

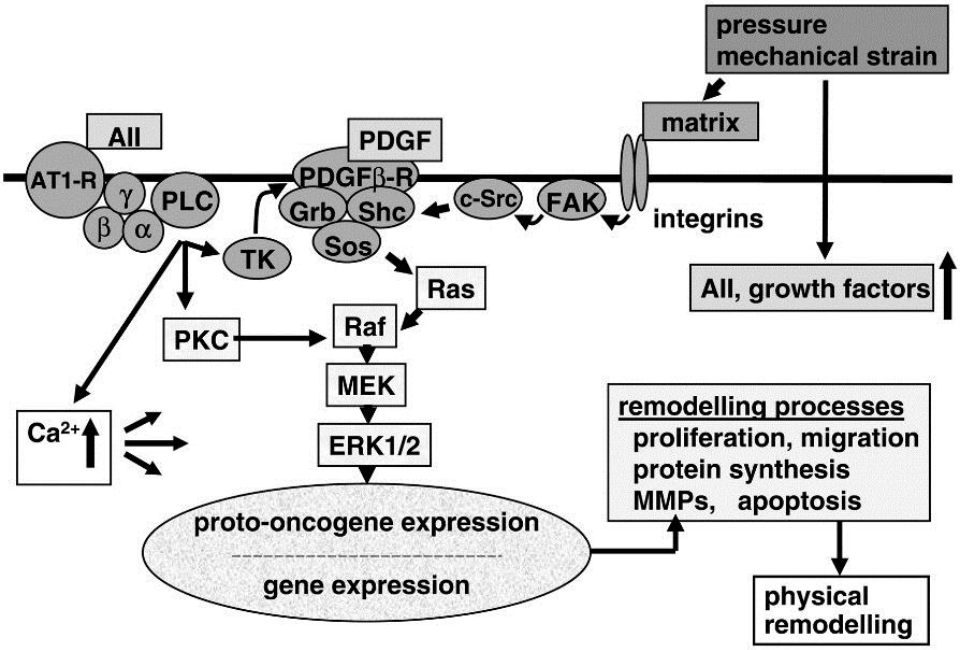

Figure 17 : Facteurs participant au remodelage artériel sous l'action du récepteur de type 1 (AT1-R) à l'angiotensine II (AII). PLC : Phospholipase C ; PDGF : platelet-derived growth factor ; PDGFβ-R : récepteur du PDGF. D'après (Mulvany, 2002)

Les facteurs inflammatoires sont eux aussi capables d'induire un remodelage artériel. Bien que cela puisse passer par l'activation du SRA, d'autres facteurs peuvent induire un remodelage dans l'HTA : des molécules comme les molécules d'adhésion (VCAM ou ICAM), le recrutement de lymphocytes et macrophages (MCP-1, IL-6) (Touyz, 2005).

Les facteurs hormonaux comme les œstrogènes peuvent également être impliqués dans le remodelage artériel au flux, via leur recrutement du NO comme décrit précédemment (Tarhouni et al., 2013).

Il a été démontré que le remodelage artériel est présent dans de nombreuses pathologies affectant le système cardiovasculaire comme l'obésité (Bouvet et al., 2007), le vieillissement vasculaire (Dumont et al., 2008), le diabète (Belin de Chantemele et al., 2009) ou l'HTA (Mulvany, 2002) au cours desquelles il joue un rôle prépondérant. Dans ces pathologies le remodelage le plus fréquent est de type hypertrophique, parfois constrictif, associé ou non à la présence de plaques d'athérome. C'est le cas de l'hypertension où deux remodelages sont observés (figure 17) au niveau des artères de résistance. Ces remodelages se font sous l'influence de facteurs distincts : une augmentation de pression sanguine ou du flux entraînera un remodelage hypertrophique sous contrôle de l'Ang II ; le remodelage eutrophique serait dû à une normalisation des contraintes appliquées aux vaisseaux par l'épaississement de la média (Mulvany, 2002).

2.2. Le remodelage dans le diabète

Au cours du diabète, un remodelage de type hypertrophique est observé que ce soit dans les artères de résistance ou de conductance dans le diabète de type 1 (Searls et al., 2012) ou de type 2 chez l'animal (Souza-Smith et al., 2011) et chez l'homme (Endemann et al., 2004).

Son appréciation repose alors sur l'indice de remodelage : rapport de l'épaisseur de la média sur la lumière du vaisseau. Ce rapport est classiquement augmenté dans les deux types de diabètes.

Des études précédentes réalisées au laboratoire ont montré que le remodelage au flux chez le rat diabétique obèse est associé à une perte de vasorelaxation via une surproduction de ROS (Bouvet et al., 2007). Il est également perturbé notamment par les produits de glycation avancés ou « *advanced glycation end products* » (AGEs) (Freidja et al., 2012). En effet, les AGEs perturbent l'action des métaloprotéases, enzymes qui dégradent la matrice extracellulaire pour permettre l'expansion du vaisseau (Vessieres et al., 2012)

3. La dysfonction endothéliale

La dysfonction endothéliale est l'une des atteintes les plus importantes du système vasculaire. Elle peut être l'initiatrice de pathologies ou bien une conséquence de ces pathologies. Le terme de dysfonction endothéliale a été utilisé pour définir une altération globale de l'endothélium, incluant une perte des fonctions de coagulation, de son rôle anti-inflammatoire, de ses capacités de régulation du remodelage vasculaire et de l'expansion vasculaire. Cependant, ce terme est de plus en plus utilisé pour définir une perte de relaxation endothélium-dépendante médiée par le NO (Cai and Harrison, 2000).

Parmi les causes classiques de l'instauration de cet état figurent d'une part la production du NO par la eNOS qui est, comme décrit précédemment, régulée par de nombreux systèmes de contrôle aussi bien positifs (BH_4) que négatifs (cavéoline), d'autre part la capacité de fixation et la compétition possible sur la GCs, et également l'hydrolyse du GMPc par les phosphodiestérases (PDEs).

La plupart des études se concentrent depuis plusieurs années sur la partie production du NO car c'est la partie directement sous contrôle de l'endothélium. Pourtant, il est décrit et communément accepté qu'une fois produit, le NO doit encore pouvoir exercer l'ensemble de ses effets avec le maximum d'efficacité. Et

s'ils ne sont pas les seuls, deux systèmes enzymatiques sont capables de fortement perturber cette efficacité : le système hème-oxygénase (HO)/CO ainsi que les PDEs.

Le système HO/CO fait intervenir l'enzyme HO (principalement son isoforme HO-1) pour dégrader des noyaux hème pour former du CO, libérer le fer et la biliverdine de l'hème (figure 18 (Wu and Wang, 2005). La particularité du CO est de pouvoir rentrer en compétition avec le NO pour la fixation sur la GCs. Cela entraîne donc un effet d'inhibition compétitive (Maines, 1997). Mais il y a une deuxième interaction possible : la GCs est une enzyme dont le site catalytique comporte un noyau hème. Cela en fait donc une cible de l'HO.

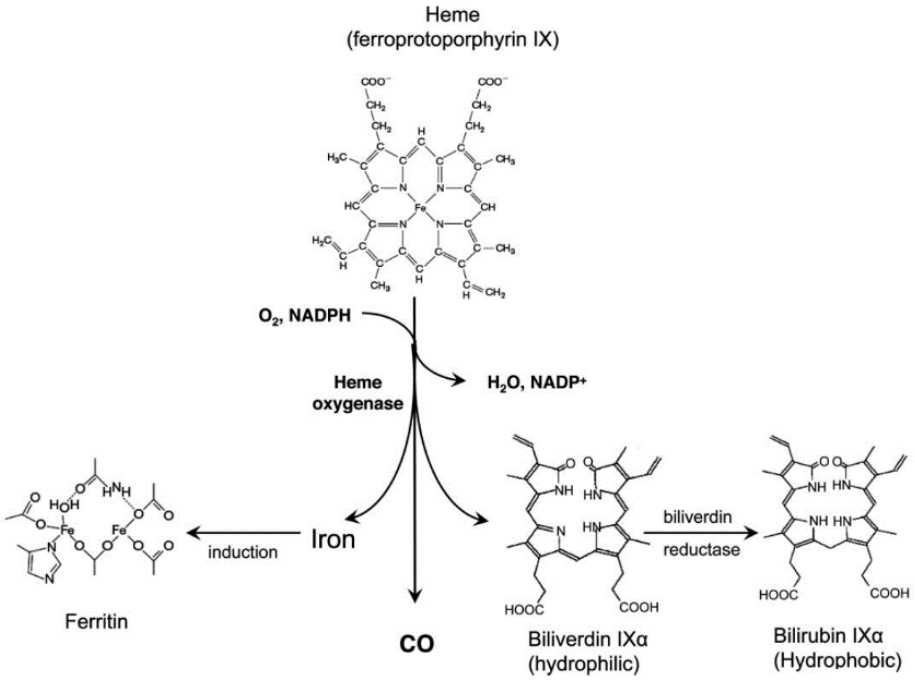

Figure 18 : Action de l'hème-oxygénase et synthèse du monoxyde de carbone (CO). D'après (Wu and Wang, 2005)

D'autre part, les PDEs sont responsables de l'hydrolyse des messagers intracellulaires secondaires, l'AMPc et le GMPc. Il existe 11 PDEs chez l'homme dont chacune possède une affinité et une spécificité différente pour ces deux messagers (Omori and Kotera, 2007). Les trois isoformes spécifiques du GMPc sont les PDE5, PDE6 et PDE9. L'isoforme 5 est celle qui est exprimée au niveau vasculaire. Elle est la cible du Sildenafil®, et de ses homologues Tadalafil®, Vardénafil® et Avanafil®.

Ces molécules sont toutes utilisées dans le traitement des troubles érectiles par voie orale, et pourtant le sildénafil était à l'origine destiné au traitement de l'angor. En effet, l'inhibition de la PDE5 avait pour but d'augmenter la quantité de GMPc disponible après stimulation de la GCs par le NO et ainsi augmenter l'action vasculo-protectrice de celui-ci. Ce n'est qu'au cours des études cliniques que celui-ci a été repositionné sur l'indication des troubles érectiles. Aujourd'hui, l'inhibition de la PDE5 est envisagée dans le traitement de l'hypertension essentielle (Ghiadoni et al., 2008), du syndrome métabolique (Lugnier,

2011) et même de la maladie d'Alzheimer (Sabayan et al., 2010). C'est déjà un traitement utilisé dans l'HTAP (Klinger, 2011).

4. Le cas du diabète

Le diabète est défini par l'OMS comme « une maladie chronique qui apparait lorsque le pancréas ne produit pas suffisamment d'insuline ou que l'organisme n'utilise pas correctement l'insuline qu'il produit… » (OMS 09/2012). Selon leurs dernières statistiques, 347 millions de personnes sont diabétiques dans le monde, et le nombre de décès par diabète devrait doubler d'ici à 2030.

Dans la définition donnée par l'OMS, la distinction des deux grands types de diabètes est faite : le diabète de type 1 (DT1) dit insulino-dépendant et le diabète de type 2 (DT2) ou non-insulinodépendant.

Ces deux types de diabètes se retrouvent tous les deux chez des sujets à prédisposition génétique, mais ne se développent pas de la même façon, ni au même âge. En effet, on diagnostique un DT1 surtout avant les 30 ans, même si l'atteinte pancréatique est déjà irréversible car elle a débuté bien en amont du diagnostic (Atkinson and Eisenbarth, 2001). C'est pourquoi le DT1 est aussi appelé le diabète juvénile. A l'inverse, le DT2 est plus souvent découvert chez des adultes de 40 à 50 ans où il est souvent associé à de l'obésité, une vie sédentaire (Weyer et al., 1999).

4.1. Physiopathologie des diabètes de type 1 et 2

Le diabète de type 1 (ou insulino-dépendant, DID) est une maladie auto-immune caractérisée par une destruction progressive des cellules productrices d'insuline, les cellules β des îlots de Langerhans, par les lymphocytes T. L'initialisation de la réponse auto-immune se fait chez des sujets à fond immunitaire sensible, suite à une exposition environnementale défavorable : très souvent virale, mais aussi bactérienne ou environnementale (consommation de lait de vache ou de protéines de blé) (van Belle et al., 2011).

Il existe plusieurs modèles représentant l'instauration et l'évolution du DT1. Si certains partent d'un modèle linéaire de décroissance de la masse de cellules β pancréatiques, d'autres y intègrent des phases de « rebond » où la destruction de ces cellules est compensée par une prolifération plus importante. Un modèle qui intègre les données récentes de l'aspect immunitaire de l'instauration du DT1 est présenté en figure 19 (van Belle et al., 2011).

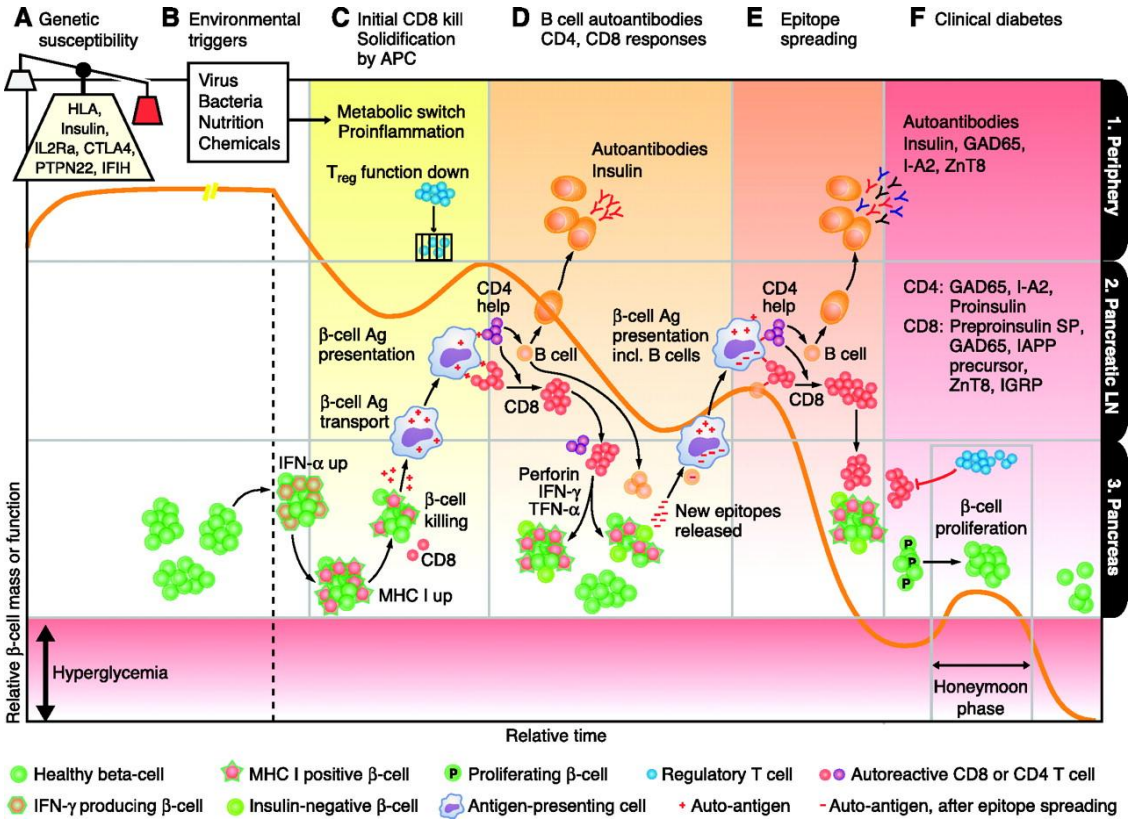

Figure 19 : Différentes phases du diabète de type 1 d'après (van Belle et al., 2011)

L'une de ces phases de rebonds est appelée la « honeymoon phase ». Elle correspond à une période supposée durer entre trois et six mois mais peut s'étendre jusqu'à deux ans, où les cellules β pancréatiques arrivent à proliférer de nouveau et à reprendre un rythme de production d'insuline permettant un maintien de la glycémie (Ludvigsson and Heding, 1978). Durant cette phase, l'insulinothérapie qui est le traitement de base du DT1 peut être partiellement ou totalement suspendue. Ce traitement comprend aujourd'hui plusieurs types d'insulines à action rapide ou de plus longue durée. La combinaison de ces deux types d'insulines est le plus souvent utilisée aujourd'hui.

Une prédisposition génétique se retrouve aussi dans le cas du DT2. Ce DT2 (ou non insulino-dépendant, DNID) est caractérisé par quatre grandes anomalies métaboliques : obésité, insulino-résistance, déficit de sécrétion d'insuline, baisse de la synthèse endogène de glucose (Weyer et al., 1999). Leurs évolutions relatives dans le développement du DT2 restent pour l'instant méconnues. Il est à noter que le DT2 représente environ 90% des cas de diabète dans le monde, et que son traitement est plus symptomatique que curatif dans le sens où on ne sait pas encore corriger la résistance à l'insuline. Toutefois, la metformine qui est un agent de la classe des antidiabétiques oraux permet de contrôler la glycémie d'une partie des sujets traités, en diminuant la production de glucose hépatique par une inhibition de la respiration mitochondriale (Foretz et al., 2010). Son utilisation est cependant limitée par des effets secondaires dont l'acidose lactique et des hypoglycémies sont les plus fréquents et sévères (Al-Abri et al., 2013).

Ces deux types de diabètes entrainent des complications qui sont multiples, depuis les néphropathies, les rétinopathies, et autres désordres métaboliques qui conduisent à de nombreuses pathologies cardiovasculaires (Roberts, 2010).

4.2. Complications cardiovasculaires liées au diabète

De par des mécanismes physiopathologiques différents, les atteintes cardiovasculaires liées au diabète varient moins par leur nature que par leur importance relative. Elles sont cependant beaucoup plus documentées en ce qui concerne le DT2, surement de par la proportion plus importante de ce type de diabète mais également par la limite des traitements actuels dans ce cas.

Les pathologies associées à un DT1 sont le plus souvent des atteintes de type athérosclérotiques, sténoses, qui évoluent vers le facteur de risque cardiovasculaire rencontré le plus souvent chez le sujet diabétique : l'HTA. Cela s'accompagne d'un remodelage vasculaire important avec un fort épaississement de la média et un rétrécissement de la lumière des vaisseaux. Mais d'autres facteurs conduisent également aux pathologies cardiovasculaires avec notamment des dyslipidémies, troubles de la coagulation et de la fonction plaquettaire. Il ne faut toutefois pas sous-estimer une autre complication cardiovasculaire majeure liée au diabète de type 1 : le syndrome dit de la mort subite dans son lit. Ce syndrome est retrouvé lors d'hypoglycémies sévères qui sont associées à une augmentation de sécrétion des catécholamines entraînant des arythmies pouvant être fatales (Brindisi et al., 2010).

Le développement des pathologies cardiovasculaires dans le DT2 suit un tout autre rythme étant donné son mécanisme. Sont retrouvées principalement une forte athérosclérose due à des infiltrations de cellules immunitaires pro-inflammatoires, une dyslipidémie marquée avec une balance HDL-cholestérol (HDL)/LDL-cholestérol (LDL) très en faveur des LDL ce qui induit un fort stress oxydant. Le tout conduit à une dysfonction endothéliale et l'installation progressive d'une HTA (Roberts, 2010).

4.3. SRA et Diabète

Le SRA est présent à tous les niveaux de l'instauration et du développement des deux types de diabète, et également dans les complications liées à ces pathologies. Cependant son intervention ne se situe pas au même niveau pour les deux types de diabète.

Durant la fin des années 90, la présence du SRA a été démontrée au niveau du pancréas chez le rat et la souris (Leung et al., 1999), et également chez l'homme (Tahmasebi et al., 1999). Ces travaux ont été poursuivis pour déterminer plus précisément le rôle des récepteurs AT1R et AT2R à ce niveau. Ici aussi, leurs effets ont été décrits à l'opposé : si AT1R oriente vers une baisse de production d'insuline, de la prolifération des cellules β et une hypotrophie de ces cellules, AT2R possède lui un rôle hyperproliférateur, hypertrophique et hypersécrétoire (Leung, 2007). D'autres études ont pu montrer le bénéfice des bloqueurs d'AT1R comme des IEC dans l'insulinorésistance, ainsi qu'une fibrose des cellules β ou un retard de sécrétion d'insuline chez l'animal après activation du SRA (Jandeleit-Dahm et al., 2005).

D'autre part, le lien entre la physiopathologie du SRA et les complications vasculaires retrouvées dans le diabète est évident : le SRA (surtout via AT1R) peut être à l'origine de la quasi-totalité des perturbations

retrouvées chez le sujet diabétique : augmentation du stress oxydant, dysfonction endothéliale, hypertension, athérosclérose.

Pourtant, peu d'études se sont intéressées au rôle d'AT2R dans cette pathologie. Au laboratoire, il a toutefois été démontré chez le rat ZDF, que l'angiotensine en présence de candésartan (bloqueur d'AT1R) entraîne une vasoconstriction via les ROS et le thromboxane A2 (Retailleau et al., 2010). Chez l'homme par contre, la stimulation à l'Ang II après un traitement chronique par un bloqueur d'AT1R entraîne une réponse vasodilatatrice accompagnée d'une surexpression d'AT2R au niveau de la média des artères de résistances de patients diabétiques hypertendus (Savoia et al., 2007).

5. Objectifs de thèse

Le récepteur AT2R possède des propriétés qui lui confèrent un intérêt certain dans l'avenir du traitement des pathologies cardiovasculaires et métaboliques. Cependant, bien que plusieurs auteurs aient évoqués des rôles propres à AT2R qui le désignent comme acteur potentiel dans la pathologie diabétique, aucune étude n'a pour l'instant cherché à caractériser AT2R dans ce contexte.

C'est dans ce cadre que c'est inscrit notre projet. Etant donné le positionnement d'AT2R au niveau du pancréas, nous nous sommes intéressés à son rôle dans les deux types de diabète grâce à un modèle de DT1 et un modèle de DT2. Pour cela nous nous sommes appuyé sur une souche de souris dont le gène codant pour AT2R a été invalidé (Hein et al., 1995). Au niveau vasculaire, cette s'est concentrée aussi bien sur le rôle d'AT2R au niveau de la réactivité vasculaire qu'au niveau du remodelage artériel, en étudiant les voies de signalisation impliquées dans ces phénomènes. Nous nous sommes également penchés sur le rôle d'AT2R au niveau de la mise en place de la pathologie diabétique et de son évolution dans ces deux modèles.

