



HAL
open science

Mécanismes impliqués dans le remodelage tissulaire : rôle de la voie de signalisation Notch3 dans le coeur et de la Connexine 43 dans le rein

Magali Genest

► **To cite this version:**

Magali Genest. Mécanismes impliqués dans le remodelage tissulaire : rôle de la voie de signalisation Notch3 dans le coeur et de la Connexine 43 dans le rein. Physiologie [q-bio.TO]. Sorbonne Université, 2019. Français. NNT : 2019SORUS544 . tel-03139802

HAL Id: tel-03139802

<https://theses.hal.science/tel-03139802>

Submitted on 12 Feb 2021

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.

Sorbonne Université

Ecole doctorale Physiologie, physiopathologie et thérapeutique (ED394)

INSERM UMR-S 1155

« Maladies rénales fréquentes et rares :

des mécanismes moléculaires à la médecine personnalisée »

**Mécanismes impliqués dans le remodelage tissulaire :
rôle de la voie de signalisation Notch3 dans le cœur
et de la Connexine 43 dans le rein**

Par Magali GENEST

Thèse de doctorat de Sorbonne Université

Directeur de thèse : Dr Christos CHADJICHRISTOS

Co-Directeur de thèse : Dr Christos CHATZIANTONIOU

Présentée et soutenue publiquement le 17 Décembre 2019

Devant un jury composé de :

Madame le Docteur Catherine COIRAULT

Présidente

Monsieur le Maître de conférences Frank BIENAIME

Rapporteur

Monsieur le Docteur Frank LEZOUALC'H

Rapporteur

Madame le Professeur Hélène FRANCOIS

Examinatrice

Monsieur le Docteur Nicolas PICARD

Examineur

Madame le Docteur Jane-Lise SAMUEL

Examinatrice

Monsieur le Docteur Christos CHADJICHRISTOS

Directeur de thèse

Monsieur le Docteur Christos CHATZIANTONIOU

Co-Directeur de thèse

Le savant est fier d'avoir tant compris ;

Le sage est humble d'en savoir si peu.

William Cowper

Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier les Dr Pierre RONCO et Christos CHATZIANTONIOU de m'avoir accueillie au sein de leur unité UMR-S 1155, ainsi que les Dr Alain COHEN-SOLAL et Alexandre MEBAZAA pour m'avoir admis dans l'unité UMR-S 942.

Je souhaite également remercier tous les membres de mon jury pour avoir répondu présents pour ma soutenance de thèse. Une pensée toute particulière aux Dr Frank BIENAIME et Frank LEZOUALC'H pour avoir accepté d'être rapporteurs de ma thèse malgré vos planning remplis. Mais aussi aux Dr Hélène FRANCOIS et Nicolas PICARD pour leur rôle d'examineur et surtout au Dr Catherine COIRAULT de présider le jury. C'est un honneur de tous vous compter parmi mon jury.

Je remercie le Dr Jane-Lise SAMUEL de m'avoir donné la chance de réaliser travail. Merci de m'avoir soutenu et transmis votre savoir durant ces années de thèse.

Et le meilleur pour la fin : le Dr Christos CHADJICHRISTOS, alias Junior. Que dire... mon phare dans la tempête, sans toi je ne sais pas si j'aurai réussi. Déjà sans toi je n'aurai pas eu la chance de faire une thèse. Tu as eu confiance en moi et je t'en remercie. Tu m'as soutenue et aidée à me relever quand j'avais l'impression que tout allait mal. Avoir deux laboratoires et deux sujets a rendu cette thèse bien plus ardue mais ton optimisme et ton objectivité m'ont permis de continuer à croire que je pouvais y arriver. Malgré le fait que je n'ai jamais vraiment compris tes références musicales, ni tes références aux sketches des inconnus, tu m'as toujours fait rire, surtout avec tes blagues à 2 balles ! Je pense que notre amour pour la nourriture nous a également tout particulièrement lié. J'aurai aimé continuer à tes côtés plus longtemps mais je suis sûre que nos chemins se recroiseront, pour de nouvelles aventures.

Un gigantesque merci à Malha SADOUNE. Ma Popie, même si on se connaît depuis mon Master 1, nous nous sommes vraiment trouvées durant ma thèse. Tellement de choses à dire, je ne saurais pas par où commencer. Je ne te remercierai jamais assez d'avoir été là pour m'aider lorsque Clément a fait son Master 2, pour m'avoir aidée avec les manips et tes nombreux conseils. Mais avant toute chose mille mercis pour m'avoir supportée moi et mon côté grognon, et de m'avoir canalisée. Tu es une pépite, un joyau qui n'est pas assez reconnu. Je suis tellement heureuse de t'avoir rencontrée, l'amitié profonde qui est née entre nous n'est pas prête de disparaître.

Merci à Panos KAVVADAS, que je n'oublierai jamais. Tu as passé trois ans à m'apprendre à réfléchir par moi-même, et malgré la difficulté tu as toujours fait preuve d'empathie et tact. Joke ! Ta voix me disant « travail, travail » résonnera toujours dans ma tête, tout comme ton amour des Français

« French people... ». Ta sociabilité légendaire me manque déjà, ainsi que ton humour grec. C'est pour tout cela qu'on t'apprécie !

Merci à Ferial AZIBANI, tes conseils scientifiques m'ont été précieux, ainsi que ton soutien, tout particulièrement durant cette dernière année de thèse. Tu crois en mon potentiel et cela me boost.

Clément DELACROIX, je souhaite te remercier et aussi m'excuser. Tu as été mon étudiant de Master 2 durant ma première année de thèse et ce ne fut pas de tout repos. Merci pour ton aide sur le projet Notch3, et désolé de ne pas avoir été assez présente pour t'encadrer efficacement. Je te souhaite bonne chance pour ta thèse !

Merci à Andreia DE SOUSA JORGE et Maryame EL MOUMNI, pour votre bonne humeur et votre touche féminine dans ce bureau trop rempli de testostérone.

Merci à mes co-thésards, présents et passés : Aude DORISON, Chloé RAFAEL, Raphaël KORMANN, Aïssata NIASSE, Virgilia SAHIRI, Mathilde PRUD'HOMME, Hélène NOUGUE et Benjamin DENIAU. Ce fut une joie de partager cette aventure avec vous.

Merci à Sandrine PLACIER, pour toutes les ischémies que tu as faites pour mon projet. Ca a été long et semé d'embûches mais faire toutes ces ischémies avec toi était l'une de mes manip préférées. Cela n'a fait que renforcer mon goût pour l'expérimentation animale.

Un grand merci à toutes les personnes, cœur des laboratoires et jamais assez remerciées : Régine MERVAL, Evelyne POLIDANO, Sophie VANDERMEERSCH, Tiffany MIGEON, Souhila OUCHELOUCHE, Joëlle PEREZ, Chantal JOUANNEAU, Perrine FRERE, Mélanie CHARLERY, Emmanuelle BENARD, Béatrice BAUDOIN et Karima CHABANE. Vos expertises m'ont été précieuses, et m'ont permis de développer un savoir faire pointu qui me sera important pour la suite. Je souhaite sincèrement remercier Evelyne, avec qui j'ai passé de nombreuses heures à sacrifier mes souris, ce qui a été tout particulièrement épique pour les dernières séries.

Merci aux protecteurs du bien être murins : Clara BERNARD, Pascale CHANTRENNE, Caroline MARTIN, Liliane LOUEDEC, Claude KITOU, Jessy RENCLOT et Gaëtan GIRAULT. J'ai appris comment gérer mes lignées grâce à vous. Vous avez toujours répondu présents lors de mes demandes de dernière minutes et je vous en remercie !

Un grand merci à Adrien COGO, Baptiste PORTE et Gabrielle MANGIN. Notre petite bande m'aura bien fait rire, chose indispensable pour le moral. Nos sorties sont des bouffées d'oxygène dans le train train quotidien. La première année de ma thèse restera la meilleure puisque nous étions tous réunis au 2, heures de gloire du 71 squad.

Cette thèse n'aurait pas été la même sans la rencontre avec la team Bananaaa : Caroline ANDRIQUE, Morgane BOURMAUD et Mylène ZARKA. J'ai découvert et apprécié les courses d'obstacles avec vous, et ce n'était pas gagné (la Color Run restera toujours ma préférée). Merci pour ces soirées inoubliables à la Bodega, avec les incontournables Rocco et Téléphone !

Ma thèse sera marquée également par d'autres rencontres de l'unité U1132 : Eric HAY, Yetki ASLAN, Félix RENAUDIN, Benoit BARDECHE. Eric, ton déhanché à la soirée de l'ASBMR de Montréal... ya pas à dire t'as le groove ! Yetki et Félix : à quand la prochaine soirée japonais ?? Et Benoit, bravo tu as survécu !

Merci aussi à Nicolas VODOVAR, Niki PRAKOURA, Hélène RAGOT, Lilia ABBAD, Ellie TANG et à tous les autres que j'oublie, que j'ai rencontré durant ma thèse et m'ont chacun aidée, conseillée et faite rire.

Une pensée également pour Julie COUSIN et Bénilde BONNEFILLE, mes amies de toujours. Merci pour votre soutien infailible depuis toutes ces années. Merci pour nos discussions profondes et plus légères aussi ! La vie serait tellement moins fun sans votre amitié.

Et enfin, un immense merci et tout mon amour à ma famille : mes parents qui m'ont toujours poussée à trouver le métier qui me plait et épaulée dans mes choix, mes grands-parents qui m'ont toujours soutenue ; et enfin Yohan JOUAN, mon amour, nous avons traversé toutes les étapes de la thèse ensemble nous donnant mutuellement la force d'en atteindre le bout. Je n'y serai jamais arriver sans vous, je vous aime plus que tout !

Résumé

Mécanismes impliqués dans le remodelage tissulaire : rôle de la voie de signalisation Notch3 dans le cœur et de la Connexine 43 dans le rein

Les maladies rénales et cardiaques sont l'une et l'autre causes d'une grande morbi-mortalité, en particulier dans les pays dits développés. Malgré les progrès récents, l'insuffisance rénale et l'insuffisance cardiaque demeurent des fléaux au plan de la qualité de vie des patients et des budgets de santé. Mes recherches se donc articulées sur deux axes, l'un cardiaque et l'autre rénal.

Des études antérieures avaient montré que Notch3 a un rôle dans la physiologie des petites artères de résistance, en contrôlant la prolifération, la maturation des cellules musculaires lisses vasculaires (CMLV), et le tonus myogénique. Plus récemment, à l'aide de souris Notch3 KO, il a été montré que ce récepteur est nécessaire au maintien de l'intégrité des coronaires et donc à l'adaptation cardiaque lors d'une surcharge de pression. Notch3 apparaissant impliqué dans les mécanismes d'hypertrophie pathologique, les objectifs du projet ont été d'étudier : 1) les effets de la suractivation de la voie de signalisation Notch3 dans les CMLV de souris (TgN3ICDSM) lors d'une HTA, 2) l'implication de Notch3 lors d'un remodelage cardiaque physiologique induit par un programme d'entraînement physique (EP) modéré chez les souris Notch3 KO. Nos résultats montrent que les souris TgN3ICDSM développent une HTA mais présentent une moindre hypertrophie cardiaque et ne développent pas de fibrose cardiaque en réponse à une HTA dépendante de l'angiotensine II. Ces souris semblent donc protégées contre les signes de maladaptation cardiaque, Notch3 apparaît déterminant pour l'adaptation du cœur à une surcharge de pression. Il est important de souligner que la cardiopathie des souris Notch3 KO régresse après 5 semaines d'EP. L'EP permettrait donc de contrecarrer tout ou une partie des défauts liés à l'absence de Notch3.

Notre équipe a précédemment démontré que la connexine 43 (Cx43), protéine constitutive des jonctions gap, joue un rôle majeur dans la physiopathologie rénale. En effet, cette Cx est anormalement exprimée dans différents modèles de néphropathies expérimentales chroniques et la réduction génétique de son expression (souris hétérozygotes, HE) ou pharmacogénétique (antisens) protège contre la progression de la maladie chronique. Ainsi, l'objectif de mon projet a été d'évaluer si la Cx43 est également impliquée dans la progression de l'insuffisance rénale aiguë (IRA), et d'étudier les types cellulaires et mécanismes possiblement mis en jeu. Pour cela nous avons utilisé un modèle d'ischémie-reperfusion (IR) rénale chez des souris Cx43 HE, et chez des souris avec une invalidation de Cx43 spécifiquement dans les cellules tubulaires rénales ou dans l'endothélium, ces deux tissus étant les plus atteints dans les lésions d'IR. Nos résultats montrent que les souris Cx43 HE ont une fonction et une structure rénales améliorées par rapport aux WT après l'IR rénale. Cette protection semble liée à la réponse inflammatoire et adhésion des polynucléaires neutrophiles modérés. Cependant, une tendance à la protection, non significative, a été observée quand la Cx43 est spécifiquement invalidée au niveau des cellules endothéliales. Par conséquent, la réduction simultanée de Cx43 dans plusieurs types cellulaires semble indispensable contre la progression de l'IRA, soulignant ainsi le rôle majeur de la communication cellulaire via les jonctions gap dans la progression de la maladie.

Mots clés : Notch3, hypertension artérielle, entraînement physique, hypertrophie cardiaque, Connexine 43, insuffisance rénale aiguë, ischémie, inflammation

Abstract

Mechanisms involved in tissue remodeling: role of the Notch3 signaling pathway in the heart and Connexin 43 in the kidney.

Renal and cardiac diseases are both important causes of morbidity and mortality in western countries. Despite recent advances, kidney and heart failure are still major challenges of public health. Therefore, my thesis project was articulated in two axes, one cardiac and the other renal.

Previous studies reported that Notch3 plays a role in the physiology of small resistance arteries, by controlling proliferation, vascular smooth muscle cells (VSMC) maturation and myogenic tone. Recently, it has been shown in Notch3 KO mice that this receptor is necessary for the maintenance of coronary integrity and therefore for cardiac adaptation during a pressure overload. Given that Notch3 has been involved in pathological hypertrophy, the objectives of my project were to study : 1) the effects of the Notch3 signaling pathway in mouse overexpressing this protein specifically in VSMCs (TgN3ICDSM) during hypertension (HTA), 2) the implication of Notch3 during a physiological cardiac remodeling induced by a program of moderate physical training (PT) in Notch3 KO mice. Our results show that TgN3ICDSM mice develop HTA but show less cardiac hypertrophy and do not develop cardiac fibrosis in response to angiotensin II-dependent HTA. Since these mice are protected against cardiac maladaptation, Notch3 appears to be a determining factor for the adaptation of the heart to pressure overload. Furthermore, heart disease regresses in Notch3 KO mice after 5 weeks of PT. Consequently, physical training may be able to counteract some defects related to the absence of Notch3.

We have previously reported that the gap junction protein connexin 43 (Cx43) plays a major role in the renal pathophysiology. Indeed, this Cx is abnormally induced in different models of chronic renal disease and its reduction protected against the progression of kidney disease. Thus, the aim of this study was to evaluate whether Cx43 was implicated in the progression of acute kidney injury (AKI), and to further investigate the cell types and mechanisms involved. For this purpose, we used a model of renal ischemia-reperfusion (IR) in Cx43 HE mice and in mice in which Cx43 was specifically deleted in renal tubular cells or in the vascular endothelium, both cell types being mainly affected after IR. We observed improved renal function and structure in Cx43 HE mice, compared with WT, after renal IR. This protective effect may be due to a limited inflammatory response and neutrophil adhesion. However, a tendency for protection not reaching statistical significance was observed, when Cx43 was specifically deleted in endothelial cells. Therefore, simultaneous reduction of Cx43 in several cell types seems necessary against AKI, underlying thus the important role of cell-to-cell communication in the progression of the disease.

Key words : Notch3, arterial hypertension, physical training, cardiac hypertrophy, Connexin 43, acute kidney injury, ischemia, inflammation

SOMMAIRE

Liste des abréviations	12
Liste des figures.....	14
Liste des tableaux	15
Avant Propos	16
Introduction.....	17
Partie 1 : Rôle de Notch3 dans le remodelage cardiaque	17
1. Le réseau vasculaire	17
a. Les artères	17
L'endothélium	19
Les cellules musculaires lisses vasculaires	20
b. L'angiogenèse	21
c. Le remodelage vasculaire	22
2. Remodelage cardiaque.....	25
a. Le cœur	25
b. Hypertrophie cardiaque physiologique.....	26
Les voies de signalisation	27
L'angiogenèse.....	28
c. Hypertrophie cardiaque pathologique	28
Les voies de signalisation	29
La fibrose	30
Le stress oxydant	32
3. Notch3	32
a. Généralités.....	32
Le récepteur Notch.....	32
Les ligands	33
La voie de signalisation.....	34
Les gènes cibles	35
b. Rôles physiopathologiques.....	36
Rôles de Notch3 dans les CMLV	36

Notch3 et CADASIL	37
Notch3 et l'HTAP	39
Notch3 et les pathologies cardiovasculaires et rénales	39
Chapitre 2 : Rôle de la Connexine 43 dans le remodelage rénal	40
1. Le rein	40
a. Fonction	40
b. Structure	41
Le rein	41
Le néphron	42
2. La maladie rénale aigüe	45
a. Définition	45
b. L'ischémie-reperfusion rénale	47
Mort cellulaire	47
L'apoptose	47
La nécrose	48
Inflammation	49
Les neutrophiles	49
Les macrophages	49
Les autres acteurs de l'immunité	51
3. Les jonctions gap	53
a. Généralités	53
b. La Connexine 43	55
c. Connexine 43 et physiopathologies	57
Cx43 et l'inflammation	57
Cx43 dans le cœur, le système nerveux central et les poumons	58
Cx43 et le rein	59
Les vaisseaux	59
Les cellules tubulaires	60
Les podocytes	60
Les cellules mésangiales	61

Objectifs	62
Matériels et méthodes	63
I- Modèles animaux	63
1. Lignées Notch3	63
a. Souris surexprimant N3ICD dans les CMLV	63
b. Souris Notch3 KO	63
2. Lignées Cx43	63
a. Souris hétérozygote pour la Cx43	63
b. Souris invalidée pour la Cx43 dans les tubules rénaux	64
c. Souris invalidée pour la Cx43 dans les cellules endothéliales	64
II- Modèles expérimentaux	65
1. Modèles d'hypertrophies cardiaques	65
a. Hypertension artérielle par infusion d'Angiotensine II	65
b. Surcharge de débit induite par un entraînement physique	65
2. Modèle d'agression rénale aigüe par ischémie-reperfusion	66
III- Evaluations fonctionnelles	67
1. Projet Notch3	67
a. Mesure de la pression artérielle par tailcuff	67
b. Mesure de la fonction cardiaque par échocardiographie	68
c. Mesures de la vasoréactivité rénale	68
2. Projet Cx43	69
Mesure de la fonction rénale	69
IV- Mise à mort des souris et prélèvement des organes	69
1. Projet Notch3	69
2. Projet Cx43	69
V- Analyse de l'expression des ARNm	70
1. Projet Notch3	70
a. Extraction des ARN totaux et réverse transcription	70
b. RT-PCR quantitative	71
2. Projet Cx43	72
a. Extraction des ARN totaux et réverse transcription	72
b. RT-PCR quantitative	72

VI- Analyse de l'expression protéique.....	73
a. Extraction protéique.....	73
b. Western Blot.....	74
VII- Histologie	74
1. Projet Notch3	74
a. Marquages par immunofluorescence	75
b. Etude de la fibrose par coloration au Rouge Sirius	75
c. Etude du stress oxydant par marquage au DHE	76
2. Projet Cx43	76
a. Evaluation des dommages morphologiques par coloration PAS.....	77
b. Marquages par immunohistochimie	77
VIII-Numération Formule Sanguine par cytométrie en flux.....	78
IX- Analyses statistiques	78
Résultats.....	79
Chapitre 1 : La suractivation de la voie de signalisation Notch3 dans les CMLV prévient le développement de la fibrose cardiaque en réponse à l'HTA.....	79
Chapitre 2 : Effets de l'inactivation de Notch3 sur le remodelage cardiovasculaire induit par une surcharge de débit.....	88
Chapitre 3 : La diminution de la Connexine 43 protège contre la progression de l'insuffisance rénale aiguë chez la souris	97
Discussion et perspectives	117
Rôle de Notch3 dans le remodelage cardiaque	117
Rôle de la Connexine 43 dans le remodelage rénal	121
Bibliographie	129

Liste des abréviations

ACE : angiotensin-converting enzyme
AngII : Angiotensine II
ANP : Atrial Natriuretic Peptide
β3-AR : β3 Adrenergic Receptors
ATP : Adénosine-Triphosphate
ATR1 : Angiotensin II receptor type 1
AVC : Accidents Vasculaires Cérébraux
Ca²⁺ : Calcium
CADASIL : Cerebral Autosomal Dominant Arteriopathy with Subcortical Infarcts and Leukoencephalopathy
CaMKII : Calcium/calmodulin-dependent protein Kinase II
CITED4 : Cbp/P300 Interacting Transactivator With Glu/Asp Rich Carboxy-Terminal Domain 4
CMLV : Cellules Musculaires Lisses Vasculaires
Coll : Collagène
Cx : Connexine
DAG : Diacylglycérols
DAMP : Damage-Associated Molecular Pattern
DII : Delta-like
DSL : Delta, Serrate, Lag2
DSR : Débit Sanguin Rénal
EGF : Epidermal Growth Factor
EPO : Erythropoïétine
ERK : Extracellular signal- Regulated Kinase
Gal-3 : Galectine-3
GC : Gyanylate Cyclase
GMPC : Guanosine Monophosphate cyclique
GOM : Granular Osmiophilic Material
HC : hemicanal ou connexon
HES : Hairy and Enhancer of Split
HEY : Hairy and Enhancer of split with YRPW motif
HIF1 : Hypoxia Inducible Factor 1
HRE : Hypoxia Responsive Enhancer
HTA : Hypertension Artérielle
ICAM1 : Intercellular Adhesion Molecule1
IFNγ : Interféron γ
Ig : Immunoglobuline
IGF1 : Insulin Growth Factor 1
IL : Interleukine
IP3 : inositol-1,4,5-triphosphate
IR : Ischémie Reperfusion
IRA : Insuffisance Rénale Aigue
JG : Jonctions Gap
JNK : c-Jun-N-terminal Kinase
KIM1 : Kidney Injury Molecule 1
KO : Knock-Out
MAPK : Mitogen-Activated Protein Kinases
MCP1 : Monocyte Chemoattractant Protein 1
MEC : Matrice Extracellulaire

MMP : Matrice Métalloprotéinase
MRA / MRC : Maladies Rénales Aigues / Chroniques
N3ICD : Notch3 Intracellular Domain
NADP : Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate
NFAT : Nuclear Factor of Activated T cells
NFκB : Nuclear Factor kappa B
NGAL : Neutrophil Gelatinase-Associated Lipocalin
iNKT : invariant Natural Killer T cells
NO : monoxyde d'azote (Nitric Oxide)
eNOS (ou NOS3) : endothelial Nitric Oxide Synthase
NRG1 : Neuregulin-1
O₂ : Oxygène
PAS : Periodic Acid Schiff
PI : Préconditionnement Ischémique
PI3K : Phosphatidyl Inositol-3-Phosphate Kinase
PKG : Protéine Kinase G
PLCβ : Phospholipase β
PIGF : Placental Growth Factor
RAM : RBP-Jκ Associated Molecule
ROS : Reactive Oxygen Species
RyR2 : Ryanodin Receptor 2
SERCA : Sarco/Endoplasmic Reticulum Ca²⁺-ATPase
α-SMA (ou ACTA2) : Smooth Muscle Actin α
SN : Système Nerveux
STAT : Signal Transducer and Activator of Transcription
TGFβ : Transforming Growth Factor β
TIMP : Metalloproteinase Inhibitor 1
TNFα : Tumoral Necrosis Factor α
mTOR : mechanistic Target Of Rapamycin
UUO : Unilateral Ureteral Obstruction
VCAM1 : Vascular Cell Adhesion Molecule 1
VEGF : Vascular Endothelial Growth Factor
WT : Wild Type

Liste des figures

Figure 1 : Structure des vaisseaux : artère, veine et capillaire.	19
Figure 2 : Voie de signalisation VEGF.	22
Figure 3 : Schéma des différents types de remodelage vasculaire.	23
Figure 4 : Schéma des différents remodelages cardiaques.	26
Figure 5 : Signalisation fibrosante entre les différentes populations cellulaires cardiaques que sont les cardiomyocytes, les macrophages et les fibroblastes.	31
Figure 6 : Structure des ligands et récepteurs Notch chez l'Homme.	34
Figure 7 : Voie de signalisation canonique de Notch.	35
Figure 8 : Structure rénale.	42
Figure 9 : Structure du glomérule rénal.	43
Figure 10 : Structure du néphron et localisation rénale des ses différentes parties.	44
Figure 11 : Classification des IRA selon KDIGO.	46
Figure 12 : Structure des JG et HC.	54
Figure 13 : Localisation présumée des différentes isoformes de connexines dans le rein.	55
Figure 14 : Structure de la Cx43 et ses différents sites de phosphorylation et d'interaction avec d'autres protéines.	56
Figure 15 : Protocole expérimental d'IR rénale. I.	67
Figure 16 : La surexpression de N3ICD dans les CMLV protège contre l'hypertrophie cardiaque induite par l'hypertension artérielle.	81
Figure 17 : Etude de la vasoréactivité rénale des souris TgN3ICD SM	82
Figure 18 : Les souris TgN3ICD SM ont une dysfonction cardiaque similaire aux contrôles.	83
Figure 19 : Les souris TgN3ICD SM ont des marqueurs de fibrose cardiaque diminués en réponse à l'hypertension, par rapport aux contrôles.	85
Figure 20 : La surexpression de N3ICD empêche la régulation négative de la voie de signalisation Notch3 suite à l'infusion d'AngII.	86
Figure 21 : L'entraînement physique semble réduire l'hypertrophie cardiaque chez les souris Notch3 KO.	90
Figure 22 : L'entraînement physique ne modifie pas les effets du Notch3 KO sur la vasculature des souris.	92
Figure 23 : L'entraînement physique augmente le stress oxydant cardiaque chez les souris Notch3 KO.	94
Figure 24 : L'entraînement physique diminue la fibrose cardiaque chez les souris Notch3 KO.	95

Figure 25 : La diminution de l'expression de Cx43 améliore la fonction et la structure rénales après IR rénale.....	99
Figure 26 : La diminution de Cx43 chez les souris HE module la réponse inflammatoire après 48h d'IR.....	101
Figure 27 : Numération Formule Sanguine des souris Cx43 WT et HE.	102
Figure 28 : Mesure des marqueurs endothéliaux chez les souris Cx43 WT et HE après 48h d'IR.	103
Figure 29 : L'absence de Cx43 dans les cellules tubulaires rénales ne semble pas améliorer significativement la structure et la fonction rénales..	105
Figure 30 : Impacte de la délétion tubulaire de Cx43 sur les monocytes.....	106
Figure 31 : Impacte de la délétion tubulaire de Cx43 sur l'activation endothéliale..	107
Figure 32 : Impacte de la délétion spécifique de la Cx43 endothéliale sur la fonction et la structure rénales.....	109
Figure 33 : Impacte de la délétion spécifique de la Cx43 endothéliale sur les réponses inflammatoire et fibrotique après IR rénale.	111
Figure 34 : L'absence de Cx43 dans les cellules endothéliales module la réponse inflammatoire après IR rénale.	112
Figure 35 : Numération Formule Sanguine des souris Cx43FloxVeCadh Tam- et Tam+.....	113
Figure 36 : Etude des marqueurs d'adhésion cellulaire chez les souris délétées de la Cx43 endothéliale.	115
Figure 37 : Schéma bilan du rôle de Notch3 dans le remodelage cardiaque..	120
Figure 38 : Schéma bilan du rôle de la Connexine 43 dans le remodelage rénal suite à une IR.....	128

Liste des tableaux

Tableau 1 : Amorces utilisées pour les RT-PCR quantitatives cardiaques.	71
Tableau 2 : Amorces utilisées pour les RT-PCR quantitatives rénales.....	73
Tableau 3 : Anticorps utilisés pour les Western Blot.	74
Tableau 4 : Anticorps utilisés pour les immunofluorescences cardiaques.....	75
Tableau 5 : Anticorps utilisés pour les immunohistochimies rénales.....	78

Avant Propos

Les maladies rénales et cardiaques sont l'une et l'autre causes d'une grande morbi-mortalité, en particulier dans les pays dits développés. En dépit des progrès récents, et de l'apport de nouvelles approches thérapeutiques, l'insuffisance rénale et l'insuffisance cardiaque demeurent des fléaux au plan de la qualité de vie des patients et des budgets de santé. Outre leurs dysfonctions propres, il apparaît maintenant que la dysfonction aiguë ou chronique de l'un peut induire la dysfonction aiguë ou chronique de l'autre, on parle alors de syndrome cardiorénal, dont la physiopathologie n'est pas encore parfaitement élucidée. Pour atteindre cet objectif, est un préalable nécessaire une meilleure compréhension des mécanismes physiopathologiques conduisant respectivement à la défaillance de l'un ou de l'autre de ces organes. Récemment C. Chatziantoniou *et al*, ont démontré que dans le rein Notch3 pourrait représenter une cible thérapeutique, à contrario dans le cœur, l'absence de cette voie de signalisation aggraverait la symptomatologie cardiaque. Ces résultats mettent en exergue la complexité et la spécificité des mécanismes d'adaptation d'un organe face à une agression. Au cours de ma formation et par la recherche, j'ai, d'une part, participé à l'analyse des conséquences de l'absence de la voie de signalisation Notch3 dans l'adaptation du myocarde à une surcharge de débit, et d'autre part j'ai étudié le rôle de la connexine 43 dans le rein face à une agression aiguë. Si la connexine 43 pourrait au niveau rénal, constituer une cible thérapeutique, la présence de cette protéine au niveau cardiaque est indispensable à la formation des jonctions gap et donc à la transmission du signal électrique entre les cellules.

Cette dualité entre 2 organes m'a conduite à développer en parallèle, 2 axes de recherches, l'un visant à définir si Notch3 était une voie de première importance au niveau cardiaque quelque soit le mode d'hypertrophie ; l'autre axe a été de déterminer l'importance de la connexine 43 lors des maladies rénales aiguës.

Introduction

Partie 1 : Rôle de Notch3 dans le remodelage cardiaque

Les maladies cardiovasculaires sont une cause majeure de morbidité et de mortalité de nos jours. Grandement étudiées, il n'en reste pas moins que certaines zones d'ombres restent à éclaircir, notamment de rôle des cellules musculaires lisses vasculaires (CMLV).

1. Le réseau vasculaire

Pour fonctionner, notre organisme a besoin d'énergie. Afin d'acheminer l'oxygène et les nutriments aux différents organes, le sang est conduit jusqu'à ces derniers grâce au réseau vasculaire. Le système vasculaire est composé de 2 circuits : la circulation pulmonaire qui permet l'oxygénation du sang, et la circulation systémique qui permet le transport de l'oxygène aux organes. La circulation se fait en sens unique dans tout l'organisme.

Le réseau vasculaire forme un système clos composé de trois grands types de vaisseaux :

- les artères, qui transportent le sang du cœur vers les organes
- les veines, qui transportent le sang des organes vers le cœur
- les capillaires, qui sont les plus petits vaisseaux sanguins et font la liaison entre artères et veines. Ils sont le lieu privilégié où l'oxygène entre dans les cellules avoisinantes.

a. Les artères

Les artères possèdent 3 couches distinctes :

- L'intima : elle est constituée d'un endothélium (monocouche de cellules épithéliales pavimenteuses) au contact direct du sang, d'une couche sous-endothéliale et d'une lame basale les séparant.
- La média : elle est constituée principalement de cellules musculaires lisses vasculaires (CMLV), associées à des feuillets d'élastine continus (aorte) ou non (artère de résistance) formant des unités lamellaires. Le nombre de ces dernières augmente suivant le diamètre du vaisseau sanguin. La média est bordée d'un côté par la limitante élastique interne (circulaire), et de l'autre par la limitante élastique externe (longitudinale). C'est grâce au CMLV que l'artère régule la taille de sa lumière, en se contractant ou se dilatant, en fonction des

conditions, et donc modifiant la pression artérielle. Cette activité contractile est régulée par le système nerveux sympathique et les médiateurs vasoactifs.

- L'adventice : est la tunique externe des vaisseaux. Elle est principalement constituée de fibres de collagène lâchement entrelacées, et permet l'arrimage des artères aux tissus environnants. Elle est également riche en fibroblastes, contient de l'élastine et des terminaisons nerveuses. Dans les vaisseaux de gros calibre l'adventice est parcourue par le vasovasorum (« vaisseaux des vaisseaux ») qui sont de tout petits vaisseaux sanguins permettant l'irrigation sanguine des parties externes de la media, la partie interne se nourrissant directement via le sang circulant dans la lumière.

On distingue deux types d'artères : les artères de conductance et les artères de résistance.

Les artères de conductance, ou artères élastiques, ont une média riche en fibres d'élastine. Il s'agit des artères de gros calibres (diamètre de 2,5cm et paroi de 2mm) telles que l'aorte et les carotides. Les artères de conductance amortissent la pulsativité du flux sanguin éjecté par le ventricule gauche et permettent ainsi d'avoir une pression continue dans le reste du réseau artériel.

Les artères de résistance, ou artères musculaires, ont une média riche en CMLV. A contrario, elles vont avoir une modification active de leur calibre vasculaire, pour s'adapter aux conditions environnementales. Il s'agit des artères de petites tailles (diamètre de 0,4cm et paroi de 1mm), donc les artères périphériques. Ces artères ont un rôle capital dans le contrôle du débit sanguin, donc de la pression sanguine. Plusieurs facteurs modulent le tonus myogénique de ces artères : le taux de divers métabolites sanguins (PO_2 , PCO_2 , pH), divers agents vasoactifs sécrétés par les cellules endothéliales ou encore les facteurs mécaniques. Par exemple, une diminution de pression induit une contraction des CMLV ce qui augmente le tonus myogénique. Ou encore, une augmentation des forces de cisaillement entraîne la sécrétion de molécules relaxantes par les cellules endothéliales aboutissant à une vasodilatation.

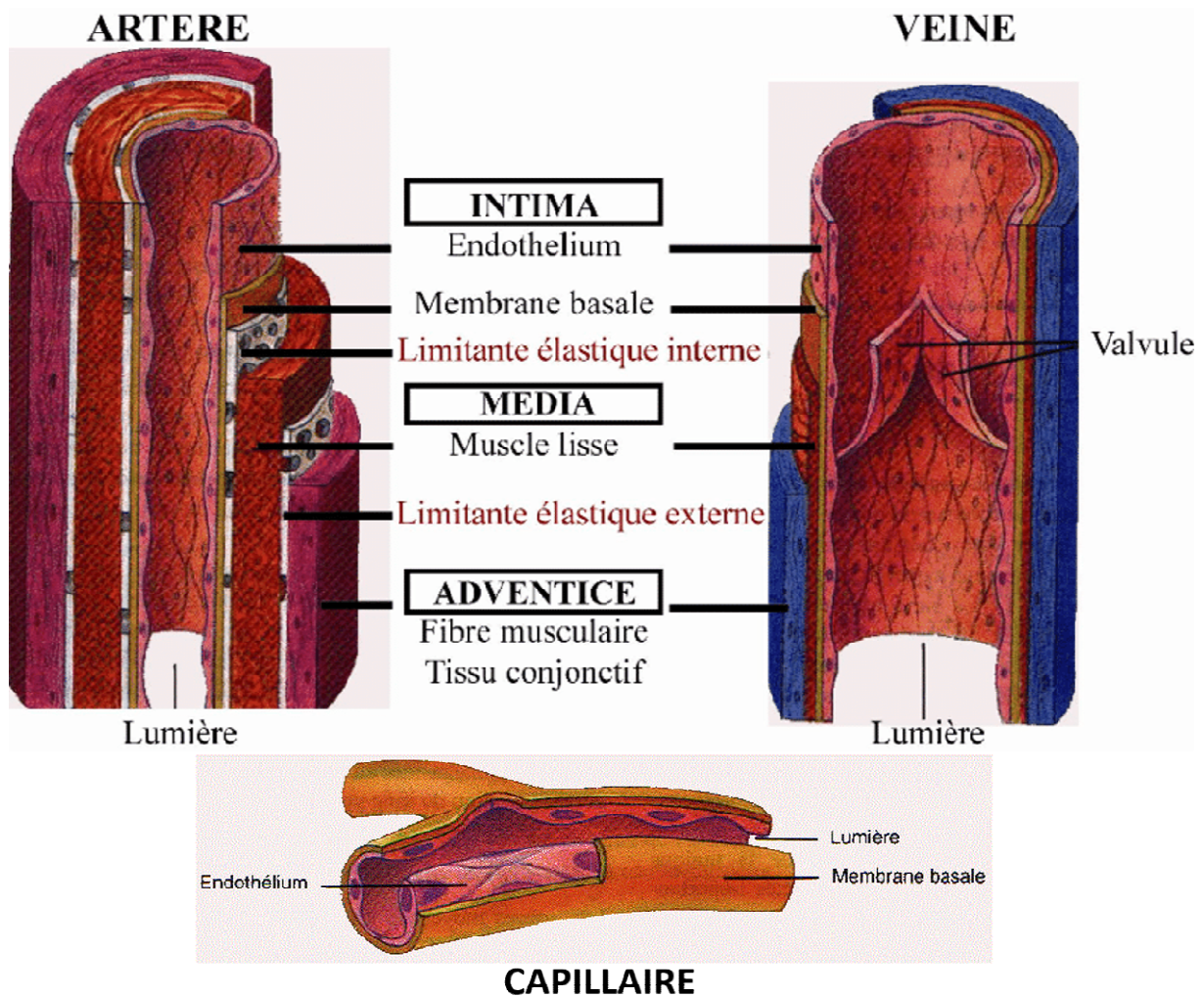


Figure 1 : Structure des vaisseaux : artère, veine et capillaire. Les artères et les veines possèdent couches distinctes : l'intima, la media et l'adventice. Les capillaires permettent l'échange d'oxygène entre le sang et les cellules avoisinantes. (bio.m2osw.com)

L'endothélium

L'endothélium a un rôle majeur dans la vasomotricité et l'hémostase. La surface des cellules endothéliales est recouverte de glycocalyx, qui est une couche de glycoaminoglycane chargés négativement, ce qui aide à l'inhibition de la thrombose à la surface des vaisseaux et qui participe également à la régulation de protéines telles que les lipoprotéines ou les protéines plasmatiques. Mais outre cette caractéristique structurale, les cellules endothéliales ont un rôle sécrétoire. D'une part, l'endothélium module la coagulation en sécrétant des facteurs inhibants la coagulation tels que la prostacycline (anti-agrégant plaquettaire) ou l'activateur tissulaire du plasminogène (agit sur la thromolyse). D'autre part, les cellules endothéliales modulent le tonus et la vasomotricité vasculaire en produisant des agents vasodilatateurs (monoxyde d'azote (NO) et prostacycline) ou vasoconstricteurs (angiotensine II (AngII), endothéline et thromboxane) qui vont agir sur les CMLV.

Les cellules musculaires lisses vasculaires

Les CMLV sont des cellules allongées de 2-5µm de diamètre et de longueur variable pouvant atteindre jusqu'à 500µm, et elles sont uninuclées. Tout comme les cellules musculaires cardiaques, elles possèdent de l'actine et de la myosine, cependant ces filaments ne sont pas organisés et ne forment pas de myofibrilles individualisées. De plus, leur contraction est également la résultante d'un cycle calcique intracellulaire permettant le mécanisme général de contraction-relaxation. La différence majeure étant l'absence de troponine C dans les CMLV.

La régulation de la contraction-relaxation des CMLV se fait de 2 manières : par le système nerveux (SN) autonome ou par contrôle hormonal. Concernant le SN autonome, le SN sympathique semble avoir une action principalement vasoconstrictrice, via la noradrénaline. Cependant, il semble que la réponse du SN sympathique à la noradrénaline dépende du type de récepteur mis en jeu : les récepteurs α -adrénergiques ont une action vasoconstrictive alors que les récepteurs β -adrénergiques ont une action vasodilatatrice. S'ajoute à cela, le SN parasympathique qui lui est décrit comme ayant une action vasodilatatrice, bien que son rôle soit moins marqué.

Du point de vue hormonal, les CMLV sont régulées par nombre d'hormones mais les cellules endothéliales ont une importance majeure dans ce contrôle. En effet, bien que les agents vasoconstricteurs exercent une action directe sur les CMLV, les vasodilatateurs agissent le plus souvent de façon indirecte via les cellules endothéliales. L'activation des cellules endothéliales par des agents relaxants ou des contraintes de cisaillement va leur faire sécréter du NO, qui va diffuser vers les CMLV adjacentes, et va alors activer la GC (guanylatecyclase), entraînant la production de GMPc (Guanosine monophosphate cyclique). Cette augmentation de GMPc intracellulaire dans les CMLV active la PKG (Protéine Kinase G) qui phosphoryle en retour le phospholambane, qui stimule le recaptage du Ca^{2+} (calcium) par SERCA (Sarco/Endoplasmic Reticulum Ca^{2+} -ATPase). Tout ceci entraîne la relaxation des CMLV donc la vasodilatation. Les vasoconstricteurs, dans la plupart des cas, vont directement se lier aux récepteurs présents sur les CMLV et ainsi activer la PLC β (Phospholipase β) qui va libérer IP3 (inositol-1,4,5-triphosphate) et DAG (diacylglycérols) et *in fine* aboutir à une augmentation de la concentration intracellulaire de Ca^{2+} .

Outre leur rôle dans le tonus vasculaire grâce à leur activité contractile, les CMLV modifient leur phénotype en réponse aux changements environnementaux. Ainsi elles peuvent passer d'un phénotype différencié « contractile » à un phénotype dédifférencié dit « sécrétoire ». Ce dernier phénotype a été mis en évidence dans certaines pathologies artérielles telles que l'athérosclérose ou l'hypertension artérielle. Le phénotype sécrétoire des CMLV se caractérise par la capacité de prolifération et de migration ainsi qu'une synthèse accrue de MEC (Matrice

ExtraCellulaire).Concernant les voies de signalisations mises en jeu dans la dédifférenciation des CMLV, plusieurs acteurs ont été mis en évidence. Ainsi, en réponse à un stress mécanique, sont induites des molécules régulatrices tels que des facteurs de transcription (c-Fos, Sp1, Egr1), des molécules de signalisation (JNK, P38, ERK), des facteurs de croissance (FGF-2, PDGF)¹⁻⁴, leur expression étant rapide et transitoire. Il a aussi été montré que PDGF-BB (Platelet-Derived Growth Factor-BB) et TGF β (Transforming Growth Factor β) modulent cette dédifférenciation⁵ : PDGF-BB inhibe l'expression des gènes codant les protéines contractiles des CMLV, a contrario du TGF β . De plus, la voie Notch3 interagit avec les voies du PDGF-BB⁶ et du TGF β ^{7,8} pour moduler la migration et la différenciation des CMLV via l'activation de kinases telles que : ERK (Extracellular signal- Regulated Kinase), JNK (c-Jun-N-terminal Kinase), p38 MAPK, AKT (RAC-alpha Serine/Threonin-protein), Rho/Rho-kinase, et calcineurine/calmoduline kinase.

b. L'angiogenèse

L'angiogenèse est le processus de croissance de nouveaux vaisseaux sanguins à partir de vaisseaux pré-existants. C'est un processus physiologique se retrouvant notamment lors de la croissance, de l'exercice physique ou de la grossesse, permettant d'assurer un meilleur apport en oxygène aux organes quand leur demande s'accroît. Cependant, il est également retrouvé lors de processus pathologiques (hypoxie, cancer). Il est notamment établi qu'un déficit d'angiogenèse participerait au développement de l'insuffisance cardiaque⁹.

La formation de nouveaux vaisseaux se fait grâce à la prolifération de cellules endothéliales. Il existe plusieurs voies de signalisation contrôlant le processus d'angiogenèse, et la principale est la voie du VEGF (VascularEndothelial Growth Factor). Cette famille est constituée de 5 ligands, qui sont des protéines sécrétées : VEGF-A (le premier découvert et le plus étudié), B, C, D et le PlGF (placental Growth Factor)¹⁰ ; et de 3 récepteurs transmembranaires à activité tyrosine-kinase: VEGFR1 à 3, ainsi que la forme soluble de VEGFR1 (sVEGFR1). Contrairement à VEGFR1 et 2 dont la localisation est endothéliale, VEGFR3 est présent dans les vaisseaux lymphatiques. VEGF-A se lie préférentiellement à VEGFR1 (aussi appelé Flt1), mais il se lie également à VEGFR2 (aussi appelé Flk1).

Bien que l'affinité pour VEGFR2 soit moindre (10 fois supérieur pour le VEGFR1), il est le plus fort médiateur de l'activité du VEGF-A, la transduction du signal par VEGFR1 étant très réduite¹¹. Il semble que VEGFR1 sert à piéger VEGF-A afin de réduire l'activité de VEGFR2. sVEGFR1 (ou sFlt1) semble également jouer ce rôle de piège en se liant à VEGF-A et PlGF, empêchant leurs activités angiogéniques¹². Cependant, VEGFR1 ne se cantonne pas à ce rôle car il a été mis en évidence que sa liaison avec PlGF active l'angiogenèse^{13,14}.

Concernant le VEGFR2, la délétion du gène VEGFR2 chez la souris est létale par des défauts de vascularisation¹⁵, et son implication a été décrite dans la croissance, la survie et la migration des cellules endothéliales durant la vie embryonnaire et la vie adulte¹⁶. Tout cela confirme son rôle pro-angiogénique.

La disponibilité de l'oxygène est un modulateur majeur de l'expression de VEGF-A. En effet, le gène codant pour VEGF-A possède des domaines HRE (Hypoxia Responsive Enhancer) permettant la liaison du facteur de transcription HIF1 (Hypoxia Inducible Factor 1) en condition hypoxique.

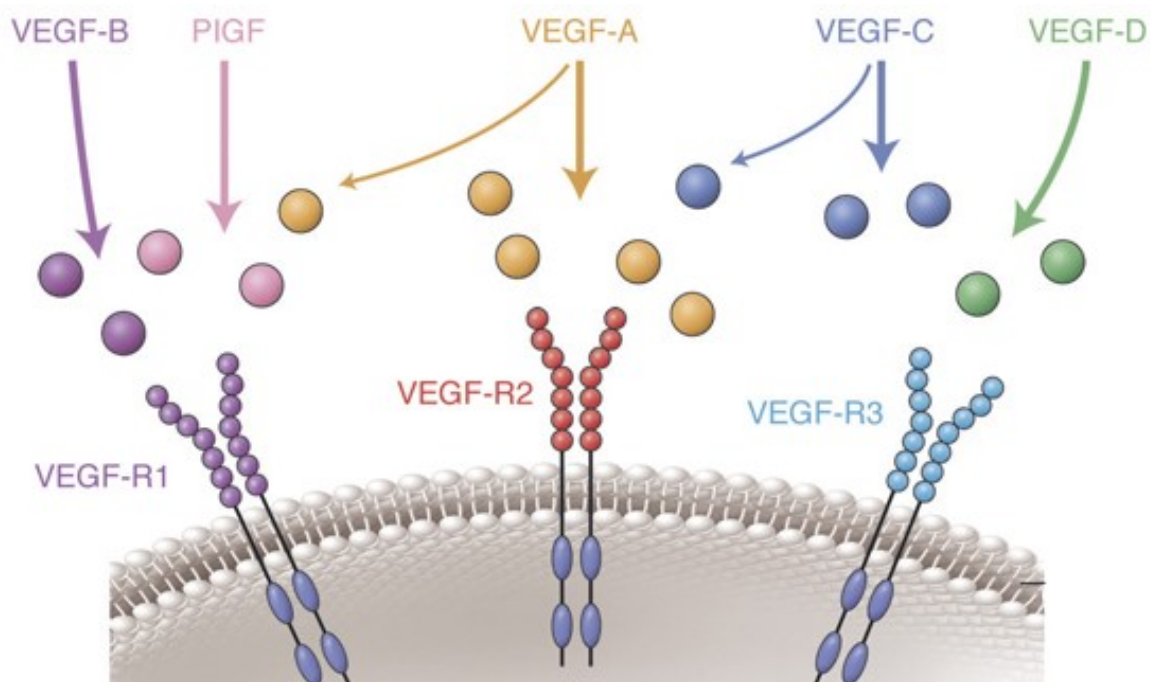


Figure 2 : Voie de signalisation VEGF. La famille des protéines VEGF est composée de 5 ligands : VEGF-A, B, C, D et PlGF. L'action des différents VEGF est médiée par l'activation de trois récepteurs tyrosine kinase : VEGF-R1, -R2 et -R3 (Delyfer M.N.).

c. Le remodelage vasculaire

Le remodelage vasculaire correspond à la modification de la structure et de la fonction artérielles au cours de processus physiologiques ou pathologiques. Ces modifications adaptatives sont en général compensatoires à court terme mais induisent des conséquences pathologiques sur le long terme. Le phénomène de remodelage vasculaire survenant au niveau de la paroi artérielle, implique des processus cellulaires (croissance, apoptose et migration cellulaires, production ou dégradation de la MEC) dépendants d'interactions dynamiques entre les facteurs de croissance produits localement, les substances vasoactives et les stimuli hémodynamiques¹⁷.

Il existe plusieurs catégories de remodelage. Le remodelage va être dit interne lorsque la lumière du vaisseau est réduite, ou dit externe si au contraire elle est élargie. S'ajoute à cela le remodelage eutrophique lorsque la quantité et la qualité du matériau pariétal est inchangé, hypertrophique en cas d'augmentation ou hypotrophique en cas de réduction du matériau pariétal.

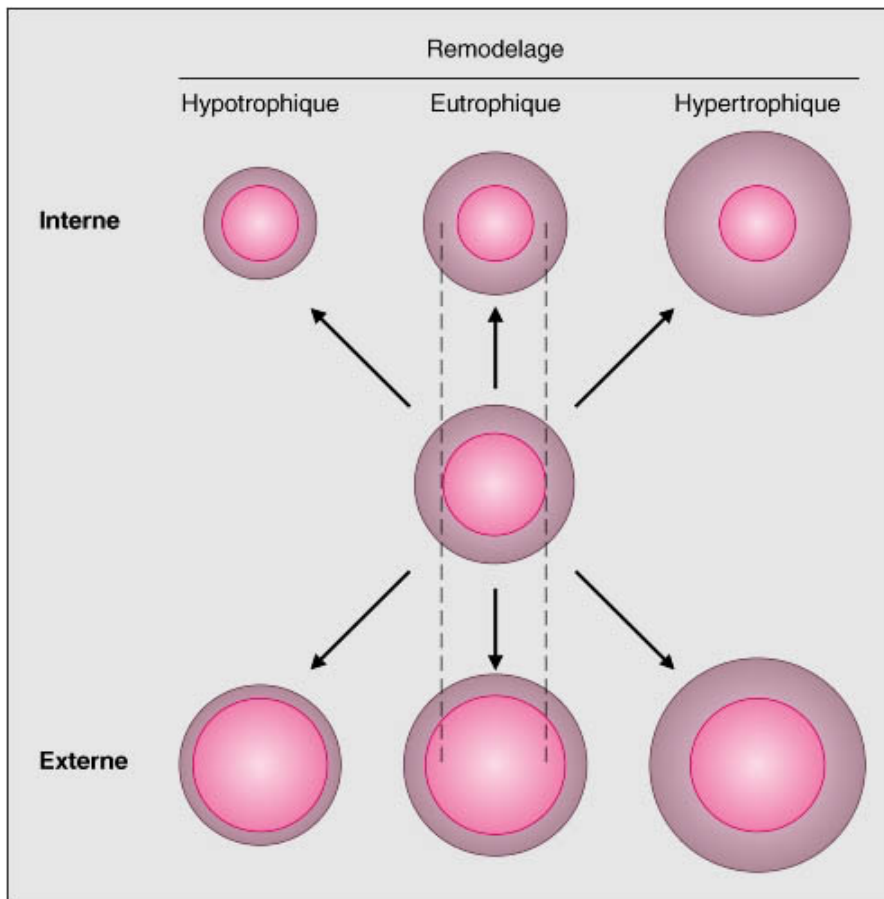


Figure 3 : Schéma des différents types de remodelage vasculaire. Le remodelage interne correspond à une réduction de la lumière du vaisseau, alors que le remodelage externe correspond à son augmentation. Le remodelage est dit hypertrophique lorsque la quantité de matériau pariétal est augmentée, ou hypotrophique lorsqu'elle est diminuée et eutrophique lorsqu'elle ne change pas (Laurent S., médecine/sciences. 1997).