Matériels et méthodes

1. Induction du diabète

1.1. Diabète de type 1

Des souris mâles et femelles, wild-type (WT) ou déficientes pour le gène codant pour AT2R (AT2R$^{-/-}$), d'âge compris entre 3 et 6 mois ont été rendues diabétiques par injection unique de streptozotocine (150mg/kg, i.p., Sigma, Saint-Louis, MO, Etats-Unis) une drogue cytotoxique pour les cellules β du pancréas (Pathak et al., 2008). Les animaux témoins ont reçu une dose équivalente de tampon citrate, solvant de la streptozotocine (STZ).

Le poids des souris et leur glycémie ont été mesurés 1, 5, 10, 20, 30 et 40 jours après l'injection. A 45 jours, les souris ont été euthanasiées par inhalation de CO_2. Les souris ont été considérés comme diabétiques lorsque la mesure de glycémie à jeun au cours du protocole a dépassé le seuil des 300 mg/dL.

1.2. Diabète de type 2

Des souris mâles WT et AT2R$^{-/-}$ de 10 semaines ont été nourries *ad libitum* avec un régime *high-fat* contenant 20% de protéines, 36% de graisses et 36% de carbohydrates (sucres) ainsi que les compléments nécessaires en vitamines, acides aminés et minéraux (F1850, Bioserve, Frenchtown, NJ, Etats-Unis). Cette alimentation leur a été distribuée durant le temps nécessaire à ce que leur glycémie atteigne un plateau sur deux mesures consécutives supérieures à 200mg/dL. Les souris contrôles ont été nourries avec un régime classique (régime M20, SDS diets, Angleterre) durant la même période.

2. Etudes *in vivo*

2.1. Cages à métabolisme

Les souris des différents groupes ont été placées individuellement en cage à métabolisme pour quantifier leur alimentation et leur prise de boisson ainsi que l'excrétion urinaire et fécale. Ces études ont été réalisées sur sept jours après une période d'acclimatation de deux jours. Les résultats sont exprimés sur 24h.

2.2. Tests de glycémie forcée et de tolérance à l'insuline

Les souris vigiles ont reçu une mono-injection d'une solution de glucose à 1g/L. Des mesures de glycémie ont été réalisées juste avant l'injection, puis à 15, 30, 60 et 120 minutes après l'injection.

Les souris vigiles ont reçu une mono-injection d'insuline rapide à 1UI/kg. Les mesures de glycémies ont été réalisées en amont de l'injection, puis à 15, 30, 60 et 120 minutes après celle-ci.

3. Prélèvements et devenir des tissus

Après euthanasie, les tissus suivants ont été prélevés : mésentère, aorte thoracique, cœur, rein, pancréas, ainsi que le sang par prélèvement intracardiaque post-mortem. Le sang total a ensuite été centrifugé à

4000 tours/minute afin de séparer le plasma des hématies. Le plasma a été conservé à -20°C en attente d'analyses.

Les autres organes ont été placés dès leur prélèvement dans une solution physiologique saline (PSS) à 4°C et tamponnée à pH=7,4. Cette solution est composée de NaCl (130mM), $NaHCO_3$ (15mM), KCl (3,7mM), KH_2PO_4 (1,2mM), $MgSO_4$ (1,2mM), glucose (11mM) et $CaCl_2$ (1,6mM).

3.1. Devenir des artères

Les artères mésentériques ont été disséquées et utilisées comme suit : quatre ont été montées sur un myographe de Mulvany (protocole détaillé en paragraphe 4) pour études de réactivité vasculaire, une a été pressurisée pour études histomorphométriques (voir paragraphe 6), une a été inclue sans fixation pour marquages fluorescents après réaction enzymatique (voir paragraphe 6.1), enfin un manchon contenant artère, veine et graisse a été inclu pour marquages immunohistochimiques.

L'aorte thoracique a été nettoyée de sa graisse sur la quasi-totalité de sa longueur. Deux anneaux (dont un non degraissé) ont servi aux études de réactivité vasculaire, une portion d'aorte a été conservée pour analyses biomoléculaires (voir paragraphe 5), une dernière pour analyses biochimiques.

3.2. Analyses pancréatiques

Le pancréas a été nettoyé de toute afférence nerveuse, de la graisse résiduelle et du parenchyme qui le relie à l'estomac d'une part, au mésentère d'autre part, et également à la rate. Il a ensuite été placé dans une solution contenant 1.75% d'HCl et 75% d'éthanol et conservé à -20°C.

Il a ensuite été broyé mécaniquement (ultraturax), et le contenu en insuline a été extrait puis dosé (kit « insulin mouse ultrasensitive jumbo ELISA », Alpco, Salem, NH, Etats-Unis) après plusieurs étapes de sonication et centrifugation.

4. Etudes de réactivité vasculaire

Les études de la réactivité des artères mésentériques et de l'aorte thoracique ont été réalisées sur un myographe de Mulvany (DMT, Aarhus, Danemark) comme décrit précédemment (Loufrani et al., 2001). Brièvement, des segments d'artères de 2mm de long environ ont été disséqués et dégraissés. Deux fils de tungstène de 40µm de diamètre ont été insérés dans la lumières des artères pour les fixer sur deux mâchoires : l'une reliée à une vis micrométrique permettant de prétendre les vaisseaux à une tension physiologique, l'autre reliée à un capteur de force. Les artères ont été en contact continu avec la solution saline décrite en paragraphe 3 à 37°C et alimentées par un mélange gazeux contenant 5% de CO_2. Elles ont premièrement été prétendues à une tension équivalente à 90 mmHg puis laissées pour stabilisation pendant 45 minutes.

Nous avons alors testé la réactivité des vaisseaux par une solution riche en potassium (PSS avec KCl à 80mM) qui provoque une dépolarisation et une contraction des vaisseaux. Après 20 minutes de repos, la réponse endothéliale des artères a été explorée par une précontraction à la phényléphrine (Phe, agoniste α1-adrénergique, 1µM) puis une relaxation à l'Acétylcholine (ACh, 1µM).

Des courbes doses-réponse à l'ACh (1nM à 10µM) ont ensuite été réalisées (en respectant entre chacune un temps de repos de 20 minutes) en présence de plusieurs agents pharmacologiques : le L-NAME (inhibiteur de eNOS, 100µM), l'indométhacine (bloqueur non-sélectif des COXs, 10µM), le tempol (mime l'activité de la superoxyde dismutase, 10µM), la catalase (100µM), le PD123319 (bloqueur d'AT2R, 10µM), le CAY10404 (inhibiteur sélectif de COX-2, 10µM). Une dernière courbe dose-réponse au nitroprussiate de sodium (SNP, 1nM à 10µM) a été réalisée afin de déterminer la capacité des CML à répondre aux EDRFs.

5. Analyses moléculaires

La détermination des niveaux d'expression des gènes a été effectuée sur segments d'aorte d'environ 1cm de long. Ces segments ont été plongés après dissection dans une solution de conservation (RNA-later®, Sigma) et placés à -20°C. L'extraction des ARN a été réalisée sur colonne RNeasy® micro kit (Qiagen). Puis ces extraits ont subi une transcription inverse en utilisant le kit Quantitect Reverse Transcription® (Qiagen). Les niveaux d'expression des gènes cibles a été déterminée en utilisant le Power SYBR Green PCR master kit® (Qiagen). Les amorces ont été conçues à l'aide du logiciel *Primer3*® (tableau 1). Les expressions relatives ont été déterminées d'après les valeurs de seuil d'amplification selon les recommandations du fournisseur après normalisation par rapport aux trois gènes de références.

Gène (protéine cible)	Séquence référencée par NCBI	Brin 5'-3'	Brin 3'-5'
Hprt (gène de référence)	NM_013556.2	tgatagatccattcctatgactgtaga	aagacattctttccagttaaagttgag
Gapdh (gène de référence)	NM_008084.2	ccggggctggcattgctctc	ggggtgggtggtccagggtt
Gusb (gène de référence)	NM_010368.1	ctctggtggccttacctgat	cagttgttgtcaccttcacctc
Agtr1b (AT1R)	NM_175086.3	gtgacatgatcccctgacagt	agtgagtgaactgtctagctaaatgc
Agtr2 (AT2R)	NM_007429.4	Sonde taqman, Assay ID: Mm01341373_m1 (Life Technologies)	
Ptgs1 (COX-1)	NM_008969.3	cctctttccaggagctcaca	tcgatgtcaccgtacagctc
Ptgs2 (COX-2)	NM_011198.3	gggagtctggaacattgtgaa	gcacattgtaagtaggtggactgt
Cyba (p22phox)	NM_007806.3	tgccctccacttcctgtt	gcagatagatcacactggcaat
Cybb (p91phox)	NM_007807.4	gaggttggttcggttttgg	gttttgaaagggtgggtgac
Ncf2 (p67phox)	NM_010877.4	ccaagacaacttttctggcttc	ttctggggttttgggtctg
Sod2 (Mn) (MnSOD)	NM_013671.3	gacccattgcaaggaacaa	gtagtaagcgtgctcccacac

Tableau 1 : Séquence des brins 3'-5' et 5'-3' des différents gènes explorés. Entre parenthèse, la protéine codée par chacun des gènes.

6. Histologie

6.1. Préparation des échantillons pour inclusion

Les échantillons destinés à des études histologiques (morphologie ou immunohistochimie) ont été placés dans une cupule contenant un milieu d'inclusion : l'OCT (Optimal Tissue Compound, Tissue-Teck, VWR, Radnor, PA, Etats-Unis). Ce composé est liquide à température ambiante et se solidifie à -10°C. Les cupules sont ensuite trempées dans un bain d'isopentane afin de solidifier l'OCT de façon douce et en permettant un maintien de la structure des tissus sans écrasement, puis conservées à -80°C avant coupe.

6.2. Coupes

Nous avons réalisé des coupes des échantillons ainsi inclus. L'épaisseur des coupes d'artères mésentériques était de 7µm, les coupes de rein ou de manchon veine-artère-graisse 10µm. Ces coupes ont été placées sur des lames superfrost ultraplus (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, Etats-Unis) qui permettent une adhérence maximale à la lame.

6.3. Traitement des coupes

6.3.1. Histomorphologie

Les mesures sur la structure des artères mésentériques ont été faites après coloration des lames avec de l'orcéine (violet) qui met en évidence les lames élastiques interne et externe, et à l'eau lithinée qui marque les noyaux (bleu).

Après fixation, les paramètres suivants ont été mesurés : périmètres interne et externe, épaisseur de la média. Ces paramètres ont ensuite servi au calcul du diamètre interne des artères, et de l'indice de remodelage (rapport entre l'épaisseur de la média et le diamètre interne des artères). Les paramètres mesurés sont illustrés en figure 20.

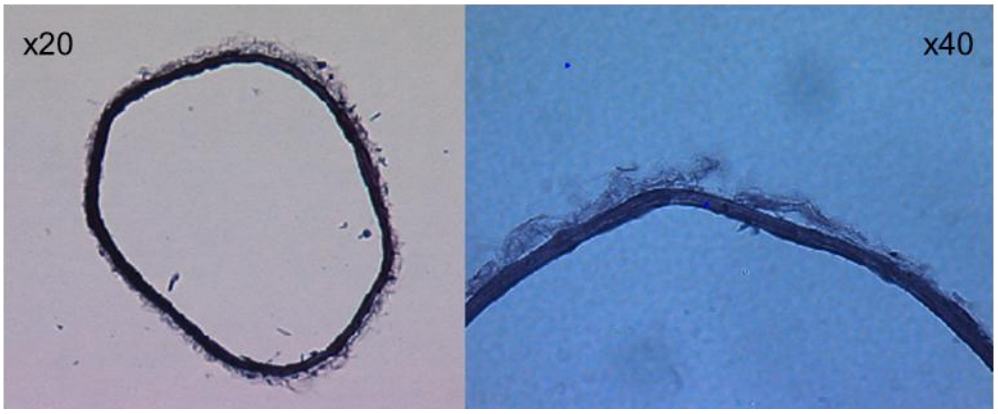

Figure 20 : Illustration des paramètres histologiques mesurés sur artères mésentériques pressurisées : les mesures de diamètres internes et externes ont été réalisées aux grossissements x10 ou x20 (à gauche), les mesures d'épaisseur de média sur des images au grossissement x40 (à droite).

6.3.2. Marquage des ROS

La détection des ROS a été faite en utilisant de le diacétate de 2',7'-dichlorodihydrofluorescéine (DCFDA). Ce marquage repose sur l'oxydation du DCFDA par les ROS en composé émettant une fluorescence verte proportionnelle à la quantité de ROS présents. Brièvement les artères mésentériques non pressurisées ont été coupées à 7µm d'épaisseur. Un marquage au DAPI pendant 30 minutes a été suivi d'une incubation avec le DCFDA à 30µM, pendant 45 minutes à température ambiante. Après 4 lavages au PBS, le montage a été fait avec du Mowiol qui est un milieu de montage alcoolique, et l'observation a été immédiate.

6.3.3. Traitement d'images

L'analyse des coupes colorées à l'orcéine a été réalisée à l'aide du logiciel ImageJ®.

7. Analyses statistiques

Les graphes et figures du présent manuscrit ont été réalisés à l'aide du logiciel GraphPad Prism®. Les analyses statistiques ont également été réalisées avec ce logiciel. Les résultats sont présentés sous forme

de moyennes ± sem. La significativité de la variance entre les différents échantillons a été déterminée par ANOVA, à deux facteurs pour les courbes doses réponses, à un facteur par ailleurs. Le test de Bonferoni a été utilisé en post-ANOVA pour les courbes doses réponses. L'ANOVA à un facteur a été suivie d'un test t ou d'un test de Bonferoni pour les autres résultats. Les tests ont été faits avec un risque de 5%.

Résultats

Premièrement, je développerai les résultats de l'article « **Angiotensin II type 2 receptor induces hypertrophy and reduces endothelium-mediated relaxation of resistance arteries in a mouse model of type 1 diabetes »,** en cours de soumission dans *Hypertension*

Je présenterai ensuite les résultats d'un travail parallèle réalisé chez des souris femelles. Puis j'exposerai les résultats obtenus sur le rôle métabolique d'AT2R et finirai par quelques données préliminaires sur le rôle d'AT2R dans le diabète de type 2. Ces résultats seront brièvement discutés consécutivement à leur présentation avant une discussion globale.

1. Article

"Angiotensin II type 2 receptor induces hypertrophy and reduces endothelium-mediated relaxation of resistance arteries in a mouse model of type 1 diabetes"

Marc-Antoine BEGORRE, Emilie VESSIERES, Bertrand TOUTAIN, Céline BAUJEAN, Bertrand BLONDEAU, Laurent LOUFRANI, CELINE FASSOT, Daniel HENRION.

Statut Article : en revision, *Hypertension*

1.1. Manuscrit soumis pour publication

ANGIOTENSIN II TYPE 2 RECEPTOR REDUCES ENDOTHELIAL RELAXATION OF RESISTANCE ARTERIES IN A MOUSE MODEL OF TYPE 1 DIABETES.

[1]Marc-Antoine BEGORRE, [1]Emilie VESSIERES, [1]Bertrand TOUTAIN, [1]Céline BAUJEAN, [2]Bertrand BLONDEAU, [1]Laurent LOUFRANI, [1]CELINE FASSOT, [1]Daniel HENRION.

[1]CNRS UMR 6214, INSERM U1083, CHU d'Angers, LUNAM et l'Université d'Angers, France
[2]INSERM, U872, Centre de recherche des Cordeliers, Université René Descartes, Université Pierre et Marie Curie, Paris, France

Short title: AT2R reduces endothelial relaxation in diabetes

Address for Correspondence:
Daniel Henrion, Pharm.D.,Ph.D.
CNRS UMR 6214 - INSERM U1083,
Faculté de Médecine,
49045 Angers,
FRANCE
Tel : 332 41 73 58 45
Fax : 332 41 73 58 95/96
E-mail : daniel.henrion@univ-angers.fr
Web site: www.bnmi.fr

Word count: 4756

Abstract

The renin-angiotensin system has a key role in cardiovascular homeostasis, mainly through activation of angiotensin II type 1 (AT1R) and type 2 (AT2R) receptors. Although AT2R usually opposes the effects of AT1R, with vasodilator and antitrophic properties, AT2R-dependent dilation is reduced in type 2 diabetic obese rats and AT2R induces contraction in hypertensive and aged rats. Thus we aimed to determine the role of AT2R in endothelium-mediated dilation in a mouse model of type 1 diabetes. Diabetes was induced in three-month-old mice by streptozotocin (150 mg/kg, ip). After 45 days, mesenteric resistance arteries were isolated and mounted on a wire myograph to measure vascular reactivity. Endothelium-dependent relaxation, reduced in diabetic mice arteries, was normalized after AT2R blockade (PD123319) as well as after cycloxygenase-2 (COX-2) (CAY10404) blockade or ROS reduction with tempol plus catalase. AT2R, COX-2 and NADPH-oxidase subunits (gp91phox and p22phox) gene expression was higher in arteries of diabetic mice than in control animals. In arteries isolated of diabetic AT2R-knockout mice endothelium-dependent relaxation and COX-2 and NADPH-oxidase subunits expression were equivalent to those measured in control mice, suggesting the central role of AT2R in the endothelial dysfunction. Although diabetes was associated with arterial hypertrophic remodeling in WT animals, no change in wall structure was observed in arteries of diabetic AT2R-knockout mice. The absence of AT2R did not prevent hyperglycaemia and body weight loss induced by streptozotocin. Thus, in a model of type 1 diabetes AT2R induced wall hypertrophy and reduced endothelium-dependent relaxation through the production of ROS and COX-2-derived prostanoid(s).

Key-words: angiotensin II type 2 receptor; endothelium; vascular; diabetes; vascular remodeling

Introduction:

Diabetes Mellitus is associated with cardiovascular disorders (CVD), which represent 70% of death in diabetic patients[1]. However, these CVD differ between the two forms of diabetes. In type 2 diabetes, hypertension, atherosclerosis, dyslipidemia represent the major pathologies derived from diabetes. As it is generally coupled with sedentary lifestyle or obesity, these factors accelerate and enhance morbidity and mortality among those patients. In type 1 diabetes, CVD result more from hyperglycemia with nephropathy, autonomic neuropathy, and microvascular complications. Dyslipidemia or hypertension may occur but would result from an increased cardiovascular risk[2]. Besides reduced endothelium-dependent dilation, an important hypertrophic remodeling occurs in resistance arteries from diabetic patients[3]. This remodeling has been linked to hyperglycemia and to the activation of the renin-angiotensin system (RAS).

The RAS is a key regulator of cardiovascular homeostasis. Angiotensin II activates two major receptors, the type 1 (AT1R) and the type 2 receptor (AT2R), both coupled to G-proteins. Adverse vascular remodeling observed in cardiovascular diseases is usually attributed to AT1R. The effects of AT2R are usually presented as counteracting the effects exerted by AT1R[4]. Nevertheless, in physiological ageing[5] or hypertension[6,7] AT2R is

associated with vasoconstriction. Furthermore, we have previously shown in type 2 diabetic rats that AT2R-dependent dilation is reduced due to COX-2-dependent production of thromboxane-A2 and reactive oxygen species[8].

Thus we aimed to determine the role of AT2R in endothelium-dependent relaxation and arterial remodeling in a model of streptozotocin (STZ)-induced diabetes in mice. The role of the AT2R was investigated using pharmacological tools as well as mice lacking the gene encoding the receptor (AT2R-/- mice). We hypothesized that AT2R might have a role in the endothelial dysfunction and hypertrophy associated to diabetes.

Research Design and Methods

Animals

Male wild-type (WT) and AT2R KO mice (AT2R-/-)[9] aged 3 to 6 months, were injected with streptozotocin (150 mg/kg, i.p., Sigma), in order to induce type 1 diabetes (n= 8 to 16 per group). Body weight and glycaemia (glucometer AccuChek Go®, Roche) were measured 1, 5, 10, 20, 30, 40 and 45 days after injection. After 45 days, animals were sacrificed by $C0_2$ inhalation. The thoracic aorta and segments of mesenteric arteries were gently dissected and placed in ice cold physiological salt solution (PPS) as described below. Other segments of the aorta and mesenteric arteries were excised and rapidly stored at -80°C.

The protocol was approved by the Committee on the Ethics of Animal Experiments of "Pays de la Loire" (permit # CEEA.2011.14).

Pharmacological profile of isolated mesenteric arteries

Four segments of first order mesenteric arteries were dissected and mounted on a wire-myograph (DMT, Aarhus, DK) as previously described10. Briefly, 2 tungsten wires (40 µm diameter) were inserted into the lumen of the arteries and fixed to a force transducer and a micrometer, respectively. Arteries were bathed in a PSS of the following composition (mM): 130, NaCl; 15, NaHCO3; 3.7, KCl; 1.2 KH2PO4; 1.2, $MgSO_4$; 11, glucose; 1.6, $CaCl_2$; and 5, HEPES, pH 7.4, PO_2 160 mmHg, PCO_2 37 mmHg. Wall tension was applied as described previously[11]. After 45 minutes arterial segments viability was tested using a potassium rich solution (KCl, 80 mmol/L). Endothelial function was then tested using acetylcholine (ACh, 10^{-6} mol/L) after precontraction with phenylephrine (Phe, 10^{-6} mol/L). After washout, a cumulative concentration-response curve to ACh (10^{-9} to 10^{-5} mol/L) was performed before and after pretreatment with one of the following drug: N(omega)-nitro-L-arginin methyl ester (L-NAME, 10^{-4} mol/L, 20 min), indomethacin (10^{-5} mol/L, 20 min), 1-Oxyl-2,2,6,6-tetramethyl-4-hydroxypiperidine (tempol, 10^{-5} mol/L, 20 min) plus catalase (80 U/mL, 20 min), the AT2R blocker PD123319 (10^{-5} mol/L, Sigma) or the selective COX-2 inhibitor CAY 10404 (10^{-5} mol/L, Cayman).

Histology

A fifth segment of mesenteric artery was bathed in Ca^{2+}-free PSS containing 10 µmol/L sodium nitroprusside (SNP) and 2 mmol/L ethylene-bis-(oxyethylenenitrolo) tetra-acetic acid (EGTA) and cannulated between 2 glass micropipettes. Pressure was then set at 75 mmHg, and the artery was fixed in a 4% buffered paraformaldehyde solution as previously described[12]. Sections (7 µm thick) were stained with orcein. External diameter, lumen diameter and media thickness were determined after images acquisition (Olympus T100 microscope, Sony camera) and analyzed using the Histolab software (Microvision, Paris, France) for remodeling index calculation as previously described[13].

Quantitative RT-PCR analysis

The mRNA levels for the following proteins were determined using Q-RT-PCR as previously described[14]: Segments of the aorta were dissected and stored in RNAlater® (Sigma) at -20°C until RNA extraction using the RNeasy® micro kit (Qiagen). Two hundred ng of total RNA extracted from each artery were used to synthesize cDNA for reverse transcription using the QuantiTect® Reverse Transcription kit (Qiagen) according to the manufacturer instruction. The Quantitative real-time PCR reactions were performed on a 7500 Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems) using Power SYBR® Green PCR Master Mix (Applied Biosystems) and gene-specific primers designed using Primer3 online software (please see http://hyper.ahajournals.org). All data were normalized to the House-keeping genes mRNA. Differences in transcript level were determined using the cycle threshold method as described by the manufacturer.

Statistical analysis

Results are expressed as means ± SEM. Significance of the difference between arteries was determined by ANOVA (1-way ANOVA for histological studies or 2-way ANOVA for concentration-response curves). Means were compared by paired t test (PCR analysis) or by Bonferroni test for multigroup comparisons. Kolmogorov-Smirnov test was used to assure values followed Gaussian distribution. Values of $p<0.05$ were considered to be significant. All statistical analysis were performed using Graphpad Prism® software.

Results:

Blood glucose and body weight

Streptozotocin-induced diabetes in all groups. Indeed, 45 days after injection, glycaemia was significantly higher in STZ-injected mice than in control animals (table 1). All diabetic animals showed loss of weight, but AT2R-/- mice lost more weight than WT animals.

Endothelium-dependent relaxation in diabetic animals

Acetylcholine induced a concentration-dependent relaxation of isolated mesenteric arteries. ACh-mediated relaxation was significantly lower in STZ-treated mice than in control animals (figure 1). The NO synthesis inhibitor L-NAME reduced significantly ACh-mediated relaxation whereas the addition of the COX inhibitor indomethacin had no further effect (figure 1).

In the presence of the AT2R blocker PD123319, ACh-mediated relaxation in diabetic mice was not significantly different from the relaxation measured in control mice (figure 1). On the other hand, in arteries isolated of non-diabetic mice, PD123319 had no significant effect. Similarly, ROS reduction with tempol and catalase and COX-2 inhibition with CAY 10404 increased Ach-mediated relaxation to control level in diabetic mice without affecting the relaxation in control mice (figure 1). Precontraction level was equivalent in all study groups (data not shown).

Q-RT PCR analysis

AT2R gene expression level was significantly higher in arteries isolated of diabetic mice than in control animals whereas AT1R level was not affected (figure 2). Similarly, COX-2 gene expression was increased in diabetic animals, not COX-1 (figure 2). The NAPDH-oxidase sub-units Gp91 and p22phox expression levels were also significantly greater in diabetic mice compared to control (figure 2). MnSOD and p67phox gene expression levels were similar in diabetic and control mice (figure 2).

Endothelium-dependent relaxation and Q-RT PCR analysis of AT2R KO mice

In mice lacking the gene encoding for AT2R, no difference in ACh-mediated relaxation was observed between STZ-treated and control animals (figure 3). NO synthesis inhibition with L-NAME significantly reduced ACh-mediated relaxation in control and in diabetic animals (figure 3). PD123319, tempol plus catalase and CAY 10404 affected ACh-mediated relaxation neither in diabetic mice nor in control AT2R-/- mice (figure 3). Precontraction level was equivalent in all study groups (data not shown).

By contrast with diabetic WT mice, NAPDH-oxidase sub-units Gp91 and p22phox expression level as well as COX-2 expression level were not significantly greater in diabetic knockout mice compared to control animals (figure 4).

Endothelium-independent relaxation and adrenergic receptors-dependent contraction

Endothelium-independent relaxation to sodium nitroprusside (SNP) and Phe-induced contraction were affected neither by diabetes nor by the absence of AT2R (figure 5).

Arterial diameter and structure

Diabetes induced hypertrophic remodeling in WT mice, evidenced by increased wall thickness and wall to lumen ratio whereas no hypertrophic remodeling was observed in AT2R-/- mice (figure 6). Lumen diameter was not affected by diabetes whereas it was larger in AT2R-/- mice than in WT animals (figure 6).

Discussion:

Our study evidenced the role of AT2R in endothelial dysfunction and arterial wall hypertrophy in a mouse model of type 1 diabetes.

In type 1 diabetes, hyperglycemia induced by a lack of insulin secreting cells leads to cardiovascular disorders. These later result mainly from endothelial dysfunction and arterial remodeling as evidenced in human3 and in rat resistance arteries[15].

The RAS has a major role in the development of both type 1[16,17] and type 2 diabetes[18,19]. The role of the AT1R in type 1 diabetes has been intensively studied over the past decades, due to its important role in nearly all type 1 diabetes-associated complications by increasing oxidative stress, endothelial dysfunction or decreasing insulin sensitivity[20]. Although the AT2R is usually described as opposing the effect of the AT1R, the AT2R may induce vasoconstriction in ageing5 or hypertension[6,21] in the rat. AT2R also induced vasoconstriction in subcutaneous gluteal arteries in untreated hypertensive patients[22]. In a rat model of type 2 diabetes, AT2R-mediated dilation is reduced due to the COX-2-dependent production of thromboxane-A2[8]. In the present study, we found that Ach-mediated relaxation in mesenteric resistance arteries of STZ-treated mice was improved and restored to control level in the presence of the AT2R blocker PD123319. This finding was confirmed using AT2R knockout mice. In STZ–treated AT2R knockout mice, relaxation was equivalent to that in non-diabetic animals although their glycaemia remained elevated. Furthermore, the same result (data not shown) was obtained in the aorta, indicating that AT2R-induced endothelial dysfunction linked to diabetes occurs both in resistance arteries and in large compliance blood vessels.

The endothelial dysfunction was associated with an excessive ROS production as evidenced by an increased gp91phox and p22phox expression. Moreover, a functional evidence of an excessive oxidative stress was provided by the effect of catalase and tempol, a SOD mimetic[23], on ACh-mediated relaxation. Indeed, catalase coupled with SOD or tempol suppresses acutely ROS production, thus allowing NO to induce relaxation[12,24]. In this condition, relaxation in diabetic mice was restored to control (non-diabetic) level suggesting that ROS actively reduced NO bioavailability. This observation is in agreement with previous studies showing the

involvement of ROS in the endothelium dysfunction associated with type 1 diabetes in both large[25] and resistance arteries20. ROS may reduce NO-dependent dilation mainly through direct NO scavenging[26] or alteration of eNOS dimerization. The defect in relaxation observed in diabetic mice mainly originated in endothelium as SNP-mediated relaxation was not affected.

The inhibition of COX-2 also restored ACh-mediated relaxation in diabetic mice to control level. This observation is in agreement with previous studies showing that COX-2 expression is increased in mesenteric arteries of type 2 diabetic rats although less information is available concerning type 1 diabetes. Interestingly, COX-2 inhibition and ROS reduction both restored complete ACh-mediated relaxation in diabetic to control level. This may suggest that they act sequentially. Indeed, COX-2 produces vasoactive prostanoids among which thromboxane A2, a potent vasoconstrictor agent[26]. Thromboxane-A2-mediated contraction is strongly reduced by ROS reduction with tempol or apocynin[8,27]. This observation is in agreement with our previous results obtained in ZDF rats[8] showing that AT2R stimulation leads to ROS generation by NADPH and COX-2 derived thromboxane-A2 generation.

Thus, COX-2 and ROS are involved in the reduction of ACh-mediated relaxation in the mesenteric resistance artery in a mouse model of type 1 diabetes. We previously found in a model of type 2 diabetes that COX-2 and ROS were also responsible for the reduction in endothelium-mediated relaxation[24,28]. Nevertheless, whereas blocking COX-2 and ROS production restores the relaxation to control level, AT2R blockade has no effect on ACh-mediated relaxation in type 2 diabetes (Vessieres and Henrion, unpublished observation) by contrast with the present study in type 1 diabetes. Indeed, in type 2 diabetes arterial dilation induced by the direct stimulation of the AT2R is also strongly reduced by COX-2 and ROS[8]. By contrast, in the present study, we found that AT2R is located upstream COX-2 activation and ROS production.

In order to confirm the role of AT2R in the endothelial dysfunction observed in diabetic mice, we treated AT2R knockout mice with STZ. Although diabetes developed in AT2R knockout mice, no endothelial dysfunction was observed in their mesenteric resistance arteries and the inhibition of COX-2 as well as ROS reduction were without effect. This finding confirms the central role of AT2R in the endothelial dysfunction observed in type 1 diabetic mice. Our observation that gp91phox and p22phox expression level was not affected in arteries of diabetic AT2R knockout mice supports the possibility that COX-2 and the NADPH-oxidase activation is located downstream AT2R. Furthermore, inflammation, visualized by COX-2 expression and oxidative stress evidenced by NADPH-oxidase activation are not directly activated by hyperglycemia in the arterial by rather through the activation of AT2R as neither hyperglycemia and weight loss were not affected by the absence of AT2R. Nevertheless, this issue requires further investigation. Although AT2R is usually presented as opposing the effects of AT1R with vasodilatory, antitrophic and pro-apoptotic properties[29] in pathological situations associated with some degree of oxidative stress and/or inflammation, AT2R may have different properties and induces vasoconstriction as shown in hypertension[6,21] and ageing[5]. Other components of the RAS such as the

mas receptor may not be involved in the dysfunction observed as their expression level was too low to be detected (data not shown).

Streptozotocin-mediated diabetes was also associated with hypertrophic remodeling of arteries as previously shown in both large[30] and resistance arteries in the same model and in type 2 diabetic rats/mice[31] and patients[32]. The media to lumen ratio is considered a good index of deleterious remodeling as shown in most diseases such as hypertension, type 1[33] and type 2[32] diabetes as well as in diabetes-induced atherosclerosis[34]. Interestingly, in AT2R-/- mice treated with STZ, media to lumen ratio was not increased by contrast with diabetic WT mice. This finding might suggest that AT2R was involved in the hypertrophy associated to diabetes. Previous studies have shown a role of AT2R in arterial wall hypertrophy. Indeed, in angiotensin II-induced hypertension in rat, chronic AT2R blockade prevents aortic hypertrophy and fibrosis of the thoracic aorta[35].

Conclusion

Thus, we found that AT2R was overexpressed in STZ-treated mice and induced both arterial wall hypertrophy and endothelium dysfunction. Interestingly, that AT2R was located upstream COX-2 and ROS production in type 1 diabetic mice suggests that AT2R might be a new therapeutic target. Its blockade might help reducing arterial damages in type 1 diabetes. Indeed, targeting AT2R instead of COX-2 and/or ROS might be more selective if the overexprespression of the receptor is limited to the vascular wall. This issue requires more investigation. Finally, caution should take in targeting AT2R as its stimulation may have protective effects after myocardial infarction and in hypertension-induced end organ damage 36.

Thus, the pathophysiology of the AT2R needs more investigation in order to better define whether its targeting in type 1 diabetes is a potential therapeutic tool. Nevertheless, the present study predict that its targeting might reduce wall hypertrophy and endothelial dysfunction in type 1 diabetes.

Acknowledgement:

Professor Lutz Hein generated the AT2R-/- mice and provided them for experiments.

MAB wrote the manuscript and researched data, EV, CB and BT researched data. CF, BB and LF contributed to discussion and reviewed/edited the manuscript. DH designed the protocol, obtained grants and wrote the manuscript.

Dr. Daniel Henrion is the guarantor of this work and, as such, had full access to all of the data in the study and takes responsibility for the integrity of the data and the accuracy of the data analysis.

Funding:

This work was supported in part by the French Society for Hypertension (SFHTA), Paris, France.

MAB was supported by a grant from the Region Pays de la Loire (PROVASC project), France.

Conflict of Interest: None declared.

References:

1. Nathan DM, Lachin J, Cleary P, Orchard T, Brillon DJ, Backlund JY, O'Leary DH, Genuth S. Intensive diabetes therapy and carotid intima-media thickness in type 1 diabetes mellitus. The New England journal of medicine. 2003;348:2294-2303
2. Roberts AW. Cardiovascular risk and prevention in diabetes mellitus. Clin Med. 2010;10:495-499
3. Rizzoni D, Rosei EA. Small artery remodeling in diabetes mellitus. Nutrition, metabolism, and cardiovascular diseases : NMCD. 2009;19:587-592
4. de Gasparo M, Catt KJ, Inagami T, Wright JW, Unger T. International union of pharmacology. Xxiii. The angiotensin ii receptors. Pharmacological reviews. 2000;52:415-472
5. Pinaud F, Bocquet A, Dumont O, Retailleau K, Baufreton C, Andriantsitohaina R, Loufrani L, Henrion D. Paradoxical role of angiotensin ii type 2 receptors in resistance arteries of old rats. Hypertension. 2007;50:96-102
6. Matrougui K, Levy BI, Henrion D. Tissue angiotensin ii and endothelin-1 modulate differently the response to flow in mesenteric resistance arteries of normotensive and spontaneously hypertensive rats. British journal of pharmacology. 2000;130:521-526
7. Qiu HY, Henrion D, Levy BI. Endogenous angiotensin II enhances phenylephrine-induced tone in hypertensive rats. Hypertension. 1994;24:317-321
8. Retailleau K, Belin de Chantemele EJ, Chanoine S, Guihot AL, Vessieres E, Toutain B, Faure S, Bagi Z, Loufrani L, Henrion D. Reactive oxygen species and cyclooxygenase 2-derived thromboxane a2 reduce angiotensin ii type 2 receptor vasorelaxation in diabetic rat resistance arteries. Hypertension. 2010;55:339-344
9. Hein L, Barsh GS, Pratt RE, Dzau VJ, Kobilka BK. Behavioural and cardiovascular effects of disrupting the angiotensin ii type-2 receptor in mice. Nature. 1995;377:744-747
10. Loufrani L, Matrougui K, Gorny D, Duriez M, Blanc I, Levy BI, Henrion D. Flow (shear stress)-induced endothelium-dependent dilation is altered in mice lacking the gene encoding for dystrophin. Circulation. 2001;103:864-870
11. Mulvany MJ, Halpern W. Contractile properties of small arterial resistance vessels in spontaneously hypertensive and normotensive rats. Circ Res. 1977;41:19-26
12. Bouvet C, Belin de Chantemele E, Guihot AL, Vessieres E, Bocquet A, Dumont O, Jardel A, Loufrani L, Moreau P, Henrion D. Flow-induced remodeling in resistance arteries from obese zucker rats is associated with endothelial dysfunction. Hypertension. 2007;50:248-254

13. Vessieres E, Belin de Chantemele EJ, Toutain B, Guihot AL, Jardel A, Loufrani L, Henrion D. Cyclooxygenase-2 inhibition restored endothelium-mediated relaxation in old obese zucker rat mesenteric arteries. Frontiers in physiology. 2010;1:145

14. Freidja ML, Tarhouni K, Toutain B, Fassot C, Loufrani L, Henrion D. The age-breaker alt-711 restores high blood flow-dependent remodeling in mesenteric resistance arteries in a rat model of type 2 diabetes. Diabetes. 2012;61:1562-1572

15. Zhang R, Thor D, Han X, Anderson L, Rahimian R. Sex differences in mesenteric endothelial function of streptozotocin-induced diabetic rats: A shift in the relative importance of edrfs. American journal of physiology. Heart and circulatory physiology. 2012

16. Hunyady L, Catt KJ. Pleiotropic at1 receptor signaling pathways mediating physiological and pathogenic actions of angiotensin ii. Mol Endocrinol. 2006;20:953-970

17. Cai H, Griendling KK, Harrison DG. The vascular nad(p)h oxidases as therapeutic targets in cardiovascular diseases. Trends in pharmacological sciences. 2003;24:471-478

18. Dzau VJ. Vascular renin-angiotensin: A possible autocrine or paracrine system in control of vascular function. Journal of cardiovascular pharmacology. 1984;6 Suppl 2:S377-382

19. Patel BM, Mehta AA. Aldosterone and angiotensin: Role in diabetes and cardiovascular diseases. European journal of pharmacology. 2012;697:1-12

20. Arrick DM, Sharpe GM, Sun H, Mayhan WG. Losartan improves impaired nitric oxide synthase-dependent dilatation of cerebral arterioles in type 1 diabetic rats. Brain research. 2008;1209:128-135

21. You D, Loufrani L, Baron C, Levy BI, Widdop RE, Henrion D. High blood pressure reduction reverses angiotensin ii type 2 receptor-mediated vasoconstriction into vasodilation in spontaneously hypertensive rats. Circulation. 2005;111:1006-1011

22. Savoia C, Touyz RM, Volpe M, Schiffrin EL. Angiotensin type 2 receptor in resistance arteries of type 2 diabetic hypertensive patients. Hypertension. 2007;49:341-346

23. Mitchell JB, Samuni A, Krishna MC, DeGraff WG, Ahn MS, Samuni U, Russo A. Biologically active metal-independent superoxide dismutase mimics. Biochemistry. 1990;29:2802-2807

24. Belin de Chantemele EJ, Vessieres E, Guihot AL, Toutain B, Maquignau M, Loufrani L, Henrion D. Type 2 diabetes severely impairs structural and functional adaptation of rat resistance arteries to chronic changes in blood flow. Cardiovascular research. 2009;81:788-796

25. Rajagopalan S, Kurz S, Munzel T, Tarpey M, Freeman BA, Griendling KK, Harrison DG. Angiotensin ii-mediated hypertension in the rat increases vascular superoxide production via membrane nadh/nadph oxidase activation. Contribution to alterations of vasomotor tone. J Clin Invest. 1996;97:1916-1923

26. Virdis A, Ghiadoni L, Taddei S. Human endothelial dysfunction: Edcfs. Pflugers Archiv : European journal of physiology. 2010;459:1015-1023

27. Cogolludo A, Frazziano G, Cobeno L, Moreno L, Lodi F, Villamor E, Tamargo J, Perez-Vizcaino F. Role of reactive oxygen species in kv channel inhibition and vasoconstriction induced by tp receptor activation in rat pulmonary arteries. Annals of the New York Academy of Sciences. 2006;1091:41-51

28. Vessieres E, Guihot AL, Toutain B, Maquigneau M, Fassot C, Loufrani L, Henrion D. Cox-2-derived prostanoids and oxidative stress additionally reduce endothelium-mediated relaxation in old type 2 diabetic rats. PloS one. 2013;8:e68217

29. Lemarie CA, Schiffrin EL. The angiotensin ii type 2 receptor in cardiovascular disease. Journal of the renin-angiotensin-aldosterone system : JRAAS. 2010;11:19-31

30. Searls Y, Smirnova IV, Vanhoose L, Fegley B, Loganathan R, Stehno-Bittel L. Time-dependent alterations in rat macrovessels with type 1 diabetes. Experimental diabetes research. 2012;2012:278620

31. Souza-Smith FM, Katz PS, Trask AJ, Stewart JA, Jr., Lord KC, Varner KJ, Vassallo DV, Lucchesi PA. Mesenteric resistance arteries in type 2 diabetic db/db mice undergo outward remodeling. PloS one. 2011;6:e23337

32. Endemann DH, Pu Q, De Ciuceis C, Savoia C, Virdis A, Neves MF, Touyz RM, Schiffrin EL. Persistent remodeling of resistance arteries in type 2 diabetic patients on antihypertensive treatment. Hypertension. 2004;43:399-404

33. Greenstein AS, Price A, Sonoyama K, Paisley A, Khavandi K, Withers S, Shaw L, Paniagua O, Malik RA, Heagerty AM. Eutrophic remodeling of small arteries in type 1 diabetes mellitus is enabled by metabolic control: A 10-year follow-up study. Hypertension. 2009;54:134-141

34. Palombo C, Kozakova M, Morizzo C, Gnesi L, Barsotti MC, Spontoni P, Massart F, Salvi P, Balbarini A, Saggese G, Di Stefano R, Federico G. Circulating endothelial progenitor cells and large artery structure and function in young subjects with uncomplicated type 1 diabetes. Cardiovascular diabetology. 2011;10:88

35. Levy BI, Benessiano J, Henrion D, Caputo L, Heymes C, Duriez M, Poitevin P, Samuel JL. Chronic blockade of at2-subtype receptors prevents the effect of angiotensin ii on the rat vascular structure. J Clin Invest. 1996;98:418-425

36. Steckelings UM, Larhed M, Hallberg A, Widdop RE, Jones ES, Wallinder C, Namsolleck P, Dahlof B, Unger T. Non-peptide at2-receptor agonists. Current opinion in pharmacology. 2011;11:187-192

New: The angiotensin II type 2 receptor is overexpressed in arteries of type 1 diabetic mice and is associated with endothelial dysfunction involving oxidative stress and cycloxygenase-2

Relevant: angiotensin II has a key role in diabetes and angiotensin II type 1 blockers are frequently given to patients although the role of the type 2 receptor (AT2R) remains insufficiently known. Our study highlights a potent effect of the AT2R, which should be taken into consideration in the treatment of diabetes.

Summary: We investigated the role of the angiotensin II type 2 receptor on endothelium-dependent relaxation in a mouse model of type 1 diabetes. Using pharmacological inhibitors and AT2R knockout mice, we found that arterial wall hypertrophy and the reduction in endothelium-dependent relaxation associated with diabetes were dependent on AT2R activation in the mesenteric resistance artery. AT2R-dependent endothelial dysfunction was due to the production of ROS and COX-2-derived prostanoid(s).

Table 1: Body weight and glycaemia measured in WT and AT2R$^{-/-}$ mice before and 45 days after STZ-injection. Mean ± sem is presented.