Lors de l'exercice physique un remodelage externe hypertrophique s'opère. Il a été montré que ce type de remodelage est la conséquence de l'activation de eNOS (augmentation de la lumière par dilatation vasculaire) et de la MMP-9 (matrice métalloprotéinase-9), mais aussi de l'hypertrophie de la média^{18,19}. Les mécanismes mis en jeu lors d'un exercice physique résultent d'une demande accrue en oxygène et nutriments des tissus. Donc, afin d'accroître l'apport, les artérioles vont se vasodilater, ce qui réduit les résistances périphériques. L'augmentation du débit en résultant entraîne une augmentation des forces de cisaillements sur l'endothélium, ce qui active la production de médiateurs vasodilatants tels que le NO, les prostacyclines ou la bradykinine, favorisant d'autant plus

la relaxation vasculaire^{20,21}. L'augmentation de la tension pariétale due à l'augmentation de pression, secondaire à la dilatation, stimule la production de facteurs de croissance et donc l'hypertrophie/hyperplasie des CMLV de la média²².

Au cours de l'hypertension artérielle, certains territoires artériels sont l'objet d'un remodelage interne eutrophique et d'autres d'un remodelage interne hypertrophique, donc dans tous les cas la lumière est réduite. Ce dernier cas peut concerner les artères de toute taille et faire intervenir des modifications cellulaires et de la MEC. L'hypertrophie résulte soit d'une augmentation de la taille des cellules (hypertrophie), soit d'une augmentation du nombre de cellules (hyperplasie)²³. Dans des modèles d'hypertension artérielle expérimentale l'hypertrophie cellulaire prédomine au niveau des artères de gros calibre, et l'hyperplasie au niveau des artérioles²⁴. De plus, est visible lors d'hypertensions artérielles expérimentales une augmentation du collagène, de l'élastine et des protéoglycanes²³⁻²⁶ par stimulation de leur production par les CMLV. Cet ensemble mène à une rigidité des artères de conductance ainsi qu'à une perte de compliance. Les artères de résistances subissent trois types de phénomènes : un remodelage interne eutrophique, c'est-à-dire une réorganisation des cellules murales ; une raréfaction artériolaire ; une atteinte précoce de la fonction endothéliale, se traduisant par la diminution de la biodisponibilité du NO. Il en résulte une augmentation des résistances périphériques, une altération des capacités de vasodilatation et une diminution de l'apport en oxygène aux tissus. De plus, il a été montré chez le rat hypertendu, que le remodelage eutrophique est associé à l'activation du système rénine-angiotensine-aldostérone²⁷, alors que la voie endothéline-1 induit un remodelage hypertrophique²⁸.

Un autre des paramètres clés du remodelage vasculaire se trouve être la dysfonction endothéliale, qui se caractérise en partie par une diminution de la réponse vasodilatatrice endothélium-dépendant mettant en jeu le NO²⁹. D'une part, lors de l'hypertension la vasodilatation, induite par les médiateurs sécrétés par les cellules endothéliales, n'est plus fonctionnelle. Il a été montré que l'hypertension est associée à une diminution de l'activité de la cascade NOS/NO/GMPC³⁰. Notamment, la délétion spécifique d'une des trois NOS a mis en évidence que le déficit d'activité de eNOS joue un rôle majeur dans le développement de l'hypertension³¹. La dysfonction endothéliale entraîne également un déséquilibre entre le NO et les ROS (Reactive Oxygen Species), qui est caractéristique de l'hypertension. En effet, la surproduction de ROS entraîne une diminution de la biodisponibilité du NO³². Les ROS vont perturber la balance synthèse-dégradation du BH4, entraînant un mauvais couplage de eNOS, ce qui va générer plus d'ions superoxydes au lieu du NO³³. Ainsi, la

dysfonction endothéliale est associée à plusieurs facteurs de risque cardiovasculaire tels que l'hypertension artérielle (HTA), le diabète, l'hypercholestérolémie³⁴⁻³⁷.

Enfin s'ajoute à cela, l'implication de l'inflammation dans le remodelage vasculaire. L'inflammation participe au remodelage vasculaire via l'infiltration des cellules inflammatoires, notamment les macrophages, et par la surexpression de médiateurs inflammatoires tels que ICAM1 (Intercellular Adhesion Molecule1) ou MCP1 (Monocyte Chemoattractant Protein 1). Ces cellules immunitaires vont alors participer à la surproduction de ROS, l'expression de l'AngII et la fibrose (par la surproduction de MEC), induisant l'HTA et le remodelage vasculaire délétère³⁸⁻⁴⁰.

2. Remodelage cardiaque

L'une des conséquences possible sur le long terme d'un remodelage cardiaque est l'adaptation du cœur aux nouvelles conditions hémodynamiques qu'il subit.

a. Le cœur

Le cœur est une pompe musculaire striée active en permanence afin d'assurer une irrigation continue des organes par le sang. Le cœur possède 4 cavités: 2 ventricules et 2 oreillettes. Le côté droit reçoit le sang pauvre en O₂ (oxygène) via l'oreillette droite, alors que le côté gauche reçoit un sang riche en O₂ après le passage par les poumons. La séquence rythmique et synchrone des contractions cardiaques est due à la propagation du flux électrique propagé de cellules en cellules, via les jonctions gap, composées de connexines.

Le cœur est composé de 3 couches : l'endocarde qui est une couche monocellulaire endothéliale tapissant les cavités internes, le myocarde, et au niveau externe l'épicarde qui fait partie du péricarde. Les composants majeurs du myocarde sont les cellules musculaires striées : les cardiomyocytes. La contraction musculaire se fait grâce à dépolarisation des cardiomyocytes. Le couplage excitation-contraction se traduit par une accumulation de Ca²⁺ intracellulaire lors de la systole, le Ca²⁺ se lie à la troponine C permettant la liaison actine-myosine, et donc la contraction du sarcomère. A la fin de chaque contraction le Ca²⁺ est réabsorbé par le réticulum sarcoplasmique via des pompes membranaires en particulier les SERCA⁴¹.

Le cœur s'adapte aux changements hémodynamiques, afin de pouvoir garder un fonctionnement le plus optimal possible et garantir une survie de son porteur la plus longue possible. Cette adaptation

structurale et fonctionnelle, est appelée remodelage cardiaque. On en distingue deux modes, le remodelage cardiaque physiologique, présent par exemple chez la femme enceinte ou le sportif ; et le remodelage cardiaque pathologique, en réponse à l'hypertension artérielle et l'infarctus du myocarde, par exemple. Le paramètre commun à ces deux remodelages sera l'hypertrophie cardiaque, mais l'évolution sera différente.

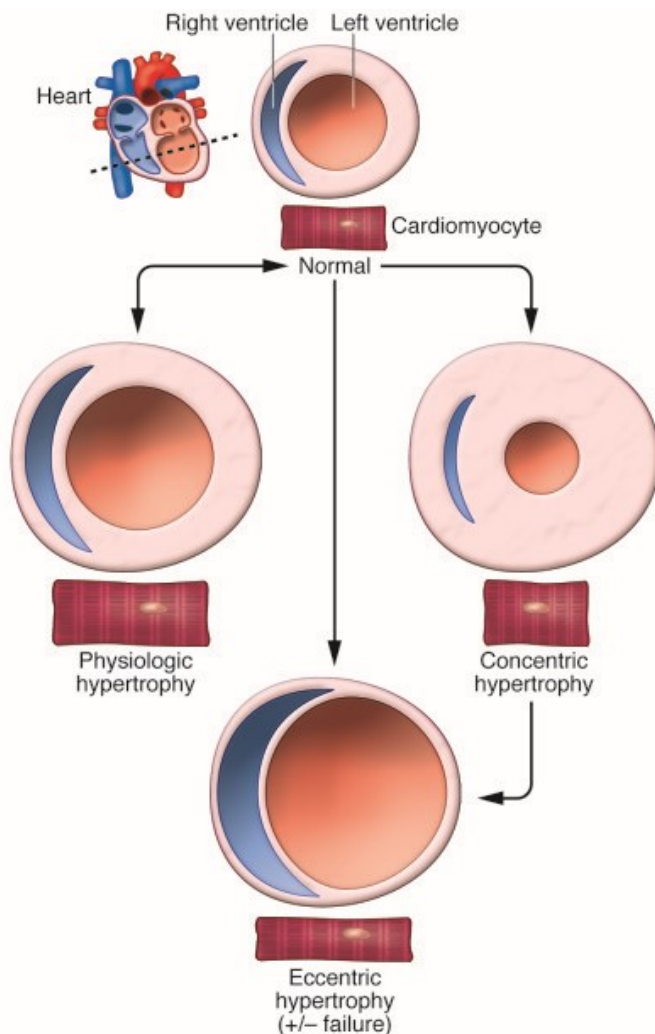


Figure 4 : Schéma des différents remodelages cardiaques. Le remodelage physiologique donne lieu à une hypertrophie excentrique due à l'augmentation de la largeur et de la longueur des cardiomyocytes. Le remodelage pathologique va d'abord être un phénomène compensatoire résultant en une hypertrophie concentrique due à l'augmentation de la largeur des cardiomyocytes (fonction contractile préservée), pouvant évoluer en hypertrophie excentrique (allongement du cardiomyocyte) alors associée à une dysfonction contractile (Van Berlo JH et al, J Clin Invest. 2013).

b. Hypertrophie cardiaque physiologique

L'hypertrophie cardiaque physiologique résulte d'une augmentation en synergie des différents acteurs cardiaques afin de répondre à la demande accrue en oxygène du corps : les cardiomyocytes

s'hypertrophie, la capacité contractile augmente et le métabolisme cellulaire change. Ce type d'hypertrophie a lieu lors de la croissance, de la grossesse ainsi que de l'entraînement physique. L'hypertrophie cardiaque physiologique est transitoire, donc disparaît en l'absence de ses stimuli. Il est ainsi observé une régression de la masse cardiaque quelques semaines après l'arrêt de l'exercice physique chez les athlètes de haut niveau⁴².

L'hypertrophie physiologique est initiée par des facteurs hormonaux et des stress mécaniques qui induisent des changements intracellulaires des cardiomyocytes. Ces changements entraînent une augmentation de la masse cardiaque mais de manière proportionnelle : est observée une croissance proportionnelle en longueur et en largeur du cœur ainsi qu'un agrandissement proportionnel de la cavité cardiaque. Pour cela il a été mis en évidence l'implication de différentes voies de signalisations. Dans les lignes qui vont suivre nous nous concentrerons sur les voies de signalisations identifiées dans la réponse à l'exercice physique.

Les voies de signalisation

La voie cellulaire clé dans la régulation de l'hypertrophie cardiaque physiologique en réponse à l'exercice est celle de la PI3K (Phosphatidyl Inositol-3-Phosphate Kinase)/Akt⁴³. L'activation d'un récepteur tyrosine kinase (RTK) induit une cascade de signalisation passant par PI3K, puis Akt et puis la voie de signalisation mTOR (mechanistic Target Of Rapamycin). S'en suit la régulation des effecteurs en aval de mTOR tels que S6K1 et 4EBP1 qui régulent la synthèse protéique et l'hypertrophie^{44,45}. Un des activateurs majeur de cette hypertrophie physiologique par les RTK est le facteur de croissance IGF1 (Insulin Growth Factor 1). Et il se trouve qu'il est induit lors d'un exercice physique⁴⁶. Outre l'activation de la voie mTOR, la modulation de l'hypertrophie par Akt se fait via la modulation de la voie GSK3 β (Glycogen Synthase Kinase 3 β). GSK3 β est un régulateur négatif de l'hypertrophie, notamment en régulant la prolifération myocytaire durant la croissance cardiaque embryonnaire, en partenariat avec GATA4 ou la encore la cyclin D1 ; mais aussi en régulant la fibrose cardiaque via l'inhibition de la voie β -caténine⁴⁷ et de SMAD-3⁴⁸.

Une autre voie mise en jeu est celle de l'activation des récepteurs β 3-AR (β 3 Adrenergic Receptors) par les catécholamines induisant la production de NO par la eNOS (endothelial nitric oxide synthase). Et l'exercice physique induit une augmentation des catécholamines dans le sang et donc une suractivation des β 3-AR⁴⁹. Cette production de NO va activer GC qui va produire de GMPc et lui-même activer la PKG, ce qui induit l'augmentation de la contractilité cardiaque et la diminution de la fibrose. Il est à noter que Akt peut lui aussi activer directement la eNOS.

Il est maintenant établi qu'en plus d'induire une hypertrophie dite physiologique l'exercice physique permet une amélioration du phénotype cardiaque lors de pathologies, diminue les risques de complication des patients à risques cardiovasculaires et améliore le déclin du au vieillissement cardiaque. Le rôle de NRG1 (neuregulin-1) à notamment été mis en évidence : c'est une petite molécule d'adhésion qui va activer les récepteurs tyrosine kinase ErbB puis activer la voie PI3K/Akt. Ainsi il a été démontré que la voie NRG1/ErbB favorise la réparation cardiaque⁵⁰ et protège les cardiomyocytes de l'apoptose⁵¹ chez le rat après infarctus du myocarde ; permet la régénération cardiaque via la différenciation et la prolifération des cardiomyocytes⁵². L'une des cibles de la voie NRG1/ErbB récemment mis en évidence est le facteur de transcription C/EBP β : son inhibition entraîne la surexpression de gènes pro-hypertrophiques tels que GATA4, et est lié à l'augmentation de CITED4 (Cbp/P300 Interacting Transactivator With Glu/Asp Rich Carboxy-Terminal Domain 4)⁵³.

L'angiogenèse

Une induction d'angiogenèse a lieu afin de faire face à la demande accrue en oxygène et aux besoins énergétiques nécessaires à l'hypertrophie des cardiomyocytes. Afin d'avoir une croissance cardiaque adéquate lors d'un exercice physique on observe donc l'augmentation du flux sanguin coronaire, du diamètre des artères coronaires et du nombre de capillaires par cardiomyocyte⁵⁴⁻⁵⁶. La modulation de l'angiogenèse est principalement médiée par la voie de signalisation VEGF⁵⁷. Une régulation négative de la voie de signalisation VEGF est observée dans les cœurs âgés, et il a été montré que l'exercice physique permet de contrecarrer cette régulation négative⁵⁸.

c. Hypertrophie cardiaque pathologique

L'hypertrophie cardiaque pathologique résulte de processus de remodelage cardiaque maladaptés. Deux types d'hypertrophies pathologiques sont décrits : l'hypertrophie concentrique et l'hypertrophie excentrique.

L'hypertrophie concentrique se caractérise par un cœur ayant des parois épaisses et des cavités rétrécies, résultant de l'addition en parallèle de myofibrilles entraînant l'augmentation du diamètre des cardiomyocytes. Ce phénotype pathologique se développe lors d'une surcharge de pression (l'hypertension artérielle ou une sténose de l'aorte).

L'hypertrophie excentrique se définit par une augmentation de la masse associée à une dilatation des ventricules, voire à un amincissement de la paroi. Elle résulte d'une part de la dégradation de la MEC et d'autre part de l'addition en série de sarcomères sur les myofibrilles entraînant une

augmentation de la longueur des cardiomyocytes. Ce phénotype est observé en réponse à un infarctus du myocarde, et lors de la décompensation d'une hypertrophie de type concentrique, ou enfin suite à des maladies mitrales ou insuffisance aortique.

L'hypertrophie pathologique se caractérise aussi par le développement d'une fibrose interstitielle participant à la dysfonction cardiaque et augmentant les risques de mort subite⁵⁹⁻⁶¹.

Les voies de signalisation

L'un des déterminants cellulaires associés à l'hypertrophie cardiaque concerne la concentration en Ca^{2+} intramyocytaire. Il existe un équilibre de la concentration de Ca^{2+} cytosolique : une augmentation du Ca^{2+} dans le cytosole, via sa libération par le réticulum sarcoplasmique par RyR2 (Ryanodine Receptor 2) ou venant du milieu extracellulaire via les LTCC (L-type Ca^{2+} channel), induit la contraction cardiaque ; la relaxation a lieu lorsque ce Ca^{2+} est recapté par le réticulum sarcoplasmique par SERCA ou sorti de la cellule par NCX (Na^+/Ca^{2+} exchanger). Il est bien établi que tout défaut de cet équilibre entraîne des dysfonctions contractiles. Ainsi une régulation négative de SERCA a été clairement démontrée dans les modèles expérimentaux^{62,63} et chez les patients^{64,65} atteints d'insuffisance cardiaque. Mais aussi altération de RyR2 peut entraîner une augmentation de Ca^{2+} intracytosolique induisant une dysfonction cardiaque⁶⁶.

L'augmentation du Ca^{2+} cytosolique va également réguler deux voies de signalisation majeures de l'hypertrophie cardiaque. La première, qui est la voie calcineurine/NFAT (Nuclear Factor of Activated T cells) est notamment activée par la liaison de l'AngII à son récepteur ATR1 (Angiotensin II receptor type 1) couplé aux protéines G. Lorsqu'elle est activée la calcineurine va déphosphoryler NFAT ce qui permet sa translocation au noyau et l'activation de la transcription de gènes impliqués dans l'hypertrophie cardiaque pathologique, qui sont pour la plupart des gènes du programme fœtal⁶⁷⁻⁷⁰. Cette voie a été montrée nécessaire et suffisante pour induire une hypertrophie cardiaque pathologique⁷¹. La deuxième voie de signalisation ayant montré un rôle indéniable dans l'hypertrophie cardiaque pathologique est celle de la CaMKII (Calcium/calmodulin-dependent protein Kinase II). Il est montré que l'activation de cette sérine/thréonine protéine kinase induit l'hypertrophie cardiaque⁷²⁻⁷⁵ en particulier via la phosphorylation de HDAC4 (Class II Histone Deacetylase 4) qui se dissocie du facteur de transcription MEF2 (Myocyte Enhancer Factor 2), va lui permettre d'être transloqué au noyau et d'activer ses gènes cibles. Là encore il a été montré que l'activation de MEF2 était suffisante à l'induction de l'hypertrophie cardiaque pathologique⁷⁶⁻⁷⁸.

Une autre voie de signalisation semble participer à l'hypertrophie cardiaque pathologique, celle des MAPK (Mitogen Activated Protein Kinase). Les MAPK se répartissent en 3 sous familles : la famille ERK, la famille JNK, et la famille p38-MAPK. Leur activation a lieu via des récepteurs couplés aux protéines G tel qu'ATR1, ou par le stress mécanique (par exemple lors d'une hypertension artérielle). Bien que nombres d'études montrent leur implication dans l'hypertrophie pathologique⁷⁹⁻⁸⁶, cette implication n'en reste pas moins débattue par d'autres⁸⁷⁻⁸⁹.

La fibrose

Un déterminant de la dysfonction cardiaque associé à l'hypertrophie pathologique est la fibrose cardiaque. La fibrose se caractérise par une accumulation de MEC. Il existe plusieurs voies de signalisation et divers types cellulaires influençant ce processus fibrotique, mais les fibroblastes et tout particulièrement les myofibroblastes en sont les effecteurs centraux. En réponse à un stress cardiaque, les fibroblastes cardiaques vont s'activer et se différencier en myofibroblastes. Ces myofibroblastes vont exprimer l' α -SMA (smooth muscle actine α), c'est-à-dire acquérir une capacité contractile et synthétiser une grande quantité de MMP, de TIMP (Metallopeptidase Inhibitor 1) et de collagène. Les fibroblastes, les cardiomyocytes et les cellules endothéliales peuvent également sécréter les cytokines et facteurs de croissance, amplifiant la réponse pro-fibrotique. Cela induit une accumulation disproportionnée de MEC entraînant in fine un dysfonctionnement cardiaque. En effet, la fibrose est responsable de la rigidité du myocarde, altérant le processus contraction-relaxation et détériorant le couplage mécano-électrique du cœur⁹⁰⁻⁹².

L'un des médiateurs les plus étudiés de cette fibrose cardiaque est le TGF β (Transforming Growth Factor β), et dont le TGF β 1 est la forme prédominante qui agit via l'activation de la voie de signalisation Smad⁹³⁻⁹⁵. Le rôle de TGF β dans le développement de la fibrose cardiaque a été montré à l'aide de souris hétérozygotes pour TGF β qui présentent moins de fibrose cardiaque lors du vieillissement⁹⁶, et de souris surexprimant TGF β qui développent une hypertrophie cardiaque associée à une fibrose ventriculaire⁹⁷. Notons que le TGF β inhibe aussi la dégradation de la MEC en régulant PAI-1 (Plasminogen Activator Inhibitor 1) et les TIMP⁹⁸. L'activation et la sécrétion cardiaque de TGF β est stimulée par l'AngII^{94,98}, de plus l'AngII stimule l'adhésion et la croissance des fibroblastes cardiaques ainsi que leur sécrétion de PAI-1 et de MEC⁹⁹. Et il est établi que l'inhibition de l'AngII réduit le développement de la fibrose cardiaque chez des patients atteints d'une maladie rénale ou cardiaque terminale¹⁰⁰.

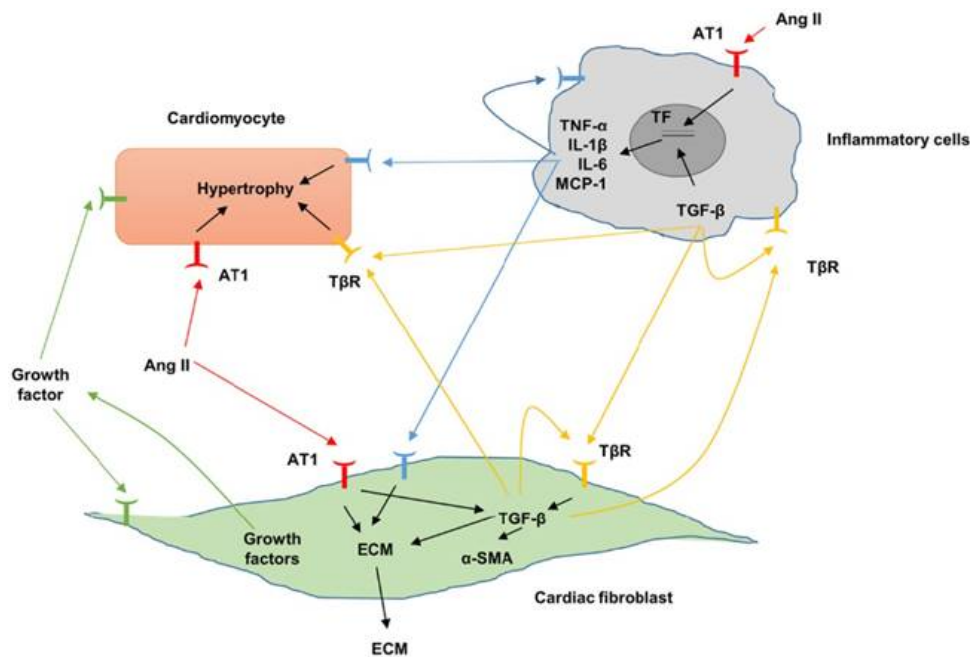


Figure 5 : Signalisation fibrosante entre les différentes populations cellulaires cardiaques que sont les cardiomyocytes, les macrophages et les fibroblastes. AngII : angiotensine II, AT1 : récepteur à l'angiotensine II de type 1, ECM : matrice extracellulaire, TβR : récepteur du TGFβ. L'AngII et les différentes cytokines libérées par les cellules inflammatoires vont potentialiser la réponse inflammatoire ; mais elles vont aussi induire la différenciation des fibroblastes en myofibroblastes qui vont alors produire de la matrice extracellulaire et donc participer à la fibrose cardiaque ; enfin elles vont induire l'hypertrophie des cardiomyocytes. (Zhen-Guo Ma et al, Int J Biol Sci. 2018).

L'inflammation joue un rôle également prépondérant, et notamment dans la production de fibrose cardiaque. L'hypertension artérielle peut activer le système immunitaire inné et donc déclencher de l'inflammation¹⁰¹. L'activation de l'inflammation se fait en partie par les macrophages qui produisent des cytokines activant les processus pro-fibrosants des fibroblastes et des cardiomyocytes. Une des cytokines phare de ce processus inflammatoire est TNFα (tumoral necrose factor α), dont l'expression augmente lors de pathologies cardiaques¹⁰²⁻¹⁰⁴. Mais on retrouve aussi d'autres cytokines comme IL-1β et IL-6, et on sait que le niveau d'expression de ces trois cytokines est corrélé à la sévérité de l'insuffisance cardiaque⁹⁷. Ainsi, l'IL-6 produit par les fibroblastes cardiaques, et activé par les macrophages, est un médiateur essentiel de la fibrose cardiaque induite par l'AngII¹⁰⁵ ; son absence protège de la fibrose cardiaque¹⁰⁶. Les macrophages produisent également Gal-3 (galectine-3) qui est une molécule pro-inflammatoire activant les fibroblastes et favorisant leur production de collagène donc de fibrose en réponse à l'HTA ou lors d'un syndrome cardiorénal^{107,108}. L'induction de la fibrose cardiaque par une HTA, via Gal-3 et l'inflammation, a notamment été montré comme aggravé lors d'un hyperaldostérionisme par Azibani F. *et al*¹⁰⁹. Très récemment, Prud'Homme M. *et al* ont montré que la voie de signalisation Gal-3 joue un rôle majeur dans la fibrose et la dysfonction cardiaque lors d'un syndrome cardiorénal de type 3¹¹⁰.

Le stress oxydant

Il apparait également que le stress oxydant, résultat du déséquilibre de production de ROS, favorise l'inflammation et est associé à l'hypertrophie cardiaque pathologique¹¹¹⁻¹¹³. Il existe trois sources majeures de ROS : la NADPH oxydase (Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate Oxidase), la chaîne respiratoire mitochondriale et eNOS. Il a été montré que des stimuli hypertrophiques tels que l'AngII, ET-1, les catécholamines, des cytokines ou encore le stress mécanique peuvent stimuler la production de ROS par les cardiomyocytes¹¹⁴⁻¹¹⁶. Cela active des médiateurs hypertrophiques tels que la voie ERK1/2 et NFκB (nuclear factor kappa B)¹¹⁷. De plus, il a été montré que le stress oxydant joue un rôle dans la dysfonction endothéliale et le remodelage vasculaire, et contribue aux effets délétères liés à l'HTA^{118,119}.

3. Notch3

Un nouvel acteur non suspecté du remodelage cardiaque a récemment été mis en évidence par Ragot *et al* : le récepteur Notch3. En effet, nous avons mis en évidence le rôle de Notch3 dans l'adaptation cardiaque en réponse à l'HTA. Notch3 était bien connu comme acteur du remodelage vasculaire. En effet, les études princeps ont montré que Notch3 a un rôle dans la physiologie des petites artères de résistance en contrôlant la prolifération et la maturation des CMLV^{120,121} mais également le tonus myogénique¹²². Il a été montré que toute mutation conduisant à l'inactivation du gène *NOTCH3* est délétère car cela entraîne l'apparition du syndrome cérébral CADASIL (Cerebral Autosomal Dominant Arteriopathy with Subcortical Infarcts and Leukoencephalopathy)¹²³, que nous détaillerons par la suite dans la partie 3.b. Le rôle de Notch3 dans la prolifération des CMLV a été démontré dans l'hypertension artérielle (HTA) pulmonaire¹²⁴.

a. Généralités

Le récepteur Notch

Il existe chez les mammifères 4 récepteurs Notch (Notch1 à 4). Il s'agit de protéines transmembranaires de type I (un seul segment transmembranaire avec la partie C-terminale cytosolique), composées d'une partie extracellulaire (NECD) permettant la liaison avec le ligand et d'une partie intracellulaire (NICD) impliquée dans la transduction du signal biologique. Ces deux extrémités sont associées par des liaisons non covalentes. Le NECD est composé d'une répétition de plusieurs motifs EGF (Epidermal Growth Factor), allant de 29 à 36. Ces motifs jouent un rôle dans la

conformation tridimensionnelle de la protéine et il a été montré que les séquences 11-12 sont nécessaires et suffisantes pour l'interaction ligand-récepteur. S'ajoute aux motifs EGF du NECD, un domaine NRR (Negative Regulatory Region) qui protège le récepteur des clivages protéolytiques en l'absence de ligand. Ce domaine NRR est constitué par 3 répétitions du motif LNR (Lin12 Notch Repeats) riche en cystéines et du domaine d'hétérodimérisationjuxtamembranaire. Le NICD quant à lui, est composé d'un domaine RAM (RBP-Jk Associated Molecule), de 7 répétitions ankyrine associées à 2 séquences de signaux de localisation nucléaire (NLS) et d'un domaine PEST (riche en acides aminés Pro-Glu-Ser-Thr). On retrouve une très grande homologie entre les différents récepteurs Notch¹²⁵, Notch3 se caractérise par la répétition de 34 motifs EGF et l'absence du domaine OPA (riche en glutamine). De plus, le gène *NOTCH3* se trouve sur le chromosome 19 chez l'Homme, le 17 chez la souris, et possède 33 exons. Et le récepteur Notch3 est principalement présent dans les CMLV et les péricytes.

Les ligands

Chez les mammifères la voie de signalisation Notch possède 5 ligands, répartis en 2 groupes : les Delta-like (Dll1, Dll2 et Dll4) et les Jagged (Jagged1 et Jagged2). Comme pour les récepteurs, ces ligands sont des protéines transmembranaires de type I. Ils possèdent donc un seul segment transmembranaire, mais aussi une queue C-terminale intracellulaire restreinte, ainsi qu'une partie extracellulaire très conservée permettant l'interaction entre les cellules via le récepteur Notch. Cette partie extracellulaire possède des séquences répétées EGF et un domaine DSL (Delta, Serrate, Lag2). C'est le domaine DSL qui caractérise les ligands de Notch, car il est essentiel pour l'interaction avec les récepteurs. Les différentes interactions ligand-récepteur n'entraînent pas systématiquement une activation¹²⁶.

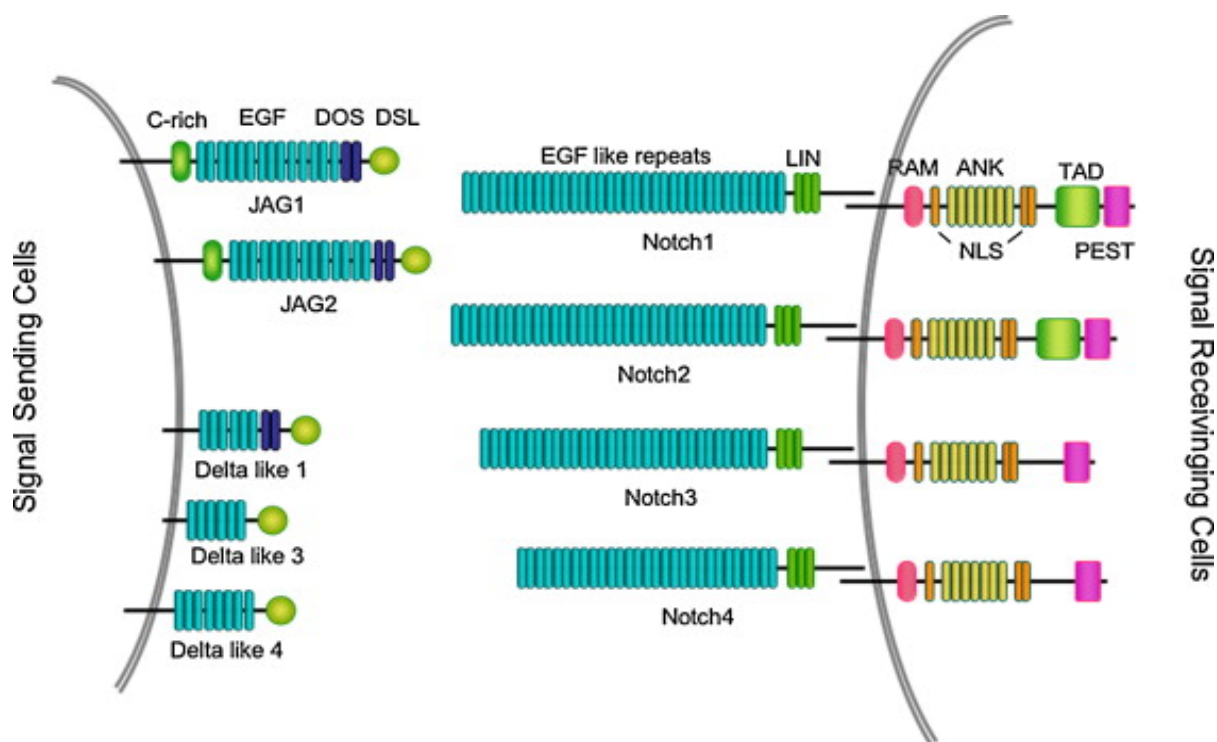


Figure 6 : Structure des ligands et récepteurs Notch chez l'Homme. La famille Notch est composée de 4 récepteurs transmembranaires (Notch1 à 4), et de 5 ligands : Jagged1 et 2, Delta like 1, 3 et 4. Les ligands sont principalement composés de séquences répétées EGF et d'un domaine DSL (Delta, Serrate, Lag2). Les récepteurs ont une partie extracellulaire (NECD) et une partie intracellulaire (NICD). Le NECD est composé d'un grand nombre de motifs EGF, et d'un domaine NRR, constitué de 3 motifs LNR, qui protège le récepteur des clivages protéolytiques en l'absence de ligand. Le NICD est composé d'un domaine RAM, de 7 répétitions ANK associées à des séquences NLS et d'un domaine PEST. Notch1 et 2 possèdent en plus un domaine TAD. (Yashiro-Ohtani Y, Semin Immunol. 2010).

La voie de signalisation

L'activation de la voie de signalisation Notch se fait via le contact d'un ligand avec un récepteur. Ces deux derniers étant tout deux transmembranaires ce contact se fait via deux cellules adjacentes. La cellule portant le ligand étant l'émettrice du signal, et la cellule portant le récepteur la réceptrice du signal. L'activation d'un récepteur Notch entraîne la succession de deux clivages protéolytiques. Le premier clivage, qui est fait en S2, est réalisé grâce à une métalloprotéinase de la famille ADAM/TACE/Kuzbanian. Cela permet de libérer le NECD, qui reste lié au ligand et qui sont tout deux internalisés par la cellule émettrice. Le NICD, toujours accroché à la membrane subit a nouveau un clivage, mais cette fois au niveau de deux sites (clivages S3 et S4) situés dans le domaine transmembranaire, catalysé par l'activité γ -sécrétase du complexe Présénilline-Nicastrine-APH1-Pen2. Cela libérant ainsi le NICD dans le cytoplasme, et grâce à ces deux séquences NLS il est alors directement transloqué au noyau. C'est dans le noyau que le NICD va former un complexe avec le facteur de transcription CSL (CBF1/Su(H)/Lag-1 ou RBPJk chez les mammifères) et le co-activateur Mastermind, et ainsi activer la transcription des gènes cibles de Notch. L'activation de ces

gènes cibles de la voie Notch se fait par une levée d'inhibition. En effet, en l'absence de NICD le facteur CSL est lié à des co-répresseurs qui inhibent la transcription et c'est la liaison NICD-CSL qui permet le recrutement de co-activateurs.

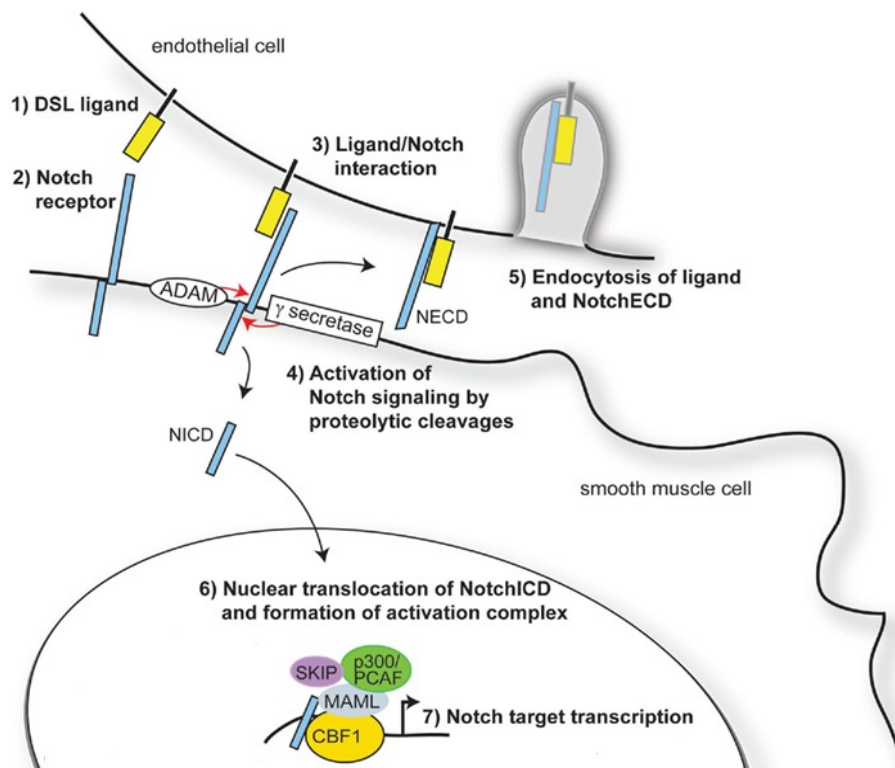


Figure 7 : Voie de signalisation canonique de Notch. DSL : ligand de la famille Delta-Serrate Lag, ADAM et γ -secretase : enzymes permettant respectivement les clivages S2 et S3, ECD : domaine extracellulaire, ICD : domaine intracellulaire, CDF1 : répresseur transcriptionnel, MAML : activateur transcriptionnel de type Mastermind-like, SKIP et p300/PCAF : co-activateurs. La cellule émettrice du signal présente le ligand qui va se lier au récepteur qui est sur la cellule réceptrice. S'en suit deux clivages par les enzymes ADAM et γ -secretase, permettant la libération du NECD. Le NICD est transloqué dans le noyau de la cellule réceptrice, où il va former un complexe avec des co-facteurs transcriptionnels et induire la transcription de ses gènes cibles. (Boucher J et al, Front. Physiol.2012).

Les gènes cibles

Les gènes cibles, chez les mammifères, sont répartis en 2 familles : la famille HES (Hairy and Enhancer of Split) comportant 7 gènes nommés HES1 à HES7, et la famille HEY (Hairy and Enhancer of split with YRPW motif) composée de 3 gènes nommés HEY1 à HEY3. Cependant, seulement 6 de ces gènes sont connus pour être des cibles directes des récepteurs Notch : HES1, -5, -7 et les 3 gènes de la famille HEY. Les gènes HES et HEY codent pour des protéines aux structures similaires : elles possèdent un domaine bHLH (basic Helix-Loop-Helix) et un domaine Orange. Le domaine bHLH possède une région de liaison à l'ADN, la partie « basic », et une région permettant la dimérisation avec d'autres effecteurs, la partie « helix-loop-helix ». Le domaine Orange, lui est impliqué dans la régulation du choix des protéines partenaires se liants au domaine bHLH¹²⁷. Ces deux familles de gènes sont

impliquées lors du développement du système nerveux, des lymphocytes et du système cardiovasculaire. Notamment, HEY1 et HEY2, exprimés dans l'aorte et les artères pulmonaires¹²⁸, sont impliqués dans le développement vasculaire embryonnaire¹²⁹. HEY2 a un rôle dans la prolifération, la migration et la formation du réseau endothélial¹³⁰. Enfin, HES1 et HES5 sont impliqués dans le remodelage vasculaire et la spécification endothéliale lors du développement vasculaire cérébral¹³¹. A l'opposé des familles HES et HEY qui ne semblent pas être tissus spécifiques, d'autres gènes cibles des récepteurs Notch ont été découverts mais ne sont exprimés que dans des contextes particuliers : GATA3, spécifique des lymphocytes T¹³², ou encore l'Ephrine B2¹³³ qui joue un rôle dans l'angiogenèse. Il semble également que l' α -SMA soit une cible potentielle de la voie Notch¹³⁴.

b. Rôles physiopathologiques

Rôles de Notch3 dans les CMLV

Le knock-out (KO) de Notch3 n'étant pas létal, ce qui au passage démontre que Notch3 n'est pas nécessaire au bon développement embryonnaire, son rôle dans le phénotype des CMLV a été mis en évidence. En effet, bien qu'à la naissance les souris Notch3 KO présentent un réseau artériel comparable à celui des souris WT (Wild Type), il n'en est pas de même au cours de la vie adulte. A l'âge adulte ces souris présentent des artères aux défauts structuraux comme une lumière élargie, une moindre épaisseur de média et des CMLV désorganisées autour de la lumière vasculaire¹²⁰. Ces défauts touchent les artères de résistances, quelque soit les organes observés, mais pas les vaisseaux de gros calibres que sont les vaisseaux de conductance¹²⁰. En plus de ces défauts macroscopiques des artères de résistances, ces dernières présentent un phénotype altéré car une diminution des transcrits codants pour des protéines impliquées dans la contractilité a été mise en évidence¹²⁰. Ainsi il semble que le Notch3 KO altère la différenciation des CMLV, empêchant le remodelage post-natal normal permettant la maturation des artères de résistances et donc résultant en un réseau artériel dysfonctionnel. Ce dernier est à l'origine d'une diminution du tonus myogénique et de l'augmentation de la dilatation induite par le débit¹²². Ces défauts fonctionnels et structurels peuvent être dus à une activité RhoA réduite dans les artères des souris Notch3 KO, ainsi qu'à une diminution de la phosphorylation de la chaîne légère de la myosine¹²². En effet, la voie RhoA a montrée son implication dans la sensibilisation de l'appareil contractile à la vasoconstriction induite par l'AngII¹³⁵, mais aussi dans la cohésion cellulaire induite : par la E-Cadhérine dans une lignée de cellules épithéliales rénales¹³⁶, et par la VE-Cadhérine dans une lignée de cellules endothéliales pulmonaires¹³⁷. Donc il semble qu'en l'absence de Notch3 la moindre activité de RhoA se traduit par

une plus faible vasoconstriction par l'AngII, et une dislocation des Cadhérines entraînant une perte d'adhésion cellulaire.

En plus de son implication dans le phénotype des CMLV, Notch3 est impliqué dans leur prolifération, leur migration et leur survie cellulaire. Il a été mis en évidence que Notch3 favorise la prolifération des CMLV. D'une part, il a été montré *in vitro* que dans des cellules transfectées avec N3ICD constitutivement actif il y a une répression de l'inhibiteur du cycle cellulaire p27^{KIP1}¹²¹. D'autre part, il a été également démontré *in vitro* que l'expression constitutive de N3ICD induit l'activité du promoteur de CBF1/RBPJk via les effecteurs HEY1 et HEY2, entraînant une prolifération cellulaire¹³⁸. Mais cela a également induit en parallèle l'inhibition de l'apoptose toujours via la voie canonique de Notch3. Et cela a également mis en évidence l'inhibition de la migration des CMLV via l'activité transcriptionnelle de RBPJk. Il a aussi été montré que la prolifération des CMLV par la voie de signalisation Notch3 semble passer par l'effecteur HES5 lors de l'HTA pulmonaire¹²⁴. Enfin, il a été démontré *in vitro* que l'activation constitutive de la voie Notch3 induit le facteur anti-apoptotique c-Flip¹²¹.

Notch3 et CADASIL

Notch3 a primitivement été mis en évidence dans la maladie CADASIL (Cerebral Autosomal Dominant Arteriopathy with Subcortical Infarcts and Leukoencephalopathy). Il s'agit d'une microangiopathie cérébrale héréditaire responsables d'infarctus sous-corticaux et d'une atteinte de la substance blanche, de transmission autosomique dominante. Les symptômes sont variables mais en général des migraines avec aura apparaissant chez les jeunes adultes (âge moyen 30 ans), des troubles de l'humeur, des altérations cognitives et plus tardivement 2/3 des patients souffrent d'accidents vasculaires cérébraux (AVC) récurrents (âge moyen 45-50 ans), et/ou de démence. Cette maladie due à une mutation du gène Notch3 au niveau 19p13.2-p13.1, a été identifiée en 1996. La mutation, qui est dans quasiment tout les cas une mutation faux sens, est responsable d'une altération des exons codants le domaine de répétitions EGF. Il en résulte la perte ou le gain d'un résidu cystéine au niveau NECD de Notch3. Cela entraîne une modification de la structure tridimensionnelle du NECD. Plusieurs études menées *in vitro* ont montré que la majorité des mutations de *NOTCH3* associées au syndrome CADASIL sont capables d'activer la transcription de RBP-Jk, et qu'une minorité des mutations (4%) entraînent une perte de fonction¹³⁹⁻¹⁴¹.

La mutation du gène Notch3 entraîne une artériopathie systémique caractérisée par un épaississement des parois vasculaires, un rétrécissement de la lumière et une dégénérescence des cellules musculaires lisses de la média¹⁴². L'endothélium quant à lui reste normal d'un point de vue morphologique. Les vaisseaux altérés de CADASIL sont caractérisés par l'accumulation de matériel osmiophile granulaire (GOM) dans la média des artères et qui s'étendent à l'adventice^{143,144}. Les GOM sont considérés comme pathognomonique de la maladie. La composition exacte des GOM n'est pas connue mais comporteraient des glycoprotéines de la matrice extracellulaires¹⁴³ ainsi que d'une accumulation du NECD de Notch3¹⁴⁵.

Bien que certaines études soutiennent le rôle des GOM dans le processus pathologique cérébral^{123,146}, certaines découvertes récentes affirment que certains symptômes de CADASIL peuvent être découplés de la production de GOM¹⁴⁷. La maladie pourrait résulter de l'accumulation de NECD de Notch3 dans les GOM et/ou être due à l'altération de la voie de signalisation Notch3¹⁴⁸.

Les manifestations cardiaques de CADASIL sont rares selon la littérature : une étude a montré une incidence élevée d'infarctus du myocarde chez des patients CADASIL. Dans cette cohorte de 41 patients CADASIL, d'âge moyen 46 ans, 25% des patients ont déjà eu des infarctus du myocarde (à l'âge de 40 ans en moyenne) et aucun chez les contrôles (d'âge moyen 40 ans)¹⁴⁹. Les analyses structurales du myocarde montrent des lésions caractéristiques de CADASIL, suggérant que les patients atteints de CADASIL seraient plus susceptibles aux épisodes d'infarctus du myocarde. Mais une autre étude cas-contrôle n'a pas mis en évidence d'anomalie de l'ECG (électrocardiogramme) chez les patients CADASIL par rapport aux témoins¹⁵⁰. Mais ce résultat peut être biaisé par le fait que les patients présentant une démence sévère étaient retirés de la cohorte. On ne peut donc pas écarter la possibilité d'altérations du myocarde aux stades tardifs de la maladie. Enfin, une étude portant sur un cas de CADASIL causé par une mutation de novo rapporte une atteinte des artères coronaires responsable de multiples épisodes de syndrome coronaire aiguë, confirmant la susceptibilité de ces patients aux maladies coronaires ou ischémiques¹⁵¹. Notons que la mort subite est responsable de 26% des décès chez les patients CADASIL, en faisant la deuxième cause de mortalité après la pneumonie¹⁵². Deux études ont mis ce phénomène en exergue. L'une montre une réduction significative de la variabilité du rythme cardiaque, et cela sans corrélation apparente avec les lésions cérébrales évaluées chez les patients¹⁵³ indiquant une dérégulation du système nerveux autonome. L'autre met en évidence une augmentation de l'index de variabilité du QT chez les patients CADASIL, traduisant l'altération de la repolarisation du myocarde¹⁵⁴. Ainsi, les patients CADASIL seraient prédisposés au développement d'arythmies pouvant expliquer l'incidence importante de mort subites.

Notch3 et l'HTAP

L'HTAP (hypertension artérielle pulmonaire) est définie comme une pression artérielle pulmonaire moyenne au repos ≥ 25 mm Hg. L'HTAP est une maladie qui affecte principalement les petites artères pulmonaires distales¹⁵⁵. La prolifération des CMLV dans les petites artères pulmonaires périphériques est une caractéristique commune à toutes les formes d'HTAP^{156,157}.

La voie de signalisation Notch3 est impliquée dans le développement de l'HTAP, via son action sur la prolifération des CMLV^{124,158}. Il a été mis en évidence une expression élevée de Notch3 chez les patients atteints d'HTAP. L'inhibition de Notch3 par un inhibiteur de γ -sécrétase ou son invalidation protège les souris de l'HTAP induite par l'hypoxie, notamment via la voie Notch3/HES5¹²⁴. Des mutations de Notch3 peuvent être présentes chez des patients atteints d'HTAP, et sont associées à la prolifération des CMLV pulmonaires¹⁵⁸. L'augmentation de la prolifération de ces cellules résulterait en partie de l'activation de HES1 par Notch3, qui en se liant au promoteur de p27Kip1 (facteur clé du cycle cellulaire) inhibe son expression¹⁵⁹.

Notch3 et les pathologies cardiovasculaires et rénales

Boulos *et al.* ont montré, au sein de l'équipe du Dr CHATZIANTONIOU, que les souris Notch3 KO présentent un défaut de vasoréactivité rénale. Fait intéressant, ces souris développaient de façon précoce une anasarque, signe d'insuffisance cardiaque sévère, associée à une forte mortalité. Les mécanismes mis en jeu dans le défaut cardiaque ont alors été étudiés par Ragot *et al.*

Ragot *et al.* ont montré qu'à l'état basal les souris Notch3 KO présentent un défaut du système coronaire se traduisant par une diminution de la densité artériolaire, mais sans modification de la densité capillaire. De plus, ces souris Notch3 KO présentent au niveau cardiaque un excès de production de ROS ainsi qu'une hypertrophie et une fibrose, sans altération de la fonction cardiaque.

En réponse à l'AngII et de l'HTA, Ragot *et al.* démontrent que les souris Notch3 KO développent une hypertrophie cardiaque plus importante associée à une dysfonction cardiaque (diminution de la fraction de raccourcissement), et à une mortalité importante. Ce phénomène semblait résulter d'un défaut d'adaptation du réseau artériel, en particulier coronaire, à l'infusion d'AngII et à l'HTA. En effet, les souris Notch3 KO hypertendues présentent un défaut d'hypertrophie de la média de leurs coronaires, associé à un phénotype sécrétoire des CMLV. De plus, les cœurs de souris Notch3 KO hypertendues ont une densité capillaire diminuée. L'ensemble est marqué par une diminution de

l'expression de la voie pro-angiogénique (VEGFa/VEGFR2). Cependant la densité artériolaire, déjà altérée, n'est pas modifiée suite à l'HTA.