	WT		AT2R$^{-/-}$	
	CONT	STZ	CONT	STZ
N=	10	16	8	15
Weight day 1 (g)	28.9 ± 1.4	29.8 ± 1.1	31.1±1.3	32.4±0.8
Weight day 45 (g)	31.4 ± 1.0	27.2 ±1.0*	31.1±2.0	23.5±1.6$^{\$, ¤}$
Glycaemia day 1 (mmol/L)	8.13±0.5	8.22±0.6	8.33±0.4	8.96±0.7
Glycaemia day 45 (mmol/L)	7.80±0.4	26.6±1.8*	7.00±0.3	32.8±0.5$^{\$, ¤}$

* p<0.05: WT diabetic mice vs control

$ p<0.05: AT2R$^{-/-}$ diabetic mice vs control

¤ p<0.05: AT2R$^{-/-}$ diabetic mice vs WT diabetic mice

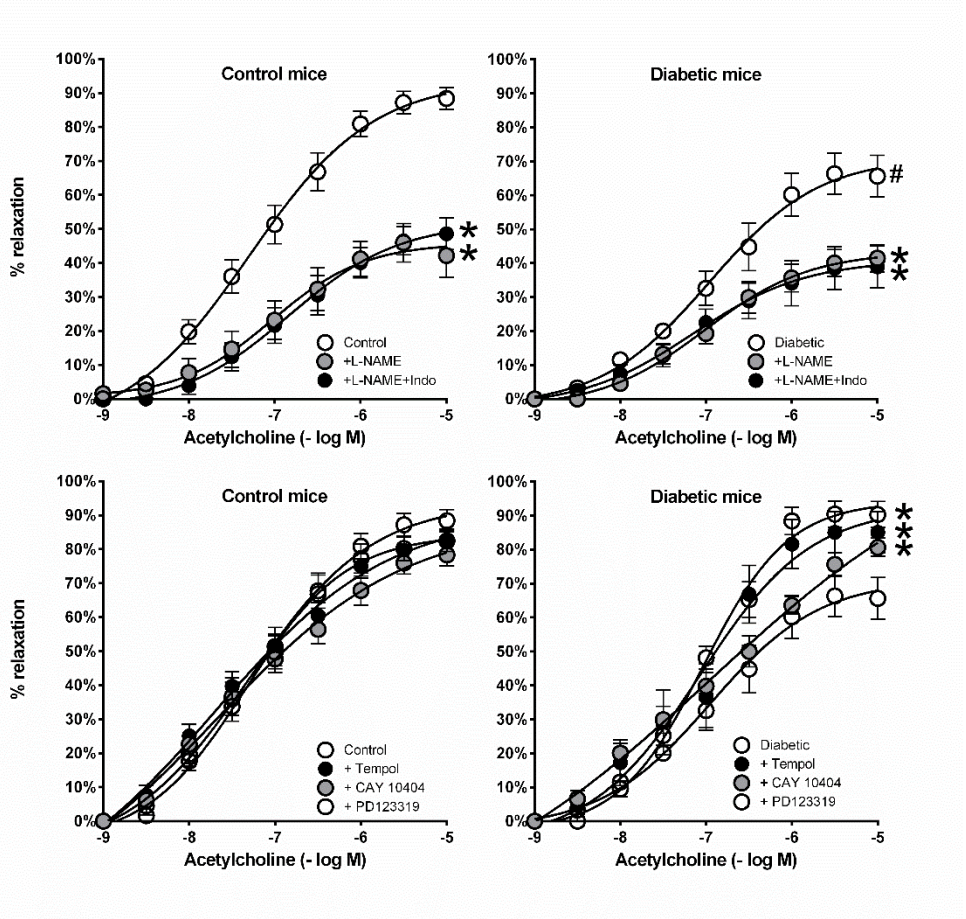

Figure 1: Acetylcholine-mediated relaxation performed in mesenteric arteries isolated from control (left panels) and diabetic mice (right panels)**.** Concentration-response curve to acetylcholine was repeated after inhibition of NO synthesis with L-NAME (10^{-5} mol/L) and both NO synthesis and COX inhibition with L-NAME (10^{-4} mol/L) plus indomethacin (10^{-5} mol/L) (L-NAME+indo) in control (A) or diabetic mice (B). In another group of experiments, concentration-response curve to acetylcholine was performed before and after ROS-scavenging (Tempol 10^{-5} mol/L and Catalase 10^{-5} mol/L, TEMPOL), AT2R blockade (PD123319 10^{-5} mol/L) or COX-2 blockade (CAY10404 10^{-5} mol/L) in control (C) or diabetic (D) mice. Mean ± sem is presented (n=9 per group)

* $p<0.05$: L-NAME and L-NAME + Indo vs control mice relaxation

# $p<0.05$: Diabetic mice vs control mice.

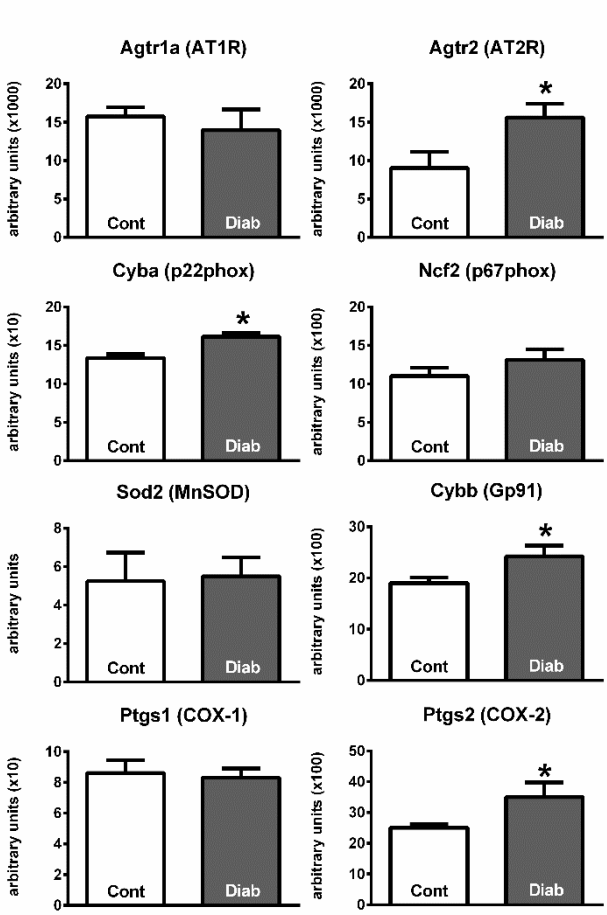

Figure 2: mRNA levels of AT1R, AT2R, COX-1, COX-2, MnSOD, Gp91, p67phox and p22phox in the aorta isolated from wild-type control or diabetic animals. Mean ± sem is presented (n=6 per group).

* $p<0.05$ Diabetic vs control mice

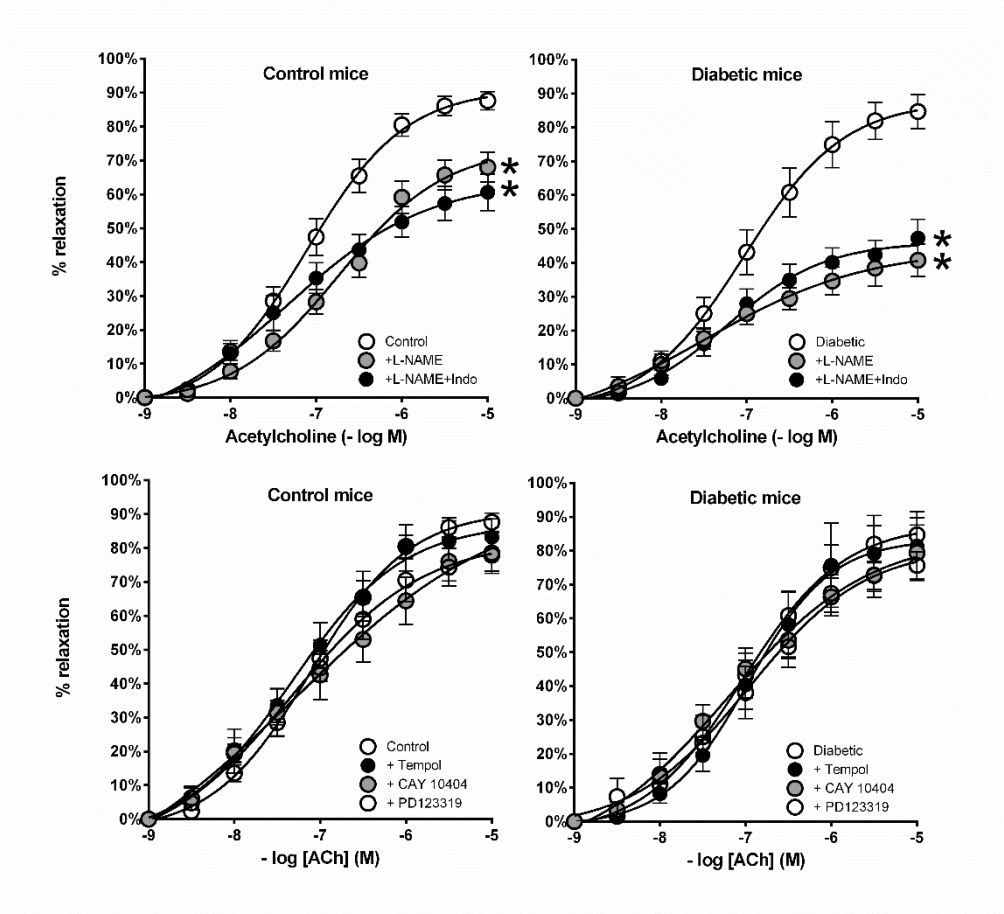

Figure 3: Acetylcholine-mediated relaxation performed in mesenteric arteries isolated from control (left panels) and diabetic (right panels) AT2R$^{-/-}$ mice**.** Concentration-response curve to acetylcholine was repeated after inhibition of NO synthesis with L-NAME (10^{-5} mol/L) and both NO synthesis and COX inhibition with L-NAME (10^{-4} mol/L) plus indomethacin (10^{-5} mol/L) (L-NAME+indo) in control (A) or diabetic mice (B). In another group of experiments, concentration-response curve to acetylcholine was performed before and after ROS-scavenging (Tempol 10^{-5} mol/L and Catalase 10^{-5} mol/L, TEMPOL), AT2R blockade (PD123319 10^{-5} mol/L) or COX-2 blockade (CAY10404 10^{-5} mol/L) in control (C) or diabetic (D) mice. Mean ± sem is presented (n=9 per group)

* $p<0.05$: L-NAME and L-NAME + Indo vs control mice relaxation

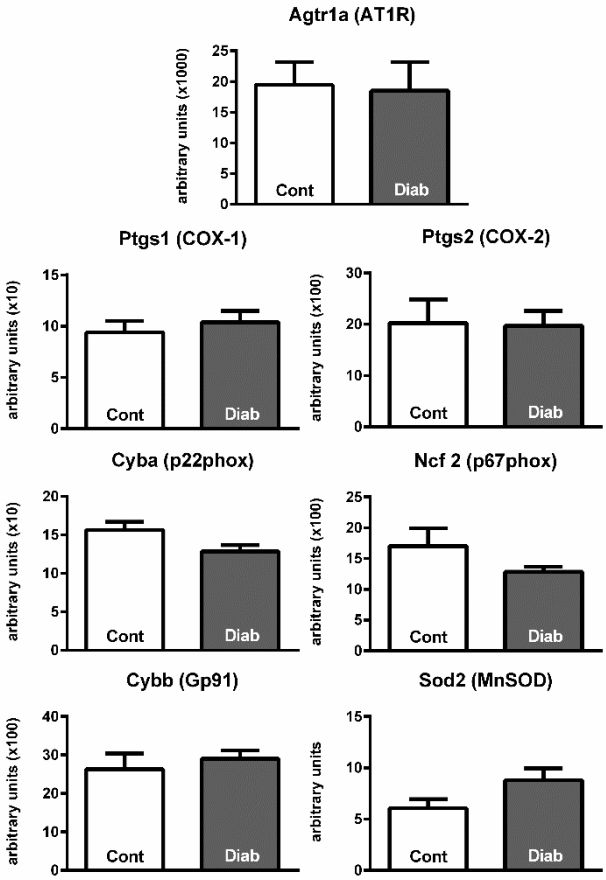

Figure 4: mRNA levels of AT1R, AT2R, COX-1, COX-2, MnSOD, Gp91, p67phox and p22phox in the aorta isolated from control or diabetic $AT2R^{-/-}$ mice. Mean ± sem is presented (n=6 per group).

* $p<0.05$ Diabetic vs control mice

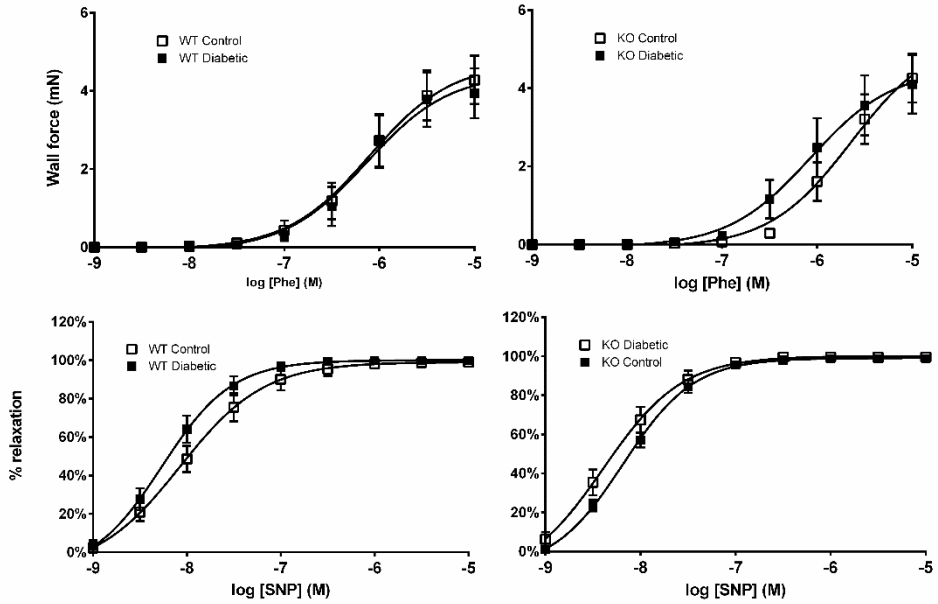

Figure 5: Panel A and B: SNP-mediated relaxation in wild-type control (WT control) or diabetic (WT diabetic), and AT2R$^{-/-}$ control (KO control) or diabetic (KO diabetic). Panel C and D: Phenylephrine-induced contraction in wild-type control (WT control) or diabetic (WT diabetic), and AT2R$^{-/-}$ control (KO control) or diabetic (KO diabetic). Mean ± sem is presented (n=9 per group).

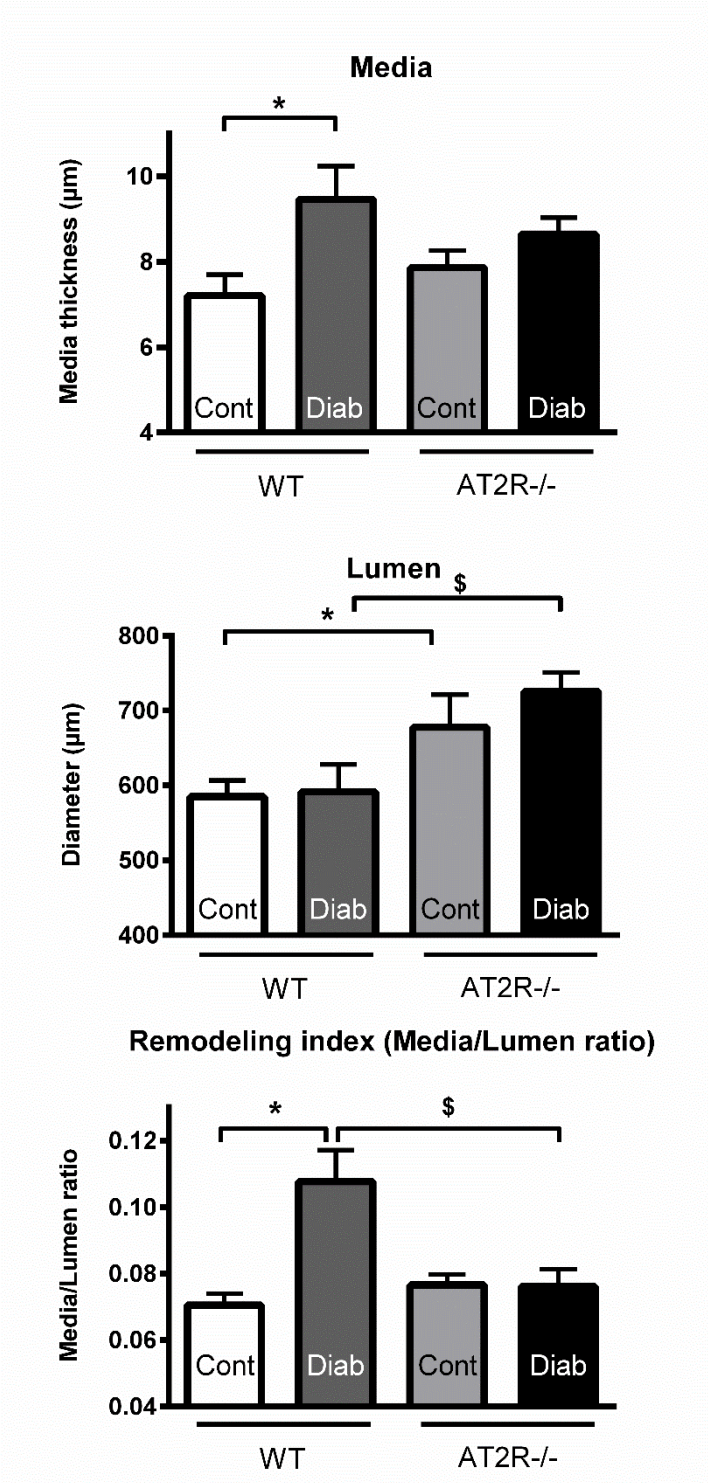

Figure 6: Media thickness, lumen diameter and remodeling index measured in wild-type (WT) and AT2R$^{-/-}$ (KO) animals, control (Cont) or diabetics (Diab). Mean ± sem is presented (n=6 per group).

* $p<0.05$ Media thickness from diabetic mice vs WT Control

$ $p<0.05$ Lumen diameter vs WT mice

# $p<0.05$ Remodeling index vs control WT and KO mice

1.2. Données complémentaires

1.2.1. Expression génique de la eNOS chez les souris WT et AT2R$^{-/-}$

Le niveau d'expression de la eNOS est plus important chez les souris AT2R$^{-/-}$, indépendamment du diabète (figure 21).

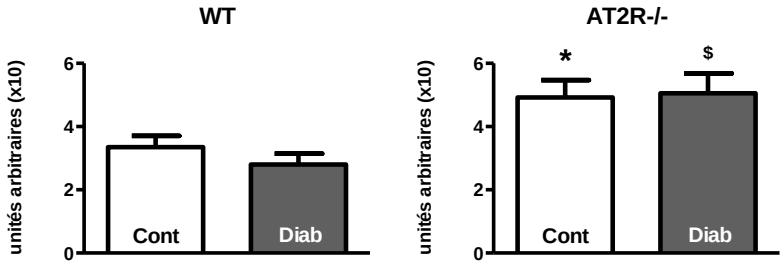

Figure 21 : Niveaux d'expression de la eNOS chez les souris WT et AT2R$^{-/-}$. Cont : souris contrôles ; Diab : souris diabétiques. *p<0.05 vs WT contrôles, $^{\$}$p<0.05 vs WT diabétiques. n=5 dans chaque groupe.

1.2.2. Réactivité sur aortes

Les résultats préliminaires des études en cours sur anneaux d'aorte semblent indiquer un rôle équivalent d'AT2R dans l'altération de la relaxation endothélium-dépendante induite par le diabète.

1.2.3. Immunohistochimie

La mise en place du protocole de marquage des ROS a permis d'obtenir des clichés tels que celui présenté en figure 22. Les ROS apparaissent en vert, et les noyaux cellulaires en bleu. Nous observons également les membranes élastiques interne (LEI) et externe (LEE) qui sont autofluorescentes dans le vert.

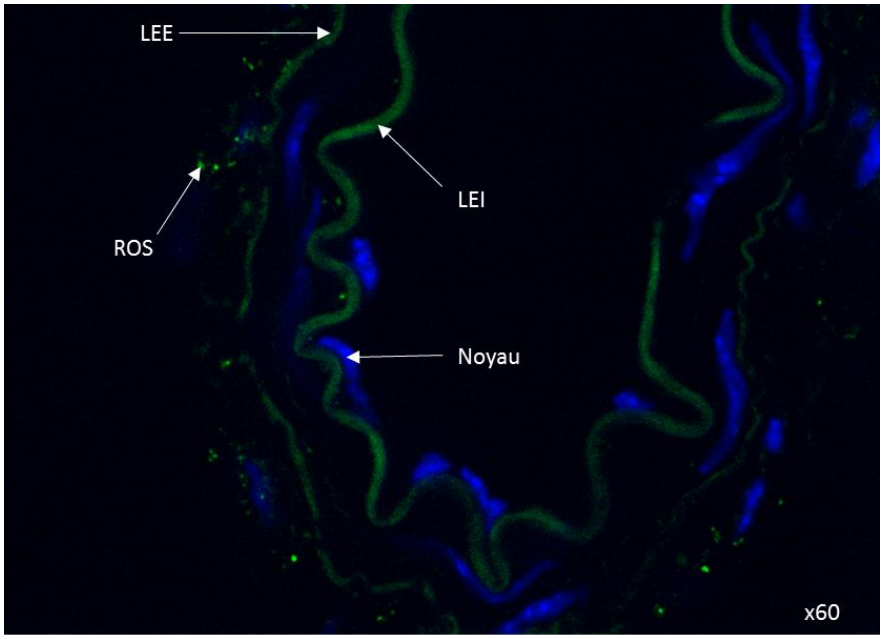

Figure 22 : Marquage des ROS au DCFDA sur coupe d'artère mésentérique non fixée. Les ROS apparaissent en vert, le noyau cellulaire en bleu (marquage DAPI), les limitantes élastiques interne (LEI) et externe (LEE) autofluorescent en vert. Grossissement x60.

1.3. Conclusions

Ces résultats montrent un rôle d'AT2R qui s'oppose à la vasodilatation des artères mésentériques et aortes par la production de ROS et une production de prostanoïde(s) vasoconstricteur(s) par COX-2. Ils montrent également un rôle d'AT2R dans le remodelage induit par le diabète.

2. Etude parallèle réalisée chez les souris femelles

2.1. Etudes chez les souris femelles WT

2.1.1. Réactivité des artères mésentériques

Le diabète induit une perte significative de relaxation par rapport aux souris contrôles (figure 23). L'inhibition des NOS induit une perte de relaxation chez les souris contrôles qui n'est pas significativement différentes chez les souris diabétiques (figure 23), sans influence supplémentaire de l'inhibition des COXs. De mêmes, le blocage de COX-2, la dégradation des ROS ou le blocage d'AT2R n'ont aucun effets chez les souris contrôles. Chez les souris diabétiques, on n'observe pas d'effet significatif, malgré une amélioration non significative par l'ajout du PD123319 (figure 23).

Les niveaux de précontraction à la phényléphrine et la relaxation endothélium-indépendante induite par le SNP ne sont pas différents dans les deux groupes (figure 24).