Afin de s'affranchir du rôle de Notch3 dans le développement vasculaire à l'état de base, des souris transgéniques chez qui ont induit une délétion de RBPJk dans les CMLV (SM-RBPJk^{-/-}), 4 semaines après le sevrage ont été utilisées par Ragot *et al.* RBPJk étant un facteur de transcription s'associant au N3ICD lors de l'activation de la voie de signalisation Notch, son invalidation bloque cette voie. Ces souris, en réponse à l'infusion d'AngII, développent une HTA et une hypertrophie cardiaque avec dilatation ventriculaire, associée à une diminution de la fraction de raccourcissement, induisant une forte mortalité.

Ainsi Ragot *et al.* ont démontré que Notch3 est nécessaire au remodelage vasculaire en réponse à l'HTA et donc à l'adaptation cardiaque.

Chapitre 2 : Rôle de la Connexine 43 dans le remodelage rénal

1. Le rein

Le rein est l'un des organes cruciaux de l'organisme, l'Homme en possède deux. Les reins sont la station d'épuration de l'organisme : ils filtrent le sang pour en extraire les éléments indésirables (déchets azotés, toxines, etc) et les éliminer dans l'urine. Mais il a également un rôle endocrine majeur et participe à l'homéostasie de l'organisme.

a. Fonction

Le rein possède deux grandes fonctions : une exocrine et une endocrine.

Sa fonction exocrine consiste à épurer le sang des éléments toxiques s'y trouvant. Ils peuvent être d'origine endogène et résultant du métabolisme (créatinine, urée...); ou exogènes (toxines, médicaments...). Cette filtration du sang est réalisée par le néphron et permet de rejeter les éléments indésirables hors de l'organisme via l'urine. Ce mécanisme est également essentiel pour le maintien de l'homéostasie de l'organisme car il permet de maintenir relativement à l'équilibre la balance hydrique et les différents ions et minéraux, ainsi que la régulation de l'équilibre acido-basique grâce aux différentes étapes d'excrétion et de réabsorption qui ont lieu tout au long du néphron.

La fonction endocrine du rein revêt plusieurs aspects. Via la sécrétion de rénine, enzyme indispensable à la production d'AngII, le rein joue un rôle important dans la régulation de la pression artérielle. Le rein agit également sur l'érythropoïèse via la sécrétion d'érythropoïétine (EPO) par la médulla rénale, et agissant directement sur la moelle osseuse. Enfin le rein agit également sur l'équilibre phosphocalcique via la transformation de la vitamine D en forme active (1-25-dihydroxy-vitamine D3) par la 1 α -hydroxylase.

b. Structure

Le rein

Les reins ne représentent qu'une petite partie de la masse totale de l'Homme (0,4% du poids total) mais reçoivent 20% du débit cardiaque soit 600L/j de débit plasmatique rénal et dont seulement 20% est transformé en urine primitive (environ 190L/j) chez un sujet normal.

Selon les espèces, les reins n'ont pas la même structure. L'Homme possède deux reins multilobaires, et les petits mammifères tels que les souris quant à eux possèdent deux reins unilobaires. Le rein a une forme incurvée de haricot, et est protégé par une enveloppe fibreuse appelée la capsule. Il est composé de 3 parties :

- le cortex, compose la partie externe du rein où se trouvent les glomérules, ainsi qu'une partie des tubules ;
- la médullaire : il s'agit de la partie intermédiaire du rein où l'on trouve d'autres parties des tubules rénaux, que sont le segment S3 du tubule proximal, l'anse de Henlé et les canaux collecteurs. Elle est divisée en médullaire externe (proche du cortex) et médullaire interne (proche des calices) ;
- les calices et bassinets : les calices recueillent l'urine à la sortie des tubes rénaux. L'ensemble des calices entraîne l'urine dans l'entonnoir qu'est le bassinets, lui faisant la jonction entre le rein et l'urètre.

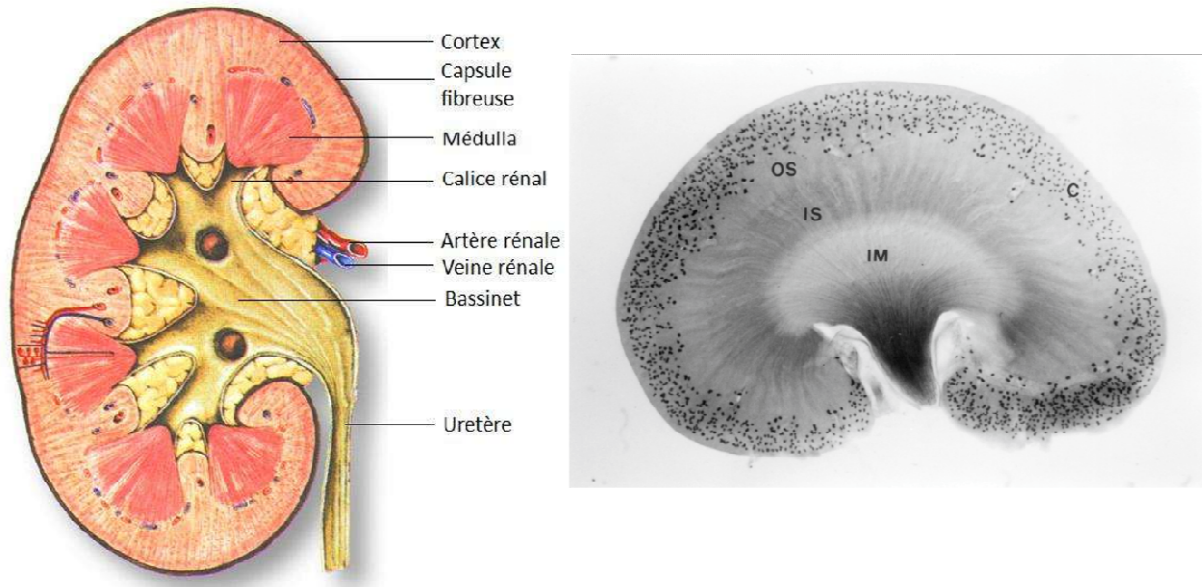


Figure 8 : Structure rénale. Gauche – Schéma d'un rein en section longitudinale (www.bioweb.lu). Droite – Coupe longitudinale d'un rein de rat coloré in vivo par du Bleu Alcian. On distingue les différentes zones rénales : le cortex avec les glomérules colorés, la médullaire externe avec sa zone externe (OS) et sa zone interne (IS), et la médullaire interne (IM) (Bankir L. et Meulders Q., theisn.org).

Le néphron

L'Homme possède environ 1 million de néphrons par reins, alors que le rat n'en possède qu'environ 35 000. Le néphron est l'unité fonctionnelle du rein. Il est composé d'un corpuscule rénal suivi d'un tubule. C'est en passant dans les différentes parties du néphron que l'urine primitive ou ultrafiltrat (environ 190L/j) subit une succession de phénomènes de sécrétion et réabsorption qui permettent au final l'obtention de l'urine définitive (environ 1,5-2L/j).

La première partie du néphron est le corpuscule rénal. Il se compose d'un glomérule (partie vasculaire) et d'une capsule de Bowman (partie urinaire). L'artériole afférente achemine le sang jusqu'au corpuscule, et le sang va alors rencontrer une barrière de filtration. Seules les molécules inférieures à 68kDa (poids moléculaire de l'albumine) passent cette barrière pour aller dans l'ultrafiltrat. La barrière de filtration glomérulaire est composée de 3 couches : des cellules endothéliales fenêtrées, une membrane basale (agissant comme un tamis) et les pédicelles qui sont des prolongements cytoplasmiques des podocytes. Les podocytes sont des cellules épithéliales composant la partie viscérale de la capsule de Bowman. Dans le corpuscule rénal on trouve également, les cellules mésangiales qui servent de soutien aux autres cellules, et participent à la filtration grâce à leur fonction contractile en contrôlant l'ouverture des capillaires. Enfin des

cellules épithéliales tapissent la chambre urinaire du côté pariétal. Une altération de cette barrière de filtration se traduit par une protéinurie. Ainsi, l'eau et les solutés présents dans le plasma passent des capillaires glomérulaires à la chambre urinaire via le passage par la barrière de filtration glomérulaire, formant l'ultrafiltrat glomérulaire.

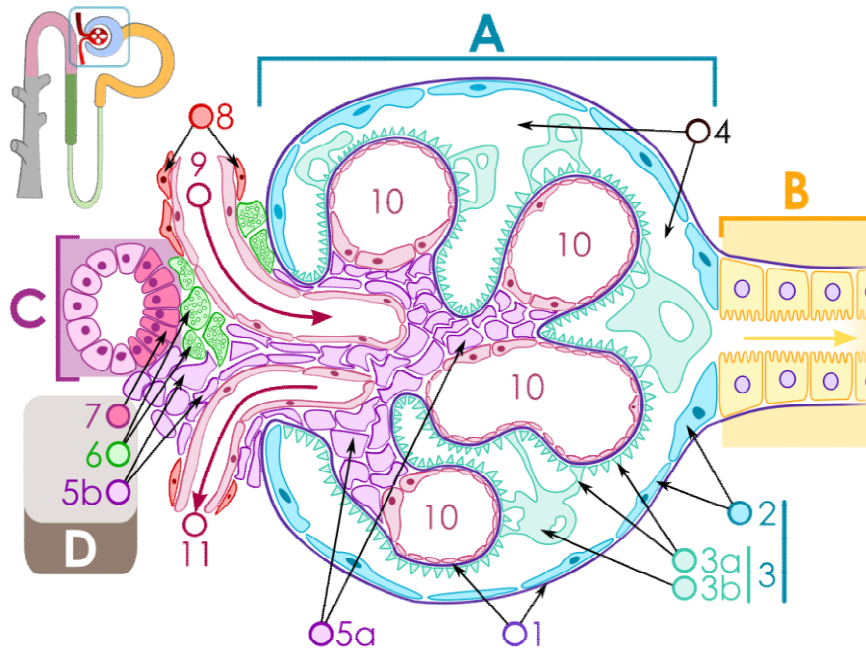


Figure 9 : Structure du glomérule rénal.A- Corpuscule rénal, B- Tubule proximal, C- Tube contourné distal, D- Appareil juxtaglomérulaire. 1- Membrane basale, 2- Couche pariétale de la capsule de Bowman et 3- sa couche viscérale composée des podocytes (3a) et de leurs pédicelles (3b), 4- Chambre urinaire, 5- Mésangium, 6- Cellules granuleuses de l'appareil juxtaglomérulaire, 7- Macula densa, 8- Myocytes lisses, 9- Artériole afférente, 10- Capillaires glomérulaires, 11- Artériole efférente (Komorniczak M., wikipedia.fr).

L'urine primitive ainsi captée dans la capsule de Bowman passe ensuite dans le tubule rénal qui aura pour fonction de réabsorber l'eau et certains solutés nécessaires à l'organisme et d'excréter certains solutés indésirables. Ce dernier est composé de plusieurs segments successifs, ayant des capacités de réabsorption différentes : le tubule proximal (composé de trois segments : les S1 et S2 forment le tubule contourné proximal et le S3 le tubule droit proximal), suivi par l'anse de Henlé (composée d'une branche descendante et d'une branche ascendante), le tubule contourné distal, le tubule connecteur et se finissant par le canal collecteur (formé par l'adjonction de plusieurs néphrons). A la fin de ce parcours est obtenue l'urine définitive. Le tubule proximal possède comme particularité la présence de microvillosités au niveau de la membrane apicale des cellules le composant, formant ainsi une bordure en brosse.

Il existe trois types de néphrons, dont les localisations diffèrent dans le rein :

- les néphrons superficiels, ou néphrons courts, qui ont une anse de Henlé courte et qui n'atteint pas la médulla interne ;
- les néphrons juxtamédullaires, ou néphrons longs, eux possédant une anse de Henlé assez longue pour atteindre la médulla interne. Bien qu'ils soient peu nombreux (1/8^e du total des néphrons) ils sont indispensables à la concentration de l'urine (urine hypertonique), puisque leur anse de Henlé est plus longue ils permettent une plus grande réabsorption de l'eau ;
- les néphrons intermédiaires.

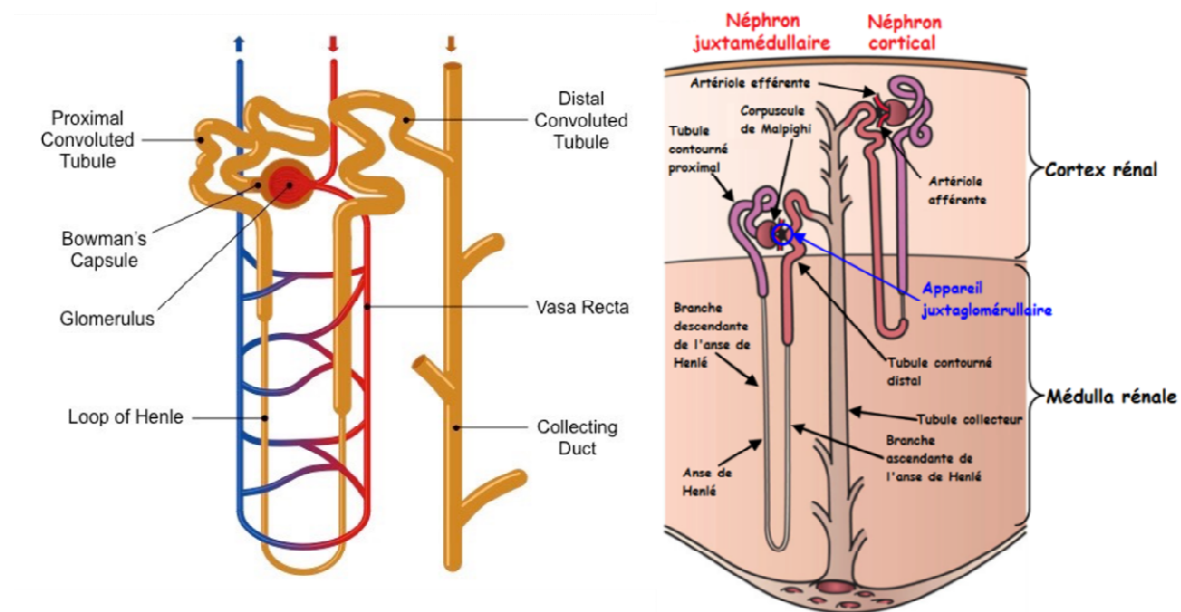


Figure 10 : Structure du néphron et localisation rénale des ses différentes parties. Gauche – Schéma des différentes parties du néphrons (bioninja.com.au). Droite – Localisation des différents types de néphrons dans le rein (ressources.unisciel.fr).

Enfin le néphron possède une petite structure permettant de réguler la pression artérielle. Il s'agit de l'appareil juxtaglomérulaire qui se situe entre le pôle vasculaire du glomérule et le tubule contourné distal. Il regroupe les 3 types cellulaires du néphron : la macula densa, qui sont des cellules différenciées de la branche ascendante large de l'anse de Henlé; les cellules mésangiales extraglomérulaires ; et les cellules juxtaglomérulaires (ou granulaires) qui sont des cellules différenciées de l'artériole afférente. Cet appareil juxtaglomérulaire est une structure endocrine, chaque cellule la composant produisant différentes hormones, dont la rénine qui permet la régulation du flux sanguin rénal et la régulation de la filtration glomérulaire.

2. La maladie rénale aigüe

De plus en plus d'études reportent une association entre les maladies rénales aiguës (MRA) et le développement de maladies rénales chroniques (MRC). Il semble donc que l'étude de la physiopathologie des MRA soit un point clé dans la prévention des MRC¹⁶⁰.

a. Définition

La maladie rénale aigüe, ou insuffisance rénale aigüe (IRA), correspond à une diminution brutale de la fonction rénale. Résultant d'une baisse rapide de la filtration glomérulaire, l'IRA est caractérisée par une rétention des déchets azotés au niveau sanguin (augmentation de la créatinine et d'urée plasmatique) et/ou une diminution de la diurèse (excrétion urinaire). La prévalence de l'IRA ne faisant qu'augmenter dans les pays développés avec les années, cela en fait un problème de santé publique majeur. Bien que l'incidence de l'IRA n'est que de 2 à 5% dans la population générale, elle s'élève jusqu'à 20 et 50% respectivement chez les patients hospitalisés et en soins intensifs. De plus la mortalité dépasse les 50% chez les patients souffrant d'IRA nécessitant une dialyse¹⁶¹⁻¹⁶⁴.

La classification des IRA a été successivement faite selon RIFLE en 2004 (Risk, Injury, Failure, Loss, End-stage), puis AKIN (Acute Kidney Injury Network) en 2007. Et depuis 2012 a pris place la classification KDIGO (Kidney Disease Improving Global Outcomes) qui est une fusion des deux premières permettant l'amélioration du diagnostic d'IRA. Dans cette dernière les IRA sont classées en trois stades, allant de 1 pour le moins sévère à 3 pour le stade le plus avancé.

Stade	Selon créatinine sérique/TFG	Selon diurèse
KDIGO (Kidney Disease Improving Global Outcomes)		
1	Augmentation créatinine sérique 1,5-1,9 x la valeur de base sur 1-7 jours ou augmentation $\geq 26,5 \mu\text{mol/l}$ ($\geq 0,3 \text{ mg/dl}$) sur 48 heures	< 0,5 ml/kg/heure sur 6-12 heures
2	Augmentation créatinine sérique 2-2,9 x la valeur de base	< 0,5 ml/kg/heure sur > 12 heures
3	Augmentation de 3 x la valeur de base ou augmentation de la créatinine sérique > 354 $\mu\text{mol/l}$ ou dialyse	< 0,3 ml/kg/heure pendant > 24 heures ou anurie sur > 12 heures
AKIN (Acute Kidney Injury Network)		
1	Augmentation créatinine sérique 1,5-1,9 x la valeur de base ou augmentation $\geq 26,5 \mu\text{mol/l}$ ($\geq 0,3 \text{ mg/dl}$) sur 48 heures	< 0,5 ml/kg/heure sur 6 heures
2	Augmentation créatinine sérique 2-2,9 x la valeur de base	< 0,5 ml/kg/heure sur 12 heures
RIFLE (Risk, Injury, Failure, Loss of function, End-stage renal disease)		
R	Augmentation de la créatinine sérique > 1,5 x ou diminution du TFG > 25% de la valeur de base (sur 1-7 jours)	< 0,5 ml/kg/heure sur 6-12 heures
I	Augmentation de la créatinine sérique > 2 x ou diminution du TFG > 50% de la valeur de base	< 0,5 ml/kg/heure > 12 heures
F	Augmentation de la créatinine sérique > 3 x ou diminution du TFG > 75% de la valeur de base ou créatinine sérique $\geq 354 \mu\text{mol/l}$ ($\geq 4 \text{ mg/dl}$) avec une augmentation aiguë d'au minimum 44 $\mu\text{mol/l}$ (0,5 mg/dl)	< 0,3 ml/kg/heure pendant > 24 heures ou anurie > 12 heures
L	IRA persistante = perte complète de la fonction rénale > 4 semaines	
E	IR terminale (> 3 mois)	

Figure 11 : Classification des IRA selon KDIGO. IR : insuffisance rénale, IRA : insuffisance rénale aiguë, TFG : taux de filtration glomérulaire. La gravité de l'IRA prend en compte la créatinine plasmatique et la diurèse. Il existe 3 stades d'IRA dans la classification KDIGO allant de 1 à 3, avec une gravité croissante. (Marco Caronni G. et al, Rev Med Suisse. 2017).

Les causes d'IRA sont multiples et peuvent être classées en 3 groupes :

- les pré-rénales, ou insuffisances rénales fonctionnelles, elles sont à l'origine d'environ 40 à 50% IRA mais n'entraînent pas directement de lésions rénales permanentes. Elles résultent d'une hypoperfusion rénale suite à une hypovolémie vraie (hémorragie, déshydratation) ou efficace (insuffisance cardiaque, sepsis). L'hypoperfusion rénale va induire la production de rénine par l'appareil juxta-glomérulaire, et *in fine* d'AngII et d'aldostérone. Ces différentes hormones ont pour conséquence la vasoconstriction de l'artériole efférente glomérulaire afin de maintenir la pression de filtration, ainsi que la réabsorption accrue d'eau et de sodium par les tubules. Cependant, lorsque les capacités d'adaptation à l'hypoperfusion sont dépassées l'IRA se déclare réellement.
- les post-rénales, ou néphropathies obstructives, dues à l'occlusion totale ou partielle des voies urinaires (e.g : présence de lithiases). La pression va alors augmenter dans la chambre urinaire du glomérule jusqu'à atteindre la même pression que dans le capillaire glomérulaire ce qui annule le processus de filtration.
- les rénales, ou néphropathies parenchymateuses, qui sont causées par des lésions des différentes structures du rein que sont les glomérules, les vaisseaux, les tubules et l'interstitium. Elles concernent environ 40-45% des patients. La forme la plus fréquente est

la nécrose tubulaire aigüe, résultant majoritairement d'un phénomène ischémique ou toxique. Les autres formes sont les atteintes rénales interstitielles, glomérulaires ou vasculaires.

C'est ce troisième type d'IRA sur lequel nous avons porté notre attention, et tout particulièrement sur les IRA résultants d'une ischémie-reperfusion rénale.

b. L'ischémie-reperfusion rénale

L'ischémie reperfusion (IR) entraîne une absence d'apport en O₂ et nutriments au sein du parenchyme rénal, ainsi qu'une accumulation de produits toxiques venants des cellules lésées. Cela entraîne la mort des cellules et active l'inflammation rénale qui va amplifier les lésions de ce tissu. L'oxygénation naturelle du parenchyme rénal étant non homogène, les différentes parties du rein auront donc des sensibilités différentes à l'hypoxie. En conséquence, les cellules les plus sensibles à l'hypoxie sont celles présentent dans le cortex. Les principales cellules lésées lors de l'ischémie sont les cellules tubulaires proximales et les cellules endothéliales¹⁶⁵. A contrario, celles présentent dans la médullaire interne et la papille démontrent une sensibilité réduite à l'ischémie de part leur prédominance à la glycolyse anaérobie. Cependant plus l'ischémie sera prolongée plus le territoire rénal lésé sera important. Dans le cas d'une agression relativement peu sévère, un mécanisme de réparation tissulaire se met en place grâce à la dédifférenciation et à la prolifération des cellules survivantes¹⁶⁶, permettant la restauration complète de la fonction rénale. En revanche il peut, suite à une agression sévère, apparaitre de la fibrose rénale pouvant conduire avec le temps à l'insuffisance rénale chronique¹⁶⁷.

Mort cellulaire

Plusieurs mécanismes de mort cellulaire ont cours lors de l'ischémie, dont la nécrose et l'apoptose¹⁶⁸⁻¹⁷⁰. Le choix de l'une ou l'autre de ces morts pourrait être lié au le degré de réduction d'ATP de la cellule lors de la lésion : une faible déplétion induirait la nécrose, alors qu'une forte déplétion entrainerait l'apoptose¹⁷¹.

L'apoptose

L'apoptose est un processus de mort programmée énergie dépendant. La membrane garde son intégrité, et va former des corps apoptotiques qui seront phagocytés par les macrophages

environnants. L'activation de ce processus se fait via deux voies : « intrinsèque » impliquant la mitochondrie, ou « extrinsèque » via l'activation de récepteurs de mort. L'activation de la voie intrinsèque entraîne une perméabilisation mitochondriale entraînant la mort cellulaire. Ainsi, suite à un stimulus cytotoxique se produit une oligomérisation des protéines pro-apoptotiques Bax et Bak, ce qui entraîne la libération du cytochrome C par la mitochondrie dans le cytosol. Ce dernier va alors se lier à Apaf-1 pour former un complexe appelé apoptosome, qui active la caspase 9, qui va à son tour activer la caspase 3. D'autres complexes tels que Smac/DIABLO ou Omi/HtrA2 vont activer les caspases respectivement par séquestration et digestion des protéines inhibitrices de protéases¹⁷²⁻¹⁷⁴. La voie extrinsèque, quant à elle, est déclenchée par un signal extérieur à la cellule. Ainsi, le récepteur Fas peut être activé, entraînant sa trimérisation, ce qui induit le recrutement de la protéine FADD possédant des domaines de mort. Cette cascade permet l'activation de la caspase 8, qui à son tour active la caspase 3. Il est à noter qu'il existe un lien d'activation entre ces 2 voies, impliquant à nouveau l'intégrité de la membrane, et notamment via le facteur Bid qui peut activer l'apoptose mitochondriale à partir de la voie extrinsèque. Enfin, il a été montré que suite à l'IR rénale il y a une altération du ratio Bax/Bcl-2 : il y a une augmentation du médiateur Bax (pro-apoptotique), et en parallèle une diminution de Bcl-2 (anti-apoptotique)¹⁷⁵⁻¹⁷⁷. De plus, la délétion spécifique de Bax dans le tubule proximal entraîne une protection des souris contre l'IR¹⁷⁸.

La nécrose

La nécrose quant à elle est un processus de mort énergie indépendant. Elle se caractérise par une dysfonction mitochondriale, la perte d'intégrité de la membrane plasmique et donc la libération des contenus cytosolique et nucléaire contenant des DAMPs (Damage-Associated Molecular Pattern) dans le milieu extracellulaire tels que HMGB1 (High-Mobility Group Box1), l'ATP et les acides nucléiques. Ce phénomène va induire une réponse inflammatoire et entraîner les processus de mort des cellules avoisinantes. L'accumulation de Ca^{2+} intracellulaire est également un des déclencheurs de la nécrose. En effet, la réduction d'ATP dans le cytoplasme entraîne une baisse d'activité des ATPase et Na^+-K^+ -ATPase induisant l'augmentation des taux de Ca^{2+} cytosolique, entraînant à son tour la dysfonction mitochondriale, l'altération du cytosquelette et l'activation de protéases¹⁷⁹. Tout cela menant à la perte d'intégrité du cytosquelette et de la membrane plasmique. Bien que la nécrose soit connue comme étant un phénomène non régulé, de récentes études semblent indiquer le contraire. Ce phénomène est plus particulièrement étudié sous le nom de nécroptose. La nécroptose est déclenché lors d'un stress ou par l'activation de récepteurs de mort ce qui va activer les sérine/thréonine kinases RIP (ReceptorInteractingProteins), et tout particulièrement RIPK1 et RIPK3^{180,181}. Ces dernières induisent la production de ROS par les NADPH oxydases¹⁸², ainsi que

l'augmentation de produits oxydants par la mitochondrie¹⁸³. Le ligand de nécroptose le plus étudié est le TNF α . Le rôle de la nécroptose dans l'IR rénale a ainsi été mis en évidence grâce à une protection visible chez des souris déficientes pour les médiateurs de cette voie (RIPK1, RIPK3, MLKL)^{184,185}.

Inflammation

Suite à l'IR une forte infiltration de cellules inflammatoires se déclare. Cela résulte en partie d'une perte d'intégrité endothéliale : l'endothélium devient perméable car l'ischémie altère le cytosquelette d'actine des cellules, mais aussi entraîne la perte des jonctions intercellulaires et accroît les interactions entre l'endothélium et les cellules inflammatoires. Cette hausse de l'inflammation est également due à l'activation des différentes populations inflammatoires par les médiateurs sécrétés par les cellules tubulaires lésées et survivantes.

Les neutrophiles

Les neutrophiles sont les cellules inflammatoires ayant une contribution importante dans les lésions suite à l'IR. Les neutrophiles vont très rapidement adhérer à l'endothélium endommagé pour migrer et s'accumuler au niveau du site lésionnel, tout particulièrement au niveau des capillaires péri-tubulaires de la médullaire externe¹⁸⁶. Les neutrophiles vont détruire les cellules lésées soit par phagocytose, soit en libérant leurs granules contenant des cytokines, des protéases et d'autres enzymes, qui vont d'autant plus contribuer à la production de ROS¹⁸⁷. Cette dernière participant à la perte d'intégrité des cellules épithéliales tubulaires et vasculaires¹⁸⁸, et donc aggravant les dommages rénaux. De plus, la dégranulation des neutrophiles peut entraîner la destruction des cellules survivantes dans le tissu lésé. La migration de ces neutrophiles est médié par tout un panel de cytokines incluant IL-17, MCP-1, CXCL8, CXCL10 et RANTES¹⁸⁹⁻¹⁹³. Enfin, il a été mis en évidence que la réduction en neutrophiles protège des dommages induits par l'IR rénale^{194,195}. Il semble notamment que prévenir la production accrue d'IFN γ par les neutrophiles qui se sont accumulés soit l'un des facteurs clés de cette protection contre l'IR¹⁹⁶.

Les macrophages

Les macrophages sont dérivés des monocytes sanguins. Les macrophages vont infiltrer le tissu jusqu'au site lésionnel afin de phagocyter les cellules mortes, mais également sécréter différentes cytokines afin de potentialiser la réponse inflammatoire. Les macrophages infiltrent le rein lésé peu

de temps après les neutrophiles (moins d'une heure après la reperfusion) et cette infiltration est médiée par les voies de signalisation CCR2 et CX3CR1¹⁸⁹. Il faut savoir que les macrophages sont classés en deux types en fonction de leur activation : les M1, activés par la voie « classique » et qui sont dit pro-inflammatoires ; et les M2, activés par la voie « alternative » et qui sont dit anti-inflammatoires. Il a été montré que ces deux types de macrophages sont impliqués dans les mécanismes d'IR, avec des rôles distincts, au niveau de la réponse inflammatoire rapide, de la réparation tissulaire et voir même de la fibrose.

Le microenvironnement lésé (contenant des DAMPS, des ROS, des produits de dégranulation des neutrophiles, ainsi que la libération d'IFN γ) provoque la différenciation des monocytes infiltrés en macrophages pro-inflammatoires M1 via l'activation des voies STAT1 (Signal Transducer and Activator of Transcription 1) par l'IFN γ (Interféron γ), et TLR/NF- κ B par les DAMP. Ces macrophages M1 vont libérer des médiateurs pro-inflammatoires tels que MCP-1, IL-1 et IL-12 qui vont à leur tour recruter d'autres cellules inflammatoires. La régulation des M1 par l'IFN γ entraîne l'activation de la voie JAK1/2-STAT1 qui active la production de chimiokines pro-inflammatoires par les macrophages : d'une part MCP1 qui recrute d'autres monocytes, et MIG (Monokine Induced by Gamma interferon) qui elle agit sur les cellules T¹⁹⁷. D'un autre côté la reconnaissance des DAMP par les macrophages, via des PRR (Pattern Recognition Receptors)¹⁹⁸, active les voies de signalisations médiées par les facteurs de transcription NF κ B et IRF5, ce qui induit la production de médiateurs pro-inflammatoires incluant IL-1, IL-6, IL-12 et TNF α ^{199,200}. L'implication des macrophages dans les lésions rénales est notamment visible dans plusieurs études, qui montrent qu'une réduction en macrophages lors de la phase précoce de l'IR diminue la sévérité des dommages²⁰¹⁻²⁰³. Bien que les macrophages M1 soient associés aux dommages tissulaires lors de l'IR rénal, leur rôle n'en reste pas moins important puisqu'ils permettent la dégradation des débris cellulaires et l'initiation de la réparation tissulaire²⁰⁴.

Les macrophages sont en effet importants pour la réparation tissulaire, et on attribue ce rôle aux macrophages M2. Ces derniers sont séparés en deux groupes, bien qu'ils soient extrêmement proches : les M2a impliqués dans la cicatrisation, et les M2b qui sont immunorégulateurs. Les M2a sont stimulés par l'IL-4 et l'IL-13 via le récepteur IL-4R α , ce qui active la voie JAK-STAT6²⁰⁵. Le facteur de transcription STAT6, à l'aide de différents régulateurs de transcriptions tels que PPAR γ (Proliferator-Activated Receptor- γ) et C/EBP β ^{206,207}, va induire la production de facteurs croissance (IGF, FIZZ1 et Ym1), mais aussi le récepteur du mannose (MR), ou encore la stimulation de l'activité de l'ARG1 (Arginase-1)^{208,209}. Cette dernière permettant la formation d'ornithine à partir d'arginine, qui est un facteur important pour la prolifération cellulaire et la synthèse du collagène²¹⁰. De plus, il a été montré dans des modèles murins d'IR qu'IGF1 favorise la prolifération des cellules

tubulaires et la réparation du rénale²¹¹. Ainsi l'activation des M2a permet la prolifération, ainsi que la production de matrice extracellulaire et donc la réparation tissulaire. Les M2b quant à eux, sont activés de différentes manières mais notamment par les ligands du TLR, les complexes immuns, l'IL-10 et les glucocorticoïdes. Les macrophages immunorégulateurs sont nommés ainsi car ils produisent de fortes quantités d'IL-10 (cytokine anti-inflammatoire)²¹² et de TGF- β (qui inhibe la production de cytokines pro-inflammatoires)²¹³. Ainsi, la fonction principale de ces M2b semble être de limiter l'inflammation en atténuant la réponse immunitaire. Le rôle des différents macrophages M2 semble donc important dans la réparation du tissu lésé, comme l'ont montrés différentes études où la réduction en macrophages, pendant la période phare de la réparation tissulaire (après 48-72h de reperfusion), inhibe la réparation tubulaire rénale^{214,215}. Cependant, ces deux types de macrophages M2 peuvent entraîner une fibrose tissulaire en cas d'activation excessive. En effet, il a été par exemple démontré qu'une autre des actions du TGF- β était d'activer les voies de signalisations pro-fibrotiques.

Enfin, la frontière entre les macrophages M1 et M2 ne semble pas définitive. En effet, les macrophages sont des cellules qui adaptent leur phénotype selon les stimuli de leur environnement. Il a ainsi été démontré que la polarisation M1-M2 dépend du microenvironnement inflammatoire : chez des souris ayant une quantité réduite de macrophages due à l'injection de clodronateliiposomale, le transfert adoptif de macrophages RAW 264.7 au repos, après 24h d'IR, restaure les lésions rénales, alors que le transfert adoptif de macrophages au repos pendant la phase de réparation, 72h après l'I/R, favorise la réparation du rein²¹⁶.

Les autres acteurs de l'immunité

La réponse inflammatoire implique également d'autres médiateurs de l'inflammation tels que les cellules dendritiques, les lymphocytes et le complément.

Médiateurs importants de l'inflammation, les lymphocytes sont répartis en deux familles : les lymphocytes T et les lymphocytes B, et tous deux sont impliqués dans la pathogenèse de l'IR rénale. Le rôle des lymphocytes T dans la pathogenèse de l'IR rénale a été établi chez différents modèles murins car ces souris dépourvus de lymphocytes T présentaient moins de dommages rénaux et moins d'infiltration de neutrophiles²¹⁷⁻²²⁰. De plus, la restauration en lymphocytes T CD4⁺ rétablit la présence de lésions rénales, contrairement aux lymphocytes T CD8⁺²¹⁹. Concernant les lymphocytes B, nombres d'études, dans différents organes, montrent leur rôle majoritairement pathogénique lors de l'IR²²¹. Notamment au niveau rénal, les souris déficientes en cellules B sont protégées contre des lésions induites par l'IR. Cependant, selon les études, le transfert de lymphocytes B à ces souris ne

permet pas de rétablir les lésions rénales après une ischémie²²² ou au contraire limite la réparation tissulaire²²³.

Un autre sous type de lymphocytes voit son rôle dans l'IR émerger, les lymphocytes NKT (natural killer T). Ils possèdent des marqueurs de lymphocytes T (CD4 et CD8) et de lymphocytes NK (NK1.1 chez la souris). Les lymphocytes NKT possèdent un TCR, mais à la différence des lymphocytes T ce dernier ne n'interagit pas avec l'antigène peptidique présenté par le CMH classique de classe I ou II, mais reconnaît les glycolipides présentés par la molécule CD1d, qui est semblable au CMH I. L'un des sous-types les plus étudiés des lymphocytes NKT sont les iNKT (NKT invariants, ou NKT de type 1). Ils sont activés le plus efficacement par le glycolipide α -GalCer (α -galactosylcéramide) et ont la capacité de produire rapidement de grandes quantités de cytokines telles que l'IFN- γ , le TNF, l'IL-4 et l'IL-13. Ainsi la réponse rapide des cellules iNKT après activation permet d'amplifier et de réguler les CD, les lymphocytes et les neutrophiles. Le rôle des iNKT dans les lésions rénales notamment a été démontré car le blocage de l'activation des cellules NKT (par des anticorps anti-CD1d ou anti-NK1.1, ou l'utilisation des souris $J\alpha 18^{-/-}$ donc déficientes en iNKT) inhibe la production d'IFN γ et donc l'accumulation de neutrophiles après IR, protégeant ainsi contre les lésions rénales¹⁹⁶.

Les cellules dendritiques (CD) semblent impliquées dans l'IRA mais leur rôle n'est pas complètement compris. La forte abondance des CD de type CD11c⁺-MHC classe II⁺ dans le tissu rénal normal, suggère leur importance dans l'immunité rénale et l'inflammation. Lorsqu'elles sont stimulées, les CD se transforment en un type cellulaire mature et font alors produire des facteurs pro-inflammatoires tels que TNF, IL-6, MCP-1 et RANTES²²⁴ ; mais aussi en interagissant avec les cellules NKT afin de les activer en cellules iNKT via le CD1d. Il a été démontré que la diminution de CD avant IRI réduisait de manière significative les taux de TNF produits dans les reins après IRA²²⁴. Cependant, il a également été montré que certaines CD rénales semblent jouer un rôle important dans la réparation suite à l'IRA²²⁵.

Enfin, le complément est également un acteur important de l'inflammation suite à l'IR. Il a notamment été mis en évidence que l'activation des récepteurs des anaphylatoxines C3a et C5a²²⁶, ainsi que le complexe d'attaque membranaire C5b-9^{227,228}, entraîne l'augmentation de la production de cytokines pro-inflammatoires ainsi que les dommages tubulaires. De plus, des études récentes ont mis en lumière que la réduction de CL-11/Colec11 permet de diminuer les lésions tubulaires suite à l'IR et de prévenir en partie la perte de fonction rénale²²⁹.

3. Les jonctions gap

L'accroissement rapide des maladies rénales, et notamment de l'IRA, nous oblige à découvrir de nouvelles cibles afin de progresser dans la prévention et la thérapie de ces pathologies. Les jonctions gap (JG) ont des rôles cruciaux dans la différenciation, la croissance cellulaire, la régulation du stress oxydant et de l'inflammation dans les organes²³⁰. Ainsi, elles ont suscité un intérêt considérable dans les pathologies de nombreux organes. Dans cette lignée, notre laboratoire a montré qu'elles semblent être des cibles potentielles dans le traitement des néphropathies.

a. Généralités

Les connexines (Cx) sont les constituants de base des jonctions gap (JG), qui sont des canaux intercellulaires permettant la transmission de l'information entre deux cellules adjacentes²³¹. Il existe 21 connexines chez l'Homme, et 20 connexines chez la souris²³².

Les Cx possèdent 4 domaines transmembranaires, deux boucles extracellulaires permettant l'arrimage des JG, une boucle intracellulaire régulant l'ouverture du pore, ainsi qu'une queue N-terminale et une queue C-terminale de longueur différente selon les Cx (cette dernière participant à différentes voies de signalisation via sa liaison avec divers autres molécules). L'assemblage de 6 Cx forme un connexon (ou hémicanal, HC) et 2 connexons une jonction gap. En plus des JG, les HC eux même permettent la transmission de signaux cellulaires dans le milieu extra-cellulaire²³³. Cette communication se fait via le passage d'ions et de petits métabolites inférieurs à 1kDa.

Les différentes Cx existantes peuvent s'associer pour former un HC, qui sera alors dit hétéromérique ; ou au contraire un HC peut être formé à partir d'un seul type de Cx, il est alors dit homomérique. S'ajoute à cela, les JG qui peuvent être homotypiques lorsqu'elles sont formées du même HC ; ou hétérotypique si elles sont formées de deux HC différents. Cela donne lieu à une très grande diversité dans la formation des JG, et leurs propriétés.

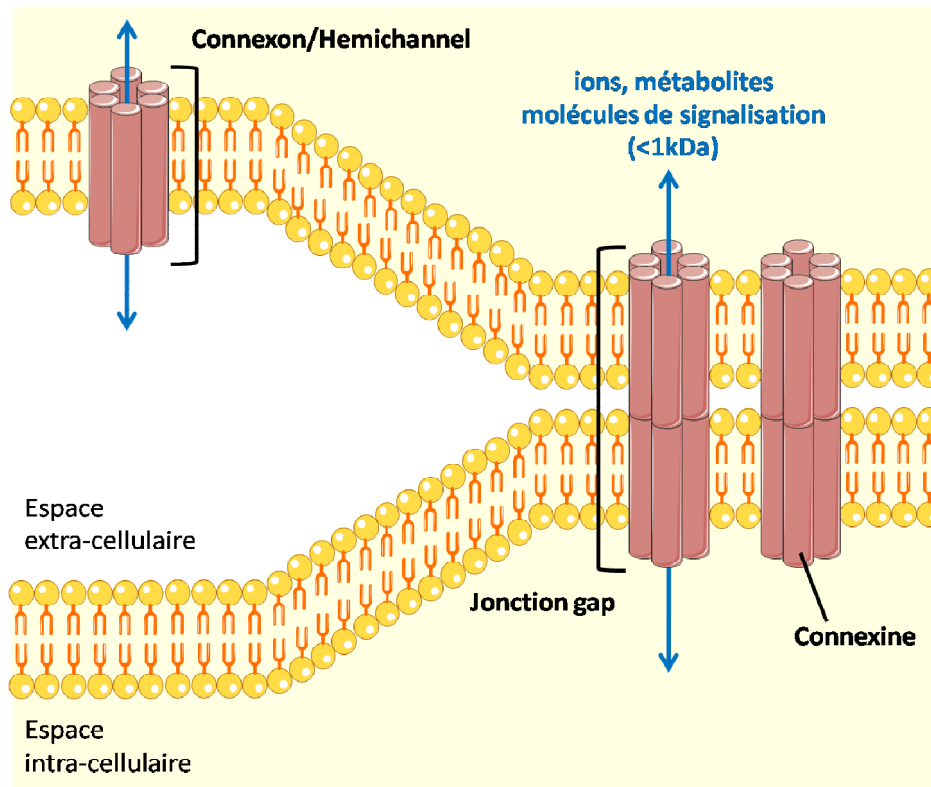


Figure 12 : Structure des JG et HC. 6 connexines forment 1 hemicanal (HC) et 2 HC forment une jonction gap (JG) (Genest M.)

Concernant la composition rénale en Cx, environs la moitié des Cx connues sont retrouvées dans le rein. Dans le système vasculaire rénal sont présentent : Cx37, Cx40, Cx43 et Cx45, avec une expression prédominante de Cx40 dans les cellules endothéliales et Cx45 dans les CMLV. Dans les tubules, il existe des preuves morphologiques de la présence de JG uniquement dans les tubules proximaux. Dans le néphron distal les Cx30, Cx30.3 et Cx37 sont exprimées, mais on ne sait pas si elles forment des JG reliant les cellules voisines ou si elles agissent via des HC. Cependant, les études montrent des expression et localisations des différentes Cx ambiguës²³⁴.

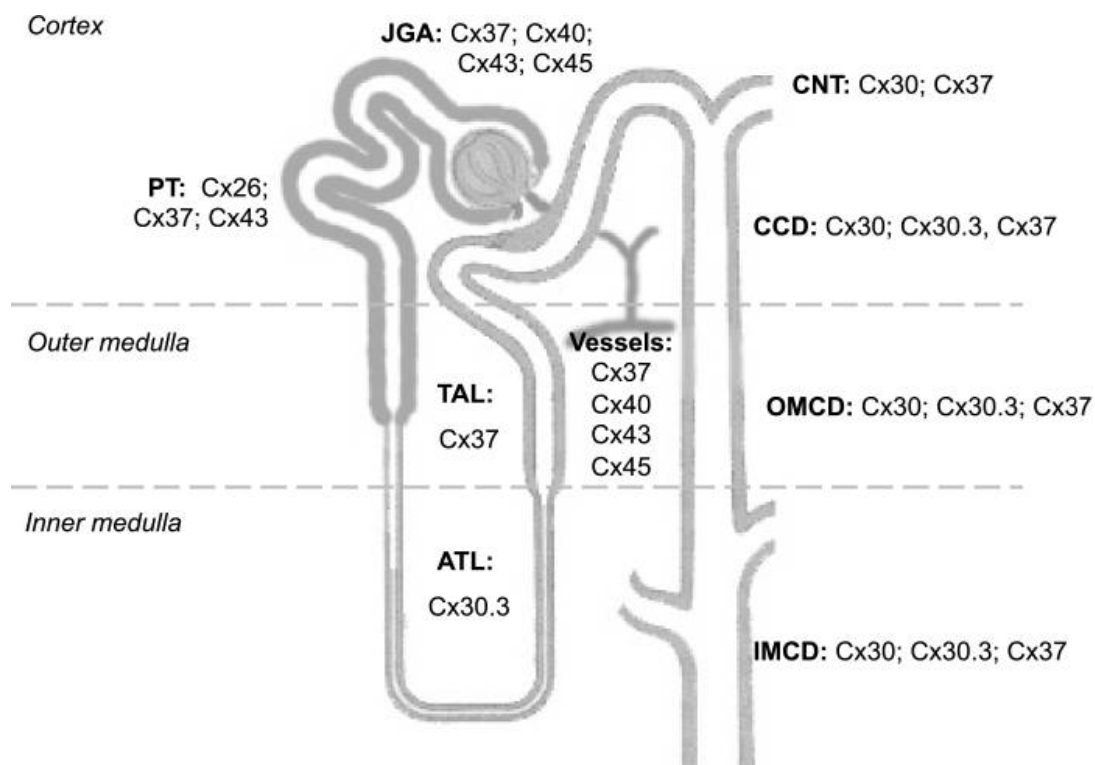


Figure 13 : Localisation présumée des différentes isoformes de connexines dans le rein. JGA : appareil juxtaglomérulaire, CNT : tubule connecteur, PT : tubule proximal, CCD : tube collecteur cortical, TAL : branche épaisse ascendante de l'Anse de Henlé, ATL : branche fine ascendante de l'Anse de Henlé, OMCD : tube collecteur de la zone externe de la médullaire externe, IMCD : tube collecteur de la zone interne de la médullaire externe (Hanner F et al, Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol. 2010)

b. La Connexine 43

La connexine 43 (Cx43) étant la première découverte elle est également la plus étudiée et documentée. La Cx43 est exprimée de façon ubiquitaire chez l'homme à l'exception des thrombocytes matures, du muscle squelettique, des érythrocytes et des spermatozoïdes²³⁵. Elle possède une demi-vie très courte (entre 1 et 4h en fonction des tissus) permettant son renouvellement perpétuel. Le gène de la Cx43 se trouve, chez l'Homme, sur le chromosome 6, mais il existe aussi un pseudogène sur le chromosome 5. Comme la plupart des autres membres de la famille, la Cx43 est codée par un gène possédant deux exons séparés par un intron. Le premier exon code pour une séquence 5' non transcrite alors que le second exon possède la séquence codant la protéine en entière. Ce gène code pour une protéine de 43 kDa, d'où son nom. Au niveau rénal, la Cx43 est retrouvée dans le tube contourné distal, et dans l'endothélium ainsi que les CMLV rénales, mais en faible proportions.

La régulation de la Cx43 est très importante pour la modulation de la communication intercellulaire. Cette régulation met en jeu un grand nombre de modifications post-transcriptionnelles tel que la

phosphorylation, l'acétylation, la sumoylation et l'ubiquitynilation. Ces différents processus modulent non seulement l'activité de la Cx43 mais également son transport jusqu'à la membrane, sa structure tridimensionnelle, sa stabilité, ou encore sa dégradation. L'un des mécanismes le plus étudié est la phosphorylation de la Cx43. Sa queue C-terminale est le siège privilégié de ces de mécanisme de part la présence de 21 sites de phosphorylation. Ces sites sont régulés par une dizaine de phosphatases et kinases tel que la PKC, la PKA, la Src, des MAPKs ou encore la PP2A^{236,237}. De plus, il est noté que la Cx43 interagit également avec de nombreuses protéines du cytosquelette, d'autres protéines de jonction (ZO-1, claudines), ou des protéines associées aux jonctions adhérentes comme la β -catenine²³⁸.

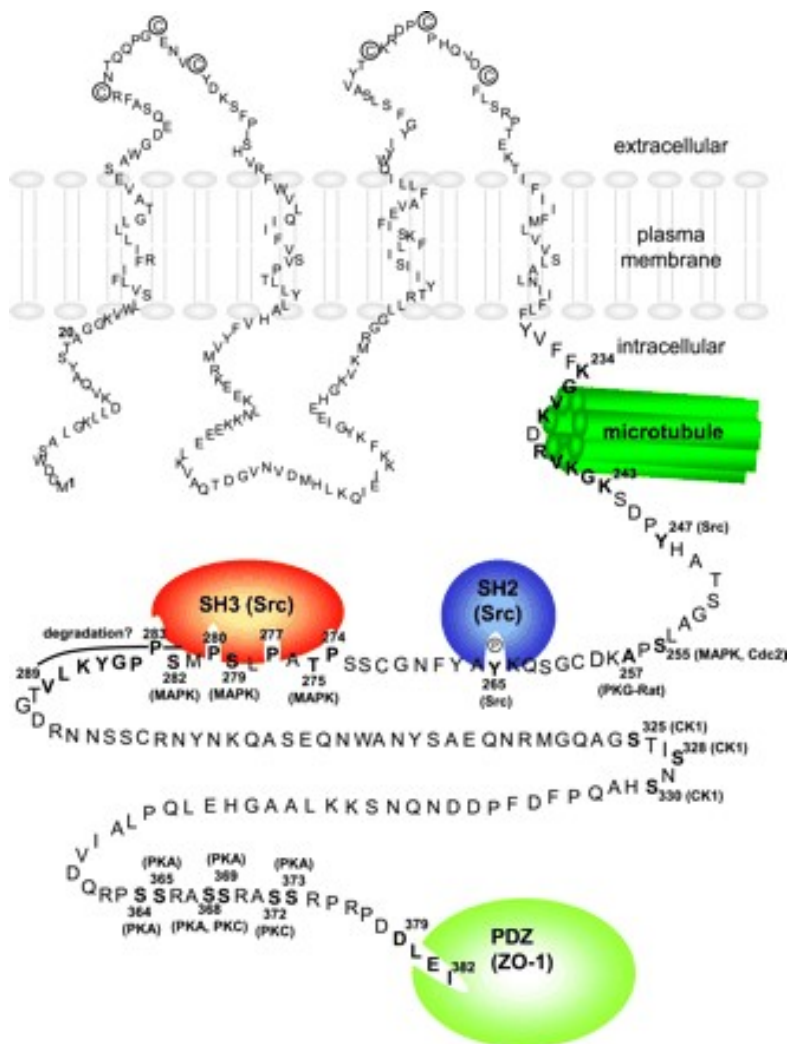


Figure 14 : Structure de la Cx43 et ses différents sites de phosphorylation et d'interaction avec d'autres protéines. Composition en amino-acides de la Cx43 humaine. Sont visibles sur la queue C-terminale longue les sites d'interactions avec les microtubules, ZO-1, des protéines Src. Les différents sites de phosphorylations et les kinases associées sont également représentés (Giepmans BN, Cardiovasc Res. 2004).

c. Connexine 43 et physiopathologies

De nombreuses études ont montrées que la Cx43 est impliquée dans les pathologies de divers organes tels que le système cardiovasculaire, le système nerveux, la peau, les poumons, le foie, et même le système érectile. Un des mécanismes clé dans le développement de pathologies est l'inflammation, nous commencerons donc par détailler le rôle de la Cx43 dans sa régulation. Ensuite nous citerons brièvement quelques organes impliquant la Cx43 dans leurs pathologies, en mettant l'accent sur le rein qui nous intéresse plus particulièrement.