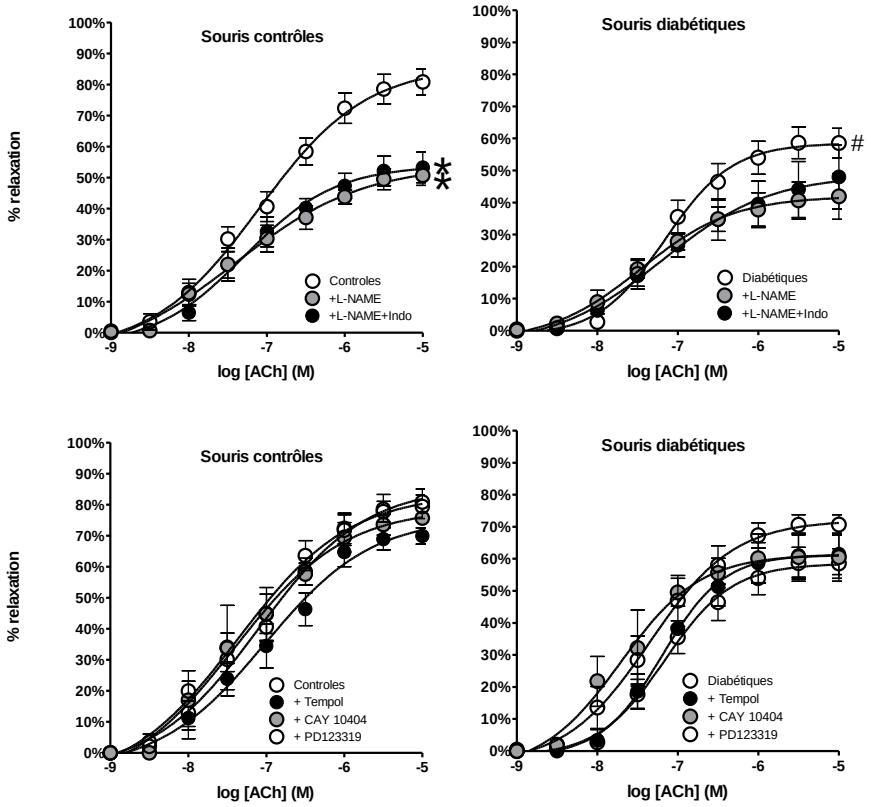

Figure 23 : Relaxation endothélium-dépendante chez les souris WT femelles. *p<0.05 vs contrôles. n=6 dans chaque groupe.

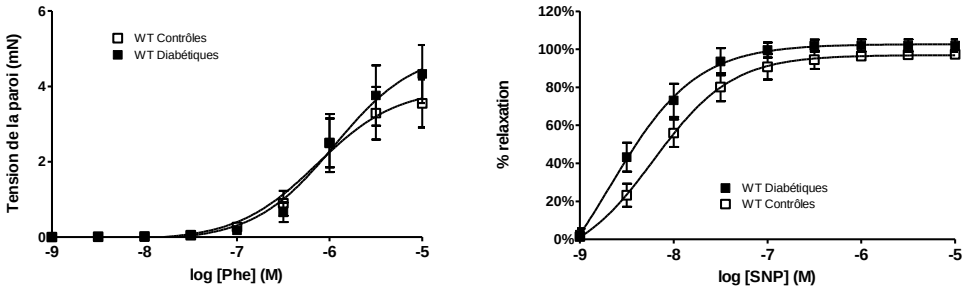

Figure 24 : Courbes de contraction à la phényléphrine (Phe) à gauche, et de relaxation au nitroprussiate de sodium (SNP) à droite chez les souris WT femelles. n=6 dans chaque groupe.

2.1.2. Réactivité des aortes

Les résultats préliminaires sur la réactivité aortique montrent un profil de relaxation équivalent pour les aortes par rapport aux artères mésentériques. Le rôle d'AT2R y semble donc équivalent. Ces expériences sont en cours de finalisation.

2.1.3. Expression des gènes des voies de relaxation impliquées

Comme chez les mâles, les niveaux d'expression des gènes codant pour les différentes protéines ciblées en réactivité sont corrélés aux résultats observés concernant la relaxation des artères mésentériques. L'expression du récepteur AT2R est augmentée chez les souris diabétiques, mais il n'y a pas de différence significative d'expression des sous-unités Nox, ou des COX. Nous observons même une baisse significative d'expression de MnSOD (figure 25).

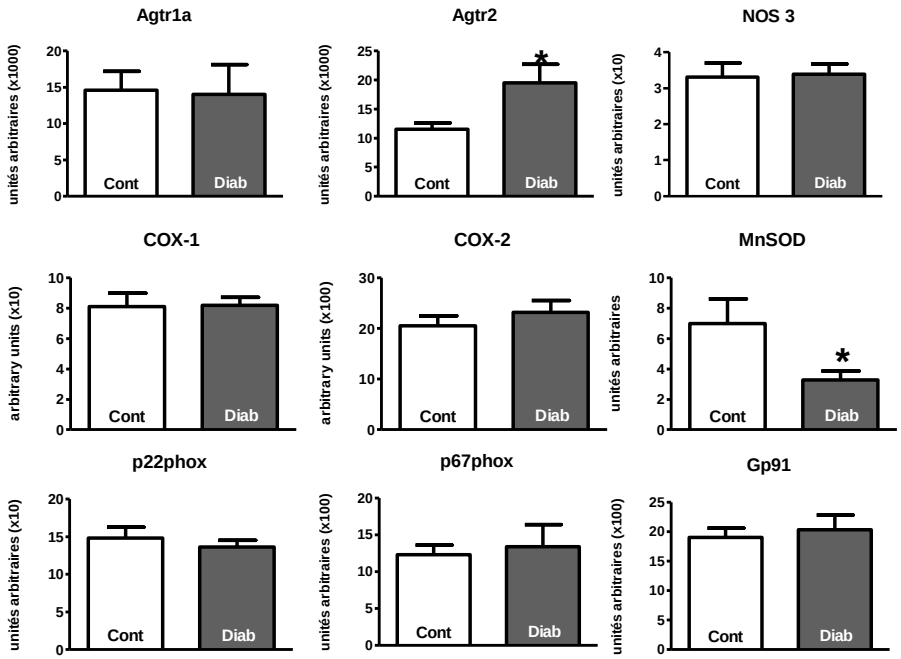

Figure 25 : Niveaux d'expression des gènes codant pour AT1R (Agtr1a), AT2R (Agtr2), eNOS (NOS 3), COX-1 et COX-2, la SOD (MnSOD), et les sous-unités NADPH-oxidase (p22phox, p67phox et Gp91) chez les souris WT femelles. Cont : contrôles ; Diab : diabétiques. *p<0.05 vs contrôles. n=5 dans chaque groupe

2.2. Etudes chez les souris femelles AT2R$^{-/-}$

2.2.1. Réactivité des artères mésentériques

Les niveaux de relaxation à l'ACh ne sont pas différents chez les souris AT2R$^{-/-}$ diabétiques et contrôles (figure 26). L'inhibition des NOS entraîne une perte de relaxation significative mais beaucoup plus faible que chez les souris WT, sans influence des COX (figure 26).

L'ajout d'inhibiteurs de COX-2, de bloqueurs AT2R ou la dégradation des ROS n'ont aucun effet sur la réactivité de ces artères (figure 26).

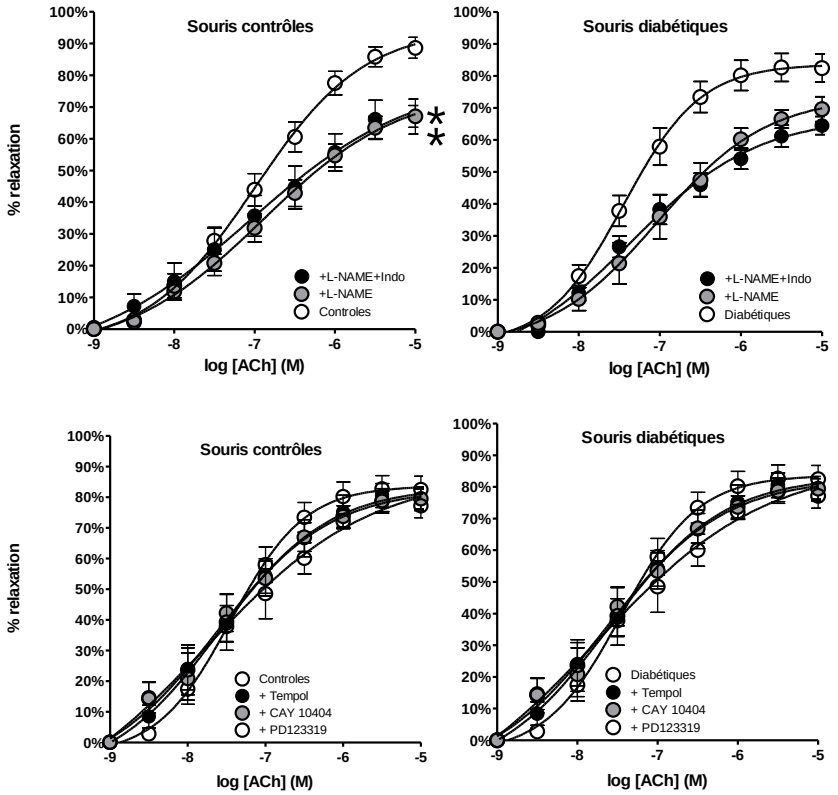

Figure 26 : Relaxation endothélium dépendante chez les souris AT2R$^{-/-}$ femelles. P<0.05 vs contrôles. n=8 dans chaque groupe.

Ici également, les valeurs de précontraction des artères à la Phe ou la relaxation indépendante de l'endothélium ne sont pas modifiés (figure 27).

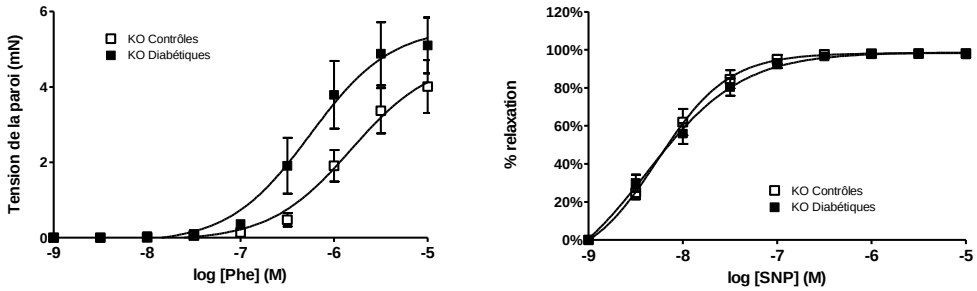

Figure 27 : Courbes de contraction à la phényléphrine (Phe) à gauche, et de relaxation au nitroprussiate de sodium (SNP) à droite chez les souris AT2R$^{-/-}$ femelles. n=8 dans chaque groupe.

2.2.2. Réactivité des aortes

Comme pour les artères mésentériques, le diabète n'altère pas la relaxation endothélium-dépendante des aortes dans ces groupes d'après nos résultats préliminaires. Le complément de ces résultats est en cours de réalisation.

2.2.3. Expression des gènes des voies de relaxation impliquées

Le profil d'expression des différents gènes est assez similaire à celui observé chez les souris WT. Nous ne retrouvons pas de différences significatives dans l'expression des différents ARNm (figure 28).

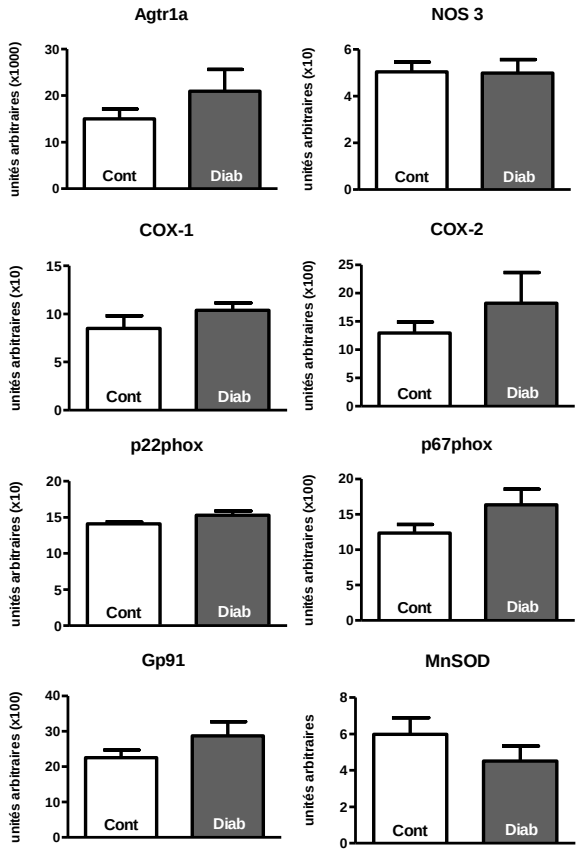

Figure 28 : Niveaux d'expression des gènes codant pour AT1R (Agtr1a), AT2R (Agtr2), COX-1 et COX-2, les sous-unités NADPH-oxidase (p22phox, p67phox et Gp91), et la SOD (MnSOD) chez les souris AT2R$^{-/-}$ femelles. Cont : contrôles ; Diab : diabétiques. *p<0.05 vs contrôles. n=5 dans chaque groupe

2.3. Histologie

Le diabète n'induit pas d'épaississement de la paroi dans nos différents groupes. Toutefois, bien que les différences ne soient pas significatives, on note que la média des souris AT2R$^{-/-}$ semble plus fine que celle des souris WT (figure 29).

Il existe par contre un remodelage expansif (par la dilatation des vaisseaux) chez les souris diabétiques WT, que l'on ne retrouve pas chez les souris AT2R$^{-/-}$. Surement car leur diamètre interne est plus important de façon basale (figure 29). Enfin, l'indice de remodelage des souris AT2R$^{-/-}$ semble également plus faible que celui des souris WT, malgré des différences non significatives (figure 29).

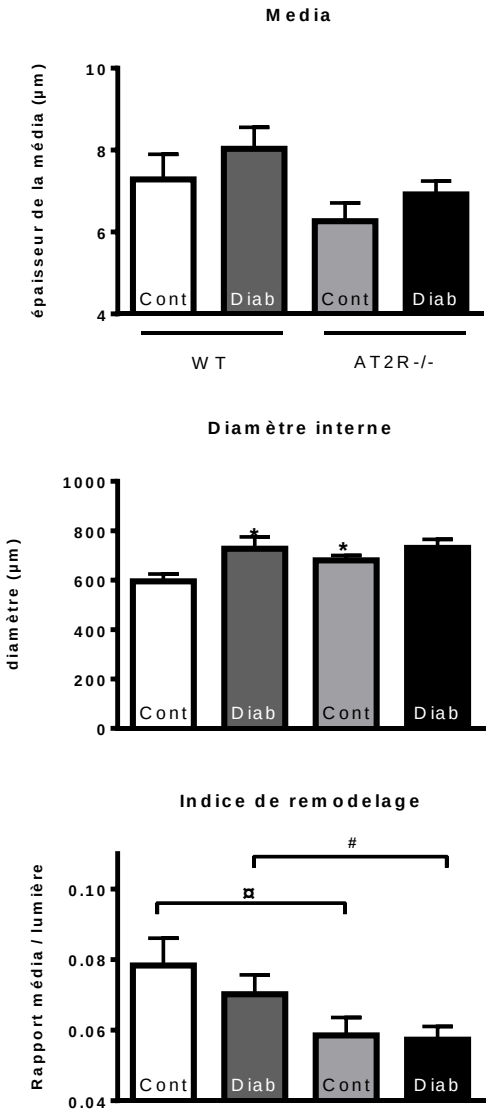

Figure 29 : Données histomorphologiques des souris femelles. En haut, épaisseur de la média ; au centre, diamètre interne ; en bas, indice de remodelage. WT : souris WT ; AT2R$^{-/-}$: souris AT2R$^{-/-}$; Cont : contrôles ; Diab : diabétiques. *p<0.05 vs WT contrôles ; #p<0.05 vs WT diabétiques. n=6 dans chaque groupe. n=7 dans chaque groupe

2.4. Conclusions

Chez les souris femelles, AT2R semble avoir un rôle aussi bien dans l'altération de fonction endothéliale que dans le développement d'un remodelage qui s'apparente ici à un remodelage expansif. Ces résultats qui impliquent AT2R n'ont toutefois pas permis de déterminer les mécanismes mis en jeu dans ces deux phénomènes.

3. Rôle d'AT2R dans le métabolisme et l'induction du diabète

3.1. Caractéristiques générales des souches FVB/N et AT2R$^{-/-}$

3.1.1. Poids et glycémie à jeun des souris

Les souris WT et AT2R$^{-/-}$ de 3 à 6 mois ont été pesés avant tout traitement. Nous observons chez les femelles un poids significativement plus important chez les AT2R$^{-/-}$ sur cette période (tableau 2). Ces résultats se retrouvent chez les mâles jusqu'à 4 mois, avant la superposition des courbes de croissance à partir de 5 mois (tableau 2).

		Poids (g)			
		3 mois	4 mois	5 mois	6 mois
WT	Femelles (n=12)	23,51±0,28	23,81±0,32	23,79±0,48	25,08±0,33
	Mâles (n=20)	26,52±0,48	29,03±0,64	31,99±0,64	32,32±0,5
AT2R$^{-/-}$	Femelles (n=12)	24,73±0,43***	26,68±0,35***	26,83±0,63***	26,82±0,77*
	Mâles (n=20)	30,66±0,44$$$	32,24±0,47$$$	31,68±0,81	33,04±1,32

Tableau 2 : Poids des souris WT et AT2R$^{-/-}$. *p<0.05 vs femelles WT. ***p<0.001 vs femelles WT, $^{\$\$}$p<0.01 vs mâles WT, $^{\$\$\$}$p<0.001 vs mâles WT.

D'autre part, la glycémie à jeun des souris n'est pas différente chez les souris WT, mais est supérieure chez les mâles AT2R$^{-/-}$ par rapport aux femelles de la même souche (tableau 3).

		Glycémie à jeun (mg/dL)
WT	Femelles (n=12)	121,6±5,4
	Mâles (n=20)	146,3±3,2
AT2R$^{-/-}$	Femelles (n=12)	119,8±4,2
	Mâles (n=20)	158,4±6,4$$

Tableau 3 : Glycémies à jeun dans les différents groupes. $^{\$\$}$p<0.01 vs mâles WT.

3.1.2. Comportement alimentaire et métabolisme

Chez les femelles, nous ne notons pas de différence dans la prise alimentaire (eau et nourriture) mais une diurie plus faible chez les AT2R$^{-/-}$ (figure 30). Chez les mâles, les souris AT2R$^{-/-}$ se nourrissent et s'hydratent moins, avec un métabolisme diminué (figure 30).

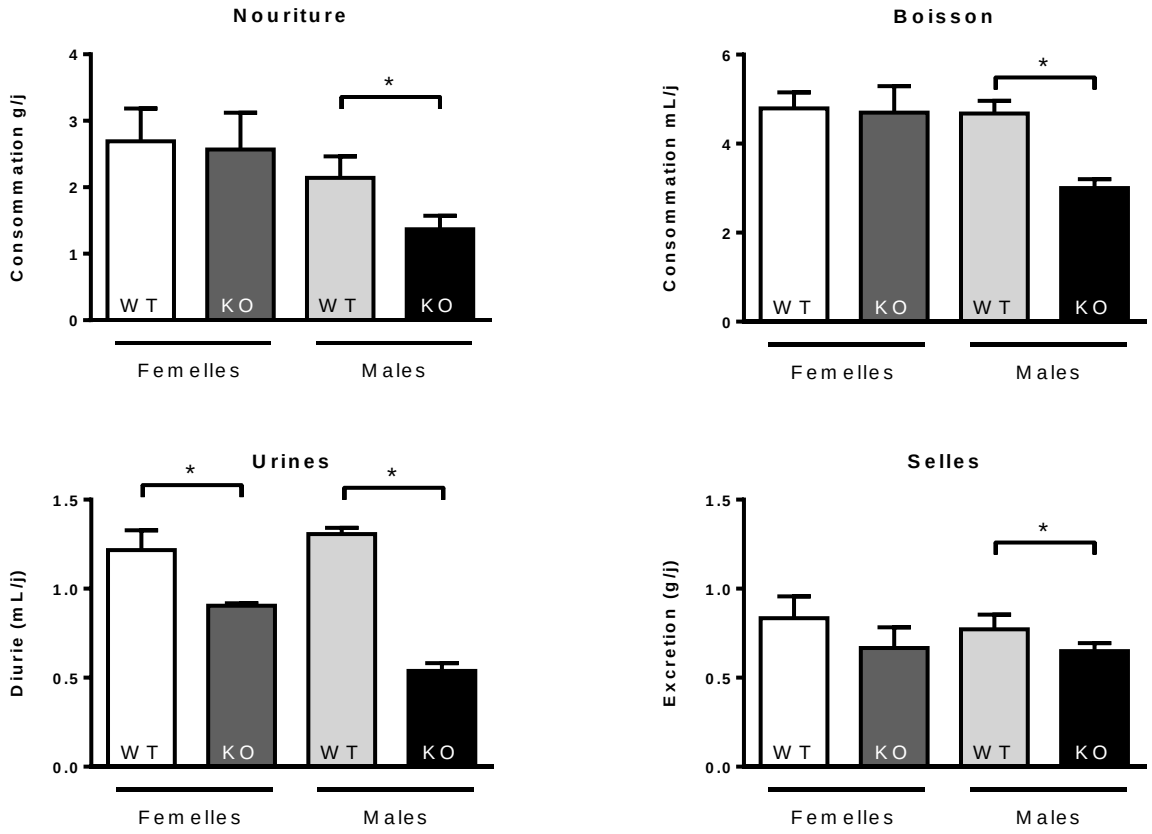

Figure 30 : Comportement alimentaire et excrétoire des souris mâles et femelles WT et AT2R$^{-/-}$. WT : souris WT, KO : souris AT2R$^{-/-}$. *p<0.05. n=10 dans chaque groupe.

3.1.3. Test de glycémie forcée

La sensibilité au glucose est plus forte chez les souris AT2R$^{-/-}$ sans différence liée au genre (figure 31).

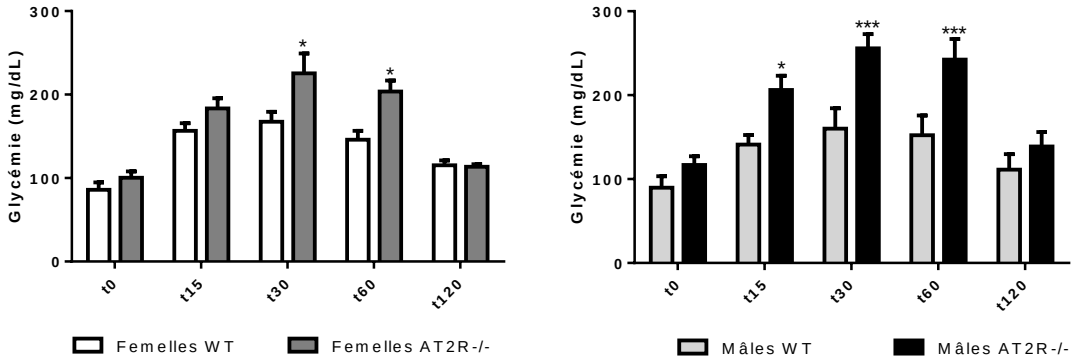

Figure 31 : Test de tolérance au glucose. *p<0.05 vs WT, ***p<0.001 vs WT. n=6 dans chaque groupe.