Cx43 et l'inflammation

L'expression et/ou l'activité des GJ et HC sont modifiés dans de nombreuses conditions inflammatoires. Il a notamment été montré *in vitro* que les GJ sont modulées par nombres de médiateurs inflammatoires tels que le LPS, le TNF α et l'IL-1, et ce dans de nombreux tissus (vasculaires, système nerveux, foie)²³⁹⁻²⁴². On sait aujourd'hui que le TNF α inhibe l'activité du promoteur de la Cx43 au niveau cardiaque, ce qui réduit l'expression de Cx43²⁴³; mais aussi que diverses cytokines entraînent une diminution d'expression et une redistribution de Cx43 lors de pathologies cardiaques^{244,245}. La diminution de l'expression de Cx43 induite par l'IL-1 β dans le tissu endométrial est médié par la voie de signalisation Erk-MAPK²⁴⁶, alors que dans les CMLV l'inhibition de la Cx43 par le TNF α se fait via la voie JNK²⁴⁷.

En revanche, concernant les cellules inflammatoires elles-mêmes on observe une augmentation de l'expression de Cx43. Cela est visible chez les neutrophiles et les macrophages. A l'état non activés ces deux types cellulaires n'expriment pas la Cx43 mais une fois activés, avec du milieu conditionné de cellules endothéliales activées, la détection de Cx43 à leur surface est possible²⁴⁸⁻²⁵⁰. Pour appuyer cela, la Cx43 a été détectée dans les macrophages de plusieurs pathologies²⁵¹⁻²⁵³. Il a également été montré que l'inhibition non spécifique des JG par le 18 α GA (18- α -glycyrrhétinacide) ou l'inhibition de la Cx43 par des peptides spécifiques bloquent de manière significative la libération d'ATP par les neutrophiles activés²⁵⁴. Il a également été montré que l'expression de Cx43 sur les macrophages contrôle de manière critique la libération d'ATP lors du sepsis²⁵⁵. L'ATP amplifiant le chimiotactisme et la migration des neutrophiles, ainsi que l'activation des macrophages, cela fait de la Cx43 un acteur majeur de la réponse inflammatoire. Enfin, il a été mis en évidence l'expression de Cx43 par les lymphocytes circulants T, B et NK purifiés à partir de personnes saines²⁵⁶, et elle semble réguler leur activation et leur transmigration à travers l'endothélium. Dans des cultures contenant différents types de lymphocytes, il a été observé que le blocage des JG réduit la sécrétion d'immunoglobulines et d'IL-10²⁵⁷. Les lymphocytes établissent une communication avec les

cellules endothéliales, via les JG formées de Cx43, au cours de la migration trans-endothéliale et ce processus est inhibé par les peptides bloquants de la Cx43²⁵⁸.

Cx43 dans le cœur, le système nerveux central et les poumons

La Cx43 est indispensable au fonctionnement du cœur. Il s'agit de la Cx la plus abondante dans le cœur, et permet la synchronisation de la contraction des cardiomyocytes. Ainsi les souris KO pour la Cx43 meurent d'arythmie cardiaque sévère quelques heures après la naissance. La Cx43 est donc nécessaire au bon développement cardiaque et à l'activité cardiomyocytaire²⁵⁹. Dans des conditions physiopathologiques, l'expression, la phosphorylation et la distribution de Cx43 sont modifiées^{260,261}. Concernant sa localisation : la Cx43 se trouve normalement au niveau du disque intercalaire (accumulation de jonctions aux extrémités des cardiomyocytes, permettant leur liens les uns avec les autres) et dans nombres de cardiomyopathies elle migre sur les parties latérales des cardiomyocytes (on parle de latéralisation)²⁶². Ces modifications peuvent contribuer à la fois à la création d'arythmies en créant des substrats anatomiques présentant une conduction électrique anormale et un dysfonctionnement contractile cardiaque par altération du mouvement de la paroi²⁶³⁻²⁶⁵.

A propos des cardiomyopathies ischémiques, l'ischémie entraîne la fermeture des JG. Cela est dû à une augmentation intracellulaire de Ca^{2+} , mais aussi de H^+ entraînant une acidification de la cellule cardiaque, et une réduction en ATP. Le tout module positivement ou négativement différentes kinases et phosphatases, entraînant des altérations de phosphorylation de la Cx43, la fermeture des JG et en résulte alors un découplage électrique des cardiomyocytes^{266,267}. S'ajoute à la fermeture des JG, la réduction de leur nombre et leur latéralisation²⁶⁸.

Concernant le système nerveux central, il a été rapporté une expression altérée des Cx astrocytaires dans le cerveau de patients atteints de la maladie d'Alzheimer ainsi que dans un modèle murin de cette pathologie^{269,270} : l'expression de Cx43 dans les JG astrocytaires est augmentée et certaines plaques correspondaient exactement aux sites immunoréactifs de la Cx43 (60-70% chez la souris). Cependant, une diminution de l'expression de Cx43 et de Cx30 a également été constatée dans quelques plaques nouvellement formées (<10%)²⁷⁰.

De plus en plus de preuves suggèrent que l'expression de la Cx43 astrocytaire est augmentée après une lésion ischémique et que la Cx43 joue un rôle important dans la mort cellulaire et les lésions cérébrales²⁷¹⁻²⁷³. L'IR et la réponse inflammatoire qui s'en suit provoquent l'activation anormale des

HC astrocytaires ce qui entraîne une libération d'ATP, de glutamate et de Ca^{2+} au niveau extracellulaire. Il en résulte une toxicité tissulaire, une amplification de l'inflammation^{271,274} et, à terme, des lésions cérébrales irréversibles. Il faut savoir que le préconditionnement ischémique (PI) a montré son efficacité dans le retardement de la mort cellulaire induite lors de futurs épisodes d'IR cardiaque. Il est intéressant de noter que la cardioprotection induite par l'PI est abolie chez les souris hétérozygotes pour la Cx43, où lorsqu'on bloque les JG^{275,276}. Enfin, notons que de nombreuses études mettent en évidence également la Cx43 mitochondriale dans le PI cardiaque, part son implication dans la production de ROS et la survie cellulaire²⁷⁷⁻²⁸⁰.

Enfin, au niveau pulmonaire une surexpression de la Cx43 a été décrite dans l'épithélium et l'endothélium pulmonaires et corrélée une augmentation de la perméabilité vasculaire pulmonaire lors de pathologies inflammatoires pulmonaires aiguës²⁸¹. En revanche, lors de maladies pulmonaires chroniques tel que la fibrose cystique une diminution de l'expression de Cx43 est observée.

Cx43 et le rein

Notre laboratoire a mis en évidence dans trois modèles murins de maladie rénale chronique un rôle crucial de la Cx43. Que cela soit dans un modèle de néphropathie hypertensive (avec des souris Ren-Tg), un modèle de glomérulonéphrite (avec des souris injectées avec du sérum néphrotoxique) ou un modèle de néphropathie obstructive (Obstruction Unilatérale de l'Uretère, UUO)²⁸²⁻²⁸⁴. Dans ces trois modèles il a été montré que la diminution de Cx43, qu'elle soit génétique (souris hétérozygotes) ou pharmacogénétique (injection d'antisens Cx43), permet la réduction du nombre de monocytes infiltrants, la réduction de fibrose rénale interstitielle et l'amélioration de la structure et de la fonction rénale.

Les vaisseaux

Le système vasculaire est impliqué dans de nombreuses néphropathies et notamment dans la néphropathie hypertensive. De plus, le rôle de la Cx43 a été étudié dans les cellules endothéliales mais tout particulièrement dans les CMLV. Afin d'étudier le rôle de la Cx43 lors d'une néphropathie mettant en jeu principalement le système vasculaire des souris surexprimants la rénine dans le foie ont été utilisées. Cette surexpression cause une augmentation de la pression sanguine et avec le temps détériore la fonction rénale. Il est alors observé parallèlement à la progression de la maladie une augmentation de la Cx43 au niveau des capillaires péri-tubulaires et glomérulaires. De plus, une

réduction de la Cx43 entraîne une diminution de l'albuminurie, des infiltrats inflammatoires ainsi que la diminution de la fibrose interstitielle. La surexpression de Cx43 dans l'endothélium rénal accroît l'adhésion et l'infiltration des cellules inflammatoire, générant ainsi un microenvironnement pro-inflammatoire. La communication entre ces cellules est médiée par la libération d'ATP via les jonctions Cx43²⁸⁵⁻²⁸⁷.

Les cellules tubulaires

Les cellules tubulaires rénales sont directement touchées par les néphropathies obstructives et l'ischémie. L'IR rénale entraîne une diminution de l'ATP intracellulaire des cellules tubulaires, et il a été montré *in vitro* que cette réduction va induire l'expression de Cx43 et activer les HC²⁸⁸. Il a aussi été montré dans les cellules tubulaires humaines, traitées au glucose ou TGFβ1, une diminution de la communication intercellulaire via les JG, malgré une augmentation de l'expression de la Cx43; cependant une augmentation de l'activité des HC qui sécrètent de l'ATP a été observée, ce qui induit l'expression d'IL-6 et de fibronectine par les cellules avoisinantes²⁸⁷. Dans un modèle de néphropathie obstructive (UUO) une expression augmenté de la Cx43 dans les cellules tubulaires a été montré, et la diminution en Cx43 (chez des souris Cx43 hétérozygotes ou via l'injection d'oligonucléotides anti-sens contre la Cx43) entraîne une diminution de la réponse inflammatoire et la préservation partielle de la E-cadhérine^{282,284}.

Les podocytes

Plusieurs modèles de néphropathies glomérulaires ont montrés une augmentation de la Cx43 au niveau des podocytes^{282,284,289}. Il a notamment été montré *in vitro* que cette augmentation de Cx43 active la NADPH ce qui entraîne l'augmentation de la production de ROS et la production de signaux pro-apoptotiques. L'amélioration de la viabilité cellulaire suite à l'inhibition de Cx43 confirme ces données^{290,291}. Il a également été montré que les podocytes sont très sensibles aux taux d'ATP extracellulaire de par la large gamme de récepteurs purinergiques qu'ils possèdent à leur surface. La liaison de l'ATP à ses récepteurs induit l'augmentation de Ca²⁺ intracellulaire donnant lieux à diverses réponses pathologiques des podocytes^{283,292,293}. Le blocage de la Cx43 réduit les actions délétères de la signalisation de l'ATP. De plus, outre son rôle dans l'apoptose des podocytes, la Cx43 semble liée à la réponse inflammatoire glomérulaire^{283,294}.

Les cellules mésangiales

Les cellules mésangiales font également parties du glomérule. Les néphropathies altérants plus particulièrement ces cellules sont la glomérulonéphrite mesangioproliférative à IgA, ainsi que les néphropathies diabétiques. A l'inverse d'autres types cellulaires cités précédemment, lorsqu'elles sont lésées les cellules mésangiales présentent une diminution de l'expression de la Cx43²⁹⁵. Cette diminution semble entraîner des modifications du cytosquelette ainsi qu'induire la prolifération des cellules mésangiales. Il a été montré d'une part, dans un modèle *in vitro* de néphropathie diabétique, qu'il y a un réarrangement du cytosquelette médié par RhoA/ROCK, la translocation de NFκB au noyau, l'accumulation de F-actine et une amélioration des interactions entre ZO-1 et Cx43 des cellules mésangiales en réponse à un traitement au glucose²⁹⁶ ; d'autre part dans la néphropathie à IgA il semble que la Cx43 joue sur la prolifération via les voies de signalisation Erk1/2 et PKC²⁹⁷. Dans les deux cas, la surexpression de Cx43 abolit ces effets.

Objectifs

Concernant le rôle de Notch3 dans le remodelage cardiaque : l'étude antérieure menée par Ragot *et al.* dans notre équipe a mis en évidence que l'absence de la voie de signalisation Notch3 est délétère pour le remodelage cardiaque pathologique, notamment lors d'une HTA. Les objectifs de cette partie de mon projet de thèse ont donc été :

- D'étudier si la suractivation de la voie de signalisation Notch3 dans les CMLV lors d'une surcharge de pression, telle que l'HTA, induit une protection contre le développement d'une cardiopathie hypertensive.
- D'évaluer l'implication de la voie Notch3 lors d'un remodelage cardiaque physiologique induit par une surcharge de débit lors d'un programme d'entraînement physique modéré.

Concernant le rôle de la Cx43 dans le remodelage rénal : les études précédentes menées par l'équipe ont montré que cette protéine est surexprimée dans différents modèles de néphropathies chroniques et que la réduction de celle-ci protège des dommages rénaux lors de ces pathologies. Les objectifs de cette partie de ma thèse ont donc été :

- D'évaluer si la Cx43 est également impliquée dans la progression de l'insuffisance rénale aiguë induite par ischémie-reperfusion rénale.
- D'étudier les types cellulaires et mécanismes possiblement mis en jeu lors d'une néphropathie aiguë.

Matériels et méthodes

I- Modèles animaux

1. Lignées Notch3

a. Souris surexprimant N3ICD dans les CMLV

Dans cette étude un modèle de souris conditionne la été utilisé, permettant d'obtenir une surexpression du domaine intracellulaire Notch3 (N3ICD) spécifiquement dans les cellules musculaires lisses vasculaires (CMLV). Pour cela 2 lignées de souris ont été croisées : des souris souris R26-N3ICSAT portent l'ADNc de N3ICD en aval d'une cassette lox-STOP-lox (fourni par le Dr. Silva Fre²⁹⁸), et des souris qui possèdent la Cre recombinase fusionnée à un élément sensible au tamoxifen (ERT2) sous le contrôle du promoteur de la Transgelin (SM22 α) qui est une protéine exprimée spécifiquement dans les CMLV. Nous avons ainsi obtenu des souris SM22 α -CreERT2, N3ICD. Ces souris ont un fond génétique C57BL/6J. L'induction de la surexpression du N3ICD est faite chez des souris mâles âgées de 1 mois, par injection intra-péritonéale pendant 5 jours de 100 μ L de tamoxifen à 10mg/mL dilué dans de l'huile de graines de tournesol. Les souris de cette lignée seront nommées « Ctrl » pour les souris contrôles et « TgN3ICDSM » pour les souris induites.

b. Souris Notch3 KO

Nous avons également utilisé des souris mâles Wild Type (WT) et des souris invalidées pour le gène *Notch3* (KO) de fond génétique mixte C57BL/6J développée par le Dr Thomas GRIDLEY de l'Institut de Recherche du Centre Médical du Maine et fournis par Jackson Laboratory. L'invalidation par recombinaison homologue du gène *Notch3* avec une cassette de résistance à la néomycine entraîne un knock out total de la protéine chez les souris homozygotes. Ces souris sont viables et fertiles.

2. Lignées Cx43

a. Souris hétérozygote pour la Cx43

Dans cette étude nous avons utilisé des souris mâles Wild Type (WT) et hétérozygotes (HE) de fond génétique mixte C57BL/6J – 129S1/SvImJ. Cette lignée de souris a été développée par le Dr Gerald KIDDER et le Dr Janet ROSSANT de l'Université Western Ontario et donnée à Jackson Laboratory. L'invalidation par recombinaison homologue du gène *Gja1* avec une cassette de résistance à la néomycine entraîne un knock out de l'exon 2 de la protéine chez les souris homozygotes. Ces souris

meurent à la naissance à cause d'une défaillance cardiaque, c'est pourquoi des souris hétérozygotes sont utilisées dans notre étude.

b. Souris invalidée pour la Cx43 dans les tubules rénaux

Nous avons également utilisé un modèle de souris conditionnel, ayant une invalidation inductible de la protéine Cx43 spécifique des cellules épithéliales tubulaires. Pour cela 3 lignées de souris ont été croisées. Tout d'abord les souris Pax8-rtTA (C57BL/6 :DBA) qui possèdent le promoteur tubulaire Pax8 fusionné à un segment génique codant un activateur de transcription (rtTA), avec les souris LC1 (C57BL/6 :BALB/c) qui possèdent la Cre recombinase sous le contrôle d'un élément sensible à la tétracycline (Robert Koesters). La souris résultante est ensuite croisée à une souris homozygote Cx43^{flox}. Il en résulte des souris Pax8-rtTA, LC1, Cx43^{flox} inductible par l'administration de doxycycline. Ces souris ont un fond génétique mixte C56BL/6 – 129/Sv. L'induction est faite chez des souris mâles âgées de 3 mois, par administration pendant 15 jours de 0.2mg/mL de doxycycline dans l'eau de boisson contenant 2,5% de sucrose. Les souris de cette lignée seront nommées « Pax8 Dox- » pour les souris contrôles non induites et « Pax8 Dox+ » pour les souris induites.

c. Souris invalidée pour la Cx43 dans les cellules endothéliales

Enfin un dernier modèle de souris conditionnel a été utilisé, ayant une invalidation inductible de la protéine Cx43 spécifique des cellules endothéliales. Pour cela 2 lignées de souris ont été croisées : des souris homozygote Cx43^{flox} et des souris Cdh5(PAC)-CreERT2 (C57BL/6) qui possèdent la Cre recombinase fusionnée à un élément sensible au tamoxifène (ERT2) sous le contrôle du promoteur de la cadherine endothéliale vasculaire Cdh5(PAC). Il en résulte des souris Cdh5(PAC)-CreERT2, Cx43^{flox}. Ces souris ont un fond génétique mixte C56BL/6 – 129/Sv. L'induction est faite chez des souris mâles âgées de 3 mois, par injection intra-péritonéale pendant 5 jours de 100µL de tamoxifène à 10mg/mL dilué dans de l'huile de graines de tournesol. Les souris de cette lignée seront nommées « VeCadh Tam- » pour les souris contrôles non induites et « VeCadh Tam+ » pour les souris induites.

II- Modèles expérimentaux

1. Modèles d'hypertrophies cardiaques

a. Hypertension artérielle par infusion d'Angiotensine II

A l'âge de 2 mois les souris mâles Ctrl et TgN3ICDSM sont soumises à une infusion d'Angiotensine II via l'implantation d'une mini-pompe osmotique (OsmoticPumps model 2004, ALZET®) associée à une alimentation riche en sel (5%), pendant 24 jours.

Avant la chirurgie la mini-pompe à été remplie avec 200µL d'Angiotensine II à 6,67mg/mL et activée par une incubation dans du sérum physiologique à 37°C pendant la nuit.

Tout d'abord les souris sont anesthésiées par injection intra-péritonéale du mélange kétamine (90mg/kg) - xylazine (5mg/kg). Une fois endormies, les souris sont rasées au niveau du cou et désinfectées avec de la bétadine. Après une petite incision transversale entre les omoplates, les aponévroses sont dissociées afin de faciliter l'introduction de la mini-pompe. Une fois que la mini-pompe a été placée en sous-cutanée, bouchon vers l'intérieur, la peau est recousue avec du fil de soie résorbable 4.0. Les souris sont remises dans leur cage et surveillées jusqu'au réveil.

b. Surcharge de débit induite par un entraînement physique

A l'âge de 2 mois les souris mâles WT et KO Notch3 suivent un protocole d'entraînement physique sur tapis roulant (Treadmill control L8 8710, Bioseb). Les souris sont acclimatées au matériel pendant 1 semaine et suivent ensuite un entraînement 3 fois par semaine pendant 5 semaines. La vitesse et la durée d'exercice augmentent progressivement (de 10min-15cm/sec à 25min-25cm/sec) lors du protocole afin d'avoir un exercice modéré qui permette de reproduire en laboratoire une contrainte cardiaque physiologique mimant l'effort demandé lors d'une réadaptation cardiaque. Le tapis est légèrement incliné et le système possède une grille électrifiée à l'arrière du tapis qui délivre un choc (0,4 mA) afin de stimuler les souris à la course. En cas de contact prolongé avec la grille la souris est considérée dans l'incapacité de continuer l'exercice et est retirée du couloir de course en cours de protocole. L'analyse de chaque exercice se fait grâce au logiciel Sedacom32. Les paramètres étudiés sont la distance parcourue ainsi que le nombre de stimuli reçus par souris.

2. Modèle d'agression rénale aiguë par ischémie-reperfusion

Les souris mâles des lignées détaillées précédemment, âgées de 2-3 mois, subissent tout d'abord une néphrectomie droite suivie d'une ischémie rénale gauche de 35min. Les souris sont ensuite sacrifiées à différents temps de reperfusion (3,6, 24, 48 et 72 heures).

Tout d'abord les souris sont anesthésiées par injection intra-péritonéale du mélange kétamine (100mg/kg)-xylazine (20mg/kg), à une dose de 100µL/10g de souris. Une fois endormies, les souris sont rasées au niveau des flancs et désinfectées avec de la bétadine. Les souris sont ensuite ouvertes au niveau du flanc droit, par une incision horizontale en dessous de la cage thoracique. Le rein est sorti de façon manuelle par pression sur l'abdomen, puis l'artère et la veine rénales sont dégagées de la graisse avoisinante et ligaturées avec du fil de soie 5.0. Ce n'est qu'après cela que le rein est coupé à l'aide d'un scalpel, au niveau de la ligature, ainsi que de l'uretère. Le flan est ensuite refermé : le plan musculaire est recousu avec du fil de soie résorbable 4.0, et le plan cutané est refermé avec des agrafes « Michel suture clips size 7.5 x 1.75 » de chez FST. Ensuite les souris sont ouvertes au niveau du flanc gauche, par une incision verticale en dessous de la cage thoracique. Le rein est à nouveau sorti de façon manuelle et l'artère et la veine rénales sont dégagées de la graisse environnante. Le pédicule rénal est ensuite clampé 35min à l'aide d'un clamp « Stainless steel micro serrefines No.18055-06 » de chez FST. Le rein devient noir en quelques minutes, attestant de l'efficacité du clamping. Pendant le temps d'ischémie les souris sont gardées sur un tapis chauffant, et recouvertes d'une couverture de survie, tout en étant placé sous une lampe chauffante, pour éviter l'hypothermie. Les yeux et le rein sont régulièrement hydratés avec du sérum physiologique gardé au chaud. Concernant les souris des lignées Pax8 et VeCadh, le rein est placé sous la peau le temps de l'ischémie. Enfin le clamp est retiré permettant la reperfusion du rein (visible par un éclaircissement de ce dernier, et un retour à sa couleur d'origine). Le rein est réintroduit dans la cavité abdominale et l'incision est refermée comme précédemment : suture pour le plan musculaire et agrafes pour la peau. De la bétadine est appliquée sur les deux cicatrices et les souris sont laissées au chaud le temps qu'elles se réveillent. Quand elles présentent des signes de réveil (vibrisses frémissantes, mouvements de la queue, marche), elles sont placées dans un papier puis dans leurs cages respectives. Les souris sont mises à mort à différents temps de reperfusion. Le rein droit issu de la néphrectomie sert de rein contrôle (CL).

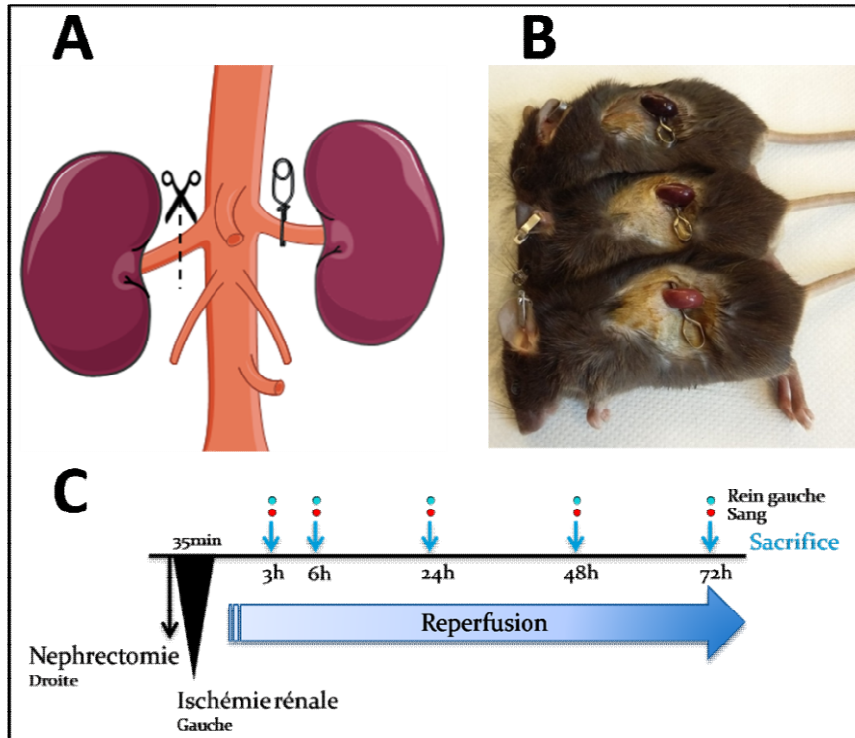


Figure 15 : Protocole expérimental d'IR rénale. A- Schéma de la néphrectomie droite et du clampage du rein droit. B- Photo d'ischémie rénale à différents temps. C- Schéma récapitulatif du protocole d'IR rénal.

III- Evaluations fonctionnelles

1. Projet Notch3

a. Mesure de la pression artérielle par tailcuff

La pression artérielle des souris est mesurée de façon non invasive par pléthysmographie au niveau de la queue des souris à l'aide du CODA® High Throughput System (Kent Scientific Corporation). Les souris sont acclimatées au matériel pendant une semaine avant la pose de la mini-pompe, puis la pression artérielle est prise 2 fois par semaine tout au long du protocole d'infusion à l'AngII.

Les souris sont placées dans les tubes de contention en plastique, le manchon est placé sur la queue et 15 mesures de pression sont effectuées par animal. Les mesures obtenues sont des valeurs de pression artérielle systolique et diastolique. Pour éviter le plus possible les variations de pression artérielle dues au stress les mesures suivantes sont utilisées : les souris sont mises à chaque fois dans un tube respectif, la contention n'est pas trop importante, le même opérateur est présent à chaque prise de pression, si une souris ne donne pas de valeur viable après 15 mesures l'opérateur ne laisse pas la souris plus longtemps dans le tube pour essayer d'avoir plus de valeurs.

b. Mesure de la fonction cardiaque par échocardiographie

La fonction cardiaque des souris est mesurée de façon non invasive par échographie cardiaque transthoracique à l'aide de l'appareil ACUSSON S3000 (Siemens Healthcare) équipé d'un capteur linéaire de 14 MHz. Une mesure est effectuée à l'état basal puis une en fin de protocole afin d'étudier l'évolution de la fonction cardiaque.

Les souris sont anesthésiées par une injection intra-péritonéale de 50µL de kétamine (Kétamine 1000 diluée au ½ dans du sérum physiologique) puis rasées au niveau du thorax, et enfin les différentes mesures de fonction cardiaques sont réalisées, tout en gardant la souris sur un tapis chauffant à 37°C. Les souris sont remises dans leur cage pour le réveil. L'anesthésie est de courte durée (environ 20min). Sont ensuite analysés les différents paramètres suivants : les diamètres télédiastoliques et télésystoliques du ventricule gauche (DTDVG et DTSVG), l'épaisseur des parois septale et postérieure, la fraction de raccourcissement et la fréquence cardiaque.

c. Mesures de la vasoréactivité rénale

La chirurgie est les différentes mesures d'hémodynamique rénale ont été réalisées en partenariat avec Sandrine PLACIER, ingénieure d'étude de l'unité INSERM UMR-S 1155 de l'hôpital Tenon de Paris. Le but est d'étudier la vasoréactivité rénale des souris en réponse à des injections de bolus de vasoconstricteurs (noradrénaline et angiotensine II) et vasodilatateur (acétylcholine). La mesure de débit sanguin rénal (DSR) est mesurée de façon invasive à l'aide d'un débitmètre (sonde TS420 de 0,5 v, TransonicSystems) et la pression artérielle (PA) est également mesurée de façon invasive à l'aide d'un transducteur de pression (Statham P23 DB).

Les souris sont anesthésiées au pentobarbital de sodium (50 à 60 mg/kg de Nembutal) par injection intrapéritonéale, puis les souris sont gardées à 37°C sur un tapis chauffant. La souris est ouverte afin de dégager l'artère et la veine fémorales gauches pour cathétérisation: l'artère est utilisée pour mesurer la pression artérielle et la veine est utilisée pour les différentes perfusions (bolus d'agents vasoactifs ou de solution saline). La souris est remplie tout au long de la chirurgie avec une solution de sérumalbumine bovine (2,5 g/dL de sérum physiologique) afin de compenser les pertes hydriques inhérentes à l'expérience : au début à 50 µL/min pour remplacer les pertes chirurgicales, puis à 10 µL/min pour la maintenance. La souris est ensuite placée sur le flan, afin de pratiquer une ouverture rétro-péritonéale pour dégager l'artère et la veine rénales. Une fois cela fait la sonde à ultrasons est placée autour de l'artère rénale. Les données ont été enregistrées, stockées et analysées à l'aide du convertisseur analogique-numérique DataTranslation et du logiciel IOX (EMKA Technologies). Le DSR et la PA sont mesurés à l'état basal et au cours des injections intraveineuses

d'AngII (0.5, 1 et 2 ng) (Sigma-Aldrich), de noradrénaline (50 et 100 ng) (Sigma-Aldrich), et d'acétylcholine (5 et 25 ng) (Sigma-Aldrich). Ce sont les variations de PA et de DSR produits par les agents vasoactifs qui sont enregistrés, et analysés.

2. Projet Cx43

Mesure de la fonction rénale

Pour évaluer la fonction rénale des dosages de créatinine et d'urée plasmatiques sont effectués en partenariat avec le Centre de Recherche des Cordeliers, sur l'automate Konelab qui utilise une méthode de dosage enzymatique.

IV- Mise à mort des souris et prélèvement des organes

1. Projet Notch3

A l'issue des différents protocoles les souris sont mises à mort par injection intra-péritonéale de pentobarbital (50mg/kg). Une fois endormies les souris sont pesées puis le thorax est ouvert afin d'injecter du KCl (1M) en intra-cardiaque pour arrêter le cœur en diastole. Différents organes sont ensuite prélevés, en commençant par le cœur qui est disséqué : l'oreillette gauche, l'oreillette droite et les ventricules sont épongées du sang puis pesées. Les oreillettes sont directement placées dans leurs cryotubes respectifs tandis que les ventricules sont coupés transversalement. La base du cœur est placée sur du liège, recouverte d'OCT puis refroidie dans l'isopentane avant d'être plongé dans l'azote liquide. Cette partie servira à faire des coupes histologiques de cœur au cryostat. La pointe du cœur quant à elle est découpée en 4 morceaux qui sont ensuite placés dans un cryotube et plongés dans l'azote liquide. Ces morceaux sont utilisés pour les extractions d'ARN et de protéines. Les autres organes récupérés sont : le rein gauche, les poumons, le foie, l'aorte thoracique. Ils sont pesés, découpés et placés dans des cryotubes, congelés à l'azote liquide puis conservés à -80°C. Le tibia gauche est rapidement mis à nu et mesuré.

2. Projet Cx43

A l'issue des différents temps de reperfusion les souris sont euthanasiées afin de récupérer le rein ischémié. Les souris sont anesthésiées par injection intra-péritonéale du mélange kétamine (100mg/kg)-xylazine (20mg/kg) et une fois endormies un capillaire hépariné est introduit au niveau

rétro-orbitaire afin de récupérer le sang dans un tube EDTA. Les souris ainsi mises à mort par exsanguination subissent ensuite une dislocation cervicale pour confirmer l'euthanasie. L'abdomen est ouvert et le rein est récupéré. La capsule rénale est retirée de façon manuelle par une légère pression sur le rein, et l'uretère est coupé. Le rein est ensuite coupé en deux dans le sens longitudinal. Une partie est placée dans une caissette puis introduit dans de l'AFA afin d'être inclus en paraffine dans les 48 heures suivantes. Cette partie sera utilisée pour faire des coupes au microtome puis des colorations ou immuno-marquages. La seconde partie est coupée en trois et les morceaux sont placés dans un cryotube qui est plongé dans l'azote liquide puis conservé à -80°C. Ces trois morceaux sont utilisés pour : l'extraction d'ARN, l'extraction de protéines et les coupes au cryostat suivi par des immuno-marquages.

V- Analyse de l'expression des ARNm

1. Projet Notch3

a. Extraction des ARN totaux et reverse transcription

Les ARN totaux sont extraits à partir de 10-15mg de tissu cardiaque ou d'aorte thoracique. L'extraction est faite à l'aide du kit RNeasy Mini Kit (QIAGEN) : après incubation dans un tampon de lyse (tampon RLT – β -Mercaptoethanol), les échantillons sont broyés à l'aide d'un Polytron. Après incubation avec la protéinase k (10min à 55°C) les échantillons sont centrifugés (3min à 12500rpm à 20°C), le surnageant obtenu est mélangé à de l'éthanol absolu afin de précipiter les ARN. Ce mélange est ensuite passé sur une colonne d'affinité qui retient les ARN. S'en suit un lavage, une incubation avec la DNase (15min à température ambiante) afin d'éviter toute contamination avec de l'ADN génomique, un lavage, la désactivation de la DNase et lavage avec le tampon RPE. Enfin les ARN sont élués avec de l'eau RNase free. Pour finir, les ARN sont dosés à l'aide d'un spectrophotomètre Nanovue Plus(Dutscher) et dilués à 100ng/ μ L pour le tissu cardiaque et 20ng/ μ L pour les aortes thoraciques. Les ARN sont considérés de bonne qualité si le ratio 260/280nm est compris entre 1,9 et 2,1.

Par la suite la synthèse d'ADNc est effectuée à l'aide du kit QuantiTect Reverse Transcription Kit (QIAGEN) à partir de 500ng d'ARN totaux. D'abord, on s'assure que toute présence d'ADN est éliminée grâce à une étape utilisant un tampon d'élimination d'ADN génomique (gDNAWipeout buffer 7X) qu'on incube 2min à 42°C. Est ajouté à cela un mélange réactionnel permettant la synthèse d'ADNc (contenant la Quantiscript reverse transcriptase, le tampon Quantiscript RT 5X et le RT primer mix constitué d'oligo-dT et d'amorces aléatoires) suivi de l'incubation 15min à 42°C puis

3min à 95°C pour inactiver la reverse transcriptase. Pour finir les échantillons sont dilués au 1/50^e pour le cœur ou au 1/10^e pour l'aorte, et conservé à -20°C.

b. RT-PCR quantitative

Les RT-PCR quantitatives sont réalisées à l'aide d'un mélange réactionnel contenant : du LightCycler® 480 SYBR Green I Master (Roche), de l'ADNc précédemment préparé et des amorces spécifiques aux gènes d'intérêts étudiés. Les plaques de RT-PCR quantitatives sont ensuite lues avec le thermocyclerLightCycler® 96 (Roche).

La quantité d'ADNc spécifique à un gène donné est normalisé par rapport à un gène référence dit « de ménage » (ici la D-glyceraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase ou « GAPDH ») puis rapporté à un échantillon de référence dit « POOL » (composé d'un pool d'ADNc d'organes sains et pathologiques de différentes lignées présentes au sein du laboratoire). La formule utilisée est : $2^{-\Delta\Delta C_T}$ où $\Delta\Delta C_T = [C_T(\text{gène d'intérêt}) - C_T(\text{GAPDH})]_{\text{échantillon}} - [C_T(\text{gène d'intérêt}) - C_T(\text{GAPDH})]_{\text{POOL}}$.

Tableau 1 : Amorces utilisées pour les RT-PCR quantitatives cardiaques.

Gènes	Séquences d'amorces sens (5'-3')	Séquences d'amorces antisens (3'-5')
GAPDH	AACTTTGGCATTGTGGAAGG	ACACATTGGGGGTAGGAACA
Coll1	GCAGGTTACCTACTCTGTCTCT	CTTGCCCCATTTCATTTGTCT
Coll3	TCCCCTGGAATCTGTGAATC	TGAGTCGAATTGGGGAGAAT
Gal3	GTGAAACCCAACGCAAACAG	CCAGTTATTGTCCTGCTTCGT
MCP1	AGGTCCCTGTCATGCTTCTG	TCTGGACCCATTCTTCTTG
Fibronectin	ACTGACGAAGAGCCCTTAC	AGATAACCGCTCCCATTCC
CD68	TTCTGCTGTGGAATGCAAG	AGAGGGGCTGGTAGGTTGAT
SERCA	GGCACACTTACCACAAACCAG	TTCATCTTCTCCACCAGGCAC
BNP	CAGCTCTTGAAGGACCAAGG	AGACCCAGGCAGAGTCAGAA
ACE	TTGCAGGCTGGCTGCTCC	CATTCCGCTGATTCTGCTCTC
ANP	CCTAAGCCCTTGTGGTGTGT	CAGAGTGGGAGAGGCAAGAC
ACTA2	CTGACAGAGGCACCACTGAA	CTACTCCAGAGTCCAGCACA
MYH7	TGCAAAGGCTCCAGGTCTGAGTCT	GCCAACACCAACCTGTGCAAGTTC
HES1	CCCACCTCTCTTCTGACG	AGGCGCAATCCAATATGAAC
Hey1	CTTTGATGGACCGAGGTGTT	TCCCTTACCTCACTGCTCT
HeyL	CACTCCCTGAAGACGAAAGC	GCTCGTATGTCTGGTGCTGA
DII4	CCTCTCGAACTTGGACTTGC	AGCTCCTGCTTAATGCCAAA

Jagged1	CAGTGCCTCTGTGAGACCAA	AGGGGTCAGAGAGACAAGCA
Jagged2	TCCTCCTGCTGCTTTGTGAT	TTGCAGGGCTGAAAGACAC

2. Projet Cx43

a. Extraction des ARN totaux et réverse transcription

Les ARN totaux sont extraits à partir d'un des 3 morceaux de rein gardés à -80°C. Le morceau est broyé de façon mécanique dans du TRI Reagent RT (MRC), puis du BAN (4-bromoanisole) est ajouté pour améliorer l'extraction. Le surnageant obtenu après centrifugation (15min à 10000rpm à 4°C) est mélangé à de l'isopropanol afin de précipiter les ARN. Le culot d'ARN obtenu après centrifugation (10min à 10000rpm à 4°C) est lavé avec de l'éthanol 70%, puis sont dissout dans de l'eau RNase free. Enfin les ARN sont dosés à l'aide d'un spectrophotomètre NanoDropOne^C (ThermoScientific) et dilués à 200ng/μL. Les ARN sont considérés de bonne qualité si le ratio 260/280nm est compris entre 1,7 et 2.

Par la suite toute présence d'ADN est éliminée grâce à une étape utilisant la DNase I (ThermoScientific). Enfin la synthèse d'ADNc est effectuée à l'aide du kit Maxima First Strand cDNASynthesis (ThermoScientific) contenant un mélange d'enzymes (la transcriptase inverse Maxima et l'inhibiteur de RNase RiboLock) et un mélange réactionnel (tampon de réaction, des dNTP, l'oligo(dT)₁₈ et des amorces hexamères aléatoires). De l'eau RNase free est ajoutée puis les échantillons sont ensuite conservés à -80°C.

b. RT-PCR quantitative

Les RT-PCR quantitatives sont réalisées à l'aide d'un mélange réactionnel contenant : du LightCycler[®] 480 SYBR Green I Master (Roche), de l'ADNc précédemment préparé et des amorces spécifiques aux gènes d'intérêts étudiés. Les plaques de RT-PCR quantitatives sont ensuite lues avec le thermocyclerLightCycler[®] 480 (Roche).

La quantité d'ADNc spécifique à un gène donné est calculée par rapport à un gène référence dit « de ménage » (ici l'hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransférase ou « HPRT », et la Ribosomal Protein L32 ou « RPL32 »).

Tableau 2 : Amorces utilisées pour les RT-PCR quantitatives rénales.

Gènes	Séquences d'amorces sens (5'-3')	Séquences d'amorces antisens (3'-5')
CD68	TCCAAGCCCAAATTCAAATC	ATTGTATTCCACCGCCATGT
CD146	TCCAGTCATCACAGATTGTCG	AAACAGGGACAGTGACCTCCT
Coll3	TCCCCTGGAATCTGTGAATC	TGAGTCGAATTGGGGAGAAT
Cx43	GTGCCGGCTTCACTTTCA	GGAGTAGGCTTGGACCTTGTC
Gal-3	CAGTGCTCCTGGAGGCTATC	ATTGAAGCGGGGTTAAAGT
HPRT	GGAGCGGTAGCACCTCCT	CTGGTTCATCATCGCTAATCA
IL6	GCTACCAAACCTGGATATAATCAGGA	CCAGGTAGCTATGGTACTCCAGAA
IL10	ACTGCACCCACTTCCCAGT	TGTCCAGCTGGTCCTTTGTT
KIM1	TCAGATTCAAGTCTTCATTTACAGG	CCCCCTTTACTTCCACATAAGAA
MCP1	GGCTGGAGAGCTACAAGAGG	CTCTTGAGCTTGGTGACAAAAA
NGAL	CCATCTATGAGCTACAAGAGAACAAT	TCTGATCCAGTAGCGACAGC
RPL32	GCTGCCATCTGTTTTACGG	TGACTGGTGCCTGATGAACT
E-Selectin	CAAATCCCAGTCTGCAAAGC	ACATTTTCATGTTGCCCTGCT
P-Selectin	TCTGGCAGTGTGGACTGG	CAAGGAAGCTTGGGGACAT
TGFb	TGGAGCAACATGTGGAATC	GTCAGCAGCCGGTTACCA
TNFa	TCTTCTCATTCTGCTTGTGG	ATGAGAGGGAGGCCATTTG
VCAM1	TGGTGAAATGGAATCTGAACC	CCCAGATGGTGGTTTCCTT

VI- Analyse de l'expression protéique

a. Extraction protéique

Les protéines sont extraites à partir d'un des 3 morceaux de rein gardés à -80°C. Le morceau est broyé de façon mécanique dans un tampon de lyse contenant : du tampon RIPA (SantaCruz), l'inhibiteur de protéase PMSF, un cocktail d'inhibiteur de protéase PIC et de l'orthovondanate. Après incubation au froid le broyat est centrifugé (15min à 12500rpm à 4°C) et le surnageant est récupéré. S'en suit un dosage de protéines par la méthode de Bradford : les surnageants sont dilués et mélangés à la solution « Proteinassaydyereagentconcentrate » (Biorad) préalablement dilué au 1/5^e. Le dosage est ensuite effectué sur le spectrophotomètre pour microplaques Xenius XM (Safas) à la longueur d'onde de 595nm.

b. Western Blot

Les échantillons sont ensuite préparés selon le mélange suivant : 15µg de protéines, du dithiothréitol (DTT), du bleu de charge et de l'eau distillée. Les échantillons sont ensuite dénaturés 10min à 70°C. S'en suit la séparation des différentes protéines en fonction de leur poids moléculaire par migration dans un gel de polyacrylamide NuPAGE™ 4-12% Bis-Tris (Invitrogen) avec le tampon NuPAGE MES SDS Running Buffer (Invitrogen), puis transférés sur une membrane de nitrocellulose de 0,2µm (Biorad) avec du tampon de transfert (Laemmli 1X – 10% méthanol). Après vérification du bon déroulement du western blot par coloration de la membrane au Rouge Ponceau (Ponceau S – 5% acide acétique) les sites non spécifiques de la membrane sont bloqués pendant 1h dans du TBS 1X – 0,1% Tween 20 - 5% lait (Tris Buffered Saline Buffer 10X (Euromedex) – Polyoxyéthylènesorbitanmonolaurate(Euromedex) – lait en poudre écrémé (Régilait)).

La membrane est ensuite incubée avec l'anticorps primaire toute la nuit à 4°C. S'en suit 3 lavages de 10min dans du TBS 1X – 0,1% Tween 20 puis 1h30 d'incubation à température ambiante avec l'anticorps secondaire couplé à la peroxydase de raifort (HRP). Après 3 lavages la membrane est incubée 5min avec le substrat à la chimioluminescence améliorée à base de luminol (ECL) de l'HRP (SuperSignal™ West Dura Extended Duration Substrate – ThermoScientific). Puis la révélation de la membrane est réalisée à l'aide de l'imageur PXi (Syngene) et la mesure de chimioluminescence est faite grâce au logiciel Quantity One (Biorad). Lors de l'analyse les différentes protéines d'intérêts sont rapportées à la protéine de référence qu'est la Glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase (GAPDH).

Tableau 3 : Anticorps utilisés pour les Western Blot.

Protéines	Anticorps primaire	Anticorps secondaire
CD146	Epitomics #2505-1, Lapin, 1/1000	GE Healthcare, Amersham ECL anti-Rabbit IgG, HRP-linked whole Ab (from donkey) #NA934V, 1/5000
Cx43	Abcam #11370, Lapin, 1/2000	
Gal-3	Abcam #ab53082, Lapin, 1/1000	
GAPDH	Sigma #G9545, Lapin, 1/100000	

VII- Histologie

1. Projet Notch3

Les différents immunomarquages et coloration sont effectués sur des coupes transversales de cœur inclus dans de l'OCT. Des coupes de 7µm d'épaisseur sont réalisées à l'aide d'un cryostat. Les blocs de cœur et les coupes peuvent être stockés à -80°C en attendant d'être utilisés.

a. Marquages par immunofluorescence

Différentes co-immunofluorescences ont été réalisées, selon le même protocole mais avec des anticorps dirigés contre des protéines d'intérêts différentes. Tout le protocole se fait à température ambiante, et les incubations se font dans une chambre humide.

Tout d'abord les coupes sont séchées 30min, puis les sites non spécifiques sont saturés 30min avec du sérum de chèvre (Goat serum (Sigma) dilué au 1/100^e dans du PBS 1X). Ensuite les coupes sont incubées avec les deux anticorps primaires (dilués dans de la BSA 0,2%) pendant 1h30. Après 3 lavages de 5min au PBS 1X, les coupes sont incubées avec les deux anticorps secondaires (dilués dans de la BSA 0,2%) couplés à un fluorochrome pendant 30min, à l'abri de la lumière. Après 3 derniers lavages les lames sont montées avec des lamelles et un milieu de montage spécial évitant la disparition de la fluorescence avec le temps, et contenant du DAPI pour marquer les noyaux (VECTASHIELD® AntifadeMounting Medium with DAPI - VectorLaboratories). Enfin les lames sont luttées avec du correcteur liquide (Tipp-Ex) puis gardées à l'abri de la lumière, à 4°C.

Les coupes sont analysées avec un microscope à fluorescence (Leica) et les images sont ensuite analysées à l'aide du logiciel ImageJ. La densité capillaire est définie par le rapport du nombre de capillaires (immunomarquage de la Caveoline-1) sur le nombre de cardiomyocytes (immunomarquage de la Vinculine) à partir d'images prise au grossissement x200. La densité artériolaire est quantifiée en comptant le nombre d'artérioles visibles (marquées avec la SMA α) sur une dizaine de champs pris à un grossissement x100.

Tableau 4 : Anticorps utilisés pour les immunofluorescences cardiaques.

Protéines	Anticorps primaire	Anticorps secondaire
Caveoline-1	Sigma #C3237, Lapin, 1/200	Invitrogen #A27034, anti-lapin IgG (H+L) Alexa Fluor 488, chèvre, 1/250
SMA α	Sigma #A2547, souris, 1/300	Invitrogen #A21131, anti-souris IgG2a Alexa Fluor 488, chèvre, 1/250
Vinculine	Sigma #9131, souris, 1/250	Invitrogen #A21125, anti-souris IgG1Alexa Fluor 594, chèvre, 1/250

b. Etude de la fibrose par coloration au Rouge Sirius

L'analyse de la fibrose cardiaque est réalisée grâce à une coloration au Rouge Sirius, qui permet de quantifier le collagène. Tout le protocole se déroule à température ambiante.

Tout d'abord les coupes sont séchées 20min, puis elles sont réhydratées : les coupes sont incubées 2min dans de l'éthanol absolu, puis 2min dans de l'éthanol 50% et enfin passées rapidement dans 3 bains d'eau distillée. A l'issue de cela les coupes sont incubées pendant 1h dans un bain de Rouge Sirius préalablement filtré. Les lames sont ensuite lavées par des passages dans 2 bains d'acide acétique 0,5%. Enfin les coupes sont déshydratées par des bains successifs : 2 bains de 2min dans l'éthanol 95%, 1 bain de 2min dans l'éthanol absolu et 2 bains de 2min dans du xylène. Pour finir les lames sont montées avec des lamelles et de la résine de montage EUKITT®. Les lames sont conservées à température ambiante, à l'abri de la lumière.

Les coupes sont analysées à l'aide d'un microscope sous lumière polarisée, en aveugle par deux personnes. Le pourcentage de fibres de collagène est estimé et permet l'obtention d'un score entre 0 et 4. Plusieurs champs sont scorés puis moyennés par souris. Plus le score est élevé plus la fibrose est importante.

c. Etude du stress oxydatif par marquage au DHE

L'analyse du stress oxydatif cardiaque est réalisée grâce à un marquage au DHE (Dihydroethidium), qui permet de quantifier la production de ROS. Tout le protocole se fait à température ambiante, et les incubations se font dans une chambre humide.

Tout d'abord les coupes sont séchées 30min, puis elles sont incubées 30min avec une solution de PBS 1X – DHE 37µM (Sigma-Aldrich #D7008) pendant 30min, à l'abri de la lumière. Après 3 lavages de 3min au PBS 1X, les lames sont montées avec des lamelles et un milieu de montage spécial évitant la disparition de la fluorescence avec le temps, et contenant du DAPI pour marquer les noyaux (VECTASHIELD® AntifadeMounting Medium with DAPI - VectorLaboratories). Enfin les photos sont prises directement après le montage, puis les lames sont gardées à l'abri de la lumière, à 4°C.

Les coupes sont analysées avec un microscope à fluorescence (Leica) et les images sont ensuite analysées à l'aide du logiciel IPLab V3.7.

2. Projet Cx43

Les différents immunomarquages et coloration sont effectués sur des coupes longitudinales de rein inclus en paraffine. Des coupes de 4µm d'épaisseur sont réalisées à l'aide d'un microtome. Pour la coloration des lames porte-objet (RS France) et de l'albumine 2% sont utilisés. Pour les immunomarquages des lames porte-objet superfrost plus (ThermoScientific) et de l'eau distillée sont

utilisées. Les blocs de paraffine et les coupes peuvent être stockés à température ambiante en attendant d'être utilisés.

a. Evaluation des dommages morphologiques par coloration PAS

L'analyse des dommages morphologiques est réalisée grâce à une coloration PAS (Periodic Acid Schiff).

Après déparaffinage (3 bains de 3min dans le xylène), fixation (3 bains de 3min dans de l'éthanol absolu) et lavage (1 bain de 5min dans de l'eau courante) les lames sont incubées 15min dans un bain d'acide périodique 1% (Sigma). Après les lames sont lavées, puis le portoir est séché avec du papier et plongé dans un bain de réactif de Schiff (Schiff reagent acc. Hotchkiss– McManus, DiaPath) pendant 30min. Après un lavage de 10min les lames sont incubées 5min dans un bain d'hématoxyline de Groat (Ironhematoxylin acc. Weigert, DiaPath). Les lames sont ensuite lavées puis plongée plusieurs fois à la suite dans un bain saturé en carbonate de lithium (Carlo Erba). Enfin les lames sont lavées, plongées dans l'éthanol absolu (3 bains de 3min), puis le xylène (2 bains de 3min) et enfin montées avec une lamelle et du milieu de montage Pertex (HistoLab). Les lames peuvent être gardées à température ambiante.

Les lames sont analysées en aveugle par deux personnes. Le cortex et la medulla sont observés et trois critères sont analysés : la nécrose épithéliale, la présence de débris nécrotiques dans la lumière tubulaire (cylindres) et la dilatation tubulaire. Le pourcentage de tubules présentant ces critères est estimé et permet l'obtention d'un score allant de 0 à 5. Plus il est élevé plus les dommages morphologiques sont importants.

b. Marquages par immunohistochimie

Après déparaffinage (3 bains de 3min dans le xylène), fixation (3 bains de 3min dans de l'éthanol absolu) et lavage (1 bain de 5min dans de l'eau courante) les sites antigéniques sont libérés par une étape de démasquage dans un bain de tampon citrate pH 6 (Target retrieval solution 10X, Dako) 30min à 98°C. Après avoir laissé le tampon refroidir (20min dans la glace) les lames sont lavées dans 3 bains de 5min dans du PBS 1X (Phosphate Buffer Solution 10X, Euromedex). Les peroxydases endogènes sont ensuite bloquées avec une incubation de 10min avec du Peroxidase-blocking solution (Dako). Après 3 bains de lavage de 5min au PBS 1X les coupes subissent une étape de perméabilisation et saturation des sites non spécifiques grâce à l'incubation d'un mélange PBS 1X – Triton 0,2% - BSA 5% à température ambiante pendant 45min. Les lames sont ensuite incubées avec

l'anticorps primaire à 4°C pendant la nuit. Après lavage les lames sont incubées avec l'anticorps secondaire couplé à une peroxydase 30min à température ambiante. Les lames sont lavées puis incubées avec le substrat AEC(AEC+highsensitivitysubstratechromogenready-to-use, Dako) à température ambiante, le temps nécessaire à l'apparition d'un marquage (3 à 10min). Les lames sont ensuite lavées à l'eau puis montées avec une lamelle et un milieu de montage aqueux. Elles sont conservées à 4°C. Les images sont ensuite analysées à l'aide du logiciel ImageJ Fiji afin de déterminer le pourcentage de coupe marqué.

Tableau 5 : Anticorps utilisés pour les immunohistochimies rénales.

Cibles	Anticorps primaire	Anticorps secondaire
Macrophages	Anti-F4/80, Biorad #MCA497R, Rat, 1/200	Nichirei Biosciences-Histofine® Simple Stain™ Mouse MAX PO
Polynucléaires neutrophiles	Anti-GR1, BD Pharmigen #550291, Rat, 1/100	(Rat) #414311F, 1 goutte

VIII-Numération Formule Sanguine par cytométrie en flux

La Numération Formule Sanguine a été réalisée à l'aide de l'analyseur d'hématologie ProCytDx, au sein de l'unité INSERM UMR-S 1163, à l'Institut IMAGINE de Paris. 80µL de sang prélevé sur tube EDTA le jour même et gardé dans la glace est homogénéisé par pipetage puis le tube est placé dans l'automate pour analyse. Cet automate utilise la cytométrie en flux par laser afin de trier les différentes populations sanguines.

IX- Analyses statistiques

Les résultats sont exprimés en moyenne +/- erreur standard de la moyenne (SEM). Les comparaisons statistiques ont été effectuées avec le logiciel GraphPadPrism (version 7.00 for Windows, GraphPad Software, La Jolla California USA, www.graphpad.com). Les différents groupes de souris ont été comparés par un ANOVA deux facteurs suivie par une correction de Bonferroni. Les variables ne permettant pas ce type d'analyse ont été analysés par un test de Mann-Whitney. Les résultats non significatifs ne sont pas montrés, seuls les résultats significatifs sont indiqués sur les figures.

Résultats

Chapitre 1 : La suractivation de la voie de signalisation Notch3 dans les CMLV prévient le développement de la fibrose cardiaque en réponse à l'HTA

INTRODUCTION

L'hypertension artérielle (HTA) figure parmi les principaux facteurs de risques de morbidité et de mortalité cardiovasculaire. L'HTA est un facteur de risque du développement de l'insuffisance cardiaque. L'HTA entraîne un remodelage artériel y compris au niveau cardiaque, c'est-à-dire au niveau du réseau coronaire. Parmi les acteurs du remodelage artériel les cellules musculaires lisses vasculaires (CMLV) jouent un rôle clé, notamment dans la régulation des résistances vasculaires. Comme décrit dans la revue introductive, Notch3 a un rôle prépondérant dans la prolifération et la maturation des CMLV, et ainsi dans la physiologie des petites artères de résistance^{120,121}. Les souris invalidées pour Notch3 soumises à une HTA induite par l'angiotensine II (AngII) présentent une altération du remodelage vasculaire, visible par un défaut d'adaptation des média coronaires. En résulte une maladaptation du cœur conduisant à une insuffisance cardiaque sévère et une mortalité accrue. Afin d'analyser plus précisément le rôle de Notch3 dans le remodelage vasculaire et cardiaque induits par l'HTA, nous avons étudié les effets d'une suractivation de la voie Notch3. Pour cela, des souris mâles transgéniques âgées de 2 mois possédant une surexpression du N3ICD dans les CMLV (TgN3ICDSM) sont soumises pendant 24 jours à une infusion d'AngII via l'implantation d'une mini-pompe osmotique associée à une alimentation riche en sel.

RESULTATS

A l'état basal les souris TgN3ICDSM présentent une pression artérielle systolique normale similaire aux souris contrôles (Fig16A). L'infusion d'AngII, associée à un régime salé, induit chez les souris une hypertension artérielle (Fig16A). Cette augmentation de pression artérielle s'accompagne d'une diminution de la fraction de raccourcissement chez les souris contrôles et donc une dysfonction cardiaque avérée chez les souris contrôles uniquement (Fig16B). L'expression génique de l'ANP confirme cette donnée : seules les souris contrôles présentent une augmentation des ARNm en réponse à l'infusion d'AngII (Fig16C). La dysfonction cardiaque semble donc absente chez les souris TgN3ICDSM après infusion d'AngII. De plus, les souris TgN3ICDSM présentent un développement moindre de l'hypertrophie cardiaque induite par l'AngII par rapport aux souris contrôles (Fig16D). Il est à noter que l'infusion d'AngII n'entraîne pas de modifications morphologiques rénales (Fig16E). Ainsi les souris TgN3ICDSM semblent protégées contre la dysfonction et l'hypertrophie cardiaques induites par l'hypertension artérielle due à l'infusion d'AngII associée à un régime salé.

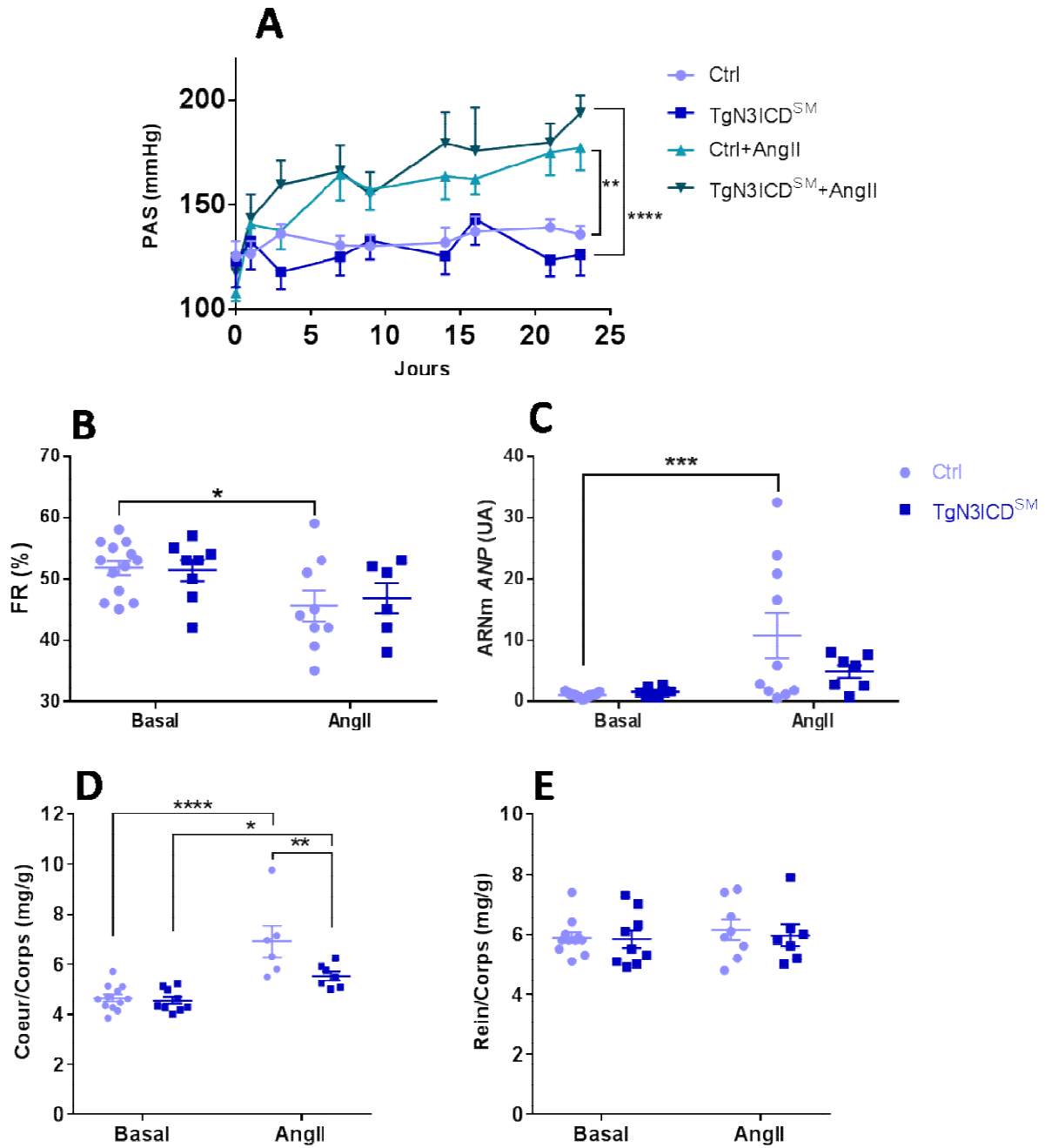


Figure 16 : La surexpression de N3ICD dans les CMLV protège contre l'hypertrophie cardiaque induite par l'hypertension artérielle. Pression artérielle systolique (A), fraction de raccourcissement (B), PCR quantitative des transcrits cardiaques de l'ANP (C), ratio poids du cœur/poids du corps (D) and ratio poids du rein/poids du corps (E) des souris contrôles et TgN3ICDSM, avec ou sans infusion d'AngII. Valeurs moyennes +/-SEM ; *p<0.05, **p<0.005, ***p<0.0005, ****p<0.0001, avec ANOVA 2 facteurs.

Pour tenter de mieux comprendre pourquoi les souris TgN3ICDSM sont protégées au niveau cardiaque des conséquences d'une HTA induite par l'AngII, nous avons analysé les effets aigus de l'AngII sur la réactivité vasculaire rénale. Nous montrons que suite à l'administration de bolus d'agents vasoconstricteurs (noradrénaline et l'AngII), ou d'agent vasodilatateur (acétylcholine), les variations de pression artérielle moyenne des souris TgN3ICDSM et contrôles sont similaires (Fig17A-C). Concernant le débit sanguin rénal (DSR), les souris TgN3ICDSM ont un débit similaire aux contrôles à l'état de base (Fig17D-F). En revanche, suite à l'administration d'agents vasoconstricteurs tel que l'AngII les souris TgN3ICDSM ont une variation de DSR plus importante que les Ctrl (Fig17D-E), donc une plus forte vasoconstriction de l'artère rénale. Cette forte vasoconstriction est plus marquée en réponse à l'AngII car le DSR est diminué dès le bolus de 0,5ng. Il est intéressant de noter qu'à une dose de 2ng d'AngII l'artère rénale est collabée chez 5 souris TgN3ICDSM sur 7 alors que ce phénomène n'est observé que chez 2/8^e des souris Ctrl. Ainsi les artères des souris TgN3ICDSM sont plus sensibles à l'AngII que celles des contrôles. Il semble donc que pour une même réponse systémique, i.e. une même variation de pression artérielle, la vasoconstriction rénale est plus importante chez les souris TgN3ICDSM.

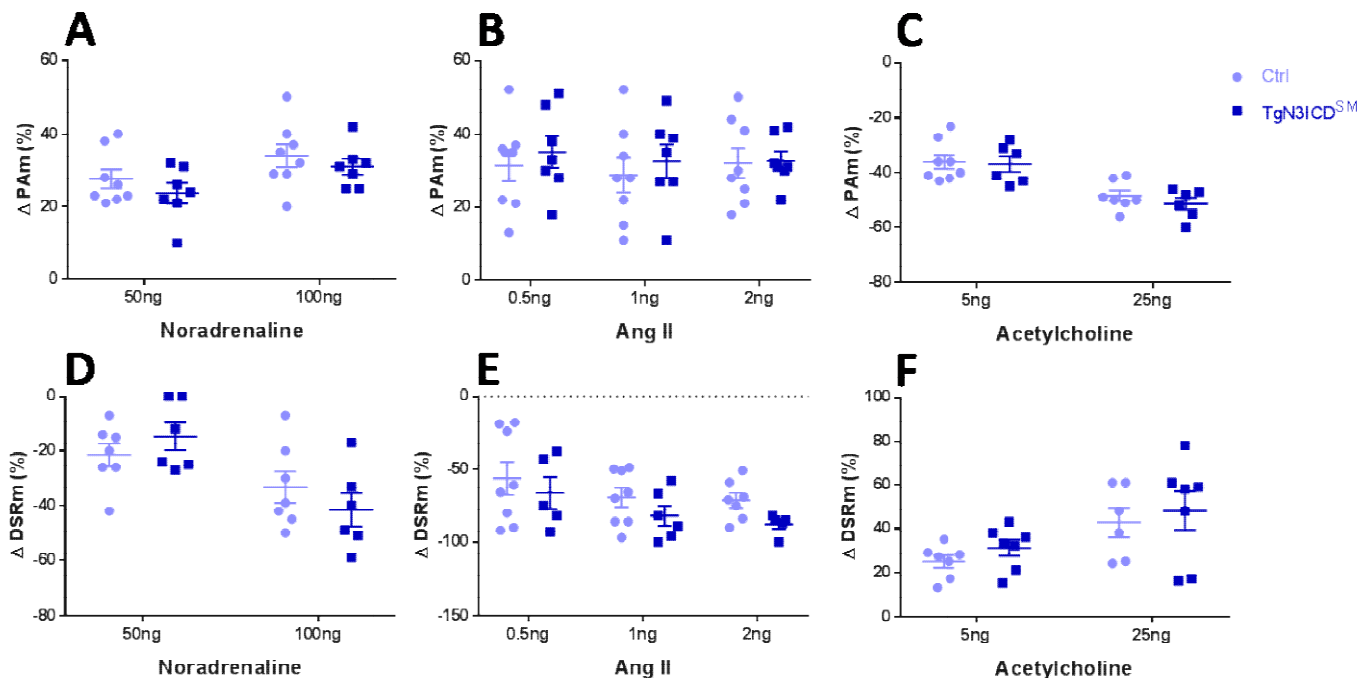


Figure 17: Etude de la vasoréactivité rénale des souris TgN3ICDSM. (A-C) Delta de la pression artérielle moyenne après administration de noradrénaline (A), d'angiotensine II (B) et d'acétylcholine (C); (D-F) Delta du débit sanguin rénal après administration de noradrénaline (D), d'angiotensine II (E) et d'acétylcholine (F) aux souris contrôles et TgN3ICDSM. Valeurs moyennes +/-SEM.

Cette sensibilité accrue à l'AngII des souris TgN3ICDSM peut expliquer la diminution d'expression génique d'ACE (enzyme de conversion à l'angiotensine) à l'état basal (Fig18B). Les souris étant plus sensibles à l'AngII, elles ont moins besoin d'en produire. Est associé à cela une expression plus faible d'ACTA2 et de SERCA, à l'état basal chez les souris TgN3ICDSM (Fig18A,C). En réponse à l'infusion d'AngII les expressions géniques d'ACTA2 et ACE ne sont pas modifiées chez les souris contrôles mais elles augmentent chez les souris TgN3ICDSM (Fig18A-B). L'AngII semble entraîner un rétro-contrôle positif de l'expression d'ACE chez les TgN3ICDSM. De plus, l'augmentation d'ACTA2 donc d' α -actine du muscle lisse, aide possiblement à augmenter les résistances vasculaires. Enfin, suite à l'administration chronique d'AngII une diminution de l'expression de SERCA est induite chez les souris contrôles, traduisant une insuffisance cardiaque (Fig18C). En effet, une diminution de l'expression de SERCA entraîne une diminution de la réabsorption du calcium cytosolique par le réticulum sarcoplasmique, entraînant une diminution de la réponse force-fréquence. En revanche, l'AngII ne modifie pas l'expression de SERCA chez les TgN3ICDSM. La modulation de l'expression de SERCA semble donc être l'un des acteurs de la protection des souris TgN3ICDSM contre la dysfonction cardiaque.

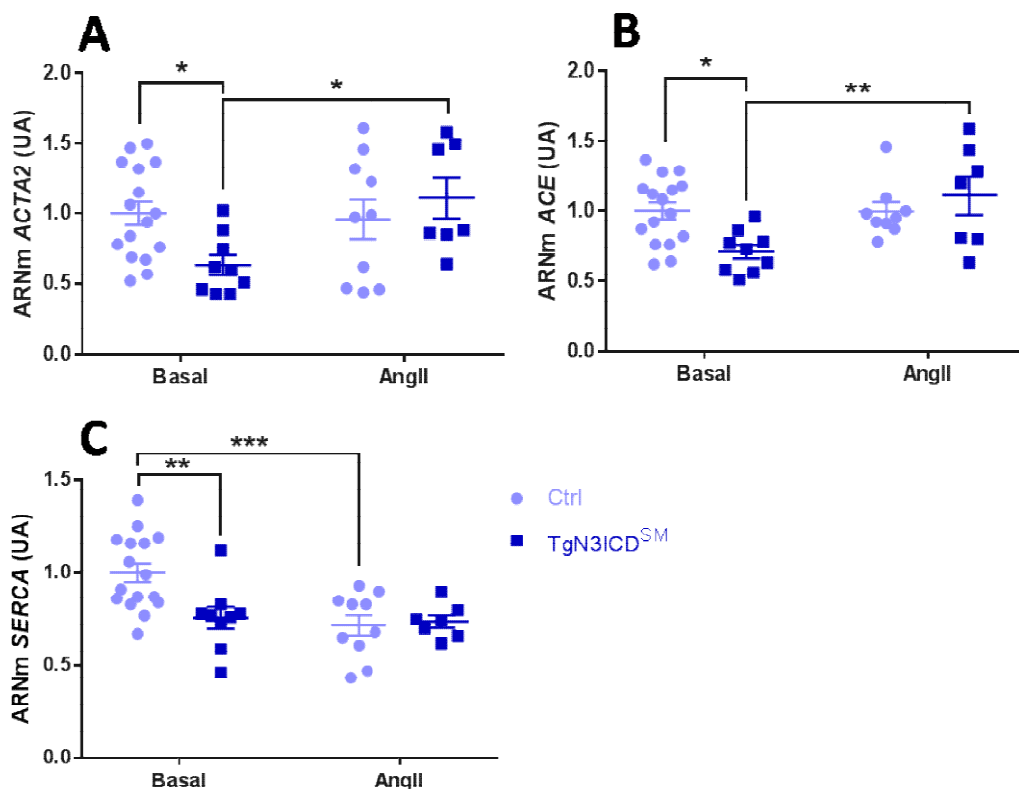


Figure 18 : Les souris TgN3ICDSM ont une dysfonction cardiaque similaire aux contrôles. PCR quantitatives des transcrits cardiaques de ACTA2 (A), ACE (B) et SERCA (C) des souris contrôles et TgN3ICDSM, avec ou sans infusion d'AngII. Valeurs moyennes +/-SEM ; *p<0.05, **p<0.005, ***p<0.0005, ****p<0.0001, avec ANOVA 2 facteurs.

Un élément du remodelage cardiaque induit par l'hypertension artérielle est la formation de fibrose cardiaque, résultant *in fine* à une dysfonction cardiaque. Différents marqueurs de fibrose cardiaque ont donc été recherchés. Les souris contrôles présentent une augmentation de l'expression des ARNm codant pour Coll1, Coll3 et Gal-3 suite à l'administration chronique d'AngII (Fig19A-C), traduisant le développement d'une fibrose cardiaque. Cela sans modification de l'expression de la fibronectine (Fig19E), possiblement car l'analyse est faite à un temps tardif de 28 jours. Fait très intéressant le myocarde de TgN3ICDSM ne présente aucun changement de l'expression de Coll1, Coll3 et Gal3 (Fig19A-C). Au stade tardif où ces animaux ont été analysés, aucun marqueur d'inflammation n'est détectable au niveau transcriptionnel, en accord avec cela MCP1 et CD68 sont donc inchangées suite à l'AngII (Fig19D,F). Les souris TgN3ICDSM semble donc protégées contre la fibrose cardiaque induite par l'infusion d'AngII.

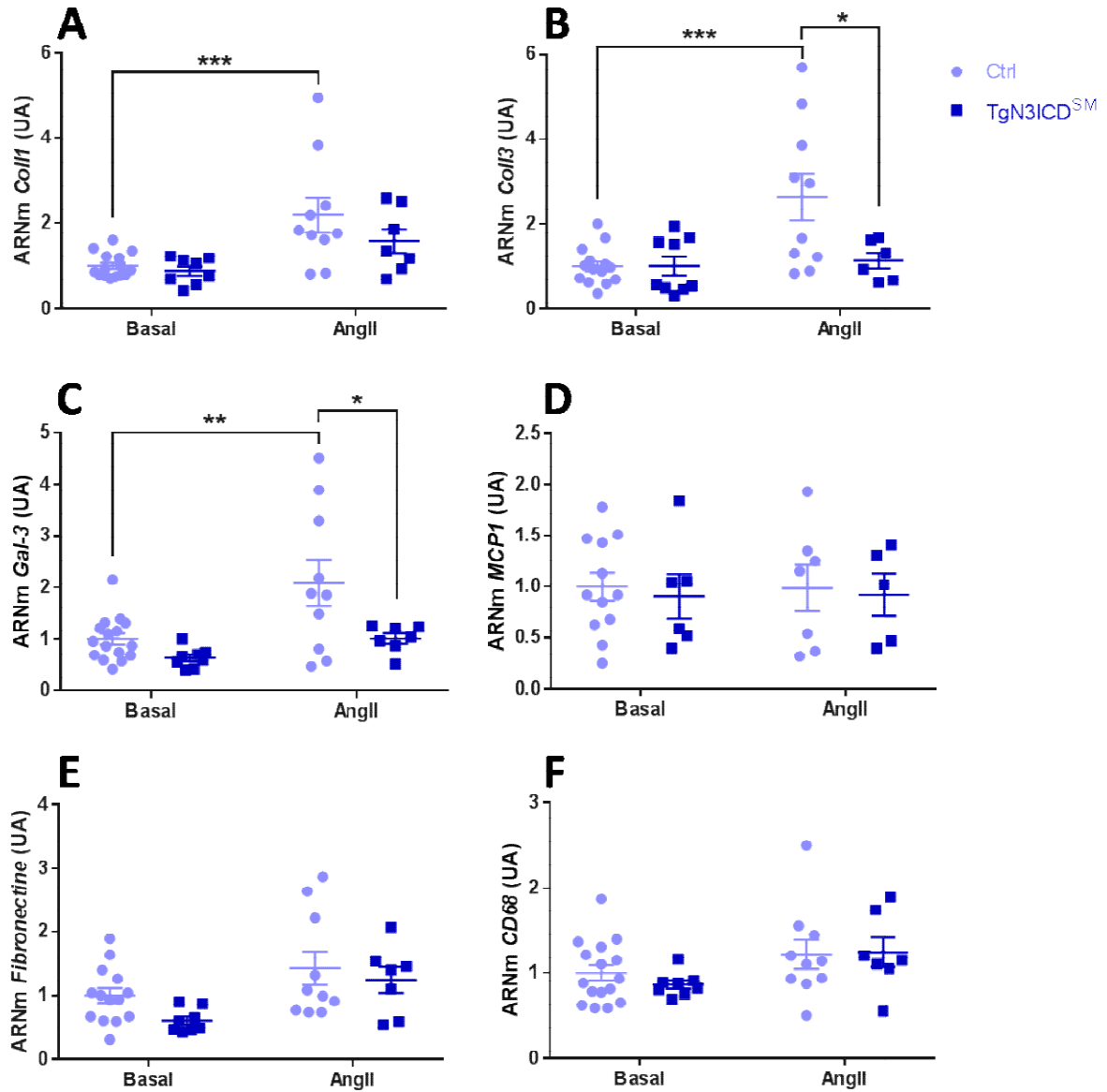


Figure 19 : Les souris TgN3ICDSM ont des marqueurs de fibrose cardiaque diminués en réponse à l'hypertension, par rapport aux contrôles. PCR quantitatives des transcrits cardiaques de Coll1 (A), Coll3 (B), Gal3 (C), MCP1 (D), Fibronectine (E) and CD68 (F) des souris contrôles et TgN3ICDSM, avec ou sans infusion d'AngII. Valeurs moyennes +/-SEM ; *p<0.05, **p<0.005, ***p<0.0005, ****p<0.0001, avec ANOVA 2 facteurs.

Enfin, les souris TgN3ICDSM possédant une surexpression de la partie intracellulaire de Notch3, la voie de signalisation Notch3 a été explorée pour rechercher de possibles modifications (Fig20). A l'état basal, les souris TgN3ICDSM présentent une faible expression de Hey1 et un niveau plus élevé d'expression de Hes1. La voie de signalisation Notch3 tend donc à être réprimée chez les TgN3ICDSM. Cela peut être due à un rétro contrôle négatif. Suite à l'administration d'AngII, il est observé une diminution de l'expression génique de Hey1 et HeyL chez les souris contrôles uniquement. Mais on ne sait pas si l'absence de régulation négative de la voie Hey1-HeyL chez les souris TgN3ICDSM les protège de l'hypertrophie et de la fibrose cardiaques induites par l'hypertension artérielle.

	Ctrl	TgN3ICD SM	Ctrl+AngII	TgN3ICD SM +AngII
HES1	1.00 ±0.13	2.36 ±0.85	2.99 ±0.88	2.33 ±0.73
Hey1	1.00 ±0.12	0.64 ±0.12 *	0.57 ±0.06 *	0.86 ±0.08
HeyL	1.00 ±0.07	0.78 ±0.15	0.66 ±0.05 *	0.87 ±0.14
Dll4	1.00 ±0.05	0.94 ±0.09	1.03 ±0.09	0.96 ±0.08
Jagged1	1.00 ±0.09	1.11 ±0.12	1.26 ±0.08	1.05 ±0.18
Jagged2	1.00 ±0.05	0.82 ±0.08	0.87 ±0.06	0.89 ±0.07

Figure 20 : La surexpression de N3ICD empêche la régulation négative de la voie de signalisation Notch3 suite à l'infusion d'AngII. PCR quantitatives des transcrits cardiaques de HES1, Hey1, HeyL, Dll4, Jagged1 and Jagged2 des souris contrôles et TgN3ICDSM, avec ou sans infusion d'AngII. Valeurs moyennes +/-SEM ; *p<0.05 vs Ctrl, avec ANOVA 2 facteurs.

CONCLUSION

L'ensemble des résultats montrent que malgré le développement d'une HTA des souris TgN3ICDSM similaire à celle des souris contrôles, les souris TgN3ICDSM présentent une moindre hypertrophie cardiaque et semblent maintenir une fonction cardiaque normale. De plus, en dépit d'une HTA, les souris TgN3ICDSM ne développent pas de fibrose cardiaque. Le fait que les souris TgN3ICDSM présentent une vasoréactivité accrue à l'AngII, une expression réduite de l'enzyme de conversion de l'Angiotensine à l'état basal chez les souris TgN3ICDSM indiquent une sensibilité accrue à l'AngII. Les mécanismes mis en jeu pour prévenir les lésions demeurent encore à établir.

En conclusion, ces résultats démontrant que l'activation soutenue de la voie Notch3 prévient des signes de maladaptation cardiaque, confirment et étendent les résultats d'H Ragot, qui démontraient l'aggravation du risque cardiaque en absence de Notch3. Il apparaît ainsi que la voie Notch3 est déterminante pour l'adaptation du cœur à une surcharge de pression.

Chapitre 2 : Effets de l'inactivation de Notch3 sur le remodelage cardiovasculaire induit par une surcharge de débit

INTRODUCTION

Notch3 est un le récepteur membranaire connu pour son un rôle majeur dans la prolifération et la maturation des CMLV, et ainsi dans la physiologie des petites artères de résistance^{120,121}. Comme décrit précédemment l'absence de Notch3 résulte en une mauvaise adaptation du coeur à une surcharge de pression²⁹⁹ et la surexpression du domaine intracellulaire prévient le développement de la fibrose cardiaque. Maintenant que le rôle de Notch3 dans l'adaptation du cœur à une surcharge de pression est clairement établi, nous avons recherché si Notch3 participait au développement de l'hypertrophie cardiaque physiologique. Pour cela nous avons soumis des souris mâles Notch3 KO âgées de 2 mois à un entraînement physique modéré de course sur tapis, 3 fois par semaine, pendant 5 semaines. L'hypothèse étant que les défauts vasculaires des souris Notch3 KO vont empêcher l'adaptation cardiaque à cette surcharge de débit. Cependant, l'entraînement physique (EP) mets en jeu des voies de signalisation connues comme permettant l'adaptation harmonieuse du cœur, permettant par exemple une augmentation de l'angiogénèse afin d'assurer un apport en oxygène suffisant aux organes dont la demande est accrue. Ainsi, l'EP a été montré comme bénéfique lors de cardiomyopathies, notamment en participant à une meilleure survie des patients.

RESULTATS

L'EP est bien toléré par les souris Notch3 KO car elles parcourent une distance cumulée (Fig21A) et subissent un nombre de chocs (Fig21B) semblables aux souris WT. L'entraînement ne modifie la fonction cardiaque (Fig21C). Cependant les souris Notch3KO, après EP, présentent une hypertrophie cardiaque moindre comme l'indique la baisse de significativité entre souris Notch3 KO et souris WT, que cela soit au niveau du rapport poids du cœur/poids du corps (Fig21D) ou l'épaisseur de la paroi du ventricule gauche (Fig21E-F). Fait intéressant, l'EP induit une diminution de l'expression du gène du récepteur de la prolactine chez les souris Notch3 KO (Fig21G). La prolactine est une protéine pro-hypertrophique via son implication dans l'activation de la voie de signalisation STAT5. A contrario, l'EP ne modifie pas le niveau d'expression des gènes des facteurs anti-hypertrophiques BNP et ANP (Fig21H-I). L'EP semble donc bénéfique pour le phénotype cardiaque des souris Notch3 KO. En effet, il induirait une diminution de l'hypertrophie cardiaque chez les souris Notch3 KO, possiblement en diminuant la voie de signalisation pro-hypertrophique.

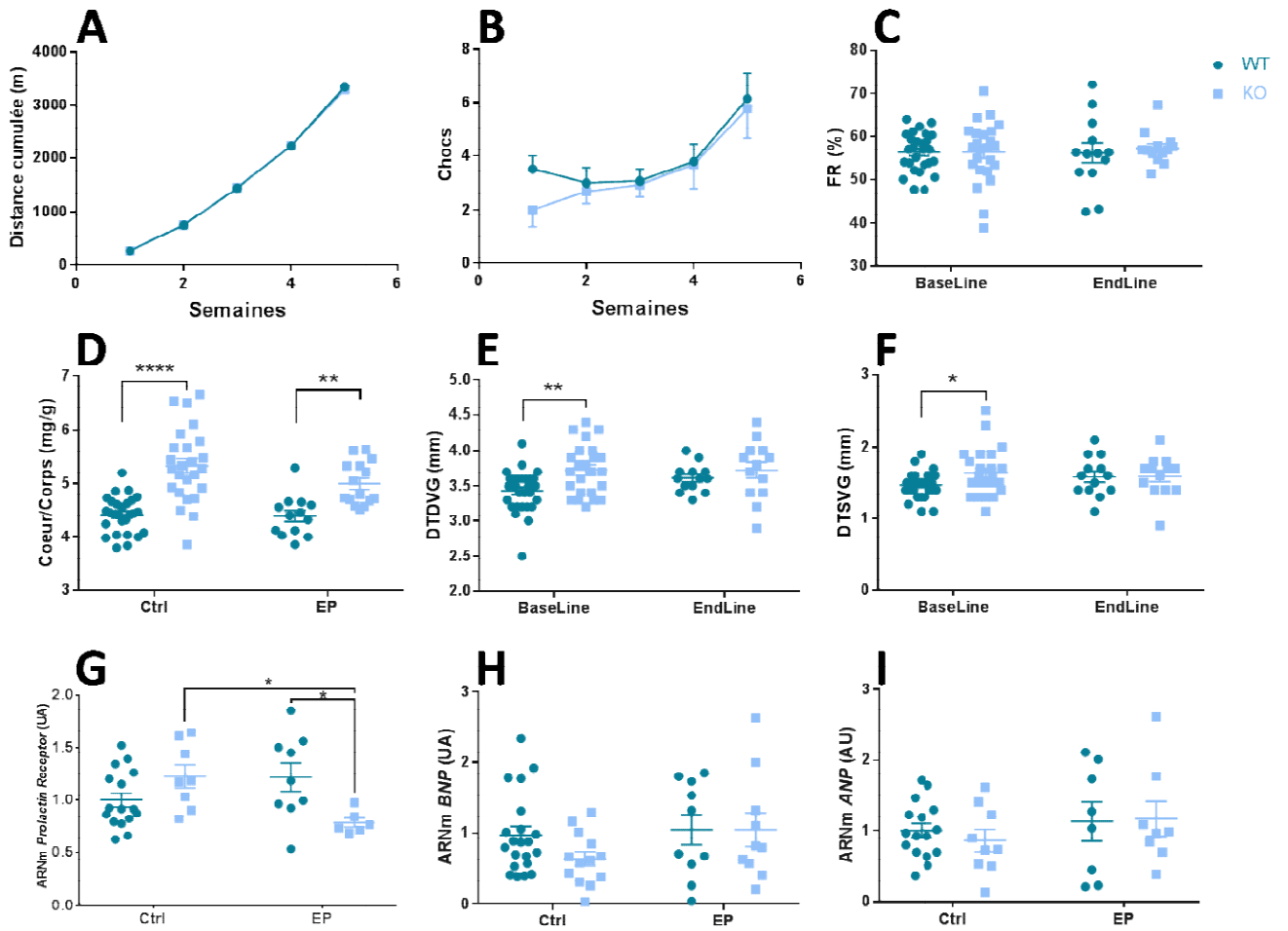


Figure 21 : L'entraînement physique semble réduire l'hypertrophie cardiaque chez les souris Notch3 KO. Distance cumulée courue (A) et chocs recus (B) des souris WT et Notch3 KO ayant suivi le protocole d'EP. Fraction de raccourcissement (C), ratio poids du cœur/poids du corps (D), Diamètres télédiastolique (E) et téléstolique du ventricule gauche (F) des souris avec ou sans entrainement physique, WT et Notch3 KO, à la semaine 0 (BaseLine) et la semaine 5 (EndLine). PCR quantitatives des transcrits cardiaques de ProlactinReceptor (G), BNP (H) et ANP (I) dans les différentes conditions. Valeurs moyennes +/-SEM ; * $p < 0.05$, ** $p < 0.005$, *** $p < 0.0005$, **** $p < 0.0001$, avec ANOVA 2 facteurs.

De part le rôle connu de Notch3 dans la physiologie des petites artères de résistance, le tonus myogénique ainsi que l'angiogenèse, nous avons étudié les effets de l'EP sur le phénotype vasculaire et la voie de signalisation angiogénique. Les souris, WT ou Notch3 KO, ne présentent pas de modification de densités capillaire et artériolaire après l'entraînement (Fig22A-B), sûrement parce que l'effort physique était insuffisant. On retrouve dans les coeurs Notch3 KO une moindre densité artériolaire, signature phénotypique du Notch3 KO, et un phénotype à tendance anti-angiogénique : l'expression des gènes VEGFR2 et VEGFa (Fig22E-F) réduits et l'expression de sFlt1 augmente (Fig22D). Il n'y a pas de modification de ces paramètres suite à l'entraînement. Il semble donc que l'EP n'affecte pas l'angiogenèse des souris Notch3 KO.

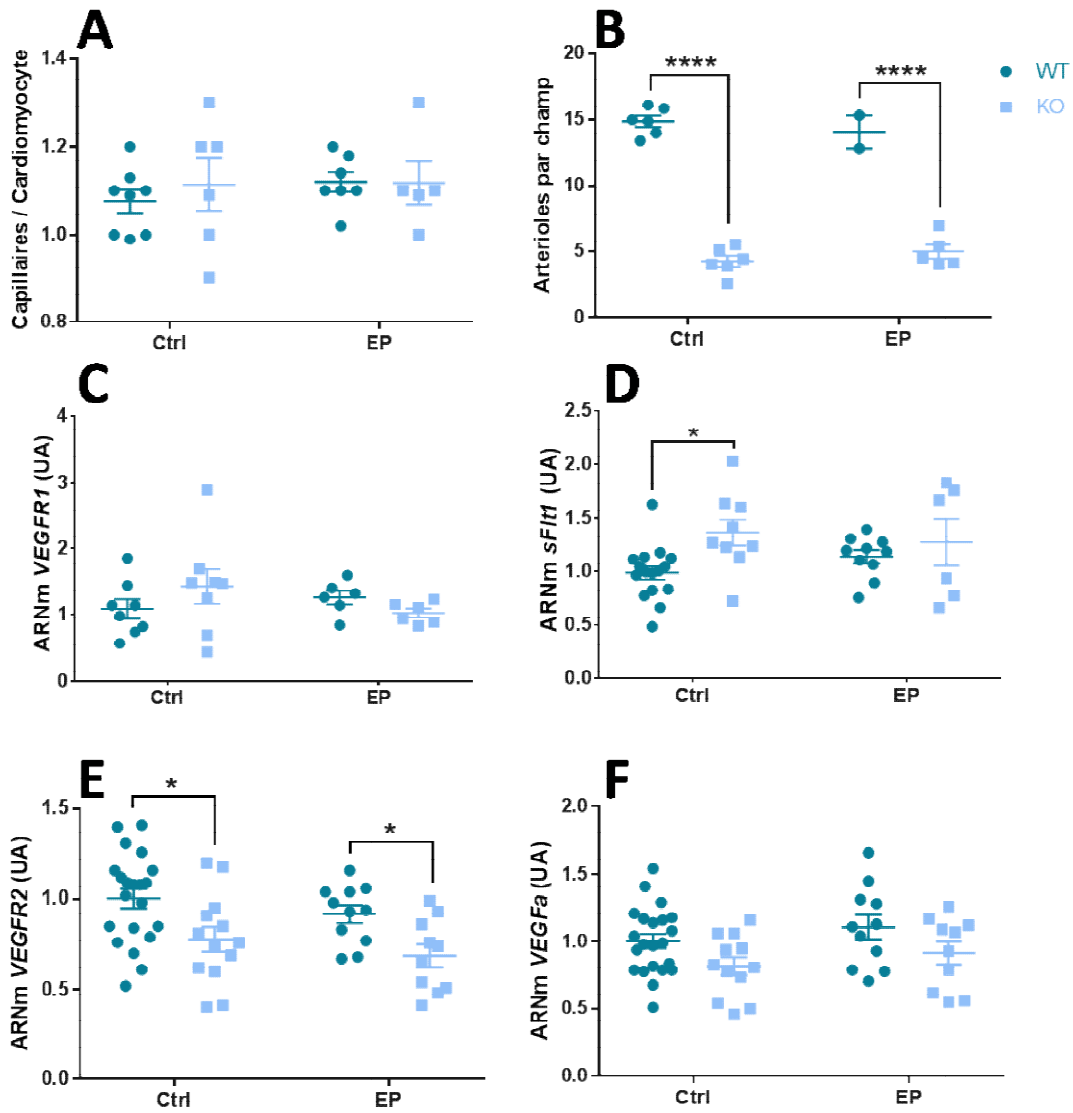


Figure 22 : L'entraînement physique ne modifie pas les effets du Notch3 KO sur la vasculature des souris. Densité capillaire (A) exprimée en nombre de capillaire par cardiomyocytes par champ chez les souris WT et Notch3 KO, en conditions contrôle ou d'exercice. Densité artériolaire cardiaque (B) ; PCR quantitatives des transcrits cardiaques de VEGFR1 (C), sFlt1 (D), VEGFR2 (E) et VEGFa (F) des souris WT et Notch3 KO, avec ou sans EP. Valeurs moyennes +/-SEM ; *p<0.05, **p<0.005, ***p<0.0005, ****p<0.0001, avec ANOVA 2 facteurs.

Nous avons ensuite mesuré le niveau de stress oxydatif dans ce modèle. Les coeurs Notch3KO ont à l'état de base des signes de stress oxydatif comme le montre le marquage DHE (Fig23A). Suite à l'EP le marquage DHE augmentant une exacerbation du stress oxydatif (Fig23A). Cela est associé à une diminution de l'expression du gène NOS3 (Fig23B) chez les souris Notch3 KO après entraînement, ainsi qu'une diminution de l'expression de la xanthine oxydase. NOS3 est impliqué de la formation de monoxyde d'azote (NO) et la xanthine oxydase est impliquée dans la production d'espèces réactives de l'azote (ERA). Leur diminution semble indiquée que l'augmentation de stress oxydatif chez les souris Notch3 KO passe par une autre voie de production des ROS. De plus PGC1a, qui est un co-facteur transcriptionnel impliqué dans l'activation du métabolisme mitochondrial, voit son expression génique inchangée suite à l'EP (Fig23D). Cela peut traduire une mal-adaptation des cellules à l'exercice entraînant un déséquilibre en faveur du stress oxydatif entraînant une dysfonction endothéliale.

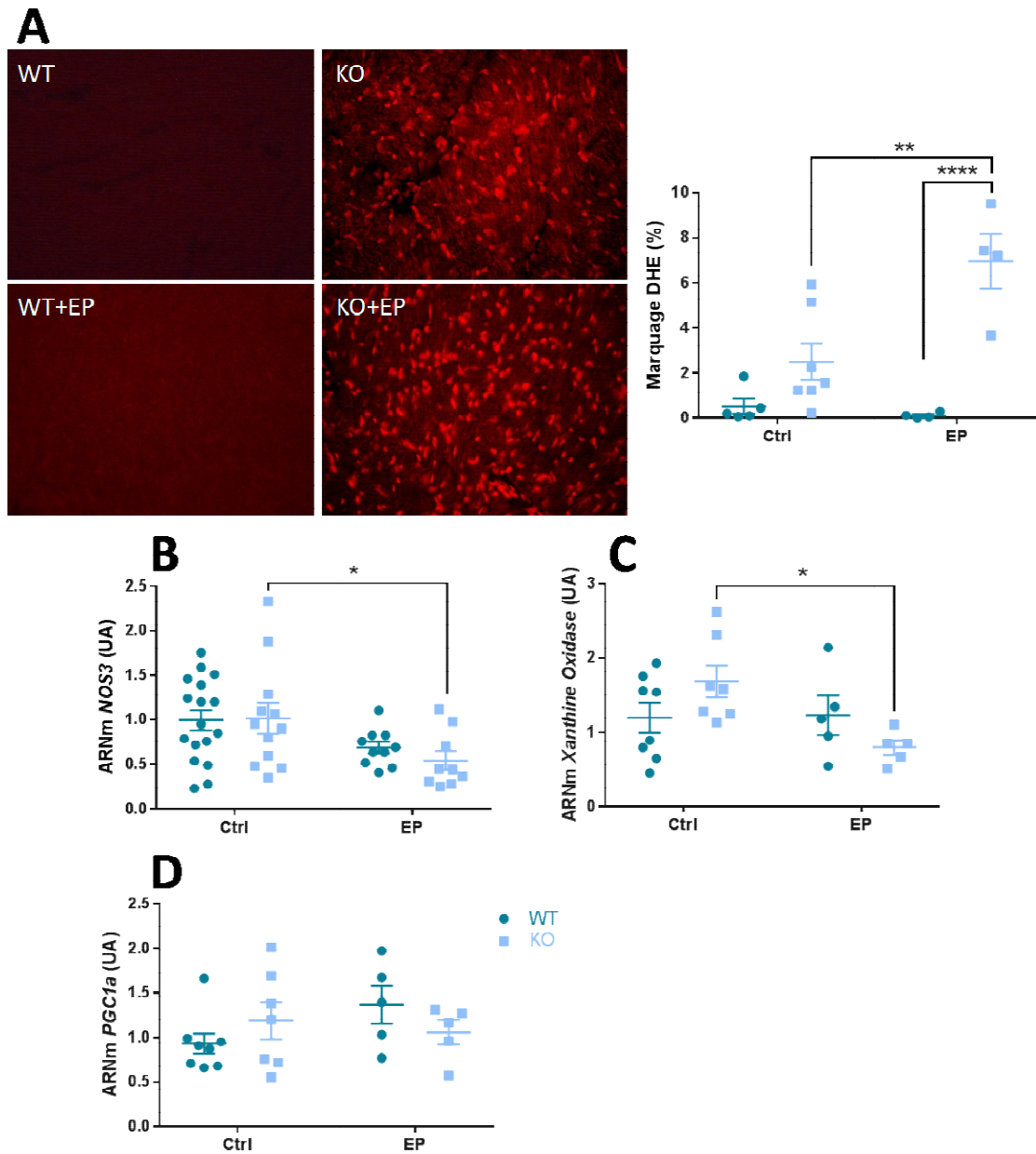


Figure 23 : L'entraînement physique augmente le stress oxydant cardiaque chez les souris Notch3 KO. (A) Coupes transversales cardiaques représentatives (gauche) et quantification (droite) d'un marquage dihydroéthidium (DHE) des souris WT et Notch3 KO, en conditions contrôles et d'exercice. PCR quantitative des transcrits cardiaques de NOS3 (B), Xanthine oxidase (C) et PGC1 α (D) des souris WT et Notch3 KO, avec ou sans EP. Valeurs moyennes \pm SEM ; * p <0.05, ** p <0.005, *** p <0.0005, **** p <0.0001, avec ANOVA 2 facteurs.

L'EP semble être délétère pour les souris Notch3 KO du point de vu du stress oxydatif, cela ne peut donc pas expliquer l'amélioration du phénotype cardiaque de ces souris. Nous avons donc étudié un autre paramètre qu'est la fibrose cardiaque. Il s'avère la de fibrose cardiaque présent chez les souris à l'état de base, précédemment démontrée par le laboratoire, est réduite suite à l'EP (Fig24A). Cependant l'EP entraîne une augmentation de l'expression génique de Gal-3, sans modification de l'expression de CD68 (Fig24B-C). Cela peut traduire une activation des monocytes-macrophages cardiaques accrue. L'EP semble donc bénéfique pour la fibrose cardiaque.

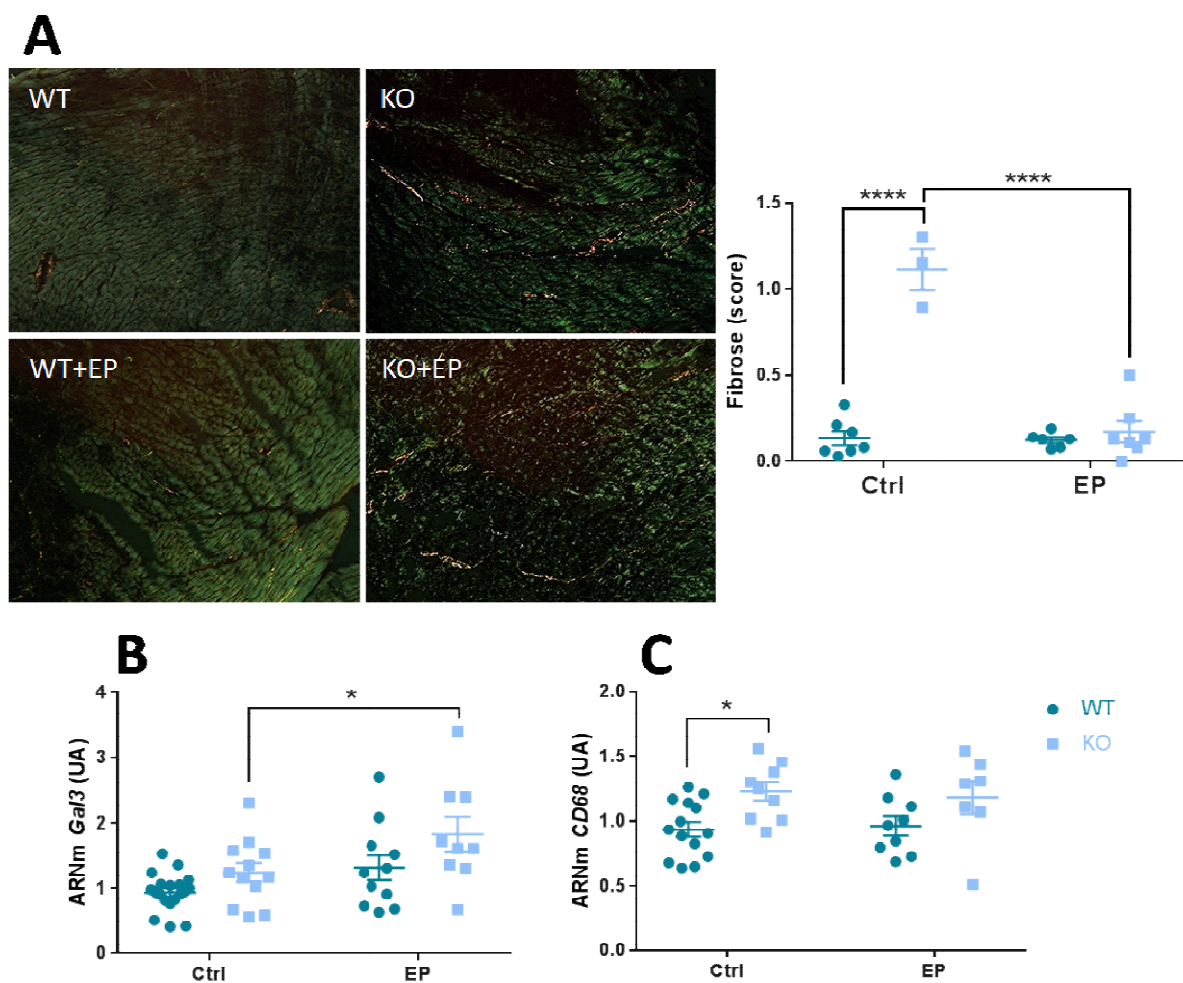


Figure 24 : L'entraînement physique diminue la fibrose cardiaque chez les souris Notch3 KO.(A) Répartition en collagène fibrillaire (marquage picosirius red) de coupes transversales cardiaques (gauche) et quantification de la fibrose cardiaque associée (droite) des souris WT et Notch3 KO, en conditions contrôles et d'exercice. PCR quantitative des transcrits de Gal-3 (B) et CD68 (C) dans les différentes conditions. Valeurs moyennes +/-SEM ; *p<0.05, **p<0.005, ***p<0.0005, ****p<0.0001, avec ANOVA 2 facteurs.