3.1.4. Test de tolérance à l'insuline

AT2R augmente la sensibilité à l'insuline chez les femelles, mais ne modifie pas ce paramètre chez les mâles (figure 32).

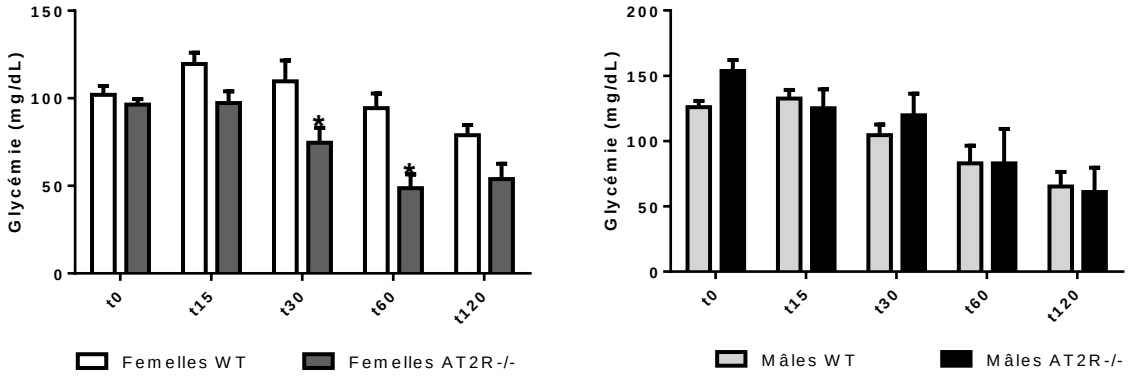

Figure 32 : Test de tolérance à l'insuline. *p<0.05 vs femelles WT

3.1. Contenus pancréatiques en insuline

Le contenu prancréatique en insuline rapporté au poids du pancréas est moins important chez les souris AT2R$^{-/-}$ par rapport aux souris WT. De plus, les femelles présentent un niveau d'insuline plus faible que les mâles. Une fois le diabète établit, la quantité d'insuline restante n'est pas différente entre les groupes (figure 33).

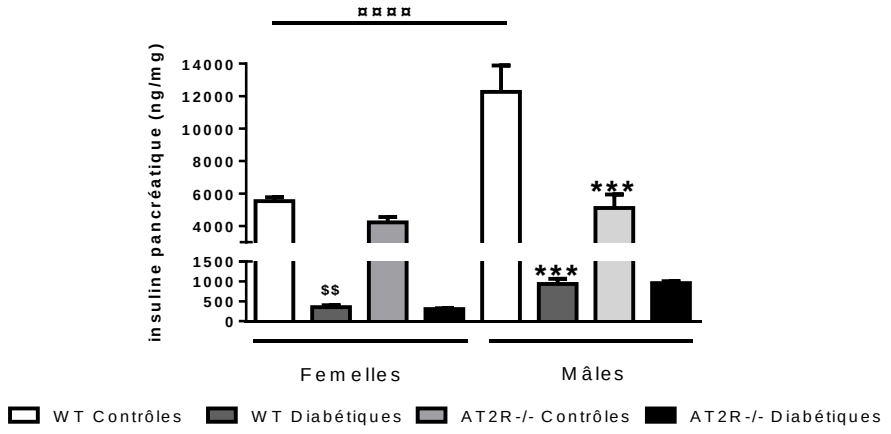

Figure 33 : Contenu en insuline pancréatique en ng par mg de pancréas; ***p<0,001 vs mâles WT contrôles ; $^{\$\$}$ p<0.01 vs femelles WT contrôles ; $^{¤¤¤¤}$p<0.0001. n=5 dans chaque groupe

3.2. Induction et développement du diabète de type 1

La streptozotocine a induit un diabète dans tous nos groupes. Cependant, le pourcentage d'souris devenus diabétiques est plus important chez les souris déficientes pour AT2R (figure 34).

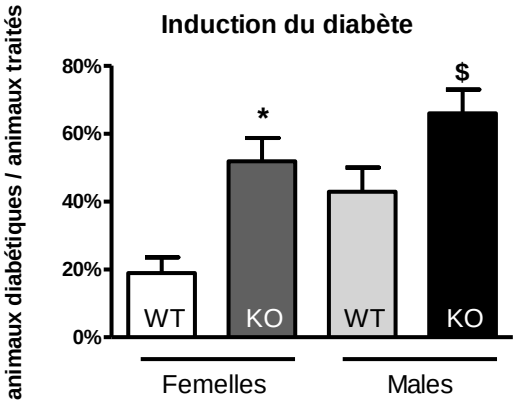

Figure 34 : Induction du diabète : pourcentage de souris devenues diabétiques par rapport au nombre de souris traitées. WT : souris WT ; KO : souris AT2R$^{-/-}$.*p<0.05 vs femelles WT.

Une fois le diabète induit, l'hyperglycémie est plus importante chez les mâles que chez les femelles, et encore plus élevée chez les souris AT2R$^{-/-}$ (figure 35).

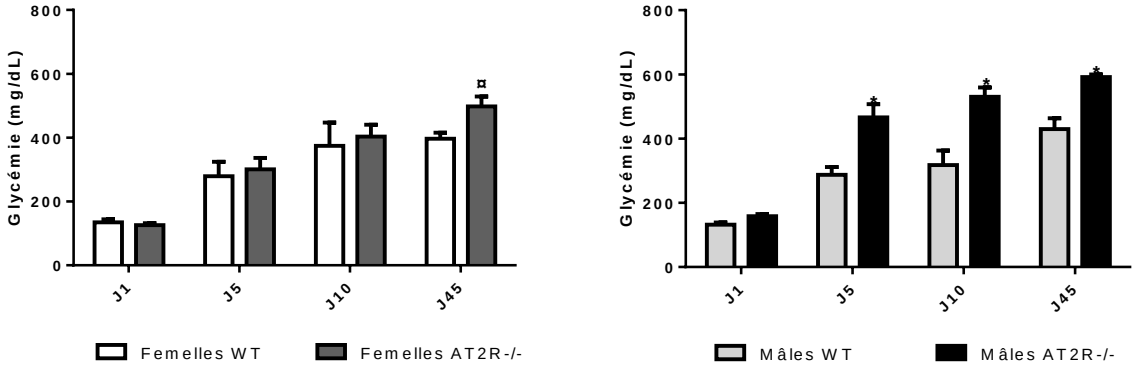

Figure 35 : Glycémies mesurées à J1, J5, J10 et J45 après l'injection de streptozotocine. Femelles WT (n=7), femelles AT2R$^{-/-}$ (n=10), mâles WT (n=8), mâles AT2R$^{-/-}$ (n=10). *p<0.05 vs autres groupes ; ¤p<0.05 vs femelles WT.

La perte de poids qui accompagne le diabète de type 1 est plus importante chez les souris mâles AT2R$^{-/-}$ par rapport aux souris WT. La proportion de perte de poids est également genre-dépendante au sein d'une même souche (figure 36).

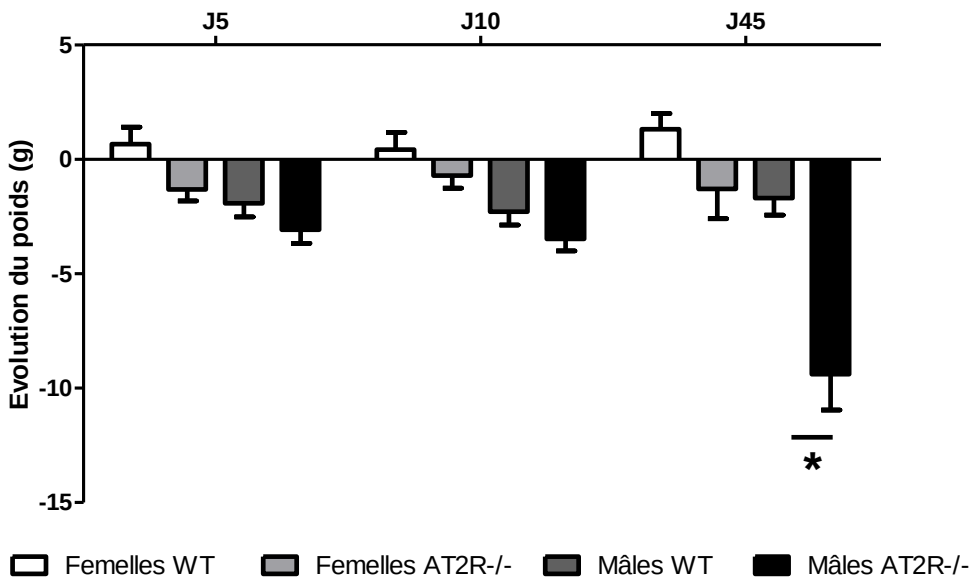

Figure 36 : Perte de poids chez les souris diabétiques. De gauche à droite : femelles WT (n=7), femelles AT2R$^{-/-}$ (n=10), mâles WT (n=8), mâles AT2R$^{-/-}$ (n=10). *p<0.05

3.3. Induction et développement du diabète de type 2

3.3.1. Comportement alimentaire

Les souris AT2R$^{-/-}$ se sont moins alimentés que les WT, avec une consommation en eau équivalente (figure 37).

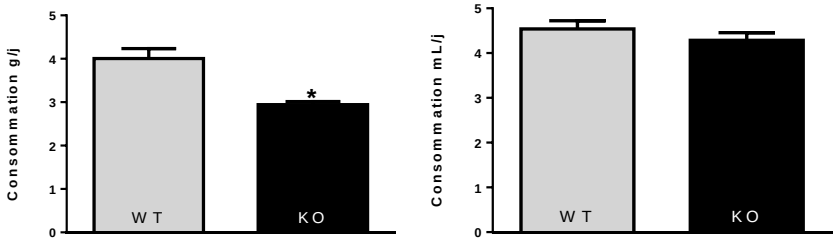

Figure 37 : Consommation en aliment (à gauche) et en eau (à droite) des souris soumises au régime enrichi en graisses. WT : souris WT ; AT2R$^{-/-}$: souris AT2R$^{-/-}$; *p<0.05 n=10 dans chaque groupe.

3.3.2. Induction et développement du diabète

Nous n'observons pas de différence d'induction du diabète de type 2 dans nos groupes (figure 38).

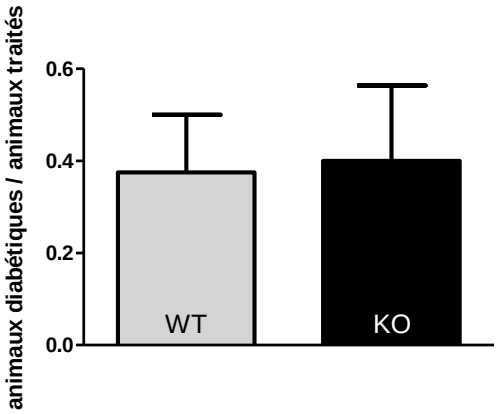

Figure 38 : Pourcentages d'induction du diabète chez les souris mâles alimentées par un régime enrichi en graisses. WT : souris WT ; AT2R$^{-/-}$: souris AT2R$^{-/-}$; *p<0.05 n=10 dans chaque groupe.

Nous observons cependant une prise de poids et une glycémie maximale très supérieures chez les souris AT2R$^{-/-}$. A noter que les souris AT2R$^{-/-}$ ont été euthanasiés à la 16ème semaine selon le protocole établi, alors que les souris WT ont été euthanasiées à la 22ème semaine (figure 39).

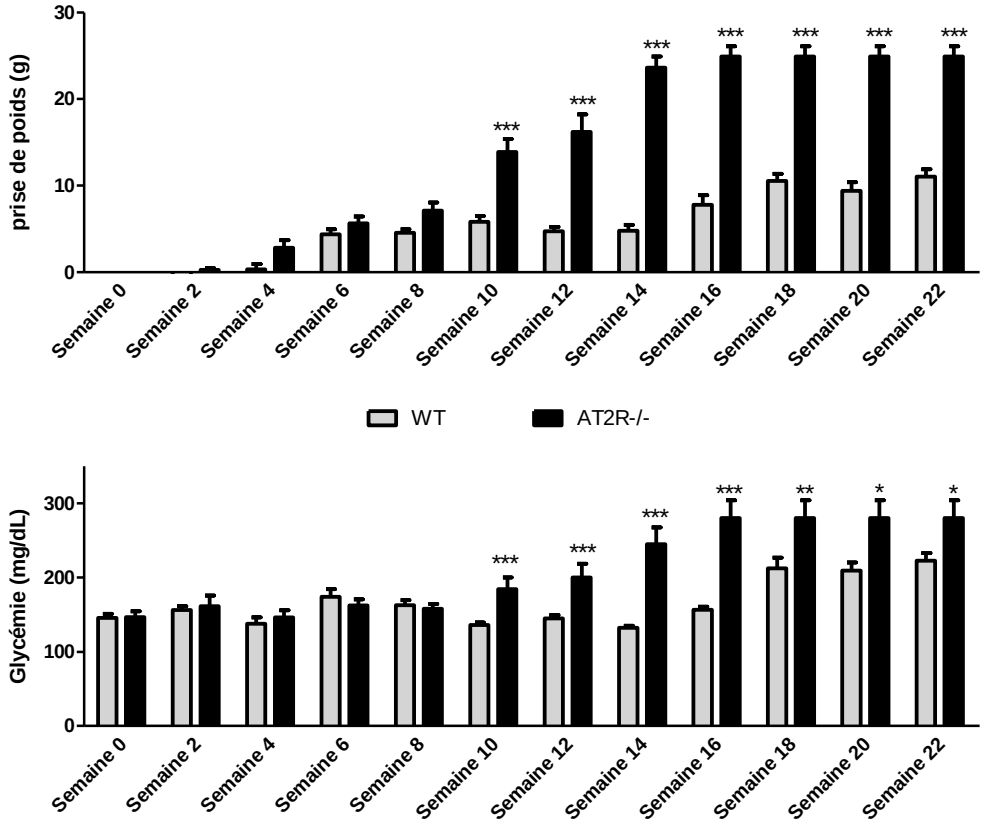

Figure 39 : Prise de poids et glycémies mesurées chez les souris mâles WT et AT2R$^{-/-}$ ayant un régime diabétogène. *p<0.05 ; **p<0.01 ; ***p<0.001

3.4. Conclusions

Les résultats obtenus ici montrent clairement un rôle d'AT2R dans le métabolisme. Aussi bien au niveau de la prise alimentaire que dans la mise en réserve et dans leur contrôle de la glycémie. En effet, les mesures de contenus pancréatiques en insuline confirment un rôle d'AT2R en faveur d'une sécrétion d'insuline. Son absence se traduit donc par une morbidité plus importante concernant les pathologies métaboliques comme le diabète, ainsi qu'un caractère plus sévère de celui-ci.

Discussion

A l'heure actuelle, la prise en charge du patient diabétique est un enjeu majeur de santé publique et nécessite une attention particulière si l'on considère les données suivantes : 347 millions de personnes sont touchées par cette pathologie dans le monde (OMS 2013) ; en France, le nombre de diabétiques a quasiment doublé entre 2000 et 2009 (INVS, 2010). Ce chiffre s'accompagne d'une augmentation du nombre de décès liés à la pathologie entre 2001 et 2006 (INVS 2010). Une meilleure approche thérapeutique est donc nécessaire en complément de la sensibilisation faite autour du diagnostic de cette pathologie.

Si les traitements de référence font intervenir de l'insuline à action rapide ou prolongée, et des antidiabétiques oraux, celui des complications liées au diabète fait surtout appel aux sartans, aux statines, anti-hypertenseurs, IEC (et autres médicaments du système cardiovasculaire). En effet l'hypertension artérielle touche environ 30% des sujets diabétiques de type 1 et 70% des sujets diabétiques de type 2 au niveau national.

Actuellement deux nouvelles thérapies alternatives sont en développement : la greffe de cellules pancréatiques et le pancréas artificiel.

La greffe de cellules pancréatiques a longtemps été retardée par défaut de conception de cellules capables de produire de l'insuline en quantité suffisante et à long terme. En 2011, une équipe française a finalement réussi à produire une lignée de cellules β stable et productrice d'insuline dans des proportions intéressantes (Ravassard et al., 2011). Cette lignée pourra servir de base à une meilleure compréhension du fonctionnement de la cellule β humaine et est actuellement en cours d'études précliniques.

Le développement du pancréas artificiel est assez nouveau. Le principe est d'utiliser une pompe à insuline couplée à une mesure continue de la glycémie, permettant d'injecter les bonnes doses au moment propice. Des études récentes ont montré un intérêt certain en utilisant une injection combinée d'insuline et de glucagon (Haidar et al., 2013). Ces techniques sont en cours de perfectionnement et nécessiteront plusieurs études cliniques afin de mieux en définir les modalités d'utilisation.

Ces traitements ne sont toutefois pas toujours suffisants pour contrôler l'évolution des complications liées au diabète et il est donc fondamentale de continuer à chercher de nouvelles cibles thérapeutiques. C'est ce que nous avons souhaité faire avec cette étude.

Le rôle d'AT2R a toujours été difficile à déterminer dans un contexte précis, sachant qu'il est censé s'opposer à AT1R avec ses effets vasodilatateurs (de Gasparo et al., 2000) mais qu'il peut aussi prendre un rôle différent dans le vieillissement (Pinaud et al., 2007) et l'hypertension artérielle (You et al., 2005). Il a été montré au laboratoire, en amont de ce travail, que la dilatation AT2R-dépendante des artères mésentériques de rats ZDF (modèle de diabète de type 2) était réduite par la production de ROS et de thromboxane-A_2 issu de COX-2 (Retailleau et al., 2010). Aussi il nous semblait important de pouvoir approfondir les mécanismes de cette dysfonction à l'aide d'un modèle murin de déficience en AT2R.

1. AT2R protecteur dans l'induction et le développement du diabète

Le but de notre étude s'est révélé d'autant plus pertinent que nous avons d'abord pu observer chez les souris AT2R$^{-/-}$ des différences métaboliques par rapport aux souris WT. En effet, nos données montrent une prise de poids plus rapide et plus importante chez les souris AT2R$^{-/-}$: phénomène continu chez les femelles mais stabilisé à quatre mois chez les mâles.

Nous avons souhaité aller plus loin et mesurer le comportement alimentaire et excrétoire de ces animaux. Malgré cette prise de poids plus rapide, les animaux AT2R$^{-/-}$ s'alimentent et boivent moins que les animaux WT. Ceci est bien le signe d'une capacité de mise en réserve plus importante ou de catabolisme ralenti chez ces animaux.

Ces résultats nous ont orientés vers le choix de l'âge des animaux à inclure dans le protocole. L'intérêt était de déterminer si nous observions des différences de comportement entre des animaux en cours de développement (3-4 mois) ou plus matures (5-6 mois) au cours de nos différents protocoles. Nos résultats ne nous ont pas montré de différences liées à l'âge durant ces expériences, et les résultats présentés résultent donc de la réunion des observations sur les animaux d'âge compris entre trois et six mois.

Ces premières observations ont toutefois conforté l'hypothèse d'une différence métabolique liée à AT2R, renforçant notre volonté d'étudier son rôle dans une pathologie métabolique comme le diabète.

Pour cela nous avons dans un premier temps utilisé un modèle de diabète de type 1. Le choix de ce modèle expérimental peut prêter à question. Il aurait pu sembler logique d'utiliser un diabète de type 2, plus représentatif de la pathologie dans la population, et qui avait servi de modèle aux études sur lesquelles nous nous sommes appuyées (Retailleau et al., 2010). Nous avons pourtant fait le choix de débuter cette étude sur un modèle de diabète de type 1 en nous appuyant sur les données obtenues par Leung et son équipe sur AT2R qui entraînerait une hypersécrétion d'insuline par le pancréas (Leung, 2007).

Nos résultats concernant le rôle d'AT2R dans l'induction et le développement du diabète sont très intéressants à considérer dans le traitement classique du diabète. En effet, l'inhibition d'AT1R provocant une surexpression d'AT2R (Jugdutt and Menon, 2004), nous pouvons imaginer que des patients diabétiques traités par un sartan pourraient bénéficier d'un effet protecteur qui n'a jusqu'à présent été qu'indirectement suggéré par l'équipe de Leung ou plus récemment dans un modèle de diabète de type 2 (Frantz et al., 2013). Nous montrons que les souris AT2R$^{-/-}$ possèdent un niveau basal d'insuline qui est environ deux fois plus faible que les souris WT donnant une explication au fait que les pourcentages d'induction du diabète étaient supérieurs chez les souris AT2R$^{-/-}$. Nous montrons également que les souris femelles sont moins sujettes à développer un diabète dans ce modèle. De façon surprenante, les souris femelles WT ont pourtant un niveau d'insuline plus faible que les souris mâles étudiées dans les mêmes conditions. Nous avons également montré qu'AT2R possède un effet positif dans la sensibilité des souris femelles à l'insuline. Ce résultat explique comment avec des niveaux d'insuline pancréatiques équivalents, la streptozocine ait eu un effet plus important chez les femelles AT2R$^{-/-}$.

Ceci est à étudier en mettant en parallèle le rôle d'AT2R avec celui des œstrogènes dans le développement du diabète. En effet, il a été décrit que les œstrogènes sont protecteurs vis-à-vis de l'instauration du diabète de type 1 dans un modèle murin de déficience en synthèse œstrogénique (Le May et al., 2006). Au-delà de l'unique observation des pourcentages d'induction du diabète, nous avons pu montrer que celui-ci se développe plus rapidement chez les animaux $AT2R^{-/-}$, et engendre une hyperglycémie qui est plus forte chez les mâles. Nous démontrons ici pour la première fois une synergie entre le rôle protecteur des œstrogènes et celui d'AT2R à ce niveau.

Dans un second temps, nous avons induit un diabète de type 2 chez nos animaux grâce à une alimentation riche en graisse (« high-fat diet »). Selon les recommandations du fabricant, le régime a été donné à des animaux de dix semaines. Là encore, nous avons observé une prise de poids plus rapide chez les animaux $AT2R^{-/-}$ associée à une hyperglycémie plus élevée, même si la sévérité du diabète est ici moindre que dans notre précédent modèle.