CONCLUSION

Nos résultats montrent que les souris Notch3 KO soumises à un EP de cinq semaines présentent une amélioration de leur phénotype cardiaque. En effet, les souris Notch3 présentent une hypertrophie cardiaque à l'état de base, qui semble être réduite après l'entraînement. Est associé à cela une diminution de leur fibrose cardiaque. Ces améliorations ne semblent pas résulter d'une angiogénèse car les densités capillaire et artériolaire sont inchangées suite à l'entraînement, tout comme les différents acteurs de la voie VEGF.

Chapitre 3 : La diminution de la Connexine 43 protège contre la progression de l'insuffisance rénale aiguë chez la souris

INTRODUCTION

Les maladies rénales sont un problème majeur de santé publique. Parmi ces dernières on distingue les insuffisances rénales aiguës (IRA) qui sont associées à une morbidité et une mortalité à court terme relativement élevées (jusqu'à 50%)³⁰⁰. D'autant plus qu'elles dégénèrent parfois en insuffisance rénale chronique. Les IRA ont de nombreuses causes et l'une d'entre elles est la lésion d'ischémie-reperfusion. Ce processus met en jeu différents mécanismes tel que la nécrose, la production de stress oxydant via des ROS, la fibrose, et il a été tout particulièrement mis en évidence le rôle de l'inflammation. Le recrutement de polynucléaire neutrophiles, suivi de monocytes-macrophages met en jeu les jonctions gap, et en particulier la connexine 43 (Cx43). Cette Cx a été mise en évidence dans de nombreux tissus comme le foie, la peau, le cœur, le système nerveux central et joue un rôle dans la réponse inflammatoire. Notamment, il a été montré par notre équipe que la Cx43 semble être une cible thérapeutique prometteuse contre les maladies rénales chroniques. En effet, sa réduction pharmacogénétique (via l'utilisation d'anti-sens) ou génétique (via l'utilisation de souris hétérozygotes, HE) entraîne une diminution de l'infiltration monocyttaire, la diminution de la fibrose rénale interstitielle ainsi que l'amélioration de la structure et de la fonction rénales²⁸². Ainsi dans cette étude nous avons investigué son rôle dans les IRA. Pour cela nous avons utilisé un modèle de néphrectomie associée à une ischémie-reperfusion (IR) rénale, sur différentes lignées de souris. Premièrement nous avons étudié l'effet de la réduction de la Cx43 sur l'IR rénale, grâce à des souris HE, à différents temps de reperfusion. Nous avons mis en évidence une amélioration de la structure et de la fonction rénale de ces souris par rapport aux WT (Wild Type) à 24h et 48h après IR, ainsi qu'une diminution de certains marqueurs d'inflammation. Puis nous avons étudié plus particulièrement le rôle de Cx43 dans les cellules tubulaires rénales et endothéliales grâce à des souris KO conditionnelles. Cependant les résultats de ces KO conditionnels sont ambivalents. La diminution de Cx43 protège donc en partie des lésions d'IR rénales, certainement en modulant la réponse inflammatoire. Mais le rôle spécifique de Cx43 des différents types cellulaires impliqués dans l'IR rénale n'est pas encore complètement élucidé.

RESULTATS

La diminution de la Cx43 protège des lésions d'ischémie reperfusion, via la modulation de l'inflammation et de l'adhésion cellulaire.

L'IR rénale entraîne chez les souris WT un pic de créatinine et d'urée plasmatique à 48h, traduisant une altération majeure de la fonction rénale (Fig25A-B). Cette altération est précédée et accompagnée d'une augmentation de l'expression des marqueurs de dommages structuraux que sont KIM1 à 24h et NGAL à 48h (Fig25C-D). De plus des dommages morphologiques de la structure rénale sont visibles 24h et 48h après IR (Fig25E-F). De plus, suite à l'IR rénale une augmentation transitoire de l'expression des ARNm de la Cx43 est observée à 3h chez les souris WT. Cette augmentation d'expression est associée à une augmentation de la protéine au niveau rénal à 48h (Fig25G). L'ensemble des dommages étant prépondérants et le pic de protéine Cx43 présent à 48h semblant montrer un lien entre la Cx43 et les lésions dues à l'IR rénale, des souris Cx43 HE ont été utilisées. Suite à l'IR les souris HE ne présentent pas d'augmentation de la Cx43 à 3h (Fig25G). De plus, à 48h les souris Cx43 He présentent des pics de créatinine et urée plasmatique réduits par rapport aux WT (Fig25A-B), ainsi qu'une amélioration de la structure rénale comme indiqué par le score PAS (Fig25E-F). L'expression de KIM1 et NGAL est aussi diminuée chez les souris Cx43 HE (Fig25C-D). La structure et la fonction rénales sont donc améliorées chez les souris Cx43 HE par rapport aux WT. Ainsi, la réduction de Cx43 chez les souris semble limiter la progression des dommages rénaux suite à l'IR rénale.

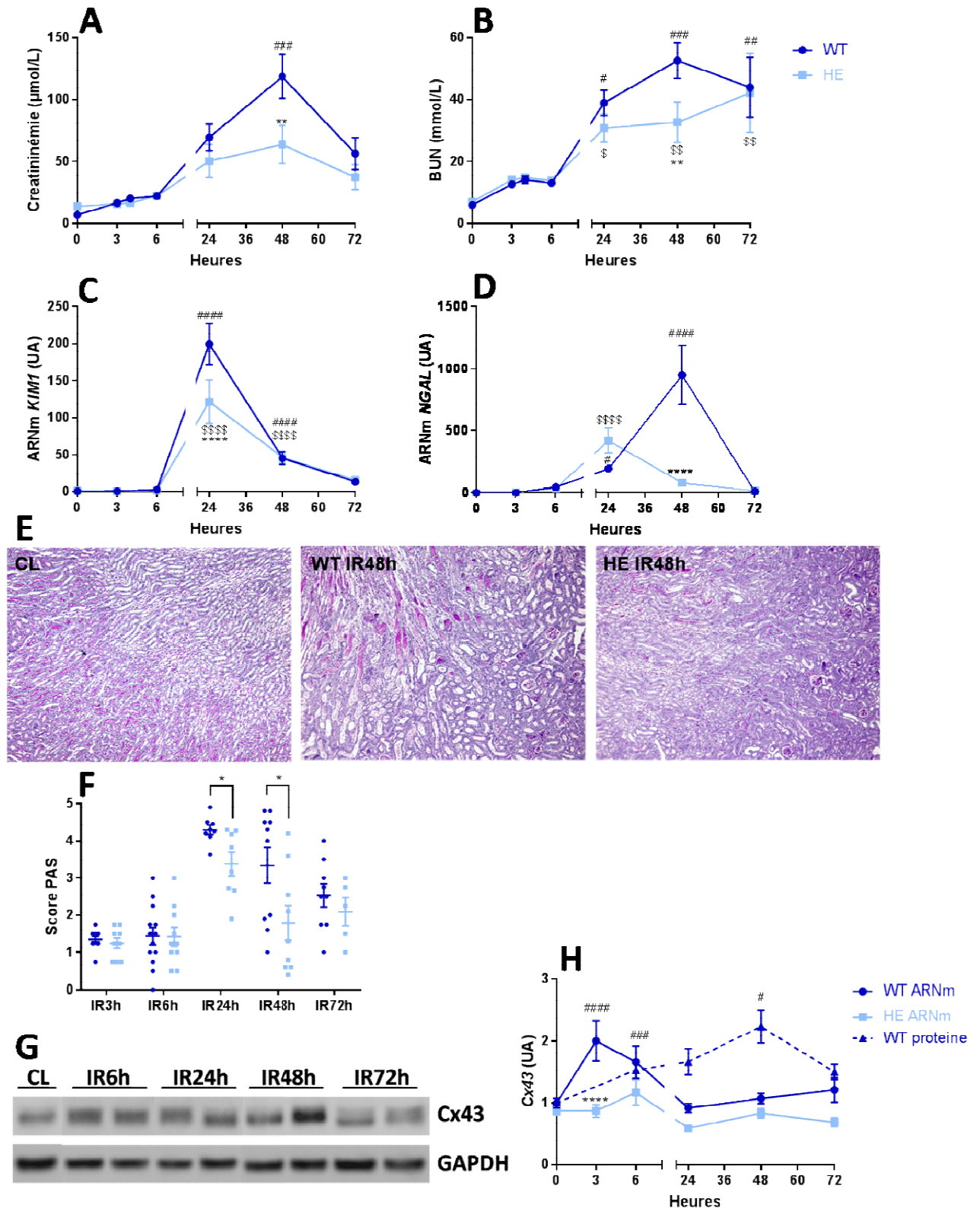


Figure 25 : La diminution de l'expression de Cx43 améliore la fonction et la structure rénales après IR rénale. Dosage de créatinine (A) et d'urée plasmatiques (B) ; PCR quantitatives des transcrits rénaux KIM1 (C) et NGAL (D) ; Western blot (G), issu de résultats représentatifs, et PCR quantitatives rénales (H) de la Cx43 de souris WT et Cx43 HE, à différents temps. Valeurs moyennes \pm SEM ; * $p < 0.05$, ** $p < 0.005$, *** $p < 0.0005$, **** $p < 0.0001$ WT vs HE, avec ANOVA 2 facteurs ; # Ctrl WT vs IR WT ; § Ctrl HE vs IR HE. Coloration de coupes rénales au PAS (E) et score histologique d'atteinte rénale associé (F) de souris WT et Cx43 HE, à différents temps. Valeurs moyennes \pm SEM ; * $p < 0.05$ avec un test Mann-Whitney.

Comme nous avons précédemment montré que la Cx43 joue un rôle important dans l'inflammation lors des maladies rénales chroniques, nous avons recherché si cela était également le cas dans la maladie rénale aigue. Suite à l'IR rénale, après 48h de reperfusion donc quand les dommages rénaux sont les plus importants, les souris Cx43 HE présentent : une diminution de l'expression de l'ARNm et de la protéine Gal-3 qui est connue pour jouer un rôle dans l'inflammation via l'activation macrophagique (Fig26A-C) ; une tendance à la diminution de l'expression de la cytokine pro-inflammatoire IL6 (Fig26H), qui est impliquée dans la différenciation cellulaire est observée. Cependant, les souris Cx43 HE présentent en parallèle une augmentation de la chimiokine MCP1 (Fig26F). Cette ambivalence se traduit également au niveau des marquages tissulaires : après 48h d'IR on observe chez les souris Cx43 HE un marquage F4-80 au niveau rénal plus important traduisant une infiltration macrophagique plus grande (Fig26D); cependant elles présentent moins de marquage GR1 donc moins d'infiltrat de polynucléaires neutrophiles (Fig26E). L'ensemble de ses résultats résultent du recrutement tissulaire et non d'une modification systémique globale puisque aucune différence significative n'est dénotée chez des souris WT et Cx43 HE, concernant les types cellulaires sanguins étudiés, 48h après reperfusion rénale (Fig 27). Il semble donc que la diminution de Cx43 module la réponse inflammatoire, possiblement en diminuant l'activation des cellules inflammatoires comme les monocytes-macrophages.

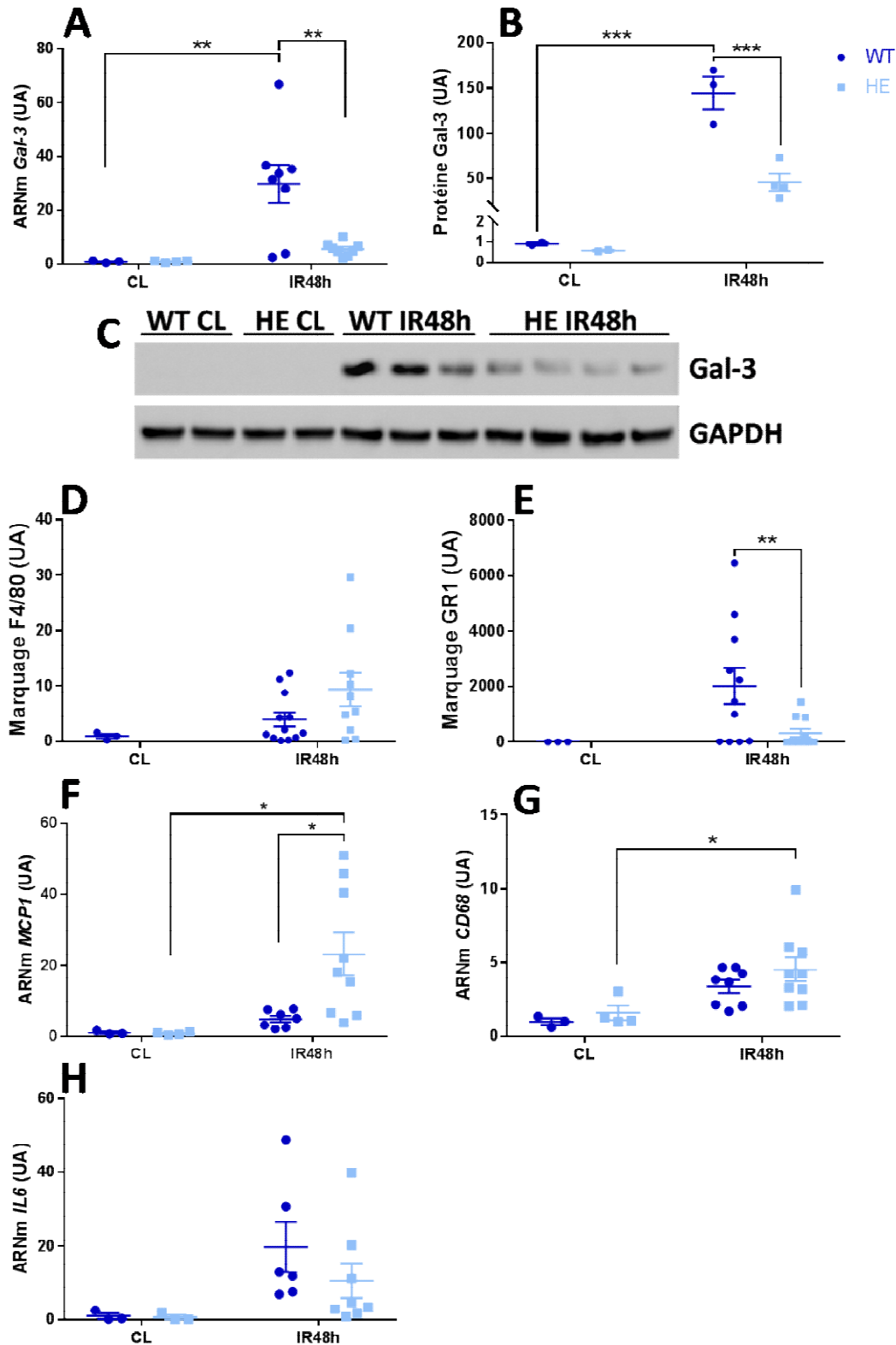


Figure 26 : La diminution de Cx43 chez les souris HE module la réponse inflammatoire après 48h d'IR. PCR quantitative des transcrits rénaux (A) et Western blot de Gal-3 rénale (B+C) ; PCR quantitatives des transcrits rénaux de MCP1 (F), CD68 (G) et IL6 (H) de souris Cx43 WT et HE, après 48h d'IR. Valeurs moyennes +/-SEM ; * $p < 0.05$, ** $p < 0.005$, *** $p < 0.0005$, **** $p < 0.0001$, avec ANOVA 2 facteurs. Quantification des immunomarquages F4/80 (D) et GR1 (E) sur tissu rénal de souris Cx43 WT et HE, après 48h d'IR. Valeurs moyennes +/-SEM ; * $p < 0.05$ avec un test Mann-Whitney.

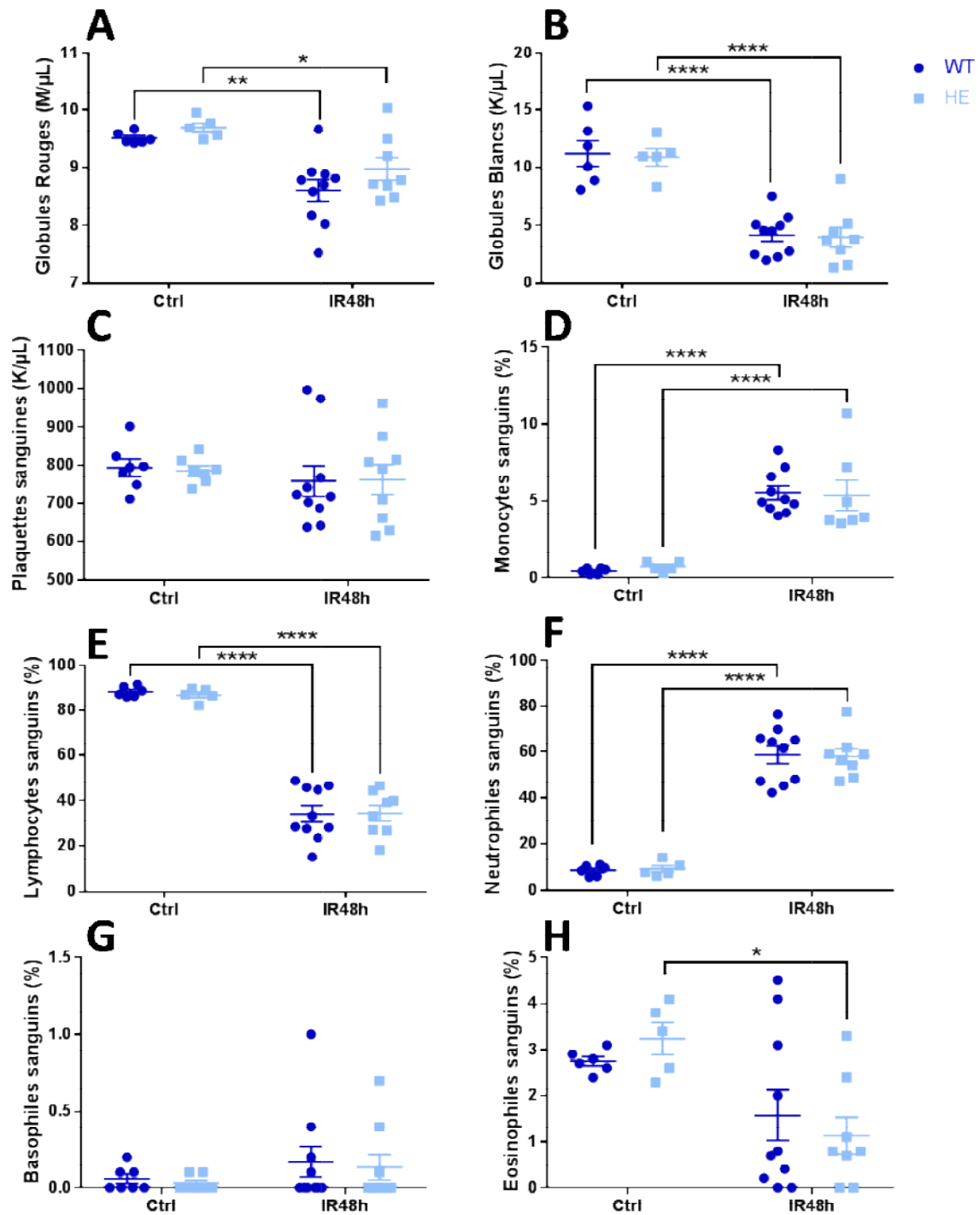


Figure 27 : Numération Formule Sanguine des souris Cx43 WT et HE. Concentration de globules rouges (A), globules blancs (B) et plaquettes (C) sanguines ; Pourcentages de monocytes (D), lymphocytes (E), polynucléaires neutrophiles (F), polynucléaires basophiles (G) et polynucléaires éosinophiles (H) sanguins des souris contrôles et IR48, Cx43 WT et HE. Valeurs moyennes +/-SEM ; * $p < 0.05$, ** $p < 0.005$, *** $p < 0.0005$, **** $p < 0.0001$, avec ANOVA 2 facteurs.

L'efficacité de la réponse inflammatoire passe en partie par la capacité des cellules inflammatoires à adhérer aux cellules afin d'aller jusqu'au site de lésion. Le compartiment vasculaire étant tout particulièrement touché lors des lésions d'IR, nous avons donc investiguer certains marqueurs d'adhésion cellulaire vasculaire. Suite à une IR de 48h les souris Cx43 HE semblent avoir une diminution de l'expression de CD146 mais qui ne se traduit pas au niveau protéique (Fig 28A-C). Cependant elles présentent une augmentation importante de l'expression de VCAM1 au niveau rénal (Fig28D). Ces résultats montrent que les souris Cx43 HE présentent une adhésion endothéliale accrue.

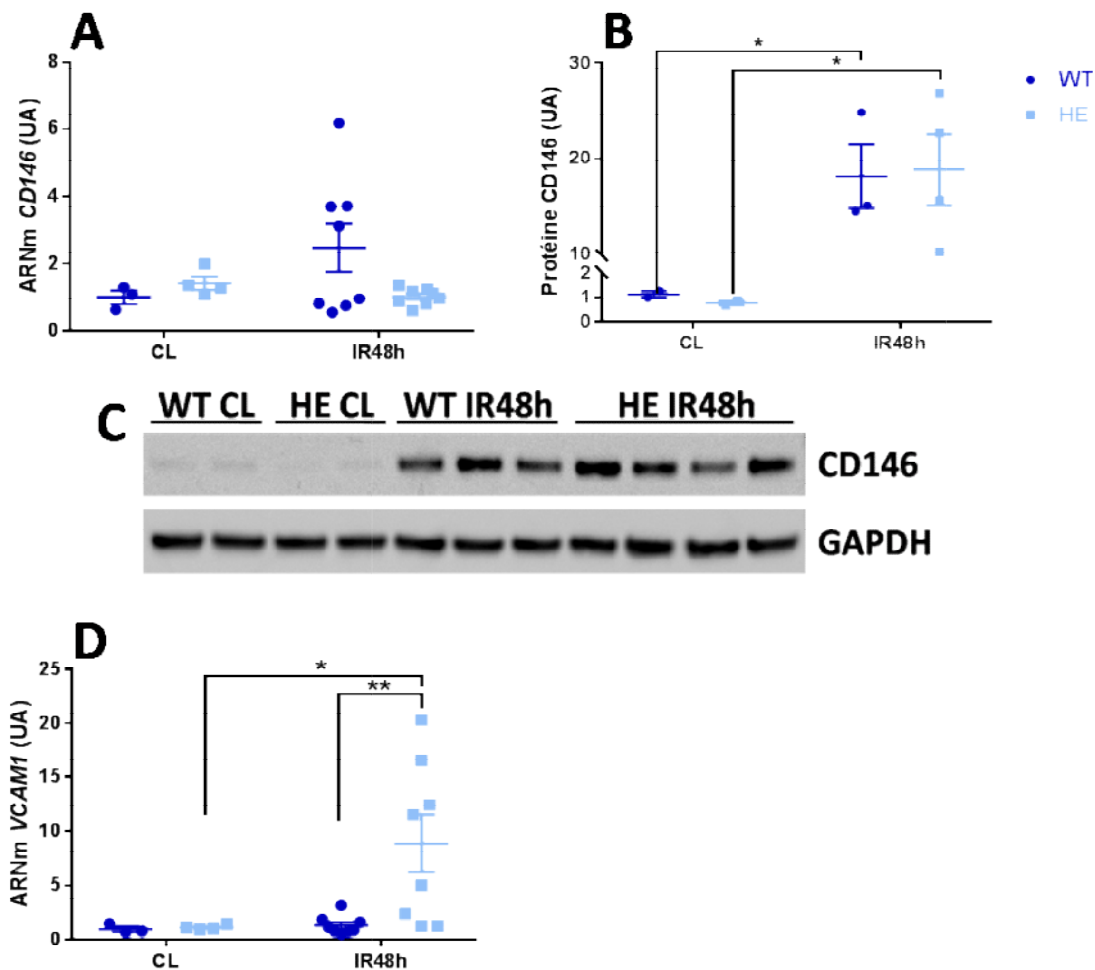


Figure 28 : Mesure des marqueurs endothéliaux chez les souris Cx43 WT et HE après 48h d'IR. PCR quantitative des transcrits rénaux (A) et Western blot de CD146 rénal (B+C) ; PCR quantitative des transcrits rénaux de VCAM1 (D) des souris Cx43 WT et HE, après 48h d'IR. Valeurs moyennes +/-SEM ; *p<0.05, **p<0.005, ***p<0.0005, ****p<0.0001, avec ANOVA 2 facteurs.

Il semble donc que la Cx43 joue un rôle lors d'une IR rénale sur la modulation de la réponse inflammatoire ainsi que l'adhésion cellulaire et que la diminution de Cx43 protège contre les lésions d'IR. Lors d'une IR rénale deux types cellulaires sont majoritairement lésés : les cellules tubulaires et les cellules endothéliales rénales. Par ailleurs, nous avons précédemment montré que l'expression de la Cx43 augmente dans ces deux types cellulaires en cas d'agression. Donc afin de déterminer laquelle des Cx43 de ces deux types cellulaires joue un rôle prépondérant dans les lésions suite à une IR rénale nous avons utilisés différentes souris conditionnelles invalidées pour la Cx43.

L'inhibition de la Cx43 tubulaire diminue l'inflammation rénale, sans affecter l'adhésion cellulaire.

Le premier type cellulaire investigué est la cellule tubulaire rénale. Pour cela des souris Cx43FloxPax8 Dox- et Dox+ ont subit une IR rénale de 24h. Suite à cela la créatinine et l'urée plasmatique (Fig29A-B), ainsi que le score PAS (Fig29E-F), ne sont pas statistiquement différents entre les souris Cx43FloxPax8 Dox+ et Dox-. En revanche l'expression des marqueurs de dommages structuraux, KIM1 et NGAL (Fig29C-D), sont nettement diminuées chez les souris Cx43FloxPax8 Dox+ après 24h d'IR rénale. Il semble donc que l'absence de n'ai pas d'impact significatif sur la fonction et la structure rénales même si on dénote une diminution des ARNm pour certains indicateurs de dommages tubulaires après 24h d'IR.

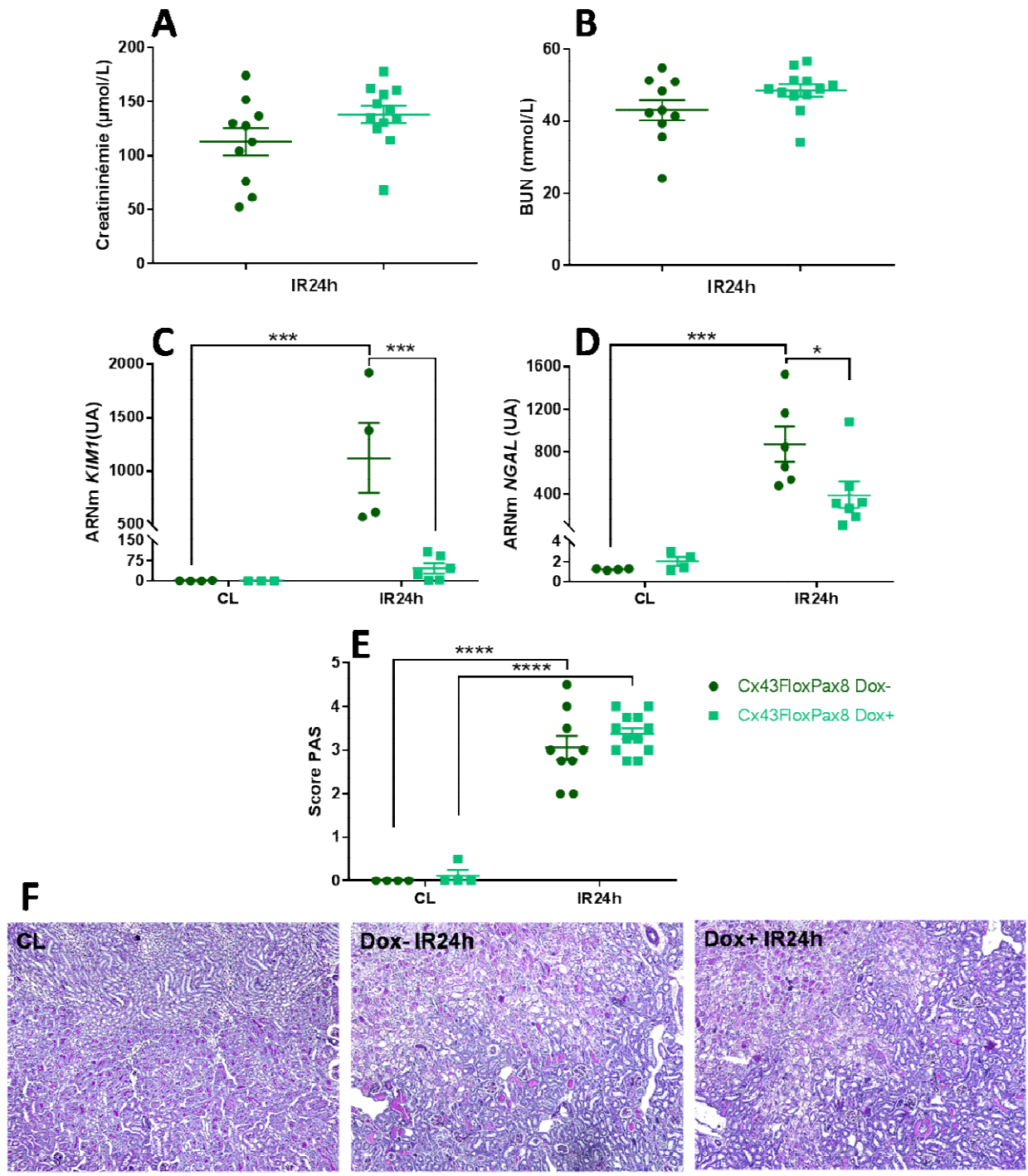


Figure 29 : L'absence de Cx43 dans les cellules tubulaires rénales ne semble pas améliorer significativement la structure et la fonction rénales. Dosage de créatinine (A) et d'urée plasmatiques (B) ; PCR quantitatives des transcrits rénaux KIM1 (C) et NGAL (D) ; Coloration de coupes rénales au PAS (E) et score histologique d'atteinte rénale associé (F) des souris Cx43FloxPax8 Dox- et Dox+, après 24h d'IR. Valeurs moyennes +/-SEM ; * $p < 0.05$, ** $p < 0.005$, *** $p < 0.0005$, **** $p < 0.0001$, avec ANOVA 2 facteurs.

Concernant l'inflammation, les souris Cx43FloxPax8 Dox+ ont une expression du gène de Gal-3, ainsi que de la protéine, réduites après 24h d'IR par rapport aux Cx43FloxPax8 Dox- (Fig30A-C). Il en est de même pour l'expression génique de CD68 (Fig30D), qui est un marqueur de monocytes-macrophages. Mais l'expression d'IL6 n'est pas modifiée par le l'invalidation spécifique (Fig30E). Cela semble donc montrer que l'absence de Cx43 tubulaire impacte la réponse inflammatoire.

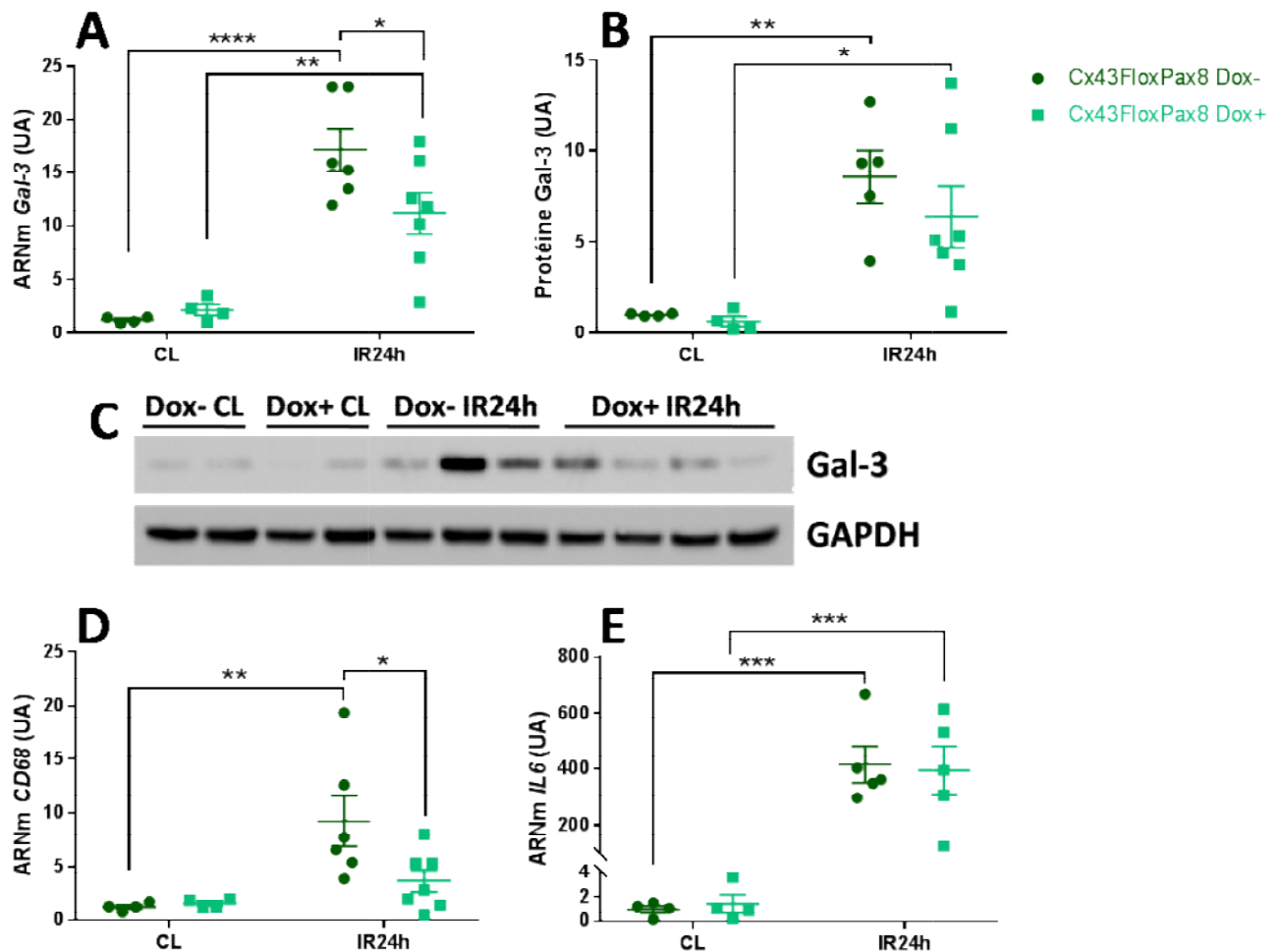


Figure 30 : Impacte de la délétion tubulaire de Cx43 sur les monocytes. PCR quantitative des transcrits rénaux (A) et Western blot de Gal-3 rénale (B+C) ; PCR quantitatives des transcrits rénaux de CD68 (D) et IL6 (E) de souris Cx43FloxPax8 Dox- et Dox+, après 24h d'IR. Valeurs moyennes +/-SEM ; *p<0.05, **p<0.005, ***p<0.0005, ****p<0.0001, avec ANOVA 2 facteurs.

De plus, tout comme chez les souris HE à 48h, l'expression du gène de CD146 (Fig31A) chez les souris Cx43FloxPax8 Dox+ après 24h d'IR est diminué par rapport aux souris Cx43FloxPax8 Dox- ; cependant cette différence ne se retrouve pas au niveau protéique (Fig31B-C). L'expression de VCAM1 ne semble cependant pas modifiée par l'inactivation spécifique de Cx43 (Fig31D). Ainsi, l'absence de Cx43 tubulaire semble fournir des résultats mitigés concernant les marqueurs d'adhésion.

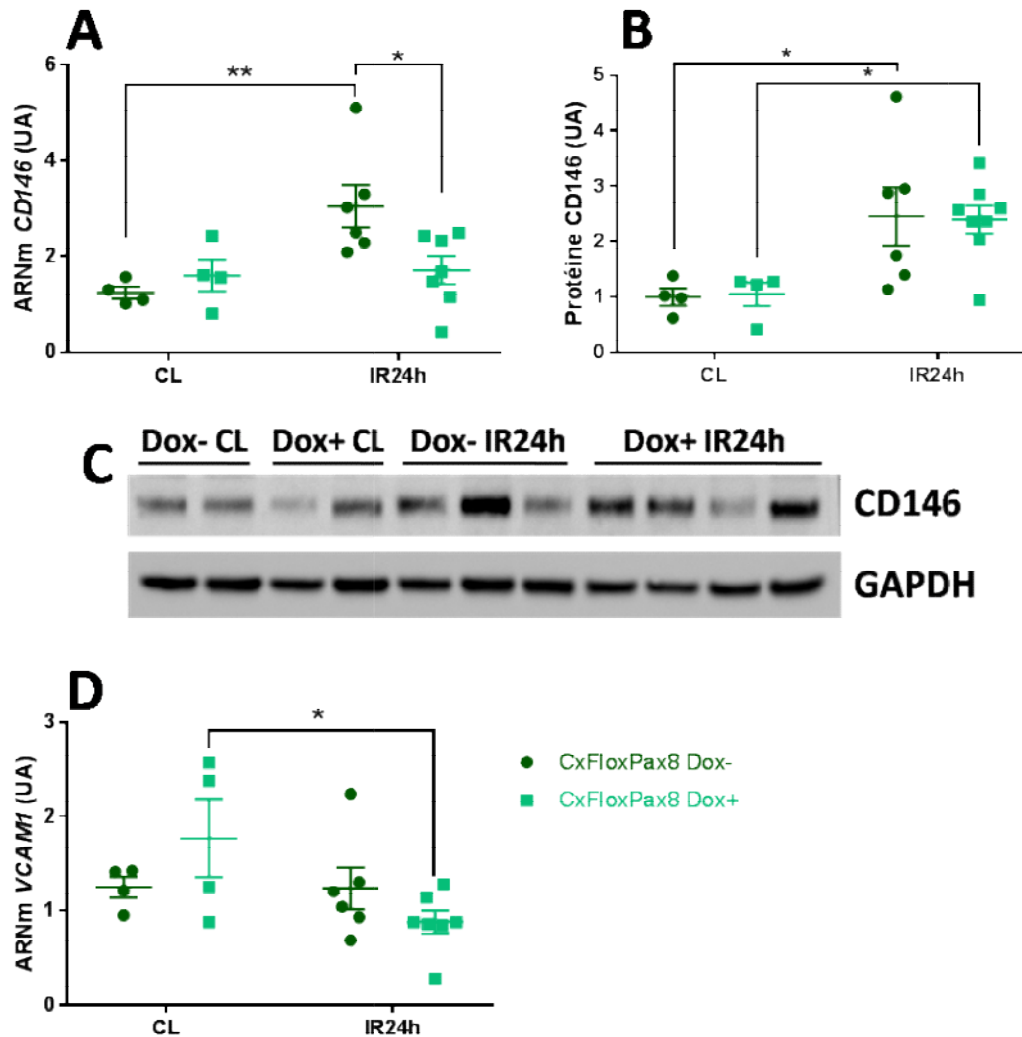


Figure 31 : Impacte de la délétion tubulaire de Cx43 sur l'activation endothéliale. PCR quantitative des transcrits rénaux (A) et Western blot de CD146 rénal (B+C) ; PCR quantitative des transcrits rénaux de VCAM1 (D) des souris Cx43FloxPax8 Dox- et Dox+, après 24h d'IR. Valeurs moyennes +/-SEM ; *p<0.05, **p<0.005, ***p<0.0005, ****p<0.0001, avec ANOVA 2 facteurs.

L'absence de Cx43 endothéliale module la réponse inflammatoire et l'adhésion cellulaire.

Il semble donc que la Cx43 des cellules tubulaires rénales jouerait un rôle minime lors après 24h d'IR rénale. En effet, certains marqueurs de dommages structurels sont diminués mais la fonction et la morphologie rénales sont inchangées. La diminution de l'inflammation quant à elle, est marquée. Par contre l'adhésion cellulaire ne semble pas affectée par cette absence de Cx43 tubulaire. Ces résultats ne montrant pas de rôle prépondérant de la Cx43 tubulaire lors de l'IR rénale nous avons investigué le deuxième compartiment cellulaire fortement touché lors de l'IR rénale : les cellules endothéliales. Pour cela nous avons effectué des IR rénales de 24h sur des souris CxFloxVeCadh invalidées (Tam+) ou non (Tam-) de la Cx43 dans les cellules endothéliales.

Comme précédemment, l'IR de 24h, n'entraîne pas de différence significative entre les souris CxFloxVeCadh Tam- et Tam+ au niveau de la fonction (Fig32A-B) et de la morphométrie rénales (Fig32E-F), bien qu'il y ait une tendance à l'amélioration chez les souris KO conditionnel. Cependant l'invalidation spécifique de la Cx43 dans les cellules endothéliale entraîne chez les souris ischémiées une aggravation du marqueur KIM1 (Fig32C) et en parallèle une amélioration du marqueur NGAL (Fig32D). Les résultats de la fonction et structure rénale de ces souris sont donc ambivalents.

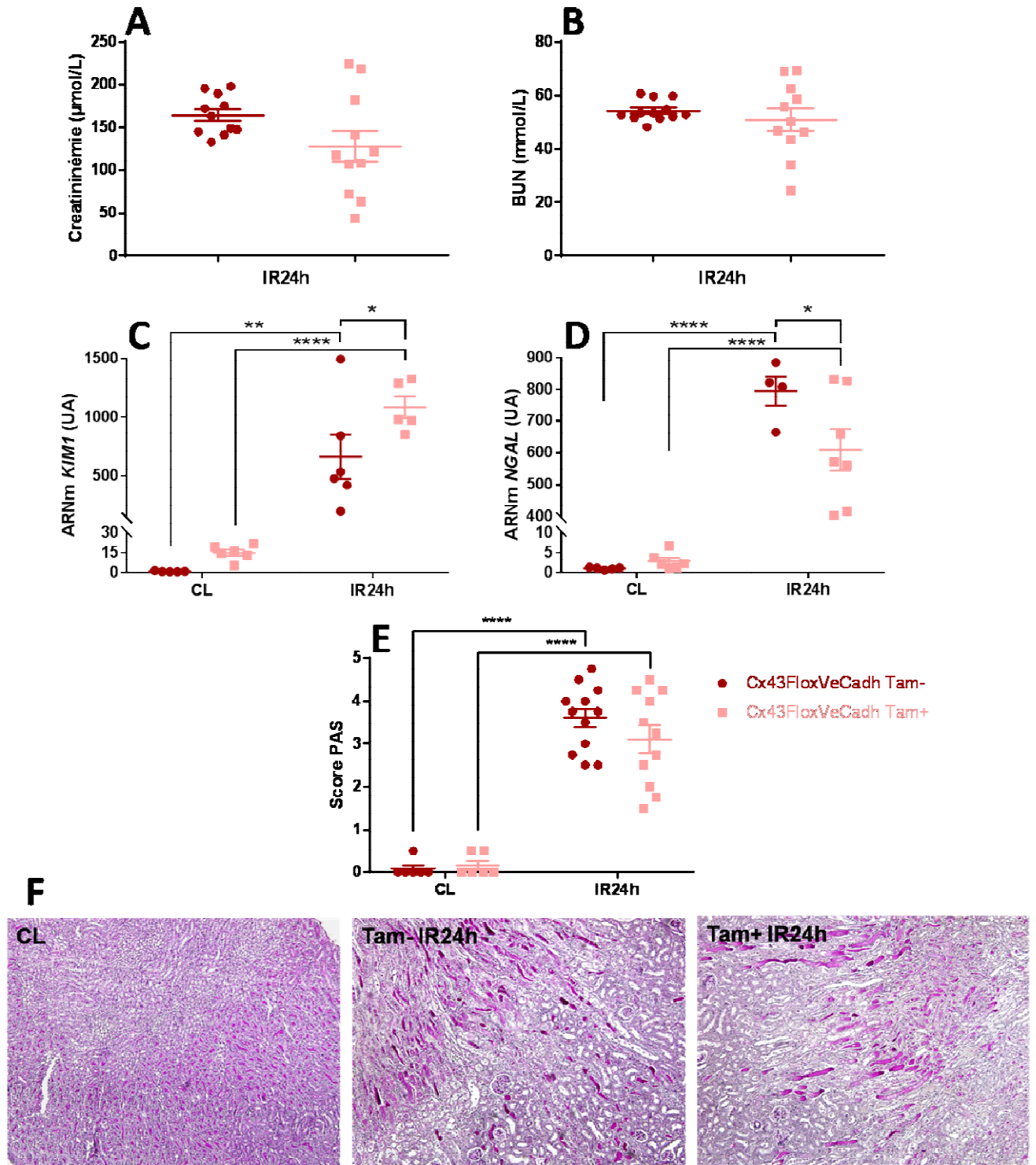
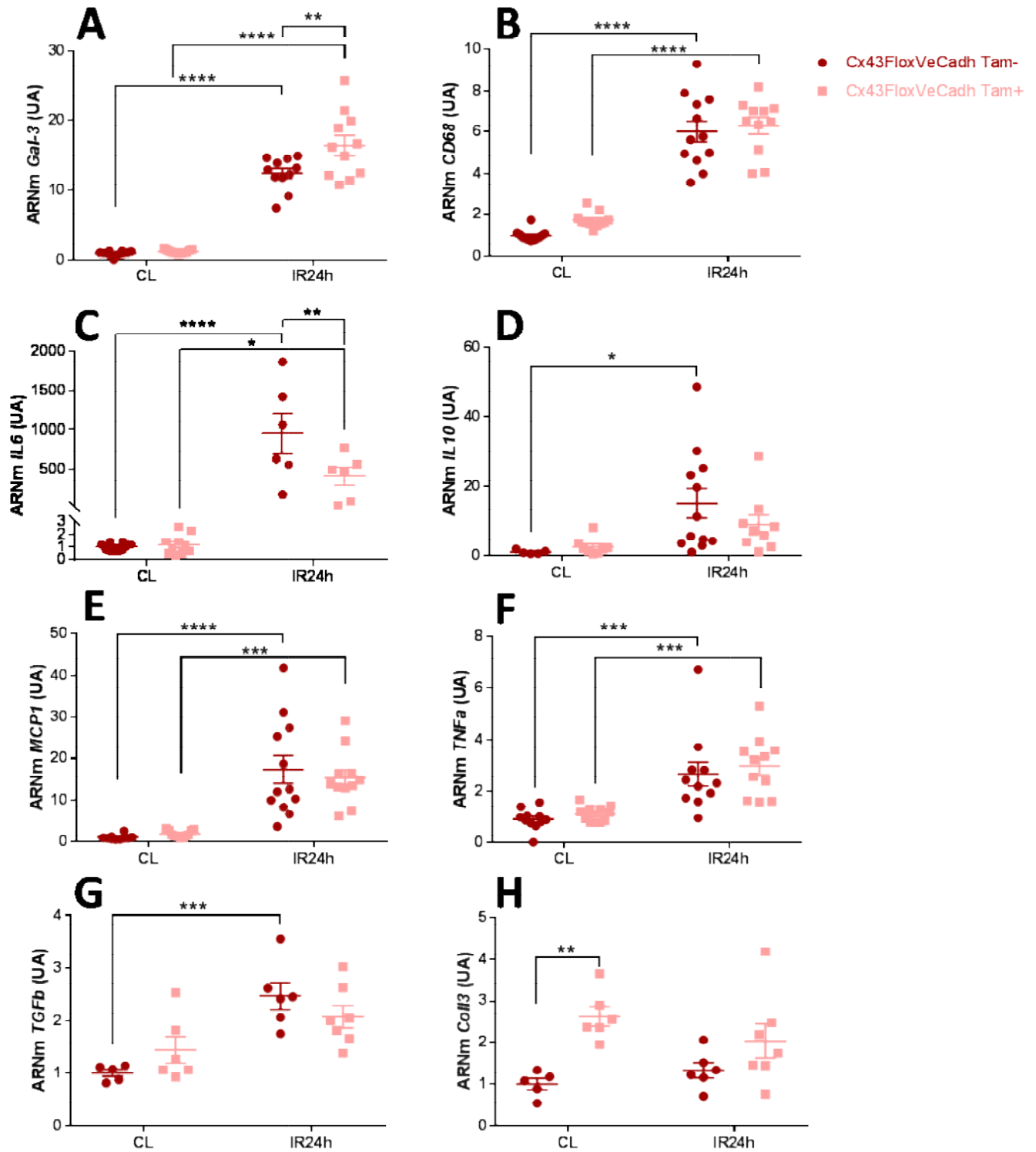


Figure 32 : Impacte de la délétion spécifique de la Cx43 endothélicale sur la fonction et la structure rénales. Dosage de créatinine (A) et d'urée plasmatiques (B) ; PCR quantitatives des transcrits rénaux KIM1 (C) et NGAL (D) ; Coloration de coupes rénales au PAS (E) et score histologique d'atteinte rénale associé (F) des souris Cx43FloxVeCadh Tam- et Tam+, après 24h d'IR. Valeurs moyennes +/-SEM ; * $p < 0.05$, ** $p < 0.005$, *** $p < 0.0005$, **** $p < 0.0001$, avec ANOVA 2 facteurs.

Concernant la réponse inflammatoire, les souris CxFloxVeCadh Tam+ ont une expression de Gal-3 augmentée par rapport aux CxFloxVeCadh Tam- après 24h d'IR (Fig33A), sans changement associé de l'expression de CD68 (Fig33B). A contrario, elles ont une expression génique diminuée de la cytokine IL6, ainsi qu'une tendance à la diminution de l'expression d'IL10 (Fig33C-D). Mais l'expression de MCP1 et TNF α ne semblent pas modifiées par le KO conditionnel (Fig33E-F). Il est également observé une tendance à la diminution du marquage GR1 donc de l'infiltration des polynucléaires neutrophiles (Fig34A-B) chez les souris CxFloxVeCadh Tam+ après 24h d'IR, sans changement sur l'infiltration macrophagique (Fig34C-D). Concernant la mesure de quelques marqueurs fibrotiques, les souris CxFloxVeCadh Tam+ ont tendance à avoir une diminution de l'expression de TGF β et a contrario une tendance à l'augmentation de l'expression de Coll3 après IR de 24h (Fig33G-H). Il est intéressant de noter qu'à l'état basal les souris CxFloxVeCadh Tam+ présentent une augmentation de l'expression de Coll3, ainsi que des tendances à l'augmentation : de l'expression de TGF β et CD68, des marquages F4-80 et GR1 donc des infiltrats macrophagiques et des polynucléaires neutrophiles (Fig33-34). L'ensemble de ses résultats résultent de changements tissulaires et non d'une modification systémique globale (Fig 35). Ces résultats semblent donc montrer une tendance à la diminution de la réponse inflammatoire chez les souris CxFloxVeCadh Tam+ après IR rénale de 24h, bien que tous les marqueurs n'aillent pas dans ce sens.



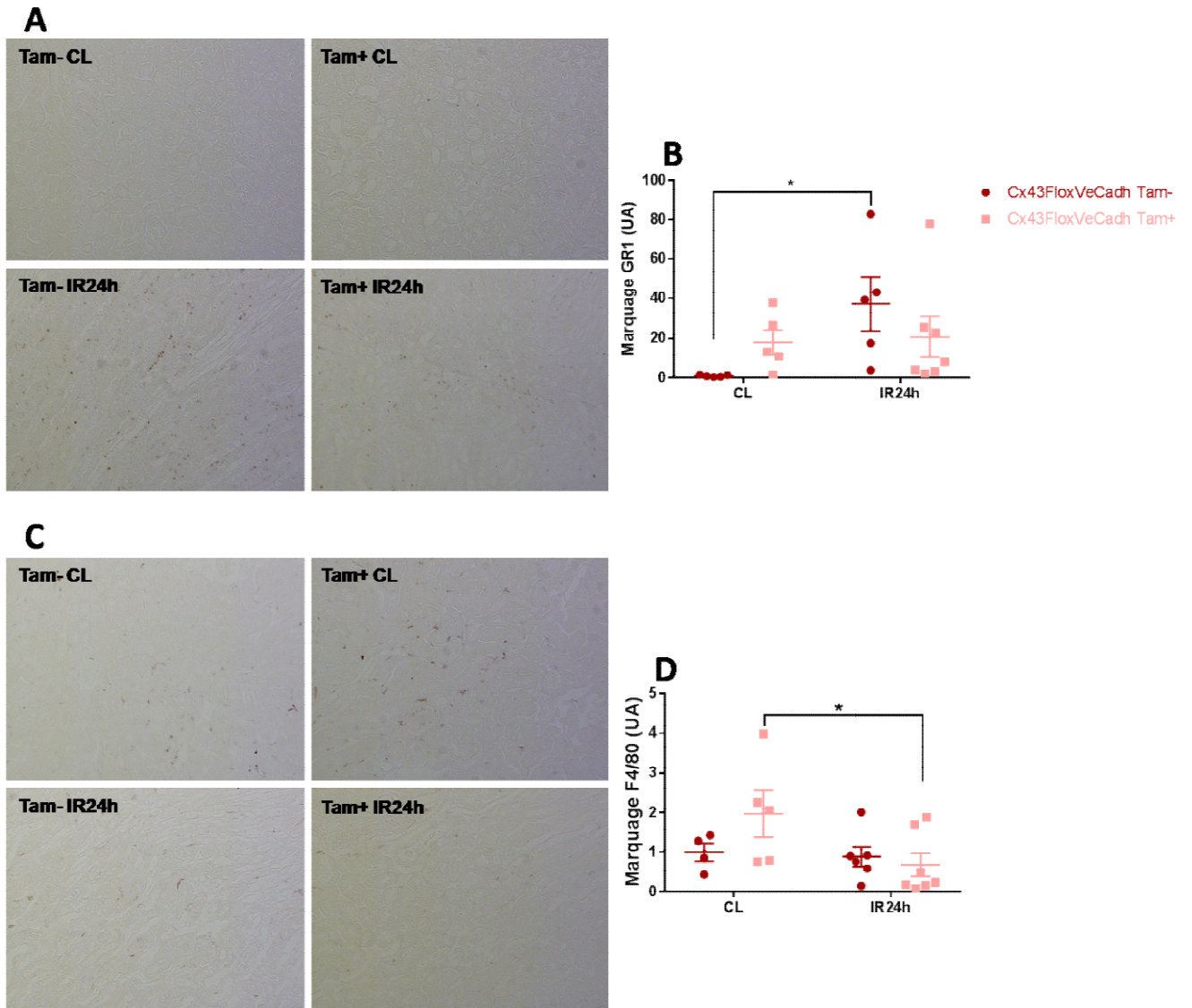


Figure 34 : L'absence de Cx43 dans les cellules endothéliales module la réponse inflammatoire après IR rénale. Immunomarquage sur coupes rénales et quantifications F4/80 (A+B) et GR1 (C+D) sur tissu rénal des souris Cx43FloxVeCadh Tam- and Tam+, après 24h d'IR. Valeurs moyennes +/-SEM ; * $p < 0.05$, ** $p < 0.005$, *** $p < 0.0005$, **** $p < 0.0001$, avec ANOVA 2 facteurs.

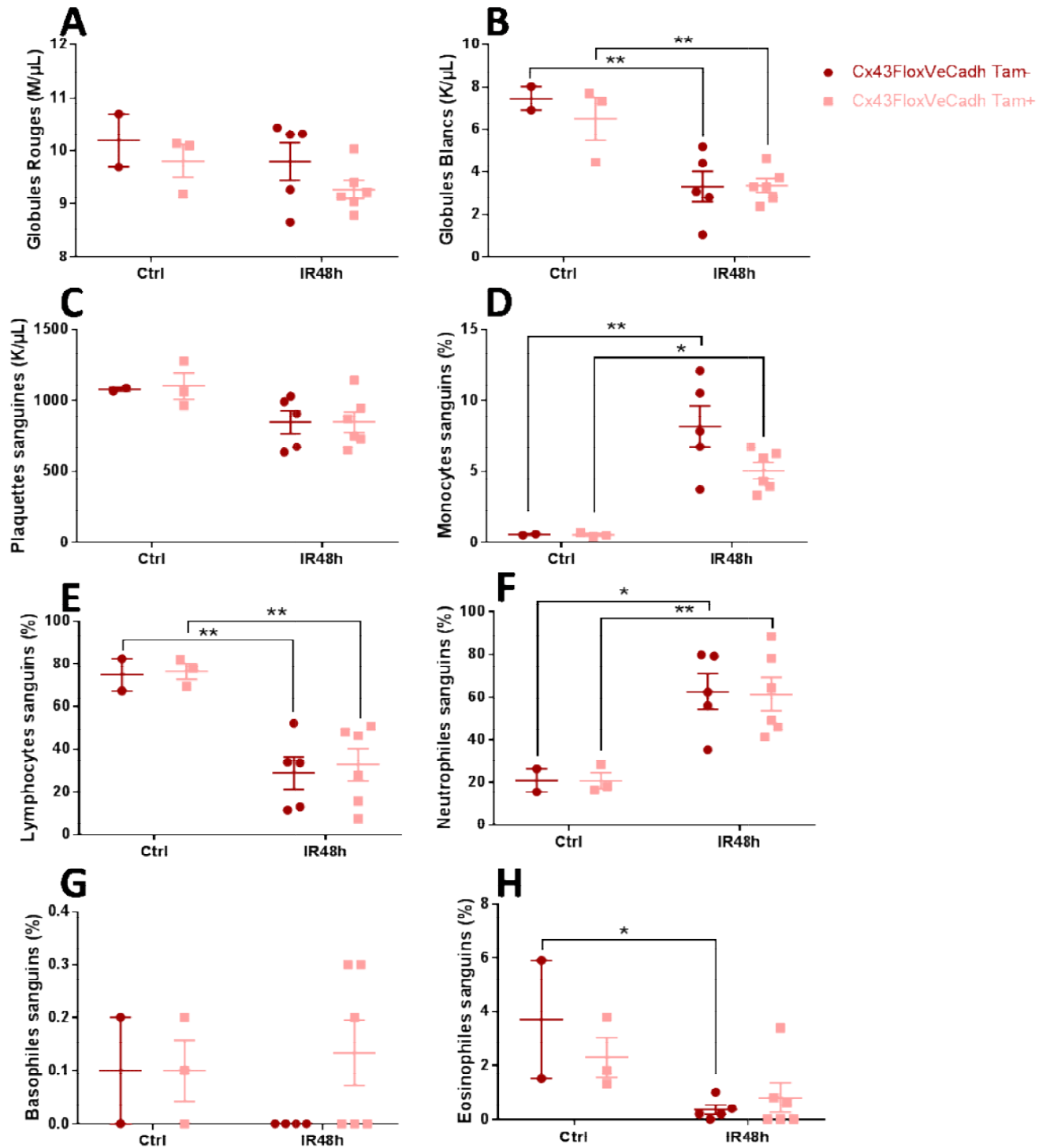


Figure 35 : Numération Formule Sanguine des souris Cx43FloxVeCadh Tam- et Tam+. Concentration de globules rouges (A), globules blancs (B) et plaquettes (C) sanguines ; Pourcentages de monocytes (D), lymphocytes (E), polynucléaires neutrophiles (F), polynucléaires basophiles (G) and polynucléaires éosinophiles (H) sanguins des souris contrôles et IR48, Cx43FloxVeCadh Tam- et Tam+. Valeurs moyennes +/-SEM ; *p<0.05, **p<0.005, ***p<0.0005, ****p<0.0001, avec ANOVA 2 facteurs.

Du point de vue de l'adhésion cellulaire les souris CxFloxVeCadh Tam+ ne présentent pas de modification de l'expression de CD146 après 24h d'IR (Fig36A), mais une tendance à l'augmentation de la protéine par rapport aux souris CxFloxVeCadh Tam- est visible (Fig36B-C). Aucune modification de l'expression des marqueurs d'adhésion VCAM1 et P-Selectin n'est observé suite à l'IR en absence de Cx43 endothéliale (Fig36D, F); cependant les transcrits du gène E-Selectin tendent à diminuer chez les souris CxFloxVeCadh Tam+ suite à l'IR (Fig36E). Il est cependant à noter qu'à l'état basal les souris CxFloxVeCadh Tam+ possède une expression accrue des transcrits de la P-Selectin (Fig36D). Ces résultats semblent indiquer que l'absence de Cx43 endothéliale module légèrement l'adhésion cellulaire.

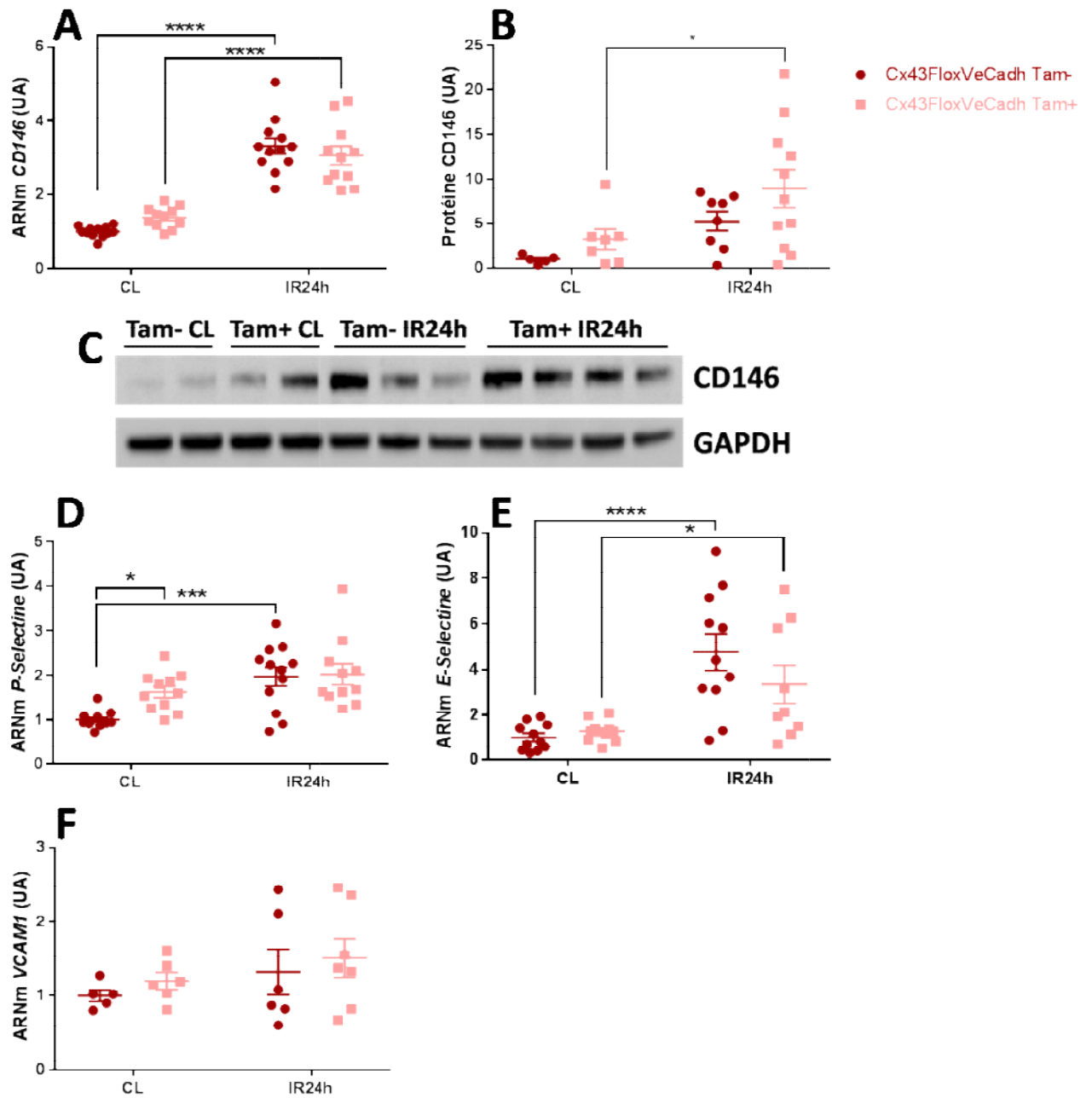


Figure 36 : Etude des marqueurs d'adhésion cellulaire chez les souris délétées de la Cx43 endothéliale. PCR quantitative des transcrits rénaux (A) et Western blot de CD146 rénal (B+C) ; PCR quantitatives des transcrits rénaux de P-Selectine (D), E-Selectine (E) et VCAM1 (F) des souris Cx43FloxVeCadh Tam- et Tam+, après 24h d'IR. Valeurs moyennes +/-SEM ; *p<0.05, **p<0.005, ***p<0.0005, ****p<0.0001, avec ANOVA 2 facteurs.

CONCLUSION

Ayant précédemment montré que la Cx43 est impliquée dans le développement de plusieurs modèles expérimentaux de MRC, nous avons cherché à étudier son rôle dans les maladies rénales aiguës (MRA). Pour cela nous avons utilisé un modèle d'IR rénale chez des souris Cx43 HE, mais aussi chez des souris invalidées spécifiquement de la Cx43 dans les cellules tubulaires rénales ou dans l'endothélium, ces deux tissus étant les plus impactés dans les lésions d'IR.

Cette étude montre que, tout comme dans les MRC, les souris Cx43 HE présentent une fonction et une structure rénale améliorées par rapport aux WT suite à l'IR rénale. Cette protection semble être liée à la modulation de la réponse inflammatoire comme le montre la diminution de l'expression de Gal-3 ainsi que de sa protéine ; mais aussi via la modulation de l'adhésion cellulaire dépeint par l'augmentation de l'expression de VCAM1.

Concernant les souris KO spécifiques les résultats sont moins marqués mais des tendances se dessinent. Chez les souris Cx43FloxPax8 Dox+ invalidées pour la Cx43 des cellules tubulaires rénales, il est observé après 24h d'IR rénale une amélioration des marqueurs de dommages rénaux KIM1 et NGAL mais sans répercussion sur la fonction rénale. En parallèle, il y a une diminution de Gal-3 donc de la réponse inflammatoire mais les résultats concernant l'adhésion cellulaire sont non équivoques. De l'autre côté, les souris Cx43FloxVeCadh Tam+ invalidées spécifiquement pour la Cx43 endothéliale, après 24h d'IR rénale, il n'y a pas d'amélioration de la fonction rénale et les résultats des marqueurs de dommages rénaux sont ambivalents. Cependant, ces souris présentent une tendance à la diminution de la réponse inflammatoire comme le montre la diminution de l'expression de la cytokine IL6 et de l'infiltration des polynucléaires neutrophiles ; ainsi qu'une tendance à la modulation de l'adhésion cellulaire visible par l'expression de P-Selectin à l'état basal et de E-Selectin après IR. L'ensemble de ces résultats montre donc que la réduction de Cx43 chez les souris semble limiter la progression des dommages rénaux suite à l'IR rénale. Il est indéniable que cette protection passe par la modulation de l'inflammation. Et il semble que ni la Cx43 endothéliale, ni la Cx43 tubulaire rénale n'aient un rôle prépondérant.

Discussion et perspectives

Rôle de Notch3 dans le remodelage cardiaque

Notch3 est connu pour son implication dans la maturation des petites artères de résistances, via la différenciation des CMLV. Il a été montré que l'invalidation de Notch3 n'est pas létale mais entraîne des altérations du phénotype des petites artères de résistances. Ragot *et al.* avaient démontré que ce récepteur est nécessaire au maintien de l'intégrité des coronaires lors d'une hypertension artérielle (HTA) induite par une infusion chronique d'AngII²⁹⁹, mettant en évidence une perte d'intégrité de l'arbre coronaire chez les souris Notch3 KO, médié par la voie VEGFa/VEGFR2, entraînant un défaut d'adaptation cardiaque lors d'une surcharge de pression. Notch3 semblant être impliqué dans les mécanismes d'hypertrophie pathologique, le premier but de la présente étude a été de déterminer si l'invalidation de Notch3 affectait également l'adaptation cardiaque dans un contexte d'hypertrophie physiologique. Pour cela nous avons soumis les souris Notch3 KO à un entraînement physique (EP) modéré : de la course sur tapis 3 fois par semaine, à des vitesses et durées croissantes, pendant 5 semaines.

Comme montré par Ragot *et al.*, les souris Notch3 KO présentent une hypertrophie cardiaque sans altération de fonction à l'état de base. L'EP de 5 semaines semble entraîner une diminution de l'hypertrophie cardiaque des souris Notch3 KO. Il semble donc que l'EP soit bénéfique pour le phénotype cardiaque des souris Notch3 KO. Il serait intéressant d'analyser au niveau protéique si cette réduction d'hypertrophie est due à l'activation de la voie de signalisation dépendant de l'hypertrophie physiologique (Akt/PI3K) ou d'une réduction de la voie de l'hypertrophie pathologique (Prolactine/STAT5). Nos premiers résultats tendants vers cette deuxième hypothèse.

Ragot *et al.* avaient montré que le défaut d'adaptation cardiaque des souris Notch3 KO était dû à une altération du réseau coronaires. L'hypertrophie cardiaque physiologique s'accompagne de mécanismes pro-angiogéniques, notamment lors de l'EP. L'angiogenèse a notamment été montrée au niveau des muscles striés squelettiques par Holloway *et al.*³⁰¹ au cours de l'entraînement physique chez l'Homme. Récemment, Morland *et al.*³⁰² ont montré que l'EP entraîne la sécrétion de cytokines et autres molécules via la voie VEGF par le muscle squelettique qui permet l'angiogenèse cérébrale. Iemitsu *et al.*⁵⁸ ont montré dans un modèle murin que l'EP améliore l'angiogenèse cardiaque lors du vieillissement via le VEGF. Résultats confirmés dernièrement par Soori *et al.*³⁰³. Dans notre travail, à l'état de base les souris Notch3 KO présentent une raréfaction artériolaire, ainsi qu'un phénotype à tendance anti-angiogénique. Après entraînement physique, aucune modification n'est observée.

L'amélioration du phénotype cardiaque des souris Notch3 KO serait donc indépendante de l'angiogénèse. Cependant, il serait intéressant d'analyser plus précisément de phénotype des CMLV des petites artères de résistances. Pour cela nous pourrions faire des immunomarquages de différentes protéines caractérisants le phénotype sécrétoire ou contractile des CMLV telles que : la fibronectine, la laminine, les intégrines $\alpha1\beta1$ et $\alpha4\beta1$, la β -actine non musculaire, l' α -actine du muscle lisse, la chaîne lourde de la myosine du muscle lisse ou encore la chaîne lourde de la myosine non musculaire.

Ragot *et al.* avaient également montré que l'hypertrophie cardiaque des souris Notch3 KO est associée à une fibrose cardiaque à l'état de base. A contrario, l'entraînement physique entraîne une diminution de la fibrose cardiaque après 5 semaines d'exercice. En revanche, que cela soit lors de la surcharge de pression induite par l'HTA ou lors de la surcharge de débit induite par l'EP, on observe une augmentation de Gal-3 qui suggère une inflammation cardiaque. L'inflammation est connue pour moduler la fibrose^{304,305}. Ainsi, bien que l'inactivation de Notch3 entraîne une augmentation de l'inflammation quelque soit le type de remodelage cardiaque, il se pourrait qu'elle n'aggrave la fibrose cardiaque qu'en condition pathologique, comme montré par Ragot *et al.*²⁹⁹ lors d'une HTA induite par l'AngII, et non lors de l'EP comme le montre nos résultats. Des études montrent un lien entre la voie Notch3 et la voie TGF β . Zhang *et al.*³⁰⁶ ont montré qu'une surexpression de Notch3 inhibe la transition des fibroblastes cardiaques en myofibroblastes induite par le TGF β , alors que la réduction de Notch3 active la production de protéines pro-fibrosantes (MMP-9) dans les cellules stimulées avec du TGF β . D'un autre côté, Lai *et al.* ont montré que l'activation notamment de la voie Notch3 dans des fibroblastes pulmonaires induit leur différenciation et l'expression de protéines de la MEC en réponse au TGF β ³⁰⁷. Selon Huang *et al.*³⁰⁸ TGF β stimulerait Notch3 dans des cellules tubulaires proximales humaines ; et Notch3 participerait à l'induction de fibrose rénale car l'augmentation de Notch3 suit la cinétique de progression de la maladie rénale obstructive UO.

En résumé, l'inactivation de Notch3 entraîne une cardiopathie chez les souris se traduisant par une hypertrophie, qui en réponse à une surcharge de pression, s'aggrave et conduit à une insuffisance cardiaque sévère, alors qu'en réponse à un EP modéré, une amélioration du phénotype cardiaque est observée. Il semble donc que Notch3 soit nécessaire à l'adaptation cardiaque lors d'un remodelage cardiaque pathologique mais qu'un entraînement physique permet de contrecarrer au moins en partie des défauts liés à l'absence de Notch3. Ce travail confirme ainsi que l'EP est bénéfique lors de pathologies cardiovasculaires, et c'est pourquoi la réadaptation cardiaque par l'exercice est désormais un traitement courant³⁰⁹. Cependant, de nombreux protocoles d'exercice physique existent, n'entraînant pas forcément les mêmes réponses cellulaires, et donc des résultats variés. Notamment le type d'exercice choisi va conditionner le type de remodelage cardiaque physiologique

qui en résultera : les exercices d'endurance tels que la nage ou la course entraînent une surcharge de volume induisant une hypertrophie excentrique, alors les exercices de résistance tels que l'altérophilie ou la lutte entraînent une surcharge de pression induisant une hypertrophie concentrique. Ces phénomènes ont été très bien résumés par Fernandes *et al.*³¹⁰, ainsi que par Weiner RB et Baggish AL³¹¹, ou encore plus récemment par Fulghum K et Hill BG³¹². Il serait donc intéressant de prolonger notre protocole afin d'obtenir, peut-être, des résultats plus marqués, notamment au niveau de la réduction de l'hypertrophie cardiaque. Nous pourrions allonger la durée du protocole, pour passer de 5 semaines à 10 semaines ; ou entraîner les souris de façon plus souvent (5 fois par semaines au lieu de 3).

Un autre objectif de mes travaux était d'étudier les effets d'une suractivation de la voie de Notch3 lors d'une surcharge de pression. L'inactivation de Notch3 étant délétère dans ces conditions, l'hypothèse était que la suractivation pourrait être bénéfique. Pour cela, nous avons induit une HTA par infusion chronique d'AngII chez des souris surexprimant le N3ICD dans les CMLV (TgN3ICDSM).

Nos résultats montrent que l'infusion d'AngII chez les souris TgN3ICDSM entraîne une HTA associée à une moindre hypertrophie cardiaque, et sans dysfonction cardiaque. De plus l'HTA chez les souris Notch3 KO induit une inflammation et de la fibrose cardiaque, alors qu'elle n'induit pas de changement dans l'expression de marqueurs d'inflammation ou fibrose cardiaque chez les souris TgN3ICDSM, indiquant que ces dernières seraient protégées contre la fibrose cardiaque. Cependant ces résultats sont à confirmer notamment par une coloration au Rouge Sirius, un immunomarquage de CD68 ou encore l'analyse de l'expression de TGF β . Ces premiers résultats confirment donc le fait que Notch3 est nécessaire à l'adaptation cardiaque à l'HTA induite par l'AngII, et que la surexpression du N3ICD dans les CMLV serait bénéfique. Il est maintenant nécessaire d'étudier le phénotype vasculaire des souris TgN3ICDSM, afin de vérifier si dans ce modèle le maintien de l'intégrité artérielle favorise l'adaptation cardiaque à l'HTA induite par l'AngII. Pour cela il est nécessaire d'effectuer un immunomarquage phalloïdine/ α -SMA, nous permettant de vérifier la morphologie de la média des artères coronaires, que nous supposons hypertrophiée de part le rôle de Notch3 dans la prolifération des CMLV. En effet, Liet *al.*¹²⁴ ont mis en évidence la surexpression de Notch3 dans CMLV lors d'une HTA pulmonaire, et Yang *et al.*¹⁵⁹ ont montré *in vitro* que cette surexpression de Notch3 entraîne la prolifération des CMLV via la voie Hes1/p27Kip1, et donc un épaississement de la média des vaisseaux pulmonaires. Il serait intéressant d'analyser le phénotype sécrétoire ou contractile des CMLV dans notre modèle de souris TgN3ICDSM, car il est possible qu'au

niveau des artères coronaires Notch3 permette le maintien de leur phénotype contractile et évite que les CMLV développent un phénotype sécrétoire.

L'étude invasive de l'hémodynamique rénale de Boulos *et al.* montrait que les souris Notch3 KO présentaient une vasoréactivité diminuée en réponse à un bolus d'AngII³¹³. A l'inverse, notre étude des souris TgN3ICDSM montre qu'elles présentent une vasoréactivité aigue accrue en réponse à l'AngII. Nos résultats confirment donc le rôle de Notch3 dans le tonus myogénique. De plus, nous montrons qu'au niveau cardiaque l'expression d'ACE est diminuée chez les souris TgN3ICDSM, ce qui pourrait s'expliquer par la plus grande sensibilité de ces souris à l'AngII : les vaisseaux étant plus sensibles à l'AngII, l'organisme a moins besoin d'en produire. Il serait intéressant d'étudier la voie de l'AngII dans les souris TgN3ICDSM afin de regarder par exemple si elles possèdent une plus grande quantité de récepteurs AT1 et le niveau d'expression de rénine au niveau rénal.

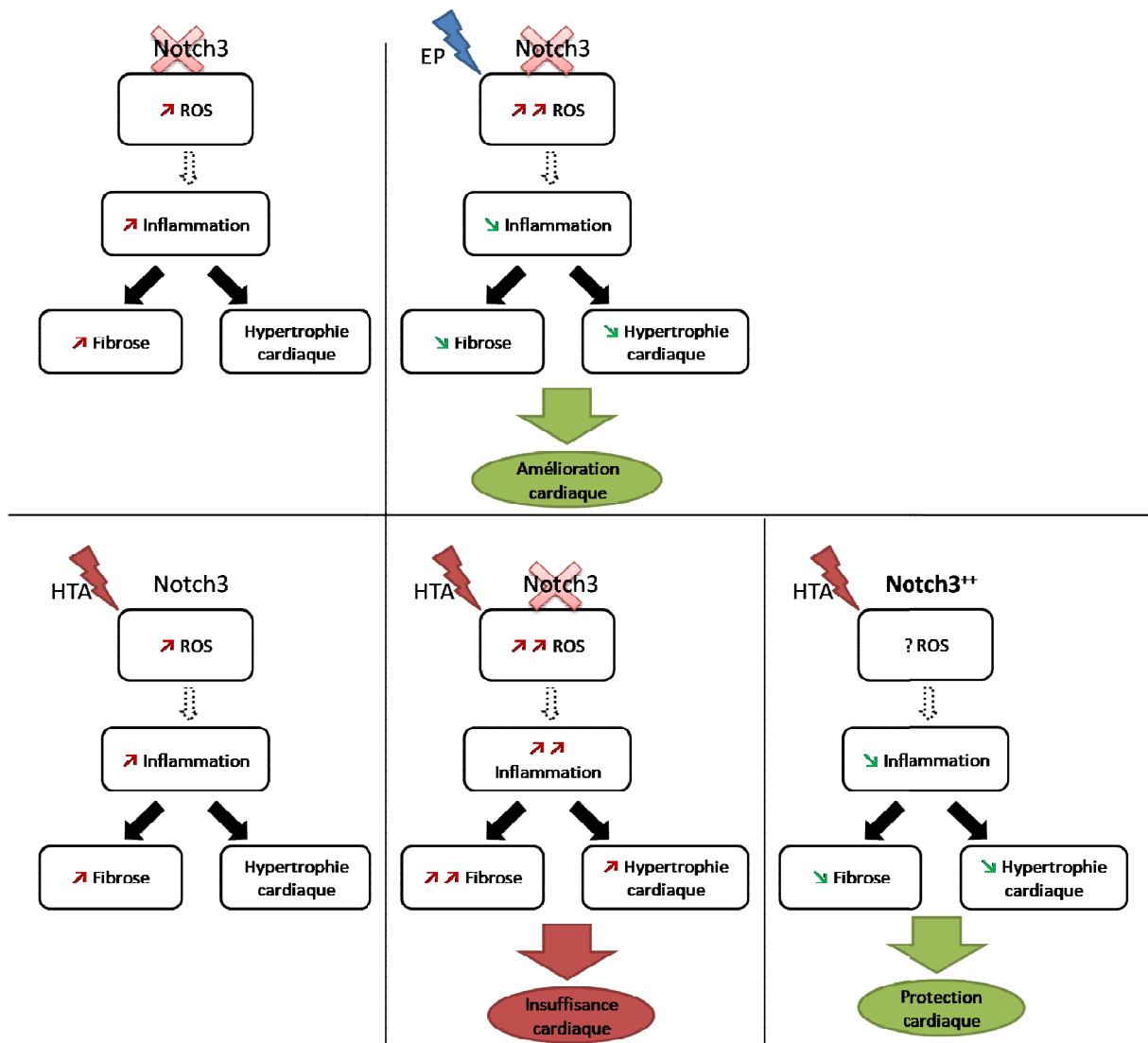


Figure 37 : Schéma bilan du rôle de Notch3 dans le remodelage cardiaque. HTA : hypertension artérielle, ROS : espèces réactives de l'oxygène, EP : exercice physique.

Rôle de la Connexine 43 dans le remodelage rénal

L'insuffisance rénale aiguë (IRA) est un problème majeur de santé publique car elle est associée à une morbidité et une mortalité à court terme relativement élevées (jusqu'à 50%). De plus, un nombre croissant d'études montre que l'IRA peut aboutir *in fine* à une maladie rénale chronique (MRC). Notre équipe a récemment montré que la Cx43 est un régulateur clé de la physiopathologie rénale dans plusieurs modèles expérimentaux de MRC. En effet, la Cx43 est induite lors de la maladie et sa localisation diffère en fonction de son étiologie. De plus, la réduction génétique et pharmacogénétique de Cx43 prévient les dommages tissulaires et améliorent la fonction rénale. Le but de ce travail a donc été d'étudier son implication dans l'IRA et tout particulièrement dans l'IRA induite par ischémie-reperfusion (IR) rénale.

Tout d'abord, nos résultats montrent, chez les souris WT, que suite à une IR rénale la fonction et la structure rénales sont altérées, avec un pic des dommages 48h après la reperfusion. De plus, nous avons montré que la Cx43 était également induite dans ce modèle d'IRA de manière transitoire, avec un pic des ARNm 3h après IR suivi d'un pic de la protéine 48h après IR. Nous avons donc étudié l'effet d'une réduction génétique de Cx43 en étudiant le phénotype des souris hétérozygotes (HE) après IR rénale, une étude avec des souris knock-out étant impossible car l'inactivation constitutive totale de la Cx43 est létale. Nos résultats montrent une protection des souris Cx43 HE contre les dommages induits par l'IRA car elles ont une structure et une fonction rénales améliorées par rapport aux souris WT. Comme dans les modèles expérimentaux de MRC^{282,283}, la réduction de Cx43 protège des dommages structuraux et fonctionnels induits par l'IR rénale.

La Cx43 est connue pour moduler la réponse inflammatoire³¹⁴⁻³¹⁷, nous donc étudié cette dernière dans notre modèle. Après 48h d'IR rénale, les souris Cx43 HE présentent une diminution de l'expression de la protéine pro-inflammatoire Gal-3 ainsi qu'une diminution de l'infiltration des polynucléaires neutrophiles, et une tendance à la diminution de l'expression de IL6 est observée. Nos résultats sont en accord avec la littérature, notamment via la réduction du recrutement neutrophilaire lors de la réduction de Cx43^{318,319}. En effet, Saredine *et al.*³¹⁸ ont ainsi montré chez la souris que les médiateurs inflammatoires, notamment TNF α , augmentent l'expression alvéolaire de la Cx43 afin de favoriser le recrutement de neutrophiles dans l'espace aérien, contribuant ainsi à moduler l'inflammation pulmonaire. Un des mécanismes de l'activation de la réponse inflammatoire via la Cx43 décrit dans la littérature serait via le relargage d'ATP dans le milieu extracellulaire. Les cellules lésées libèrent de l'ATP dans le milieu extracellulaire via des HC Cx43, puis l'ATP va se lier aux récepteurs purinergiques présents à la surface des cellules environnantes. Les macrophages et

polynucléaires neutrophiles vont être ainsi activés et surexprimer à leur surface des HC Cx43 qui, à leur tour, vont relarguer de l'ATP et potentialiser ainsi la réponse inflammatoire^{285,320,321}. Une situation semblable pourrait être envisagée dans la protection visible chez les souris HE pour la Cx43 suite à une IR rénale.

Cependant, les souris Cx43 HE présentent, après 48h d'IR, une expression accrue d'autres marqueurs inflammatoires, ce qui n'est pas cohérent avec ces données. En effet, on observe une augmentation des transcrits codants pour MCP1 et une tendance à l'augmentation des infiltrats macrophagiques. Concernant le rôle de la Cx43 au niveau de la réponse inflammatoire une autre hypothèse apparaît : il se pourrait que le rôle de la Cx43 soit protecteur ou délétère, en fonction du moment où l'étude est faite (lors de la phase initiale donc d'agression ou pendant la phase de réparation). Il a notamment été démontré que la polarisation des macrophages en M1 ou M2 est respectivement plutôt pro-inflammatoire et anti-inflammatoire. Les macrophages M1 vont être présents à des temps précoces, puis laissant leur place au M2 dans les temps tardifs^{322,323}. Il se pourrait alors que la réduction de Cx43 permette une réduction de la phase précoce pro-inflammatoire, limitant les lésions rénales ; ou augmenterai l'efficacité de la phase de réparation ; ou les deux. Pour cela, il serait intéressant d'étudier l'expression des différents marqueurs de polarité macrophagique aux différents temps de reperfusion pour voir si l'une des deux populations est prépondérante. Il serait également intéressant de comparer l'environnement inflammatoire (types cellulaires présents et dosages de cytokines au niveau tissulaires) précoce (24h d'IR) par rapport à l'environnement tardif (72h d'IR). De plus, nous pourrions également regarder plus tardivement, par exemple après un mois pour voir si une différence de réponse fibrosante est visible (la suractivation des macrophages M2 pouvant être néfaste de part la production de fibrose). Cependant, on ne peut pas exclure l'hypothèse selon laquelle la protection observée chez les souris Cx43 HE soit liée à une réparation plus rapide des tubules rénaux causée par une différenciation plus rapide.

Il est aussi connu que la réponse inflammatoire passe par différents mécanismes tels que la libération de médiateurs pro ou anti-inflammatoires, permettant l'activation des cellules inflammatoires mais également leur attraction jusqu'au site lésionnel (ou chimiotactisme). Un des facteurs clé dans cette migration des cellules inflammatoires est leur capacité à adhérer aux cellules lésées. Cette adhésion se fait notamment au niveau de l'endothélium lésé qui va permettre le roulement des leucocytes circulants sur la surface vasculaire, leur adhésion et ensuite la transmigration dans le tissu. De plus, notre équipe a notamment déjà mis en évidence une diminution de l'adhésion cellulaire des macrophages provenant de souris Cx43 HE²⁸². Au regard de

tout cela, nous avons donc étudié différents marqueurs d'adhésion cellulaires suite à l'IR rénale. Chez les souris Cx43 HE, après 48h d'IR, l'expression de VCAM1 est augmentée, alors qu'il n'y a pas de changement protéique de CD146. Il semble donc que la Cx43 module l'expression de VCAM1 dans notre modèle d'agression par IR. Cependant, l'augmentation de VCAM1 chez les souris Cx43 HE après IR est plutôt surprenante car cela est en contradiction avec les données de la littérature. La réduction de Cx43 chez les souris HE devrait entraîner une diminution de ce marqueur, ce que nous avons notamment observé dans les modèles de MCR tels que l'obstruction unilatérale de l'uretère (UUO), la néphropathie hypertensive ou la glomérulonéphrite²⁸²⁻²⁸⁴. L'implication de la Cx43 dans l'adhésion cellulaire lors de la réponse inflammatoire est bien décrit : Parthasarathiet *al.*³²⁴ ont ainsi montré que les JG Cx43 conduisent la vague de Ca²⁺ interendothéliale qui se produit dans les capillaires pulmonaires suite à un stimulus inflammatoire, induisant ainsi une réponse pro-inflammatoire par l'activation de l'expression de la P-Selectine par l'endothélium des veinules, permettant ainsi l'adhérence des leucocytes. La réponse inflammatoire ainsi mise en route, de nombreux médiateurs inflammatoires tels que des cytokines, chimiokines, DAMPs sont libérés dans l'environnement afin d'attirer les cellules inflammatoires jusqu'au site lésionnel. De plus, il est notamment connu que la Cx43 est augmentée lors de l'athérosclérose dans les CMLV, les cellules endothéliales et les leucocytes favorisant alors l'amplification de la réponse inflammatoire³²⁵, et que sa réduction génétique diminue celle-ci chez des souris hypercholestérolémiques³²⁶. Yuan *et al.*³²⁷ ont par la suite montré que dans les cellules endothéliales l'expression de Cx43 régule l'adhérence monocytaire via l'induction de VCAM1 et ICAM1, un événement critique dans le développement de l'athérosclérose. Il a récemment été mis en évidence que ces processus impliquent la Cx43 via la modulation de la voie PI3K/AKT/NFκB. Ainsi, Li *et al.*³²⁸ ont montré que l'élévation de l'expression de la Cx43 endothéliale, dans les HUVEC de femmes hypertendues au cours de leur grossesse, active cette voie d'adhésion monocytaire médiée par les CAMs via l'activation de la voie de signalisation PI3K/AKT/NF-κB. Ce rôle de Cx43 dans la modulation de l'adhésion par l'activation de cette voie de signalisation a également été récemment montré dans la lignée de monocytes U937³²⁹. Cette liaison directe entre Cx43 et NFκB a également été montrée lors d'une HTA³³⁰. Nos premiers résultats allant à l'encontre de la littérature il serait intéressant de rechercher si d'autres marqueurs d'adhésion non modulés dans notre modèle d'IR, et de regarder si la voie PI3K/AKT/NFκB est augmentée dans nos souris Cx43 après 48h d'IR.

Les lésions d'IR résultent de l'agression de deux principaux types cellulaires : les cellules tubulaires rénales et les cellules endothéliales. Etant donné que nous avons précédemment montré que l'expression de la Cx43 augmente dans le type cellulaire lésé, dans différents modèles de

néphropathie expérimentale, nous avons voulu savoir si la délétion ciblée de cette Cx au niveau de ces cellules impactait l'IRA. Pour cela nous avons utilisé des souris conditionnelles invalidées pour la Cx43 : les souris Cx43FloxPax8 Dox+ sont invalidées pour la Cx43 dans les cellules tubulaires et les souris Cx43FloxVeCadh Tam+ sont invalidées pour la Cx43 spécifiquement dans les cellules endothéliales. Après 24h d'IR rénale, nos résultats concernant le phénotype rénal des souris KO spécifiques sont plus ambigus.

En effet, chez les souris Cx43FloxPax8 Dox+, bien qu'on ne note pas d'effet statistiquement significatif sur la fonction ou la structure rénale après 24h d'IR, le phénotype rénal semble plutôt aggravé étant donné que la créatinine, l'urée plasmatiques et le score de dommages tissulaires tendent à l'augmentation par rapport aux contrôles. De manière surprenante l'expression des ARNm des marqueurs de dommages tubulaires KIM1 et NGAL est statistiquement améliorée. Cette différence de réponse peut être due à un décalage dans le temps entre l'expression des ARNm et les répercussions au niveau de la structure rénale : la protection de cette dernière pourrait être visible plus tardivement. De la même façon, certains indices inflammatoires (CD68 et Gal-3) sont aussi diminués chez les souris Cx43FloxPax8 Dox+. En revanche, les marqueurs d'adhésion cellulaire de sont pas différents des souris contrôles. Ainsi, les cellules tubulaires semblent ne pas être impliquées dans la protection rénale contre l'IR visible chez les souris Cx43 HE, bien que l'invalidation de la Cx43 dans ces cellules diminue des marqueurs d'inflammation.

A propos des souris invalidées spécifiquement pour la Cx43 au niveau de cellules endothéliales, les Cx43FloxVeCadh Tam+, on ne dénote pas non plus de différences statistiquement significatives sur la morphométrie et la fonction rénale. Néanmoins, contrairement aux souris Cx43FloxPax8 Dox+, les souris Cx43FloxVeCadh Tam+ présentent une tendance à l'amélioration de la créatinie plasmatique et un score PAS qui tend à la diminution. S'ajoute à cela une diminution attendue de NGAL, mais au contraire une augmentation de l'expression de Kim1. D'autre part, certains indices inflammatoires tissulaires comme le marquage des infiltrats neutrophiles, ainsi que les ARNm de E-selectine, IL-6 et IL-10 tendent à la diminution chez les souris Cx43FloxVeCadh Tam+ par rapport aux contrôles après 24h d'IR. En revanche l'expression de Gal-3, qui est un marqueur d'inflammation, est augmenté chez les souris Cx43FloxVeCadh Tam+. Ainsi nos résultats montrent que la Cx43 des cellules endothéliales pourrait participer à la protection rénale visible chez les souris Cx43 HE, notamment via une modulation modérée de la réponse inflammatoire. Ce résultat modéré peut paraître surprenant aussi car les travaux de l'équipe de Brian Duling ont montrés que la délétion de la Cx43 dans l'endothélium vasculaire diminuait drastiquement l'adhésion et la transmigration leucocytaire chez le hamster, après stimulation avec du TNF α ³³¹. Cependant ces auteurs avaient utilisé un promoteur Tie 2-Cre, qui ne semble pas être spécifique de l'endothélium vasculaire. En

effet, Tie2 est maintenant connu pour être exprimé également par des cellules inflammatoires tels que les monocytes³³².

Un résultat intéressant à noter est la dualité de réponse dans l'expression de Kim1 dans ces deux modèles de souris. Kim1 est considéré comme un marqueur des dommages tubulaires rénaux car la diminution de son expression est corrélée à la sévérité de la maladie rénale^{333,334}. Au regard de leurs fonctions et structures rénales, Kim1 devrait donc être augmenté chez les souris Cx43FloxPax8 Dox+ et diminué chez les souris Cx43FloxVeCadh Tam+, après 24h d'IR, mais l'inverse est observé. Cependant, *Yang et al.*³³⁵ ont montré que Kim1 protège le rein lors d'une agression rénale aigue, via le rôle qu'elle joue dans la phagocytose des corps apoptotiques par les cellules épithéliales rénales. Il serait alors cohérent que la diminution de son expression soit néfaste chez les souris Cx43FloxPax8 Dox+ et, au contraire, que son augmentation soit bénéfique chez les souris Cx43FloxVeCadh Tam+.

Ainsi les souris Cx43 HE sont protégées des lésions induites par l'IR rénale, mais ce n'est pas le cas des souris KO conditionnels. Individuellement, les KO conditionnels ne récapitulent par le phénotype des Cx43 HE, il semble même que parfois les résultats des KO conditionnels soient contraires à ceux vu chez les souris Cx43 HE. Cela pourrait être dû à la différence de timepoint analysé : l'inflammation est un mécanisme dont le schéma d'orchestration est dicté selon le temps. Bien que chez les souris Cx43 HE la protection des dommages rénaux soit visible dès 24h, il se peut que les mécanismes impliqués ne soient pas les mêmes entre 24 et 48h d'IR. Nous avons pris le parti d'étudier les souris conditionnelles à 24h mais il s'est avéré par la suite, quand les n des souris Cx43 HE furent complets, que les pics de dommages rénaux étaient à 48h. Il faudrait donc analyser les souris conditionnelles après 48h d'IR pour une meilleure comparaison avec les souris Cx43 HE.

Nos résultats montrent que l'inflammation est modulée chez les souris Cx43 HE, et il est connu que les cellules inflammatoires comme les monocytes et les neutrophiles expriment aussi à leur surface des HC Cx43 qui semblent promouvoir leur adhésion au niveau de l'endothélium dysfonctionnel^{285,318,326,336-338}. L'absence de Cx43 dans les cellules tubulaires ou les cellules endothéliales ne protégeant pas les souris de l'IR, il se pourrait que la protection visible chez les souris Cx43 HE résulte de sa réduction dans les cellules inflammatoires. Pour vérifier cela il serait intéressant d'étudier l'effet de l'IR rénale chez des souris où la Cx43 est invalidée spécifiquement dans les monocytes/macrophages et/ou neutrophiles. Malheureusement à l'heure actuelle, les systèmes de souris Cre-Lox existants ne permettent pas d'avoir une spécificité absolue et l'efficacité est également variable³³⁹. Une autre possibilité serait de faire du transfert de moelle osseuse entre des souris WT et HE.

Une autre hypothèse, pourrait être que les résultats obtenus chez les souris Cx43 HE ne proviennent pas de l'implication de la Cx43 d'un type cellulaire prépondérant mais des rôles simultanés de Cx43 de différents types cellulaires. Il se pourrait donc que la protection résulte de l'activité conjointe des Cx43 tubulaire, endothéliale et des cellules inflammatoires. Que cela soit l'association de deux types cellulaires ou même des trois. Pour vérifier cela nous pourrions analyser l'effet de l'IR chez des souris double transgéniques Pax8-VeCadh afin de déléter simultanément la Cx43 dans les cellules tubulaires rénales et endothéliales, voir en plus faire du transfert de moelle osseuse avec des souris Cx43 HE si nous voulions étudier l'implication de la réduction de Cx43 dans les cellules inflammatoire comme troisième type cellulaire d'intérêt.

Nos résultats confirment donc que la réduction de Cx43 module la réponse inflammatoire dans notre modèle d'IR rénale. Cependant, certains autres mécanismes que nous n'avons pas étudiés pour le moment restent à être éclaircis.

Tout' d'abord, l'activation de l'inflammation via la Cx43 semble d'autre part résulter de l'activation des HC des cellules tubulaires, qui vont sécréter des facteurs pro-inflammatoires, et même pro-fibrosants via la voie du TGF β . En effet, Hills *et al.*²⁸⁷ ont mis en évidence que l'exposition chronique de cellules tubulaires rénales au TGF β 1, provoqué par de fortes doses de glucose mimant la néphropathie diabétique, induit l'augmentation de l'expression de Cx43. En résulte un fonctionnement accru des HC, augmentant la libération paracrine d'ATP, et donc l'augmentation d'expression d'IL-6 et de fibronectine. Notre équipe a également mis en évidence le lien étroit entre la Cx43 et le TGF β , notamment dans le modèle UUO où l'expression de ce dernier est réduite chez les souris Cx43 HE, et ces souris présentent également une réduction de la fibrose intersitentielle rénale²⁸². Cela confirmant les résultats de Zhang *et al.*³⁴⁰ qui montraient que la réduction de Cx43 atténue le remodelage ventriculaire après un infarctus du myocarde via l'altération de la signalisation du TGF β . Il serait donc intéressant d'analyser, par une coloration au Rouge Sirius ou un trichrome de Masson, si nos souris sont protégées contre une possible fibrose rénale, notamment après 72h d'IR et plus particulièrement à un stade très tardif tel qu'après 1 mois d'IR.

L'inflammation joue un rôle important dans la réponse à l'IR mais n'est pas seule : les mécanismes de mort cellulaire sont aussi très largement impliqués. Ainsi, un autre point intéressant à explorer sera l'induction de la mort cellulaire via la Cx43 après IR rénale. D'autant plus, qu'il est aujourd'hui avéré que la Cx43 joue un rôle dans la transmission des signaux de mort entre cellules adjacentes^{291,341}. Comme décrit dans l'Introduction Chapitre 2.2.b., il existe différents mécanismes de mort cellulaire comprenant notamment la nécrose et l'apoptose. Bien que leur différenciation risque de s'avérer

difficile, nous pourrions analyser l'expression différents acteurs de mort cellulaires tels que Bcl-2, Bax, Caspase 3, RIPK1 et RIPK3 ; mais aussi via un marquage TUNEL. De plus, il serait intéressant d'étudier qui des JG ou des HC ont un rôle prépondérant dans l'induction de la mort cellulaire : est-ce les signaux transmis par l'environnement extracellulaire ou le passage du signal via les cellules adjacentes ? Pour étudier cela nous possédons déjà des peptides bloquants spécifiques de la Cx43. Le Gap19 qui bloque spécifiquement les HC en se liant à la boucle intracellulaire de la Cx43, et le Gap26 qui bloque les GJ car il se lie à la première boucle extracellulaire de la Cx43.

De plus, l'un des médiateurs reconnus d'inflammation et de mort cellulaire sont les ROS. La Cx43 de la membrane cellulaire pourrait notamment relarguer les ROS dans le milieu EC via les HC, ou les utiliser comme message de mort pour les cellules voisines via les JG. Yuan *et al.*³⁴² ont notamment montré que la Cx43 régule la production de ROS entre cellules voisines dans un modèle d'IRA après transplantation hépatique, ce qui induit le stress oxydant et en conséquence active la réponse inflammatoire et la nécroptose ; et l'inhibition de la Cx43 réduit la production de ROS des cellules hépatiques *in vitro*. Le stress oxydant ayant une implication dans les stades précoces de la maladie, il faudrait l'étudier à 3 ou 6h après IR. Pour cela des dosages plasmatiques de 15-F_{2t}-Isoprostane et MDA, mais aussi un marquage tissulaire de DHE sont envisageables.

L'implication de la Cx43 dans l'évolution de l'IRA suite à une IR ne fait pas de doute. Son rôle majeur dans la régulation de l'inflammation est connu et confirmé par nos résultats ; et son rôle dans l'induction de la mort cellulaire est connu mais reste à étudier dans notre modèle. Cependant les différents résultats que nous avons obtenus ne sont pas forcément nets et significatifs. Cela est en partie dû à la grande hétérogénéité du modèle ischémique. En effet, l'IR rénale est un modèle résultant de l'addition de nombreux facteurs et entraînant donc une grande variabilité dans les résultats. Les paramètres critiques sont le temps d'ischémie, la température de la souris pendant la chirurgie et le temps de réveil, ainsi que le clampage efficace du pédicule rénal. S'ajoute à cela le fait que l'IR entraîne des lésions focales, ce qui peut aboutir à la non-concordance des résultats pour un même tissu. Il serait donc judicieux de tester les effets de la réduction génétique de la Cx43 dans un autre modèle d'IRA : l'injection par exemple de cisplatine aux souris Cx43 HE permettrait d'induire une IRA néphrotoxique. Enfin, troisième source d'hétérogénéité : le pourcentage d'inactivation des souris des lignées KO conditionnels. Ce pourcentage n'est sûrement pas le même chez toutes les souris, et est très difficile à quantifier. Malgré toutes ces sources d'hétérogénéité la Cx43 semble tout de même être une cible thérapeutique d'avenir contre l'IRA. Cependant, la réponse inflammatoire étant nécessaire à la réparation tissulaire, par le nettoyage des débris cellulaires induits par l'IR ainsi

que le renouvellement de la MEC pour la cicatrisation tissulaire, le blocage total de la Cx43 ne serait pas souhaitable. Le rôle dose dépendant de la Cx43 a également été mis en évidence dans la physiopathologie de l'athérosclérose : la Cx43 est surexprimée les CMLV contribuant alors au processus pathologique de la maladie³⁴³, son inhibition totale dans ces cellules a été montré comme néfaste³⁴⁴ alors que sa délétion génétique partielle, chez des souris HE, est bénéfique³²⁶.