Le rôle protecteur d'AT2R au niveau du pancréas face au diabète est donc confirmé par ces résultats. Il reste à déterminer si une prolifération des cellules β peut expliquer à elle seule ces effets ou si elle est associée à un phénotype hypersécrétoire d'insuline. Pour explorer plus avant ces possibilités, nous avons déjà prévu d'étudier au niveau cellulaire l'influence d'un apport en angiotensine II en présence ou en absence de bloqueurs/activateurs des différents constituants du SRA. Nous avons également l'intention d'explorer le pancréas lui-même et notamment la masse de cellules β présente chez nos animaux, indépendamment du diabète dans un premier temps puis en condition diabétique. Ces différentes études devraient permettre une meilleure compréhension de la physiologie pancréatique du SRA et plus particulièrement d'AT2R au niveau pancréatique.

Cette étude semble d'autant plus importante à réaliser qu'il a déjà été montré qu'AT2R pouvait être protecteur en réduisant la fibrose du tissu pancréatique dans un modèle murin de fibrose induit par des injections répétées de céruléine (Ulmasov et al., 2009). Ce rôle pourrait s'étendre à d'autres tissus dont le foie, les poumons, et les glandes lacrimales dans lesquelles la fibrose a été réduite lors du blocage d'AT1R dans un modèle de rejet de transfert de cellules souches hématopoïétiques (Yaguchi et al., 2013).

D'autre part, l'interaction avec le récepteur B2 est aussi à étudier. Il semblerait en effet que les effets que nous avons observés sur l'activité du récepteur AT2R puissent être reliés à l'activité du récepteur B2, qui possède lui-même un rôle protecteur vis-à-vis des désordres glycémiques (Barros et al., 2012).

Cependant, d'autres territoires peuvent être directement impactés par ce rôle métabolique d'AT2R. Plusieurs mesures doivent être réalisées avant de limiter le rôle d'AT2R au pancréas. Il est nécessaire de déterminer si son rôle ne se localiserait pas également dans les autres tissus impliqués dans le métabolisme et les modifications de poids, notamment le foie et les reins.

Tout d'abord, il est important de considérer que le métabolisme glucidique comme lipidique est sous le contrôle de l'insuline. Ainsi, une augmentation de sécrétion en insuline, que ce soit par prolifération des cellules β ou par hypersécrétion sans modification de la masse de cellules β pourrait avoir des conséquences sur les différents tissus cibles de ces métabolismes : foie, rein, adipocytes et muscle.

Le rôle protecteur d'AT2R vis-à-vis de la fibrose hépatique est déjà connu mais il n'a pas été démontré d'effet sur la régulation du métabolisme à ce jour. Outre son rôle antifibrotique, il a été démontré qu'AT2R régule la production de VEGF dans le foie de souris diabétique (Day et al., 2010).

Au niveau adipocytaire, AT2R favorise la prolifération d'adipocytes normotrophiques là où AT1R favorise l'hypertrophie (Shum et al., 2013). Ainsi, déterminer dans nos deux modèles si les modifications de poids observées sont liées à une modification de la masse grasse sera un point important.

Au niveau rénal, AT2R est décrit comme étant protecteur face à des néphropathies chroniques (Benndorf et al., 2009). Plus récemment, il a été suggéré que la régulation de l'action d'AT2R à ce niveau pourrait être sous l'influence directe des AGE et de leurs récepteurs dont l'absence favorise l'effet protecteur d'AT2R (Sourris et al., 2010). Dans cette dernière étude, les auteurs ont retrouvé une hyperglycémie plus faible chez les souris $AT2R^{-/-}$ diabétiques par rapport aux souris WT. Ces données en opposition avec les résultats que nous avons obtenu sont à interpréter en prenant en compte le fait que la souche de souris diffère entre nos expériences et les leurs et que ceci peut avoir un retentissement sur la sensibilité à la streptozotocine. Enfin, il n'y a pas d'effets décrits d'AT2R dans la régulation métabolique au niveau du muscle squelettique. Ces différentes observations laissent à penser qu'AT2R peut avoir un rôle important dans les complications métaboliques liées au diabète de type 2 qui tiennent une place plus importante que dans le diabète de type 1.

2. Mais AT2R vasoconstricteur lorsque le diabète est établi

La suite de notre travail s'est focalisée sur le rôle vasculaire d'AT2R une fois le diabète développé. Nos premières observations nous ont permis de valider au niveau vasculaire le modèle utilisé. En effet, chez les souris mâles, le blocage d'AT2R, l'inhibition de COX-2 et l'ajout d'agents métabolisant les ROS ont permis de restaurer totalement la relaxation endothéliale des animaux diabétiques. Mais nous avons trouvé un profil différent chez les femelles où le blocage d'AT2R en cuve n'a pas amélioré de façon aussi importante la relaxation endothéliale, la dégradation des ROS et l'inhibition de COX-2 n'ayant pas d'impact sur les artères mésentériques de ces animaux. L'influence d'AT2R dans les altérations observées aussi bien chez les mâles que chez les femelles a finalement été mise en évidence par les études réalisées chez les animaux $AT2R^{-/-}$ qui n'ont pas présenté de baisse de leur relaxation endothéliale, sans que les bloqueurs COX-2 et ROS ne changent cette relaxation. Cela nous a conforté dans notre hypothèse d'un rôle vasoconstricteur d'AT2R au cours du diabète de type 1 chez ces animaux.

Afin de mieux comprendre les mécanismes mis en jeu, nous avons étudié les niveaux d'expression des gènes des différentes voies de relaxation perturbées au cours de nos études de réactivité. Ces mesures ne pouvant être réalisées sur artères mésentériques étant donné la quantité de tissu nécessaire par rapport au nombre d'artères disponibles après le montage en myographie, nous avons fait le choix d'effectuer ces mesures sur l'aorte.

Il fallait avant tout nous assurer de pouvoir réaliser ces études au niveau d'artères de conductance alors que nos études de réactivité impliquaient des artères de résistance. Nous avons donc étudié en plus des

artères mésentériques, la réactivité des aortes. Les résultats démontrent que la baisse réactivité endothéliale ne touche pas seulement les artères de résistance mais également les artères de conductance. En plus, nous avons observé dans l'aorte un rôle d'AT2R dans ces altérations, comme le montre l'effet du PD123319, et l'utilisation des souris $AT2R^{-/-}$. Cela nous permet d'étudier les modifications d'expression des gènes impliqués au niveau de l'aorte.

Nous avons ainsi pu montrer que le diabète engendre une surexpression de COX-2 et de plusieurs des sous-unités Nox chez les mâles WT, en parallèle d'une surexpression d'AT2R. Les niveaux d'expression d'autres composants du SRA (AT1R, récepteur Mas) ne sont pas modifiés. Chez les femelles, seule l'expression d'AT2R est augmentée par le diabète. Ces études, réalisées en parallèle chez les animaux $AT2R^{-/-}$ n'ont pas montré de différences dans les niveaux d'expression des gènes explorés.

Cela confirme donc d'une part qu'il existe un mécanisme par lequel AT2R favorise la synthèse de dérivés vasoconstricteurs via COX-2 et une surproduction de ROS chez les mâles. Le lien entre ces trois facteurs n'a pour l'instant pas été déterminé, mais nous pouvons toutefois formuler plusieurs hypothèses : nous savons que l'action vasodilatatrice d'AT2R passe notamment par une action conjointe avec le récepteur B2 de la bradykinine (Lemarie and Schiffrin, 2010) notamment via une hétérodimérisation (Abadir et al., 2006), relation qui pourrait être perturbée dans le diabète par manque de récepteur (Potier et al., 2013) ; de nouvelles hétérodimérisations sont à envisager (notamment avec AT1R) et pourraient être à l'origine d'une perte de la fonction vasodilatatrice (Barki-Harrington, 2004; Lyngso et al., 2009); enfin, il existe dans notre modèle de diabète une influence d'AT2R dans la relaxation NO-dépendante sur laquelle il serait intéressant de s'attarder.

3. AT2R et NO dans le diabète

Nous avons pu déterminer chez nos animaux WT que la relaxation NO-dépendante représente environ 50% de la relaxation endothélium-dépendante, et ce de façon indépendante du diabète.

Ces chiffres sont très inférieurs chez les animaux $AT2R^{-/-}$ où la proportion n'est plus que de 30%. Ceci est à mettre en parallèle de la surexpression de la eNOS que nous avons pu observer chez ces animaux. Nous pensons ici à un mécanisme de rétrocontrôle positif où une surexpression génique viendrait compenser un manque de biodisponibilité en NO. Cela correspondrait à ce que nous observons chez les animaux diabétiques où la relaxation NO-dépendante prend une part plus importante chez les mâles, alors qu'elle n'évolue pas chez les femelles.

Ces résultats sont également consistants avec l'altération de relaxation due au diabète que nous avons observé au niveau de l'aorte. En effet, au niveau des vaisseaux de conductance, la relaxation endothéliale est très majoritairement NO-dépendante. Il est donc envisageable qu'en présence d'AT2R, il y ait une altération de la relaxation NO-dépendante et ce par manque de substrat ou de eNOS. Nos études préliminaires sur l'aorte semblent indiquer que la relaxation endothélium-indépendante n'est pas perturbée par le diabète dans ces artères, et que la dégradation des ROS pourrait ne pas être suffisante pour améliorer de façon sensible la relaxation endothéliale. Ces études en cours de réalisation nous donneront

de nouveaux indices sur les mécanismes impliqués dans les altérations de relaxation observées au niveau des artères de compliance.

La réponse à cette hypothèse de manque de biodisponibilité du NO pourrait être apportée d'une part par la détermination d'expression protéique de la eNOS dans ces conditions, car la surexpression de son gène codant pourrait signifier qu'il existe un défaut de synthèse protéique ; d'autre part, il serait intéressant de renouveler ces expériences en explorant l'effet de L-Arginine en cuve, en présence ou en l'absence de BH_4. Selon cette hypothèse l'ajout de BH_4 ne devrait pas modifier la relaxation étant donné le faible niveau de ROS supposé par le manque d'efficacité du tempol associé à la catalase en cuve.

4. AT2R participe au remodelage constrictif induit par le diabète.

Le remodelage vasculaire est un phénomène d'adaptation de la structure des vaisseaux en réponse aux variations physiopathologiques (flux, pression, forces de cisaillement) et donc de protection de leurs fonctions.

Des études réalisées au laboratoire ont montré que le remodelage expansif induit par une augmentation de débit sanguin ainsi que l'amélioration de la fonction endothéliale associée étaient déficients chez les rats diabétiques (type 2, rats ZDF). Ce défaut de remodelage était en grande partie causé par l'accumulation d'AGEs (Vessieres et al., 2012).

Nous montrons dans notre modèle qu'il existe un remodelage AT2R-dépendant, chez les mâles et chez les femelles. Toutefois, ces deux types de remodelage observés sont différents selon le sexe : AT2R participe à la perte de relaxation observée chez les mâles en favorisant un remodelage de type constrictif ; sa participation est plus faible chez les femelles où d'autres facteurs favorisent un remodelage hypertrophique bénéfique pour les vaisseaux.

Chez les mâles, le remodelage constrictif observé est associé à une perte de relaxation endothéliale. Pour pouvoir mieux déterminer comment la media s'est hypertrophiée dans ce modèle, nous avons mis en parallèle les données obtenues de contraction à la phényléphrine. En effet, il est classique dans l'hypertension, qu'un remodelage constrictif soit associé à une contractilité plus importante des vaisseaux par un enrichissement de la media en cellules musculaires lisses (Mulvany, 2002). Ici, nous n'avons pas observé de différences de contraction à la phényléphrine, signe que cet épaississement de la media n'est pas dû à une augmentation de la teneur de celle-ci en CMLs. De futures études nous permettront de mieux définir quelles structures se sont mises en place au sein de la media de nos animaux diabétiques mais il est envisageable qu'elle se soit enrichie en facteurs de croissances, fibroblastes, collagène et autres facteurs inflammatoires comme cela a déjà été montré dans plusieurs modèles animaux de diabète (Sachidanandam et al., 2010; Zhou et al., 2012). Cela impliquerait un rôle nouveau d'AT2R dans le recrutement de ces facteurs dans le diabète de type 1.

Chez les femelles, le constat est différent : en effet les souris diabétiques qui présentent une perte de relaxation endothéliale, AT2R-dépendante, d'après nos résultats : surexpression chez les femelles WT diabétiques, relaxation non altérée chez les souris $AT2R^{-/-}$. Pourtant, le remodelage observé ici est un

remodelage hypertrophique avec un élargissement des artères mésentériques chez les souris diabétiques. Bien que cette composante soit absente chez les animaux AT2R$^{-/-}$, nous supposons que l'absence d'hypertrophie dans ces groupes soit due d'une part à une relaxation optimale, et d'autre part à un diamètre basal plus important. Nous pouvons donc imaginer donc que chez les souris femelles, le remodelage hypertrophique observé serait sous dépendance d'autres facteurs, comme les œstrogènes qui sont capables d'induire le remodelage au flux (Tarhouni et al., 2013) via le récepteur ERα. Nous supposons ici un rôle nouveau pour les œstrogènes dans le remodelage associé au diabète de type 1.

Concernant le diabète de type 2, les observations réalisées durant les expériences de myographie devront être mesurées par les études structurales sur les artères déjà prélevées. Si ces résultats confirment nos observations, à savoir des artères d'un diamètre plus faible, il serait intéressant de mesurer la pression artérielle de ces animaux afin de déterminer si dans ce modèle de type 2, les animaux ont développé une hypertension (qui résulterait alors d'une augmentation des résistances périphériques par diminution de la lumière des vaisseaux), et déterminer dans quelle mesure le récepteur AT2R peut influencer le développement de ces deux phénomènes (remodelage et hypertension) en traitant par exemple les animaux sous régime enrichi en graisses par du PD123319.

5. AT2R dans les complications du diabète de type 2

En parallèle des études menées sur le diabète de type 1, nous avons induit chez des souris mâles WT et AT2R$^{-/-}$ un diabète de type 2 à l'aide d'un régime diabétogène. Nous avons choisi de nous concentrer sur le genre masculin afin de pouvoir comparer sur les deux types de diabètes les effets des différents mécanismes que nous avons pu déterminer. Une étude équivalente sur les souris femelles restera à réaliser ultérieurement.

Les données recueillies restent préliminaires et sont à compléter avec d'autres animaux. Nous avons cependant pu confirmer qu'AT2R a, vis-à-vis de l'induction du diabète de type 2, le même effet protecteur que dans le diabète de type 1. En effet les animaux AT2R$^{-/-}$ ont plus rapidement pris du poids avec une prise de poids 20% supérieure aux animaux WT. De même, l'hyperglycémie était plus importante chez les animaux AT2R$^{-/-}$ et plus précoce par rapport aux WT. Cela nous ramène donc vers le rôle métabolique d'AT2R et les différentes études complémentaires à réaliser.

Ensuite, les études de réactivité des artères mésentériques d'animaux diabétiques ont mis en évidence le même profil de relaxation aussi bien chez les animaux WT que chez les animaux AT2R$^{-/-}$. Ici, les différents inhibiteurs utilisés n'ont pas permis en aigu d'améliorer la relaxation des animaux diabétiques, ce qui suggère un effet continu d'AT2R dans l'altération de relaxation observé.

Ces résultats restent toutefois à confirmer mais pourraient être d'ores et déjà complétés par des études avec des animaux traités par bloqueur COX-2 ou un agent métabolisant les ROS (tempol, apocynine). Les études de PCR permettront également de justifier ces traitements si l'on retrouve les mêmes profils d'expression des gènes que pour les animaux diabétiques de type 1.

Enfin, l'étude de structure des vaisseaux des animaux diabétiques sera également très intéressante. En effet, mes observations personnelles au cours des montages en myographie me donnaient l'impression d'artères mésentériques plus fragiles et plus petites chez les animaux WT par rapport aux animaux $AT2R^{-/-}$. Ces observations sous microscope resteront à confirmer par des mesures histologiques à réaliser sur les artères mésentériques pressurisées et inclues de la même façon que pour le protocole de diabète de type 1.

Conclusions

Les résultats obtenus durant ce doctorat ont permis de clarifier le rôle d'AT2R dans le diabète de type 1 et de confirmer les hypothèses venant des travaux précédents du laboratoire.

Au niveau métabolique, AT2R protège de l'induction du diabète et de son développement. Nous montrons aussi un rôle pancréatique d'AT2R dans la synthèse d'insuline.

Au niveau vasculaire, le rôle opposé à la relaxation d'AT2R par synthèse de ROS et de prostanoïde(s) vasoconstricteur(s) chez les mâles a été montré ici. Il serait intéressant de pouvoir déterminer quelles voies de signalisation sont impliquées dans la perte de relaxation observée chez les femelles. Nous pourrions alors peut être établir un lien AT2R-oestrogènes qui est supposé mais qui n'a pour l'instant pas été démontré. Il faudra également comparer l'influence des différents facteurs vasoconstricteurs entre les deux types de diabètes.

Enfin, les études structurales ont permis d'associer AT2R à un remodelage constrictif chez les mâles, possiblement suite à une accumulation dans la média de facteurs inflammatoires, et qui s'oppose ainsi au mécanisme protecteur que pourrait être un remodelage équivalent à ce que nous avons observé chez les femelles, où l'influence d'AT2R face à d'autres facteurs comme les œstrogènes semble plus faible.

Ces travaux sont aussi à la base de plusieurs projets afin d'aller plus loin dans ces études : la poursuite des études concernant le diabète de type 2 permettra de pouvoir comparer le rôle d'AT2R dans les deux types de diabète ; les études pancréatiques, hépatiques et adipocytaires amèneront à une meilleure compréhension du rôle métabolique d'AT2R.

Ces différents travaux présentent un véritable intérêt clinique dans le développement de nouvelles stratégies thérapeutiques face au diabète.

Bibliographie

Abadir, P.M., Foster, D.B., Crow, M., Cooke, C.A., Rucker, J.J., Jain, A., Smith, B.J., Burks, T.N., Cohn, R.D., Fedarko, N.S., *et al.* (2011). Identification and characterization of a functional mitochondrial angiotensin system. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America *108*, 14849-14854.

Abadir, P.M., Periasamy, A., Carey, R.M., and Siragy, H.M. (2006). Angiotensin II type 2 receptor-bradykinin B2 receptor functional heterodimerization. Hypertension *48*, 316-322.

Al-Abri, S.A., Hayashi, S., Thoren, K.L., and Olson, K.R. (2013). Metformin overdose-induced hypoglycemia in the absence of other antidiabetic drugs. Clin Toxicol (Phila) *51*, 444-447.

Alberghina, M. (2010). Phospholipase A(2): new lessons from endothelial cells. Microvascular research *80*, 280-285.

Atkinson, M.A., and Eisenbarth, G.S. (2001). Type 1 diabetes: new perspectives on disease pathogenesis and treatment. The Lancet *358*, 221-229.

Barki-Harrington, L. (2004). Oligomerisation of angiotensin receptors: novel aspects in disease and drug therapy. Journal of the renin-angiotensin-aldosterone system : JRAAS *5*, 49-52.

Barros, C.C., Haro, A., Russo, F.J., Schadock, I., Almeida, S.S., Reis, F.C., Moraes, M.R., Haidar, A., Hirata, A.E., Mori, M., *et al.* (2012). Bradykinin inhibits hepatic gluconeogenesis in obese mice. Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology *92*, 1419-1427.

Belin de Chantemele, E.J., Vessieres, E., Guihot, A.L., Toutain, B., Maquignau, M., Loufrani, L., and Henrion, D. (2009). Type 2 diabetes severely impairs structural and functional adaptation of rat resistance arteries to chronic changes in blood flow. Cardiovascular research *81*, 788-796.

Benndorf, R.A., Krebs, C., Hirsch-Hoffmann, B., Schwedhelm, E., Cieslar, G., Schmidt-Haupt, R., Steinmetz, O.M., Meyer-Schwesinger, C., Thaiss, F., Haddad, M., *et al.* (2009). Angiotensin II type 2 receptor deficiency aggravates renal injury and reduces survival in chronic kidney disease in mice. Kidney international *75*, 1039-1049.

Bogatcheva, N.V., Sergeeva, M.G., Dudek, S.M., and Verin, A.D. (2005). Arachidonic acid cascade in endothelial pathobiology. Microvascular research *69*, 107-127.

Bouvet, C., Belin de Chantemele, E., Guihot, A.L., Vessieres, E., Bocquet, A., Dumont, O., Jardel, A., Loufrani, L., Moreau, P., and Henrion, D. (2007). Flow-induced remodeling in resistance arteries from obese Zucker rats is associated with endothelial dysfunction. Hypertension *50*, 248-254.

Brindisi, M.C., Bouillet, B., Verges, B., and Halimi, S. (2010). Cardiovascular complications in type 1 diabetes mellitus. Diabetes Metab *36*, 341-344.

Buus, C.L., Pourageaud, F., Fazzi, G.E., Janssen, G., Mulvany, M.J., and De Mey, J.G. (2001). Smooth muscle cell changes during flow-related remodeling of rat mesenteric resistance arteries. Circ Res *89*, 180-186.

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

Cheng, Q., and Leung, P.S. (2011). An update on the islet renin-angiotensin system. Peptides *32*, 1087-1095.

Clark, J.M., and Glagov, S. (1976). Luminal surface of distended arteries by scanning electron microscopy: eliminating configurational and technical artefacts. British journal of experimental pathology *57*, 129-135.

Clark, J.M., and Glagov, S. (1985). Transmural organization of the arterial media. The lamellar unit revisited. Arteriosclerosis *5*, 19-34.

Cousin, M., Custaud, M.A., Baron-Menguy, C., Toutain, B., Dumont, O., Guihot, A.L., Vessieres, E., Subra, J.F., Henrion, D., and Loufrani, L. (2010). Role of angiotensin II in the remodeling induced by a chronic increase in flow in rat mesenteric resistance arteries. Hypertension *55*, 109-115.

Day, R.T., Cavaglieri Rde, C., Tabatabaimir, H., Mantravadi, V., Lee, M.J., Barnes, J.L., Kasinath, B.S., and Feliers, D. (2010). Acute hyperglycemia rapidly stimulates VEGF mRNA translation in the kidney. Role of angiotensin type 2 receptor (AT2). Cellular signalling *22*, 1849-1857.

de Gasparo, M., Catt, K.J., Inagami, T., Wright, J.W., and Unger, T. (2000). International union of pharmacology. XXIII. The angiotensin II receptors. Pharmacological reviews *52*, 415-472.

Dolosi, G. (2010). Quelques données sur la physiopathologie de l'athérosclérose.

Dumont, O., Loufrani, L., and Henrion, D. (2007). Key role of the NO-pathway and matrix metalloprotease-9 in high blood flow-induced remodeling of rat resistance arteries. Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology *27*, 317-324.

Dumont, O., Pinaud, F., Guihot, A.L., Baufreton, C., Loufrani, L., and Henrion, D. (2008). Alteration in flow (shear stress)-induced remodelling in rat resistance arteries with aging: improvement by a treatment with hydralazine. Cardiovascular research *77*, 600-608.

Dzau, V.J. (1984). Vascular renin-angiotensin: a possible autocrine or paracrine system in control of vascular function. Journal of cardiovascular pharmacology *6 Suppl 2*, S377-382.

Edwards, G., Feletou, M., and Weston, A.H. (2010). Endothelium-derived hyperpolarising factors and associated pathways: a synopsis. Pflugers Archiv : European journal of physiology *459*, 863-879.

Endemann, D.H., Pu, Q., De Ciuceis, C., Savoia, C., Virdis, A., Neves, M.F., Touyz, R.M., and Schiffrin, E.L. (2004). Persistent remodeling of resistance arteries in type 2 diabetic patients on antihypertensive treatment. Hypertension *43*, 399-404.

Flammer, A.J., and Luscher, T.F. (2010). Human endothelial dysfunction: EDRFs. Pflugers Archiv : European journal of physiology *459*, 1005-1013.

Foretz, M., Hebrard, S., Leclerc, J., Zarrinpashneh, E., Soty, M., Mithieux, G., Sakamoto, K., Andreelli, F., and Viollet, B. (2010). Metformin inhibits hepatic gluconeogenesis in mice independently of the LKB1/AMPK pathway via a decrease in hepatic energy state. J Clin Invest *120*, 2355-2369.

Frantz, E.D., Crespo-Mascarenhas, C., Barreto-Vianna, A.R., Aguila, M.B., and Mandarim-de-Lacerda, C.A. (2013). Renin-angiotensin system blockers protect pancreatic islets against diet-induced obesity and insulin resistance in mice. PloS one *8*, e67192.

Freidja, M.L., Tarhouni, K., Toutain, B., Fassot, C., Loufrani, L., and Henrion, D. (2012). The AGE-breaker ALT-711 restores high blood flow-dependent remodeling in mesenteric resistance arteries in a rat model of type 2 diabetes. Diabetes *61*, 1562-1572.

Furchgott, R.F., and Zawadzki, J.V. (1980). The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. Nature *288*, 373-376.

Ganten, D., and Speck, G. (1978). The brain renin-angiotensin system: a model for the synthesis of peptides in the brain. Biochemical pharmacology *27*, 2379-2389.

Gerhard, M., and Ganz, P. (1995). How do we explain the clinical benefits of estrogen? From bedside to bench. Circulation *92*, 5-8.

Ghiadoni, L., Versari, D., and Taddei, S. (2008). Phosphodiesterase 5 inhibition in essential hypertension. Current hypertension reports *10*, 52-57.

Gomez Sanchez, E.P. (2009). Central mineralocorticoid receptors and cardiovascular disease. Neuroendocrinology *90*, 245-250.

Gruetter, C.A., Barry, B.K., McNamara, D.B., Kadowitz, P.J., and Ignarro, L.J. (1980). Coronary arterial relaxation and guanylate cyclase activation by cigarette smoke, N'-nitrosonornicotine and nitric oxide. The Journal of pharmacology and experimental therapeutics *214*, 9-15.

Gwathmey, T.M., Alzayadneh, E.M., Pendergrass, K.D., and Chappell, M.C. (2012). Novel roles of nuclear angiotensin receptors and signaling mechanisms. American journal of physiology Regulatory, integrative and comparative physiology *302*, R518-530.

Haidar, A., Legault, L., Dallaire, M., Alkhateeb, A., Coriati, A., Messier, V., Cheng, P., Millette, M., Boulet, B., and Rabasa-Lhoret, R. (2013). Glucose-responsive insulin and glucagon delivery (dual-hormone artificial pancreas) in adults with type 1 diabetes: a randomized crossover controlled trial. CMAJ : Canadian Medical Association journal = journal de l'Association medicale canadienne *185*, 297-305.

Hein, L., Barsh, G.S., Pratt, R.E., Dzau, V.J., and Kobilka, B.K. (1995). Behavioural and cardiovascular effects of disrupting the angiotensin II type-2 receptor in mice. Nature *377*, 744-747.

Henrion, D. (2012). Why do we need a selective angiotensin II type 2 receptor agonist? Hypertension *60*, 616-617.

Hofmann, F. (2005). The biology of cyclic GMP-dependent protein kinases. The Journal of biological chemistry *280*, 1-4.

Inagami, T. (1998). A memorial to Robert Tiegerstedt: the centennial of renin discovery. Hypertension *32*, 953-957.

Jandeleit-Dahm, K.A., Tikellis, C., Reid, C.M., Johnston, C.I., and Cooper, M.E. (2005). Why blockade of the renin-angiotensin system reduces the incidence of new-onset diabetes. Journal of hypertension *23*, 463-473.

Jiang, J., Tran, L., Vasudevan, H., Xia, Z., Yuen, V.G., and McNeill, J.H. (2007). Endothelin-1 blockade prevents COX2 induction and TXA2 production in the fructose hypertensive rat. Canadian journal of physiology and pharmacology *85*, 422-429.

Jugdutt, B.I., and Menon, V. (2004). AT1 receptor blockade limits myocardial injury and upregulates AT2 receptors during reperfused myocardial infarction. Molecular and cellular biochemistry *260*, 111-118.

Katsuki, S., Arnold, W., Mittal, C., and Murad, F. (1977). Stimulation of guanylate cyclase by sodium nitroprusside, nitroglycerin and nitric oxide in various tissue preparations and comparison to the effects of sodium azide and hydroxylamine. Journal of cyclic nucleotide research *3*, 23-35.

Kitamura, K., and Kuriyama, H. (1979). Effects of acetylcholine on the smooth muscle cell of isolated main coronary artery of the guinea-pig. The Journal of physiology *293*, 119-133.

Klinger, J.R. (2011). Tadalafil for the treatment of pulmonary arterial hypertension. Expert review of respiratory medicine *5*, 315-328.

Landry Y., G.J.P. (2009). Pharmacologie, des cibles vers l'indication thérapeutique.

Lautner, R.Q., Villela, D.C., Fraga-Silva, R.A., Silva, N., Verano-Braga, T., Costa-Fraga, F., Jankowski, J., Jankowski, V., Sousa, F., Alzamora, A.*, et al.* (2013). Discovery and characterization of alamandine: a novel component of the renin-angiotensin system. Circ Res *112*, 1104-1111.

Le May, C., Chu, K., Hu, M., Ortega, C.S., Simpson, E.R., Korach, K.S., Tsai, M.J., and Mauvais-Jarvis, F. (2006). Estrogens protect pancreatic beta-cells from apoptosis and prevent insulin-deficient diabetes mellitus in mice. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America *103*, 9232-9237.

Lemarie, C.A., and Schiffrin, E.L. (2010). The angiotensin II type 2 receptor in cardiovascular disease. Journal of the renin-angiotensin-aldosterone system : JRAAS *11*, 19-31.

Leung, P.S. (2007). The physiology of a local renin-angiotensin system in the pancreas. The Journal of physiology *580*, 31-37.

Leung, P.S., Chan, W.P., Wong, T.P., and Sernia, C. (1999). Expression and localization of the renin-angiotensin system in the rat pancreas. The Journal of endocrinology *160*, 13-19.

Li, N., Sioutas, C., Cho, A., Schmitz, D., Misra, C., Sempf, J., Wang, M., Oberley, T., Froines, J., and Nel, A. (2003). Ultrafine particulate pollutants induce oxidative stress and mitochondrial damage. Environmental health perspectives *111*, 455-460.

Liu, B., Zhang, Y., Zhu, N., Li, H., Luo, W., and Zhou, Y. (2013). A vasoconstrictor role for cyclooxygenase-1-mediated prostacyclin synthesis in mouse renal arteries. American journal of physiology Renal physiology.

Loufrani, L., Matrougui, K., Gorny, D., Duriez, M., Blanc, I., Levy, B.I., and Henrion, D. (2001). Flow (shear stress)-induced endothelium-dependent dilation is altered in mice lacking the gene encoding for dystrophin. Circulation *103*, 864-870.

Ludvigsson, J., and Heding, L.G. (1978). beta-cell function in children with diabetes. Diabetes *27 Suppl 1*, 230-234.

Lugnier, C. (2011). PDE inhibitors: a new approach to treat metabolic syndrome? Current opinion in pharmacology *11*, 698-706.

Lyngso, C., Erikstrup, N., and Hansen, J.L. (2009). Functional interactions between 7TM receptors in the renin-angiotensin system--dimerization or crosstalk? Molecular and cellular endocrinology *302*, 203-212.

Maines, M.D. (1997). The heme oxygenase system: a regulator of second messenger gases. Annual review of pharmacology and toxicology *37*, 517-554.

Matrougui, K., Levy, B.I., and Henrion, D. (2000). Tissue angiotensin II and endothelin-1 modulate differently the response to flow in mesenteric resistance arteries of normotensive and spontaneously hypertensive rats. British journal of pharmacology *130*, 521-526.

Mehta, P.K., and Griendling, K.K. (2007). Angiotensin II cell signaling: physiological and pathological effects in the cardiovascular system. American journal of physiology Cell physiology *292*, C82-97.

Morita, I. (2002). Distinct functions of COX-1 and COX-2. Prostaglandins & other lipid mediators *68-69*, 165-175.

Mulvany, M.J. (2002). Small artery remodeling and significance in the development of hypertension. News in physiological sciences : an international journal of physiology produced jointly by the International Union of Physiological Sciences and the American Physiological Society *17*, 105-109.

Mulvany, M.J., and Halpern, W. (1977). Contractile properties of small arterial resistance vessels in spontaneously hypertensive and normotensive rats. Circ Res *41*, 19-26.

Omori, K., and Kotera, J. (2007). Overview of PDEs and their regulation. Circ Res *100*, 309-327.

Orshal, J.M., and Khalil, R.A. (2004). Gender, sex hormones, and vascular tone. American journal of physiology Regulatory, integrative and comparative physiology *286*, R233-249.

Patel, B.M., and Mehta, A.A. (2012). Aldosterone and angiotensin: Role in diabetes and cardiovascular diseases. European journal of pharmacology *697*, 1-12.

Pathak, S., Dorfmueller, H.C., Borodkin, V.S., and van Aalten, D.M. (2008). Chemical dissection of the link between streptozotocin, O-GlcNAc, and pancreatic cell death. Chemistry & biology *15*, 799-807.

Pinaud, F., Bocquet, A., Dumont, O., Retailleau, K., Baufreton, C., Andriantsitohaina, R., Loufrani, L., and Henrion, D. (2007). Paradoxical role of angiotensin II type 2 receptors in resistance arteries of old rats. Hypertension *50*, 96-102.

Potier, L., Waeckel, L., Vincent, M.P., Chollet, C., Gobeil, F., Jr., Marre, M., Bruneval, P., Richer, C., Roussel, R., Alhenc-Gelas, F.*, et al.* (2013). Selective kinin receptor agonists as cardioprotective agents in myocardial ischemia and diabetes. The Journal of pharmacology and experimental therapeutics *346*, 23-30.

Ravassard, P., Hazhouz, Y., Pechberty, S., Bricout-Neveu, E., Armanet, M., Czernichow, P., and Scharfmann, R. (2011). A genetically engineered human pancreatic beta cell line exhibiting glucose-inducible insulin secretion. J Clin Invest *121*, 3589-3597.

Retailleau, K., Belin de Chantemele, E.J., Chanoine, S., Guihot, A.L., Vessieres, E., Toutain, B., Faure, S., Bagi, Z., Loufrani, L., and Henrion, D. (2010). Reactive oxygen species and cyclooxygenase 2-derived thromboxane A2 reduce angiotensin II type 2 receptor vasorelaxation in diabetic rat resistance arteries. Hypertension *55*, 339-344.

Roberts, A.W. (2010). Cardiovascular risk and prevention in diabetes mellitus. Clin Med *10*, 495-499.

Sabayan, B., Zamiri, N., and Farshchizarabi, S. (2010). Phosphodiesterase-5 inhibitors: novel weapons against Alzheimer's disease? The International journal of neuroscience *120*, 746-751.

Sachidanandam, K., Portik-Dobos, V., Kelly-Cobbs, A.I., and Ergul, A. (2010). Dual endothelin receptor antagonism prevents remodeling of resistance arteries in diabetes. Canadian journal of physiology and pharmacology *88*, 616-621.

Savoia, C., Touyz, R.M., Volpe, M., and Schiffrin, E.L. (2007). Angiotensin type 2 receptor in resistance arteries of type 2 diabetic hypertensive patients. Hypertension *49*, 341-346.

Schmidt, T.S., and Alp, N.J. (2007). Mechanisms for the role of tetrahydrobiopterin in endothelial function and vascular disease. Clin Sci (Lond) *113*, 47-63.

Searls, Y., Smirnova, I.V., Vanhoose, L., Fegley, B., Loganathan, R., and Stehno-Bittel, L. (2012). Time-dependent alterations in rat macrovessels with type 1 diabetes. Experimental diabetes research *2012*, 278620.

Shah, N.C., Pringle, S., and Struthers, A. (2006). Aldosterone blockade over and above ACE-inhibitors in patients with coronary artery disease but without heart failure. Journal of the renin-angiotensin-aldosterone system : JRAAS *7*, 20-30.

Shum, M., Pinard, S., Guimond, M.O., Labbe, S.M., Roberge, C., Baillargeon, J.P., Langlois, M.F., Alterman, M., Wallinder, C., Hallberg, A.*, et al.* (2013). Angiotensin II type 2 receptor promotes adipocyte differentiation and restores adipocyte size in high-fat/high-fructose diet-induced insulin resistance in rats. American journal of physiology Endocrinology and metabolism *304*, E197-210.

Skeggs, L.T., Lentz, K.E., Gould, A.B., Hochstrasser, H., and Kahn, J.R. (1967). Biochemistry and kinetics of the renin-angiotensin system. Federation proceedings *26*, 42-47.

Sourris, K.C., Morley, A.L., Koitka, A., Samuel, P., Coughlan, M.T., Penfold, S.A., Thomas, M.C., Bierhaus, A., Nawroth, P.P., Yamamoto, H., *et al.* (2010). Receptor for AGEs (RAGE) blockade may exert its renoprotective effects in patients with diabetic nephropathy via induction of the angiotensin II type 2 (AT2) receptor. Diabetologia *53*, 2442-2451.

Souza-Smith, F.M., Katz, P.S., Trask, A.J., Stewart, J.A., Jr., Lord, K.C., Varner, K.J., Vassallo, D.V., and Lucchesi, P.A. (2011). Mesenteric resistance arteries in type 2 diabetic db/db mice undergo outward remodeling. PloS one *6*, e23337.

Stallone, J.N., Crofton, J.T., and Share, L. (1991). Sexual dimorphism in vasopressin-induced contraction of rat aorta. The American journal of physiology *260*, H453-458.

Tahmasebi, M., Puddefoot, J.R., Inwang, E.R., and Vinson, G.P. (1999). The tissue renin-angiotensin system in human pancreas. The Journal of endocrinology *161*, 317-322.

Tarhouni, K., Guihot, A.L., Freidja, M.L., Toutain, B., Henrion, B., Baufreton, C., Pinaud, F., Procaccio, V., Grimaud, L., Ayer, A., *et al.* (2013). Key Role of Estrogens and Endothelial Estrogen Receptor alpha in Blood Flow-Mediated Remodeling of Resistance Arteries. Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology.

Tomasian, D., Keaney, J.F., and Vita, J.A. (2000). Antioxidants and the bioactivity of endothelium-derived nitric oxide. Cardiovascular research *47*, 426-435.

Tostes, R.C., Nigro, D., Fortes, Z.B., and Carvalho, M.H. (2003). Effects of estrogen on the vascular system. Brazilian journal of medical and biological research = Revista brasileira de pesquisas medicas e biologicas / Sociedade Brasileira de Biofisica [et al] *36*, 1143-1158.

Touyz, R.M. (2005). Intracellular mechanisms involved in vascular remodelling of resistance arteries in hypertension: role of angiotensin II. Experimental physiology *90*, 449-455.

Touyz, R.M., and Schiffrin, E.L. (2004). Reactive oxygen species in vascular biology: implications in hypertension. Histochemistry and Cell Biology *122*, 339-352.

Ulmasov, B., Xu, Z., Tetri, L.H., Inagami, T., and Neuschwander-Tetri, B.A. (2009). Protective role of angiotensin II type 2 receptor signaling in a mouse model of pancreatic fibrosis. American journal of physiology Gastrointestinal and liver physiology *296*, G284-294.

van Belle, T.L., Coppieters, K.T., and von Herrath, M.G. (2011). Type 1 diabetes: etiology, immunology, and therapeutic strategies. Physiological reviews *91*, 79-118.

Vessieres, E., Freidja, M.L., Loufrani, L., Fassot, C., and Henrion, D. (2012). Flow (shear stress)-mediated remodeling of resistance arteries in diabetes. Vascular pharmacology *57*, 173-178.

Virdis, A., Ghiadoni, L., and Taddei, S. (2010). Human endothelial dysfunction: EDCFs. Pflugers Archiv : European journal of physiology *459*, 1015-1023.

Wagner, F., Buz, S., Neumeyer, H.H., Hetzer, R., and Hocher, B. (2004). Nitric oxide inhalation modulates endothelin-1 plasma concentration gradients following left ventricular assist device implantation. Journal of cardiovascular pharmacology *44 Suppl 1*, S89-91.

Ward, M.R., Pasterkamp, G., Yeung, A.C., and Borst, C. (2000). Arterial remodeling. Mechanisms and clinical implications. Circulation *102*, 1186-1191.

Weyer, C., Bogardus, C., Mott, D.M., and Pratley, R.E. (1999). The natural history of insulin secretory dysfunction and insulin resistance in the pathogenesis of type 2 diabetes mellitus. J Clin Invest *104*, 787-794.

Wu, L., and Wang, R. (2005). Carbon monoxide: endogenous production, physiological functions, and pharmacological applications. Pharmacological reviews *57*, 585-630.

Yaguchi, S., Ogawa, Y., Shimmura, S., Kawakita, T., Hatou, S., Satofuka, S., Nakamura, S., Imada, T., Miyashita, H., Yoshida, S.*, et al.* (2013). Angiotensin II type 1 receptor antagonist attenuates lacrimal gland, lung, and liver fibrosis in a murine model of chronic graft-versus-host disease. PloS one *8*, e64724.

You, D., Loufrani, L., Baron, C., Levy, B.I., Widdop, R.E., and Henrion, D. (2005). High blood pressure reduction reverses angiotensin II type 2 receptor-mediated vasoconstriction into vasodilation in spontaneously hypertensive rats. Circulation *111*, 1006-1011.

Zhang, J., and Pratt, R.E. (1996). The AT2 receptor selectively associates with Gialpha2 and Gialpha3 in the rat fetus. The Journal of biological chemistry *271*, 15026-15033.

Zhao, Y.Y., Zhao, Y.D., Mirza, M.K., Huang, J.H., Potula, H.H., Vogel, S.M., Brovkovych, V., Yuan, J.X., Wharton, J., and Malik, A.B. (2009). Persistent eNOS activation secondary to caveolin-1 deficiency induces pulmonary hypertension in mice and humans through PKG nitration. J Clin Invest *119*, 2009-2018.

Zhou, Y.B., Zhang, J., Cai, Y., Teng, X., Duan, X.H., Song, J.Q., Du, J., Tang, C.S., and Qi, Y.F. (2012). Insulin resistance induces medial artery calcification in fructose-fed rats. Exp Biol Med (Maywood) *237*, 50-57.

l'université nantes angers le mans
PÔLE DE RECHERCHE ET D'ENSEIGNEMENT SUPÉRIEUR

université angers

Thèse de Doctorat

Marc-Antoine BEGORRE

Physopathologie du récepteur de type 2 à l'angiotensine II (AT2R) dans le développement du diabète et de ses conséquences cardiovasculaires

Physiopathology of angiotensin II type 2 receptor (AT2R) in diabetes mellitus development and its cardiovascular complications

Résumé

Le diabète est une pathologie dont l'incidence est en constante augmentation ces dix dernières années. Le traitement de base actuel repose sur l'insulinothérapie pour la régulation de la glycémie, et sur plusieurs molécules de référence du système cardiovasculaire pour ses complications.
Pourtant la pathologie est toujours en progression et une meilleure compréhension des mécanismes impliqués dans son développement est nécessaire afin d'améliorer la prise en charge des patients diabétiques.
C'est dans ce contexte que se place notre étude, où nous avons clarifié le rôle du récepteur de type 2 à l'angiotensine II (AT2R) dans le développement et les complications liées à la pathologie diabétique.
En effet, le système rénine-angiotensine occupe une place centrale dans la physiopathologie du diabète et n'est aujourd'hui ciblé que par des antagonistes du récepteur de type 1 à l'angiotensine II (AT1R) ou des inhibiteurs de l'enzyme de conversion.
Nous montrons ici à l'aide de deux modèles de diabète (de type 1 et de type 2) et d'un modèle de souris déficientes en AT2R qu'il possède de façon intéressante deux rôles opposés dans cette pathologie : un rôle protecteur dans l'induction et le développement du diabète, et un rôle perturbateur au niveau vasculaire.
En effet il prévient l'augmentation de la glycémie mais renforce la dysfonction endothéliale et le remodelage vasculaire associés au diabète.
Ces résultats ouvrent sur de nombreuses perspectives thérapeutiques quant à la modulation pharmacologique d'AT2R dans le diabète.

Mots clés
Diabète ; récepteur de type 2 à l'angiotensine II; fonction endothéliale ; remodelage vasculaire

Abstract

Diabetes is a constantly progressing pathology described by a high blood-glucose levels. Its treatment is currently based on insulin therapy to regulate glycaemia levels, and several drugs standards for cardiovascular diseases.
However, a better understanding of mecanisms involved in its physiopathology remain needed to improve patients care.
Thus, we studied here the role of angiotensin II type 2 receptor (AT2R) in development and cardiovascular complications of diabetes mellitus.
Indeed renin-angiontensin system is a key regulator of diabetes physiopathology but is targeted mostly by angiotensin II type 1 receptor antagonists and angiotensin converting enzyme inhibitors.
By using two models of diabetes mellitus (type 1 and type 2) and a AT2R knock-out mouse model that AT2R interestingly possesses two opposite roles in diabetic pathology : it protects from diabetes induction and development but improve vascular complications associated with diabetes as endothelial dysfunction and vascular remodeling.
Our results show that AT2R could be a new therapeutic target in diabetes.

Key Words
Diabetes ; angiotensin II type 2 receptor ; endothelial function ; vascular remodeling