En conclusion, les données actuelles font donc de la Cx43 une cible thérapeutique prometteuse contre les maladies rénales. D'autant plus qu'il existe déjà à l'heure actuelle des outils qui pourraient être utilisés en thérapeutique : des peptides bloquants spécifique de la Cx43 que sont le Gap 19 et le Gap26. Ils ont déjà été utilisés dans différents modèles expérimentaux de dystrophie musculaire³⁴⁵ ou d'ischémie du myocarde^{346,347} et ont présentés des résultats encourageants. De plus, des essais cliniques réalisés par CoDa Therapeutics, Inc. ont eu lieu concernant l'amélioration de la cicatrisation notamment des plaies cutanées (NCT00736593), de divers ulcères (NCT00820196, NCT01199588 et NCT01490879), et des plaies de la cornée (NCT00654550), à l'aide d'un gel contenant des antisens de la Cx43(Nexagon®)³⁴⁸.

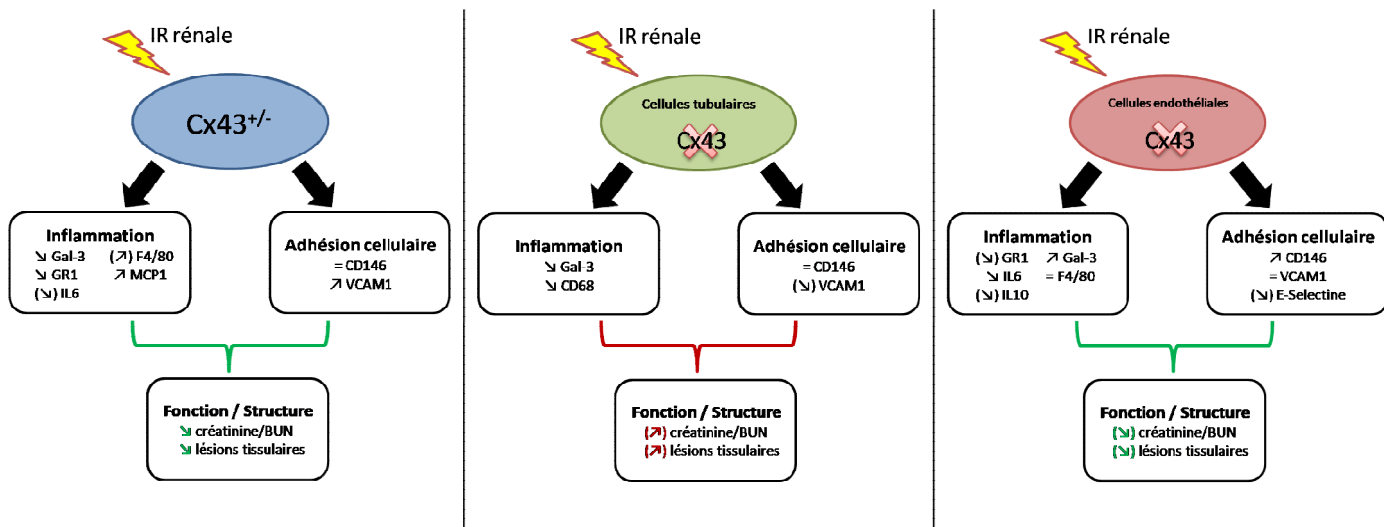


Figure 38 : Schéma bilan du rôle de la Connexine 43 dans le remodelage rénal suite à une IR. IR : ischémie-reperfusion.

Bibliographie

1. Chapman, G. B., Durante, W., Hellums, J. D. & Schafer, A. I. Physiological cyclic stretch causes cell cycle arrest in cultured vascular smooth muscle cells. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* **278**, H748-754 (2000).
2. Cheng, J. *et al.* Mechanical stretch inhibits oxidized low density lipoprotein-induced apoptosis in vascular smooth muscle cells by up-regulating integrin α v β 3 and stabilization of PINCH-1. *J. Biol. Chem.* **282**, 34268–34275 (2007).
3. Albinsson, S. & Hellstrand, P. Integration of signal pathways for stretch-dependent growth and differentiation in vascular smooth muscle. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* **293**, C772-782 (2007).
4. Qu, M.-J. *et al.* Frequency-dependent phenotype modulation of vascular smooth muscle cells under cyclic mechanical strain. *J. Vasc. Res.* **44**, 345–353 (2007).
5. Tang, Y., Yang, X., Friesel, R. E., Vary, C. P. H. & Liaw, L. Mechanisms of TGF- β -induced differentiation in human vascular smooth muscle cells. *J. Vasc. Res.* **48**, 485–494 (2011).
6. Jin, S. *et al.* Notch signaling regulates platelet-derived growth factor receptor-beta expression in vascular smooth muscle cells. *Circ. Res.* **102**, 1483–1491 (2008).
7. Tsaousi, A., Mill, C. & George, S. J. The Wnt pathways in vascular disease: lessons from vascular development. *Curr. Opin. Lipidol.* **22**, 350–357 (2011).
8. Kurpinski, K. *et al.* Transforming growth factor-beta and notch signaling mediate stem cell differentiation into smooth muscle cells. *Stem Cells Dayt. Ohio* **28**, 734–742 (2010).
9. Walsh, K. & Shiojima, I. Cardiac growth and angiogenesis coordinated by intertissue interactions. *J. Clin. Invest.* **117**, 3176–3179 (2007).
10. Ferrara, N., Gerber, H.-P. & LeCouter, J. The biology of VEGF and its receptors. *Nat. Med.* **9**, 669–676 (2003).
11. Sun, X. *et al.* Angiostatin enhances B7.1-mediated cancer immunotherapy independently of effects on vascular endothelial growth factor expression. *Cancer Gene Ther.* **8**, 719–727 (2001).
12. Kendall, R. L., Wang, G. & Thomas, K. A. Identification of a natural soluble form of the vascular endothelial growth factor receptor, FLT-1, and its heterodimerization with KDR. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **226**, 324–328 (1996).
13. Assy, N. *et al.* Effect of vascular endothelial growth factor on hepatic regenerative activity following partial hepatectomy in rats. *J. Hepatol.* **30**, 911–915 (1999).
14. Shibuya, M., Ito, N. & Claesson-Welsh, L. Structure and function of vascular endothelial growth factor receptor-1 and -2. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **237**, 59–83 (1999).
15. Shalaby, F. *et al.* Failure of blood-island formation and vasculogenesis in Flk-1-deficient mice. *Nature* **376**, 62–66 (1995).
16. Shibuya, M. & Claesson-Welsh, L. Signal transduction by VEGF receptors in regulation of angiogenesis and lymphangiogenesis. *Exp. Cell Res.* **312**, 549–560 (2006).
17. Gibbons, G. H. & Dzau, V. J. The emerging concept of vascular remodeling. *N. Engl. J. Med.* **330**, 1431–1438 (1994).
18. Schiffrin, E. L. Remodeling of resistance arteries in essential hypertension and effects of antihypertensive treatment. *Am. J. Hypertens.* **17**, 1192–1200 (2004).
19. Dumont, O., Loufrani, L. & Henrion, D. Key role of the NO-pathway and matrix metalloprotease-9 in high blood flow-induced remodeling of rat resistance arteries. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **27**, 317–324 (2007).
20. Hilgers, R. H. P. *et al.* Uterine artery structural and functional changes during pregnancy in tissue kallikrein-deficient mice. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **23**, 1826–1832 (2003).
21. Huang, A., Wu, Y., Sun, D., Koller, A. & Kaley, G. Effect of estrogen on flow-induced dilation in NO deficiency: role of prostaglandins and EDHF. *J. Appl. Physiol. Bethesda Md* **1985** **91**, 2561–2566 (2001).

22. Berk, B. C. Vascular smooth muscle growth: autocrine growth mechanisms. *Physiol. Rev.* **81**, 999–1030 (2001).
23. Schwartz, S. M., Heimark, R. L. & Majesky, M. W. Developmental mechanisms underlying pathology of arteries. *Physiol. Rev.* **70**, 1177–1209 (1990).
24. Berry, C. L. & Henrichs, K. J. Morphometric investigation of hypertrophy in the arteries of DOCA-hypertensive rats. *J. Pathol.* **136**, 85–94 (1982).
25. Clark, J. M. & Glagov, S. Transmural organization of the arterial media. The lamellar unit revisited. *Arterioscler. Dallas Tex* **5**, 19–34 (1985).
26. Brecher, P., Chan, C. T., Franzblau, C., Faris, B. & Chobanian, A. V. Effects of hypertension and its reversal on aortic metabolism in the rat. *Circ. Res.* **43**, 561–569 (1978).
27. Brassard, P., Amiri, F. & Schiffrin, E. L. Combined angiotensin II type 1 and type 2 receptor blockade on vascular remodeling and matrix metalloproteinases in resistance arteries. *Hypertens. Dallas Tex 1979* **46**, 598–606 (2005).
28. Schiffrin, E. L. Role of endothelin-1 in hypertension and vascular disease. *Am. J. Hypertens.* **14**, 83S-89S (2001).
29. Mordi, I., Mordi, N., Delles, C. & Tzemos, N. Endothelial dysfunction in human essential hypertension. *J. Hypertens.* **34**, 1464–1472 (2016).
30. Chou, T. C., Yen, M. H., Li, C. Y. & Ding, Y. A. Alterations of nitric oxide synthase expression with aging and hypertension in rats. *Hypertens. Dallas Tex 1979* **31**, 643–648 (1998).
31. Tsutsui, M. *et al.* Significance of nitric oxide synthases: Lessons from triple nitric oxide synthases null mice. *J. Pharmacol. Sci.* **127**, 42–52 (2015).
32. Kerr, S. *et al.* Superoxide anion production is increased in a model of genetic hypertension: role of the endothelium. *Hypertens. Dallas Tex 1979* **33**, 1353–1358 (1999).
33. Landmesser, U. *et al.* Oxidation of tetrahydrobiopterin leads to uncoupling of endothelial cell nitric oxide synthase in hypertension. *J. Clin. Invest.* **111**, 1201–1209 (2003).
34. Félétou, M. & Vanhoutte, P. M. Endothelial dysfunction: a multifaceted disorder (The Wiggers Award Lecture). *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* **291**, H985-1002 (2006).
35. Münzel, T., Sinning, C., Post, F., Warnholtz, A. & Schulz, E. Pathophysiology, diagnosis and prognostic implications of endothelial dysfunction. *Ann. Med.* **40**, 180–196 (2008).
36. Lee, J., Bae, E. H., Ma, S. K. & Kim, S. W. Altered Nitric Oxide System in Cardiovascular and Renal Diseases. *Chonnam Med. J.* **52**, 81–90 (2016).
37. Selthofer-Relatić, K., Bošnjak, I. & Kibel, A. Obesity Related Coronary Microvascular Dysfunction: From Basic to Clinical Practice. *Cardiol. Res. Pract.* **2016**, 8173816 (2016).
38. Nava, M., Quiroz, Y., Vaziri, N. & Rodriguez-Iturbe, B. Melatonin reduces renal interstitial inflammation and improves hypertension in spontaneously hypertensive rats. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* **284**, F447-454 (2003).
39. Rodriguez-Iturbe, B., Zhan, C.-D., Quiroz, Y., Sindhu, R. K. & Vaziri, N. D. Antioxidant-rich diet relieves hypertension and reduces renal immune infiltration in spontaneously hypertensive rats. *Hypertens. Dallas Tex 1979* **41**, 341–346 (2003).
40. Kai, H. *et al.* Pressure overload-induced transient oxidative stress mediates perivascular inflammation and cardiac fibrosis through angiotensin II. *Hypertens. Res. Off. J. Jpn. Soc. Hypertens.* **29**, 711–718 (2006).
41. Tran, D. B. & Mahabadi, N. Anatomy, Thorax, Heart Muscles. in *StatPearls* (StatPearls Publishing, 2019).
42. Maron, B. J., Pelliccia, A., Spataro, A. & Granata, M. Reduction in left ventricular wall thickness after deconditioning in highly trained Olympic athletes. *Br. Heart J.* **69**, 125–128 (1993).
43. McMullen, J. R. *et al.* Phosphoinositide 3-kinase(p110alpha) plays a critical role for the induction of physiological, but not pathological, cardiac hypertrophy. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **100**, 12355–12360 (2003).
44. Dorn, G. W. & Force, T. Protein kinase cascades in the regulation of cardiac hypertrophy. *J. Clin. Invest.* **115**, 527–537 (2005).

45. Sciarretta, S., Forte, M., Frati, G. & Sadoshima, J. New Insights Into the Role of mTOR Signaling in the Cardiovascular System. *Circ. Res.* **122**, 489–505 (2018).
46. Nindl, B. C. & Pierce, J. R. Insulin-like growth factor I as a biomarker of health, fitness, and training status. *Med. Sci. Sports Exerc.* **42**, 39–49 (2010).
47. Guo, Y. *et al.* Entanglement of GSK-3 β , β -catenin and TGF- β 1 signaling network to regulate myocardial fibrosis. *J. Mol. Cell. Cardiol.* **110**, 109–120 (2017).
48. Wang, G., Matsuura, I., He, D. & Liu, F. Transforming growth factor- β -inducible phosphorylation of Smad3. *J. Biol. Chem.* **284**, 9663–9673 (2009).
49. Calvert, J. W. *et al.* Exercise protects against myocardial ischemia-reperfusion injury via stimulation of β (3)-adrenergic receptors and increased nitric oxide signaling: role of nitrite and nitrosothiols. *Circ. Res.* **108**, 1448–1458 (2011).
50. Cai, M.-X. *et al.* Exercise training activates neuregulin 1/ErbB signaling and promotes cardiac repair in a rat myocardial infarction model. *Life Sci.* **149**, 1–9 (2016).
51. Fukazawa, R. *et al.* Neuregulin-1 protects ventricular myocytes from anthracycline-induced apoptosis via erbB4-dependent activation of PI3-kinase/Akt. *J. Mol. Cell. Cardiol.* **35**, 1473–1479 (2003).
52. D’Uva, G. *et al.* ERBB2 triggers mammalian heart regeneration by promoting cardiomyocyte dedifferentiation and proliferation. *Nat. Cell Biol.* **17**, 627–638 (2015).
53. Boström, P. *et al.* C/EBP β controls exercise-induced cardiac growth and protects against pathological cardiac remodeling. *Cell* **143**, 1072–1083 (2010).
54. Heiss, H. W. *et al.* Studies on the regulation of myocardial blood flow in man. I.: Training effects on blood flow and metabolism of the healthy heart at rest and during standardized heavy exercise. *Basic Res. Cardiol.* **71**, 658–675 (1976).
55. Pelliccia, A. *et al.* Coronary arteries in physiological hypertrophy: echocardiographic evidence of increased proximal size in elite athletes. *Int. J. Sports Med.* **11**, 120–126 (1990).
56. Laughlin, M. H., Bowles, D. K. & Duncker, D. J. The coronary circulation in exercise training. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* **302**, H10-23 (2012).
57. Tahergorabi, Z. & Khazaei, M. A review on angiogenesis and its assays. *Iran. J. Basic Med. Sci.* **15**, 1110–1126 (2012).
58. Iemitsu, M., Maeda, S., Jesmin, S., Otsuki, T. & Miyauchi, T. Exercise training improves aging-induced downregulation of VEGF angiogenic signaling cascade in hearts. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* **291**, H1290-1298 (2006).
59. Kocovski, L. & Fernandes, J. Sudden cardiac death: a modern pathology approach to hypertrophic cardiomyopathy. *Arch. Pathol. Lab. Med.* **139**, 413–416 (2015).
60. Münch, J. *et al.* Serum Matrix Metalloproteinases as Quantitative Biomarkers for Myocardial Fibrosis and Sudden Cardiac Death Risk Stratification in Patients With Hypertrophic Cardiomyopathy. *J. Card. Fail.* **22**, 845–850 (2016).
61. Pellnitz, C. *et al.* [Sudden cardiac death in familial hypertrophic cardiomyopathy. Identification of high-risk patients]. *Dtsch. Med. Wochenschr.* **130**, 1150–1154 (2005).
62. Kawase, Y. *et al.* Reversal of cardiac dysfunction after long-term expression of SERCA2a by gene transfer in a pre-clinical model of heart failure. *J. Am. Coll. Cardiol.* **51**, 1112–1119 (2008).
63. O’Rourke, B. *et al.* Mechanisms of altered excitation-contraction coupling in canine tachycardia-induced heart failure, I: experimental studies. *Circ. Res.* **84**, 562–570 (1999).
64. Arai, M., Alpert, N. R., MacLennan, D. H., Barton, P. & Periasamy, M. Alterations in sarcoplasmic reticulum gene expression in human heart failure. A possible mechanism for alterations in systolic and diastolic properties of the failing myocardium. *Circ. Res.* **72**, 463–469 (1993).
65. Hasenfuss, G. Alterations of calcium-regulatory proteins in heart failure. *Cardiovasc. Res.* **37**, 279–289 (1998).
66. Bers, D. M. Cardiac sarcoplasmic reticulum calcium leak: basis and roles in cardiac dysfunction. *Annu. Rev. Physiol.* **76**, 107–127 (2014).
67. Haq, S. *et al.* Differential activation of signal transduction pathways in human hearts with hypertrophy versus advanced heart failure. *Circulation* **103**, 670–677 (2001).

68. Li, J., Wang, J., Russell, F. D. & Molenaar, P. Activation of calcineurin in human failing heart ventricle by endothelin-1, angiotensin II and urotensin II. *Br. J. Pharmacol.* **145**, 432–440 (2005).
69. Bueno, O. F., van Rooij, E., Molkenin, J. D., Doevendans, P. A. & De Windt, L. J. Calcineurin and hypertrophic heart disease: novel insights and remaining questions. *Cardiovasc. Res.* **53**, 806–821 (2002).
70. Molkenin, J. D. *et al.* A calcineurin-dependent transcriptional pathway for cardiac hypertrophy. *Cell* **93**, 215–228 (1998).
71. Wilkins, B. J. & Molkenin, J. D. Calcium-calcineurin signaling in the regulation of cardiac hypertrophy. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **322**, 1178–1191 (2004).
72. Zhang, T. *et al.* The cardiac-specific nuclear delta(B) isoform of Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II induces hypertrophy and dilated cardiomyopathy associated with increased protein phosphatase 2A activity. *J. Biol. Chem.* **277**, 1261–1267 (2002).
73. Zhang, T. *et al.* The deltaC isoform of CaMKII is activated in cardiac hypertrophy and induces dilated cardiomyopathy and heart failure. *Circ. Res.* **92**, 912–919 (2003).
74. Zhang, R. *et al.* Calmodulin kinase II inhibition protects against structural heart disease. *Nat. Med.* **11**, 409–417 (2005).
75. Backs, J. *et al.* The delta isoform of CaM kinase II is required for pathological cardiac hypertrophy and remodeling after pressure overload. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **106**, 2342–2347 (2009).
76. Backs, J. & Olson, E. N. Control of cardiac growth by histone acetylation/deacetylation. *Circ. Res.* **98**, 15–24 (2006).
77. Backs, J., Song, K., Bezprozvannaya, S., Chang, S. & Olson, E. N. CaM kinase II selectively signals to histone deacetylase 4 during cardiomyocyte hypertrophy. *J. Clin. Invest.* **116**, 1853–1864 (2006).
78. Kim, Y. *et al.* The MEF2D transcription factor mediates stress-dependent cardiac remodeling in mice. *J. Clin. Invest.* **118**, 124–132 (2008).
79. Nishida, K. *et al.* p38alpha mitogen-activated protein kinase plays a critical role in cardiomyocyte survival but not in cardiac hypertrophic growth in response to pressure overload. *Mol. Cell. Biol.* **24**, 10611–10620 (2004).
80. Wang, L. & Proud, C. G. Ras/Erk signaling is essential for activation of protein synthesis by Gq protein-coupled receptor agonists in adult cardiomyocytes. *Circ. Res.* **91**, 821–829 (2002).
81. Harris, I. S. *et al.* Raf-1 kinase is required for cardiac hypertrophy and cardiomyocyte survival in response to pressure overload. *Circulation* **110**, 718–723 (2004).
82. Kehat, I. *et al.* Extracellular signal-regulated kinases 1 and 2 regulate the balance between eccentric and concentric cardiac growth. *Circ. Res.* **108**, 176–183 (2011).
83. Cook, S. A., Sugden, P. H. & Clerk, A. Activation of c-Jun N-terminal kinases and p38-mitogen-activated protein kinases in human heart failure secondary to ischaemic heart disease. *J. Mol. Cell. Cardiol.* **31**, 1429–1434 (1999).
84. Choukroun, G. *et al.* Regulation of cardiac hypertrophy in vivo by the stress-activated protein kinases/c-Jun NH2-terminal kinases. *J. Clin. Invest.* **104**, 391–398 (1999).
85. Braz, J. C. *et al.* Targeted inhibition of p38 MAPK promotes hypertrophic cardiomyopathy through upregulation of calcineurin-NFAT signaling. *J. Clin. Invest.* **111**, 1475–1486 (2003).
86. Liang, Q. *et al.* c-Jun N-terminal kinases (JNK) antagonize cardiac growth through cross-talk with calcineurin-NFAT signaling. *EMBO J.* **22**, 5079–5089 (2003).
87. Bueno, O. F. *et al.* The MEK1-ERK1/2 signaling pathway promotes compensated cardiac hypertrophy in transgenic mice. *EMBO J.* **19**, 6341–6350 (2000).
88. Sadoshima, J. *et al.* The MEK1-JNK pathway plays a protective role in pressure overload but does not mediate cardiac hypertrophy. *J. Clin. Invest.* **110**, 271–279 (2002).
89. Zhang, S. *et al.* The role of the Grb2-p38 MAPK signaling pathway in cardiac hypertrophy and fibrosis. *J. Clin. Invest.* **111**, 833–841 (2003).
90. Weber, K. T. & Brilla, C. G. Pathological hypertrophy and cardiac interstitium. Fibrosis and renin-angiotensin-aldosterone system. *Circulation* **83**, 1849–1865 (1991).
91. Chilton, L., Giles, W. R. & Smith, G. L. Evidence of intercellular coupling between co-cultured adult rabbit ventricular myocytes and myofibroblasts. *J. Physiol.* **583**, 225–236 (2007).

92. Brower, G. L. *et al.* The relationship between myocardial extracellular matrix remodeling and ventricular function. *Eur. J. Cardio-Thorac. Surg. Off. J. Eur. Assoc. Cardio-Thorac. Surg.* **30**, 604–610 (2006).
93. Heldin, C. H., Miyazono, K. & ten Dijke, P. TGF-beta signalling from cell membrane to nucleus through SMAD proteins. *Nature* **390**, 465–471 (1997).
94. Khan, R. & Sheppard, R. Fibrosis in heart disease: understanding the role of transforming growth factor-beta in cardiomyopathy, valvular disease and arrhythmia. *Immunology* **118**, 10–24 (2006).
95. Rosenkranz, S. TGF-beta1 and angiotensin networking in cardiac remodeling. *Cardiovasc. Res.* **63**, 423–432 (2004).
96. Brooks, W. W. & Conrad, C. H. Myocardial fibrosis in transforming growth factor beta(1)heterozygous mice. *J. Mol. Cell. Cardiol.* **32**, 187–195 (2000).
97. Rosenkranz, S. *et al.* Alterations of beta-adrenergic signaling and cardiac hypertrophy in transgenic mice overexpressing TGF-beta(1). *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* **283**, H1253-1262 (2002).
98. Schiller, M., Javelaud, D. & Mauviel, A. TGF-beta-induced SMAD signaling and gene regulation: consequences for extracellular matrix remodeling and wound healing. *J. Dermatol. Sci.* **35**, 83–92 (2004).
99. Kawano, H. *et al.* Angiotensin II has multiple profibrotic effects in human cardiac fibroblasts. *Circulation* **101**, 1130–1137 (2000).
100. Shibasaki, Y. *et al.* Impact of the angiotensin II receptor antagonist, losartan, on myocardial fibrosis in patients with end-stage renal disease: assessment by ultrasonic integrated backscatter and biochemical markers. *Hypertens. Res. Off. J. Jpn. Soc. Hypertens.* **28**, 787–795 (2005).
101. Baumgarten, G. *et al.* Load-dependent and -independent regulation of proinflammatory cytokine and cytokine receptor gene expression in the adult mammalian heart. *Circulation* **105**, 2192–2197 (2002).
102. Aker, S. *et al.* Serum but not myocardial TNF-alpha concentration is increased in pacing-induced heart failure in rabbits. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* **285**, R463-469 (2003).
103. Aukrust, P. *et al.* Cytokine network in congestive heart failure secondary to ischemic or idiopathic dilated cardiomyopathy. *Am. J. Cardiol.* **83**, 376–382 (1999).
104. Petretta, M. *et al.* Circulating levels of cytokines and their site of production in patients with mild to severe chronic heart failure. *Am. Heart J.* **140**, E28 (2000).
105. Ma, F. *et al.* Macrophage-stimulated cardiac fibroblast production of IL-6 is essential for TGF β /Smad activation and cardiac fibrosis induced by angiotensin II. *PLoS One* **7**, e35144 (2012).
106. Zhao, L. *et al.* Deletion of Interleukin-6 Attenuates Pressure Overload-Induced Left Ventricular Hypertrophy and Dysfunction. *Circ. Res.* **118**, 1918–1929 (2016).
107. Sharma, S. *et al.* Intramyocardial lipid accumulation in the failing human heart resembles the lipotoxic rat heart. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* **18**, 1692–1700 (2004).
108. Zhang, P. *et al.* AMP activated protein kinase-alpha2 deficiency exacerbates pressure-overload-induced left ventricular hypertrophy and dysfunction in mice. *Hypertens. Dallas Tex 1979* **52**, 918–924 (2008).
109. Azibani, F. *et al.* Aldosterone inhibits antifibrotic factors in mouse hypertensive heart. *Hypertens. Dallas Tex 1979* **59**, 1179–1187 (2012).
110. Prud'homme, M. *et al.* Acute Kidney Injury Induces Remote Cardiac Damage and Dysfunction Through the Galectin-3 Pathway. *JACC Basic Transl. Sci.* **4**, 717–732 (2019).
111. Huynh, K., Bernardo, B. C., McMullen, J. R. & Ritchie, R. H. Diabetic cardiomyopathy: mechanisms and new treatment strategies targeting antioxidant signaling pathways. *Pharmacol. Ther.* **142**, 375–415 (2014).
112. Keith, M. *et al.* Increased oxidative stress in patients with congestive heart failure. *J. Am. Coll. Cardiol.* **31**, 1352–1356 (1998).
113. McMurray, J., Chopra, M., Abdullah, I., Smith, W. E. & Dargie, H. J. Evidence of oxidative stress in chronic heart failure in humans. *Eur. Heart J.* **14**, 1493–1498 (1993).

114. Liu, J.-C. *et al.* The inhibitory effect of trilinolein on norepinephrine-induced beta-myosin heavy chain promoter activity, reactive oxygen species generation, and extracellular signal-regulated kinase phosphorylation in neonatal rat cardiomyocytes. *J. Biomed. Sci.* **11**, 11–18 (2004).
115. Laskowski, A. *et al.* Antioxidant actions contribute to the antihypertrophic effects of atrial natriuretic peptide in neonatal rat cardiomyocytes. *Cardiovasc. Res.* **72**, 112–123 (2006).
116. Murdoch, C. E., Zhang, M., Cave, A. C. & Shah, A. M. NADPH oxidase-dependent redox signalling in cardiac hypertrophy, remodelling and failure. *Cardiovasc. Res.* **71**, 208–215 (2006).
117. Takimoto, E. & Kass, D. A. Role of oxidative stress in cardiac hypertrophy and remodeling. *Hypertens. Dallas Tex 1979* **49**, 241–248 (2007).
118. Vaziri, N. D. Causal link between oxidative stress, inflammation, and hypertension. *Iran. J. Kidney Dis.* **2**, 1–10 (2008).
119. Münzel, T., Gori, T., Keaney, J. F., Maack, C. & Daiber, A. Pathophysiological role of oxidative stress in systolic and diastolic heart failure and its therapeutic implications. *Eur. Heart J.* **36**, 2555–2564 (2015).
120. Domenga, V. *et al.* Notch3 is required for arterial identity and maturation of vascular smooth muscle cells. *Genes Dev.* **18**, 2730–2735 (2004).
121. Campos, A. H., Wang, W., Pollman, M. J. & Gibbons, G. H. Determinants of Notch-3 receptor expression and signaling in vascular smooth muscle cells: implications in cell-cycle regulation. *Circ. Res.* **91**, 999–1006 (2002).
122. Belin de Chantemèle, E. J. *et al.* Notch3 is a major regulator of vascular tone in cerebral and tail resistance arteries. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **28**, 2216–2224 (2008).
123. Joutel, A. *et al.* Cerebrovascular dysfunction and microcirculation rarefaction precede white matter lesions in a mouse genetic model of cerebral ischemic small vessel disease. *J. Clin. Invest.* **120**, 433–445 (2010).
124. Li, X. *et al.* Notch3 signaling promotes the development of pulmonary arterial hypertension. *Nat. Med.* **15**, 1289–1297 (2009).
125. Kidd, S. & Lieber, T. Furin cleavage is not a requirement for Drosophila Notch function. *Mech. Dev.* **115**, 41–51 (2002).
126. Hofmann, J. J. & Iruela-Arispe, M. L. Notch signaling in blood vessels: who is talking to whom about what? *Circ. Res.* **100**, 1556–1568 (2007).
127. Dawson, S. R., Turner, D. L., Weintraub, H. & Parkhurst, S. M. Specificity for the hairy/enhancer of split basic helix-loop-helix (bHLH) proteins maps outside the bHLH domain and suggests two separable modes of transcriptional repression. *Mol. Cell. Biol.* **15**, 6923–6931 (1995).
128. Chin, M. T. *et al.* Cardiovascular basic helix loop helix factor 1, a novel transcriptional repressor expressed preferentially in the developing and adult cardiovascular system. *J. Biol. Chem.* **275**, 6381–6387 (2000).
129. Fischer, A., Schumacher, N., Maier, M., Sendtner, M. & Gessler, M. The Notch target genes Hey1 and Hey2 are required for embryonic vascular development. *Genes Dev.* **18**, 901–911 (2004).
130. Henderson, A. M., Wang, S. J., Taylor, A. C., Aitkenhead, M. & Hughes, C. C. The basic helix-loop-helix transcription factor HESR1 regulates endothelial cell tube formation. *J. Biol. Chem.* **276**, 6169–6176 (2001).
131. Kitagawa, M. *et al.* Hes1 and Hes5 regulate vascular remodeling and arterial specification of endothelial cells in brain vascular development. *Mech. Dev.* **130**, 458–466 (2013).
132. Fang, T. C. *et al.* Notch directly regulates Gata3 expression during T helper 2 cell differentiation. *Immunity* **27**, 100–110 (2007).
133. Iso, T. *et al.* Dll4-selective Notch signaling induces ephrinB2 gene expression in endothelial cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **341**, 708–714 (2006).
134. Nosedá, M. *et al.* Smooth Muscle alpha-actin is a direct target of Notch/CSL. *Circ. Res.* **98**, 1468–1470 (2006).

135. Loirand, G., Guérin, P. & Pacaud, P. Rho kinases in cardiovascular physiology and pathophysiology. *Circ. Res.* **98**, 322–334 (2006).
136. Takaishi, K., Sasaki, T., Kotani, H., Nishioka, H. & Takai, Y. Regulation of cell-cell adhesion by rac and rho small G proteins in MDCK cells. *J. Cell Biol.* **139**, 1047–1059 (1997).
137. Nelson, C. M., Pirone, D. M., Tan, J. L. & Chen, C. S. Vascular endothelial-cadherin regulates cytoskeletal tension, cell spreading, and focal adhesions by stimulating RhoA. *Mol. Biol. Cell* **15**, 2943–2953 (2004).
138. Sweeney, C. *et al.* Notch 1 and 3 receptor signaling modulates vascular smooth muscle cell growth, apoptosis, and migration via a CBF-1/RBP-Jk dependent pathway. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* **18**, 1421–1423 (2004).
139. Haritunians, T. *et al.* Functional analysis of a recurrent missense mutation in Notch3 in CADASIL. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* **76**, 1242–1248 (2005).
140. Peters, N. *et al.* CADASIL-associated Notch3 mutations have differential effects both on ligand binding and ligand-induced Notch3 receptor signaling through RBP-Jk. *Exp. Cell Res.* **299**, 454–464 (2004).
141. Joutel, A., Monet, M., Domenga, V., Riant, F. & Tournier-Lasserre, E. Pathogenic mutations associated with cerebral autosomal dominant arteriopathy with subcortical infarcts and leukoencephalopathy differently affect Jagged1 binding and Notch3 activity via the RBP/JK signaling Pathway. *Am. J. Hum. Genet.* **74**, 338–347 (2004).
142. Yao, M. *et al.* Dilated perivascular spaces in small-vessel disease: a study in CADASIL. *Cerebrovasc. Dis. Basel Switz.* **37**, 155–163 (2014).
143. Ruchoux, M. M. *et al.* Systemic vascular smooth muscle cell impairment in cerebral autosomal dominant arteriopathy with subcortical infarcts and leukoencephalopathy. *Acta Neuropathol. (Berl.)* **89**, 500–512 (1995).
144. Bergmann, M. *et al.* Cerebral autosomal dominant arteriopathy with subcortical infarcts and leukoencephalopathy (CADASIL): a morphological study of a German family. *Acta Neuropathol. (Berl.)* **92**, 341–350 (1996).
145. Ishiko, A. *et al.* Notch3 ectodomain is a major component of granular osmiophilic material (GOM) in CADASIL. *Acta Neuropathol. (Berl.)* **112**, 333–339 (2006).
146. Wallays Goedele *et al.* Notch3 Arg170Cys Knock-In Mice Display Pathologic and Clinical Features of the Neurovascular Disorder Cerebral Autosomal Dominant Arteriopathy With Subcortical Infarcts and Leukoencephalopathy. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **31**, 2881–2888 (2011).
147. Baron-Menguy, C., Domenga-Denier, V., Ghezali, L., Faraci, F. M. & Joutel, A. Increased Notch3 Activity Mediates Pathological Changes in Structure of Cerebral Arteries. *Hypertens. Dallas Tex 1979* **69**, 60–70 (2017).
148. Joutel, A. Pathogenesis of CADASIL: transgenic and knock-out mice to probe function and dysfunction of the mutated gene, Notch3, in the cerebrovasculature. *BioEssays News Rev. Mol. Cell. Dev. Biol.* **33**, 73–80 (2011).
149. Lesnik Oberstein, S. A. J. *et al.* Myocardial infarction in cerebral autosomal dominant arteriopathy with subcortical infarcts and leukoencephalopathy (CADASIL). *Medicine (Baltimore)* **82**, 251–256 (2003).
150. Cumurciuc, R. *et al.* Electrocardiogram in cerebral autosomal dominant arteriopathy with subcortical infarcts and leukoencephalopathy patients without any clinical evidence of coronary artery disease: a case-control study. *Stroke* **37**, 1100–1102 (2006).
151. Rubin, C. B., Hahn, V., Kobayashi, T. & Litwack, A. A Report of Accelerated Coronary Artery Disease Associated with Cerebral Autosomal Dominant Arteriopathy with Subcortical Infarcts and Leukoencephalopathy. *Case Rep. Cardiol.* **2015**, 167513 (2015).
152. Opherk, C., Peters, N., Herzog, J., Luedtke, R. & Dichgans, M. Long-term prognosis and causes of death in CADASIL: a retrospective study in 411 patients. *Brain J. Neurol.* **127**, 2533–2539 (2004).

153. Rufa, A. *et al.* Cardiac autonomic nervous system and risk of arrhythmias in cerebral autosomal dominant arteriopathy with subcortical infarcts and leukoencephalopathy (CADASIL). *Stroke* **38**, 276–280 (2007).
154. Piccirillo, G. *et al.* Increased QT variability in cerebral autosomal dominant arteriopathy with subcortical infarcts and leukoencephalopathy. *Eur. J. Neurol.* **15**, 1216–1221 (2008).
155. Guignabert, C. & Dorfmüller, P. Pathology and pathobiology of pulmonary hypertension. *Semin. Respir. Crit. Care Med.* **34**, 551–559 (2013).
156. Montani, D. *et al.* Pulmonary arterial hypertension. *Orphanet J. Rare Dis.* **8**, 97 (2013).
157. Tajsic, T. & Morrell, N. W. Smooth muscle cell hypertrophy, proliferation, migration and apoptosis in pulmonary hypertension. *Compr. Physiol.* **1**, 295–317 (2011).
158. Chida, A. *et al.* Mutations of NOTCH3 in childhood pulmonary arterial hypertension. *Mol. Genet. Genomic Med.* **2**, 229–239 (2014).
159. Song, Y. *et al.* Activation of Notch3 promotes pulmonary arterial smooth muscle cells proliferation via Hes1/p27Kip1 signaling pathway. *FEBS Open Bio* **5**, 656–660 (2015).
160. Clermont, G. *et al.* Renal failure in the ICU: comparison of the impact of acute renal failure and end-stage renal disease on ICU outcomes. *Kidney Int.* **62**, 986–996 (2002).
161. Wonnacott, A., Meran, S., Amphlett, B., Talabani, B. & Phillips, A. Epidemiology and outcomes in community-acquired versus hospital-acquired AKI. *Clin. J. Am. Soc. Nephrol. CJASN* **9**, 1007–1014 (2014).
162. Uchino, S., Bellomo, R., Bagshaw, S. M. & Goldsmith, D. Transient azotaemia is associated with a high risk of death in hospitalized patients. *Nephrol. Dial. Transplant. Off. Publ. Eur. Dial. Transpl. Assoc. - Eur. Ren. Assoc.* **25**, 1833–1839 (2010).
163. Case, J., Khan, S., Khalid, R. & Khan, A. Epidemiology of acute kidney injury in the intensive care unit. *Crit. Care Res. Pract.* **2013**, 479730 (2013).
164. Hsu, R. K. & Hsu, C.-Y. The Role of Acute Kidney Injury in Chronic Kidney Disease. *Semin. Nephrol.* **36**, 283–292 (2016).
165. Ortiz, A. *et al.* Translational value of animal models of kidney failure. *Eur. J. Pharmacol.* **759**, 205–220 (2015).
166. Bonventre, J. V. & Yang, L. Cellular pathophysiology of ischemic acute kidney injury. *J. Clin. Invest.* **121**, 4210–4221 (2011).
167. Le Clef, N., Verhulst, A., D’Haese, P. C. & Vervaet, B. A. Unilateral Renal Ischemia-Reperfusion as a Robust Model for Acute to Chronic Kidney Injury in Mice. *PLoS One* **11**, e0152153 (2016).
168. Salvadori, M., Rosso, G. & Bertoni, E. Update on ischemia-reperfusion injury in kidney transplantation: Pathogenesis and treatment. *World J. Transplant.* **5**, 52–67 (2015).
169. Gottlieb, R. A. & Engler, R. L. Apoptosis in myocardial ischemia-reperfusion. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **874**, 412–426 (1999).
170. Quesnelle, K. M., Bystrom, P. V. & Toledo-Pereyra, L. H. Molecular responses to ischemia and reperfusion in the liver. *Arch. Toxicol.* **89**, 651–657 (2015).
171. Lieberthal, W., Menza, S. A. & Levine, J. S. Graded ATP depletion can cause necrosis or apoptosis of cultured mouse proximal tubular cells. *Am. J. Physiol.* **274**, F315–327 (1998).
172. Broughton, B. R. S., Reutens, D. C. & Sobey, C. G. Apoptotic mechanisms after cerebral ischemia. *Stroke* **40**, e331–339 (2009).
173. Kroemer, G., Galluzzi, L. & Brenner, C. Mitochondrial membrane permeabilization in cell death. *Physiol. Rev.* **87**, 99–163 (2007).
174. Whelan, R. S., Kaplinskiy, V. & Kitsis, R. N. Cell death in the pathogenesis of heart disease: mechanisms and significance. *Annu. Rev. Physiol.* **72**, 19–44 (2010).
175. Wolfs, T. G. A. M. *et al.* Apoptotic cell death is initiated during normothermic ischemia in human kidneys. *Am. J. Transplant. Off. J. Am. Soc. Transplant. Am. Soc. Transpl. Surg.* **5**, 68–75 (2005).
176. Han, S. J. *et al.* Mitochondrial NADP⁺-Dependent Isocitrate Dehydrogenase Deficiency Exacerbates Mitochondrial and Cell Damage after Kidney Ischemia-Reperfusion Injury. *J. Am. Soc. Nephrol. JASN* **28**, 1200–1215 (2017).

177. Shen, S. *et al.* The protective effects of ischemic preconditioning on rats with renal ischemia-reperfusion injury and the effects on the expression of Bcl-2 and Bax. *Exp. Ther. Med.* **14**, 4077–4082 (2017).
178. Wei, Q., Dong, G., Chen, J.-K., Ramesh, G. & Dong, Z. Bax and Bak have critical roles in ischemic acute kidney injury in global and proximal tubule-specific knockout mouse models. *Kidney Int.* **84**, 138–148 (2013).
179. Schrier, R. W., Arnold, P. E., Van Putten, V. J. & Burke, T. J. Cellular calcium in ischemic acute renal failure: role of calcium entry blockers. *Kidney Int.* **32**, 313–321 (1987).
180. Moquin, D. & Chan, F. K.-M. The molecular regulation of programmed necrotic cell injury. *Trends Biochem. Sci.* **35**, 434–441 (2010).
181. Smith, C. C. T. & Yellon, D. M. Necroptosis, necrostatins and tissue injury. *J. Cell. Mol. Med.* **15**, 1797–1806 (2011).
182. Morgan, M. J., Kim, Y.-S. & Liu, Z. TNFalpha and reactive oxygen species in necrotic cell death. *Cell Res.* **18**, 343–349 (2008).
183. Vandenaabeele, P., Declercq, W., Van Herreweghe, F. & Vanden Berghe, T. The role of the kinases RIP1 and RIP3 in TNF-induced necrosis. *Sci. Signal.* **3**, re4 (2010).
184. von Mässenhausen, A. *et al.* Phenytoin inhibits necroptosis. *Cell Death Dis.* **9**, 359 (2018).
185. Linkermann, A. *et al.* Two independent pathways of regulated necrosis mediate ischemia-reperfusion injury. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **110**, 12024–12029 (2013).
186. Awad, A. S. *et al.* Compartmentalization of neutrophils in the kidney and lung following acute ischemic kidney injury. *Kidney Int.* **75**, 689–698 (2009).
187. Kinsey, G. R., Li, L. & Okusa, M. D. Inflammation in acute kidney injury. *Nephron Exp. Nephrol.* **109**, e102-107 (2008).
188. Jang, H. R. & Rabb, H. The innate immune response in ischemic acute kidney injury. *Clin. Immunol. Orlando Fla* **130**, 41–50 (2009).
189. Li, L. *et al.* The chemokine receptors CCR2 and CX3CR1 mediate monocyte/macrophage trafficking in kidney ischemia-reperfusion injury. *Kidney Int.* **74**, 1526–1537 (2008).
190. Neto, J. S. *et al.* Protection of transplant-induced renal ischemia-reperfusion injury with carbon monoxide. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* **287**, F979-989 (2004).
191. Kosieradzki, M. & Rowiński, W. Ischemia/reperfusion injury in kidney transplantation: mechanisms and prevention. *Transplant. Proc.* **40**, 3279–3288 (2008).
192. Kolaczowska, E. & Kubes, P. Neutrophil recruitment and function in health and inflammation. *Nat. Rev. Immunol.* **13**, 159–175 (2013).
193. Chaturvedi, S. *et al.* Slit2 prevents neutrophil recruitment and renal ischemia-reperfusion injury. *J. Am. Soc. Nephrol. JASN* **24**, 1274–1287 (2013).
194. Yago, T. *et al.* Blocking neutrophil integrin activation prevents ischemia-reperfusion injury. *J. Exp. Med.* **212**, 1267–1281 (2015).
195. Kelly, K. J. *et al.* Intercellular adhesion molecule-1-deficient mice are protected against ischemic renal injury. *J. Clin. Invest.* **97**, 1056–1063 (1996).
196. Li, L. *et al.* NKT cell activation mediates neutrophil IFN-gamma production and renal ischemia-reperfusion injury. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **178**, 5899–5911 (2007).
197. Rauch, I., Müller, M. & Decker, T. The regulation of inflammation by interferons and their STATs. *JAK-STAT* **2**, e23820 (2013).
198. Zhang, X. & Mosser, D. M. Macrophage activation by endogenous danger signals. *J. Pathol.* **214**, 161–178 (2008).
199. Mosser, D. M. The many faces of macrophage activation. *J. Leukoc. Biol.* **73**, 209–212 (2003).
200. Lawrence, T. & Natoli, G. Transcriptional regulation of macrophage polarization: enabling diversity with identity. *Nat. Rev. Immunol.* **11**, 750–761 (2011).
201. Jo, S.-K., Sung, S.-A., Cho, W.-Y., Go, K.-J. & Kim, H.-K. Macrophages contribute to the initiation of ischaemic acute renal failure in rats. *Nephrol. Dial. Transplant. Off. Publ. Eur. Dial. Transpl. Assoc. - Eur. Ren. Assoc.* **21**, 1231–1239 (2006).

202. Lu, L. *et al.* Depletion of macrophages and dendritic cells in ischemic acute kidney injury. *Am. J. Nephrol.* **35**, 181–190 (2012).
203. Day, Y.-J., Huang, L., Ye, H., Linden, J. & Okusa, M. D. Renal ischemia-reperfusion injury and adenosine 2A receptor-mediated tissue protection: role of macrophages. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* **288**, F722–731 (2005).
204. Huen, S. C. & Cantley, L. G. Macrophages in Renal Injury and Repair. *Annu. Rev. Physiol.* **79**, 449–469 (2017).
205. Takeda, K. *et al.* Essential role of Stat6 in IL-4 signalling. *Nature* **380**, 627–630 (1996).
206. Szanto, A. *et al.* STAT6 transcription factor is a facilitator of the nuclear receptor PPAR γ -regulated gene expression in macrophages and dendritic cells. *Immunity* **33**, 699–712 (2010).
207. Odegaard, J. I. *et al.* Macrophage-specific PPAR γ controls alternative activation and improves insulin resistance. *Nature* **447**, 1116–1120 (2007).
208. Martinez, F. O., Helming, L. & Gordon, S. Alternative activation of macrophages: an immunologic functional perspective. *Annu. Rev. Immunol.* **27**, 451–483 (2009).
209. Lee, S. *et al.* Distinct macrophage phenotypes contribute to kidney injury and repair. *J. Am. Soc. Nephrol. JASN* **22**, 317–326 (2011).
210. Morris, S. M. Recent advances in arginine metabolism: roles and regulation of the arginases. *Br. J. Pharmacol.* **157**, 922–930 (2009).
211. Miller, S. B., Martin, D. R., Kissane, J. & Hammerman, M. R. Insulin-like growth factor I accelerates recovery from ischemic acute tubular necrosis in the rat. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **89**, 11876–11880 (1992).
212. Filardy, A. A. *et al.* Proinflammatory clearance of apoptotic neutrophils induces an IL-12(low)IL-10(high) regulatory phenotype in macrophages. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **185**, 2044–2050 (2010).
213. Fadok, V. A. *et al.* Macrophages that have ingested apoptotic cells in vitro inhibit proinflammatory cytokine production through autocrine/paracrine mechanisms involving TGF- β , PGE $_2$, and PAF. *J. Clin. Invest.* **101**, 890–898 (1998).
214. Jang, H.-S., Kim, J., Park, Y.-K. & Park, K. M. Infiltrated macrophages contribute to recovery after ischemic injury but not to ischemic preconditioning in kidneys. *Transplantation* **85**, 447–455 (2008).
215. Lin, S.-L. *et al.* Macrophage Wnt7b is critical for kidney repair and regeneration. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **107**, 4194–4199 (2010).
216. Vinuesa, E. *et al.* Macrophage involvement in the kidney repair phase after ischaemia/reperfusion injury. *J. Pathol.* **214**, 104–113 (2008).
217. Rabb, H. *et al.* Pathophysiological role of T lymphocytes in renal ischemia-reperfusion injury in mice. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* **279**, F525–531 (2000).
218. Savransky, V. *et al.* Role of the T-cell receptor in kidney ischemia-reperfusion injury. *Kidney Int.* **69**, 233–238 (2006).
219. Burne, M. J. *et al.* Identification of the CD4(+) T cell as a major pathogenic factor in ischemic acute renal failure. *J. Clin. Invest.* **108**, 1283–1290 (2001).
220. Day, Y.-J. *et al.* Renal ischemia-reperfusion injury and adenosine 2A receptor-mediated tissue protection: the role of CD4+ T cells and IFN- γ . *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **176**, 3108–3114 (2006).
221. Linfert, D., Chowdhry, T. & Rabb, H. Lymphocytes and ischemia-reperfusion injury. *Transplant. Rev. Orlando Fla* **23**, 1–10 (2009).
222. Burne-Taney, M. J. *et al.* B cell deficiency confers protection from renal ischemia reperfusion injury. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **171**, 3210–3215 (2003).
223. Jang, H. R. *et al.* B cells limit repair after ischemic acute kidney injury. *J. Am. Soc. Nephrol. JASN* **21**, 654–665 (2010).
224. Dong, X. *et al.* Resident dendritic cells are the predominant TNF-secreting cell in early renal ischemia-reperfusion injury. *Kidney Int.* **71**, 619–628 (2007).

225. John, R. & Nelson, P. J. Dendritic cells in the kidney. *J. Am. Soc. Nephrol. JASN* **18**, 2628–2635 (2007).
226. Thurman, J. M. *et al.* C3a is required for the production of CXC chemokines by tubular epithelial cells after renal ischemia/reperfusion. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **178**, 1819–1828 (2007).
227. Zhou, W. *et al.* Predominant role for C5b-9 in renal ischemia/reperfusion injury. *J. Clin. Invest.* **105**, 1363–1371 (2000).
228. Abe, K., Li, K., Sacks, S. H. & Sheerin, N. S. The membrane attack complex, C5b-9, up regulates collagen gene expression in renal tubular epithelial cells. *Clin. Exp. Immunol.* **136**, 60–66 (2004).
229. Farrar, C. A. *et al.* Collectin-11 detects stress-induced L-fucose pattern to trigger renal epithelial injury. *J. Clin. Invest.* **126**, 1911–1925 (2016).
230. Anand, R. J. & Hackam, D. J. The role of gap junctions in health and disease. *Crit. Care Med.* **33**, S535–538 (2005).
231. Bosco, D., Haefliger, J.-A. & Meda, P. Connexins: key mediators of endocrine function. *Physiol. Rev.* **91**, 1393–1445 (2011).
232. Wagner, C. Function of connexins in the renal circulation. *Kidney Int.* **73**, 547–555 (2008).
233. Zhou, J. Z. & Jiang, J. X. Gap junction and hemichannel-independent actions of connexins on cell and tissue functions--an update. *FEBS Lett.* **588**, 1186–1192 (2014).
234. Hanner, F., Sorensen, C. M., Holstein-Rathlou, N.-H. & Peti-Peterdi, J. Connexins and the kidney. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* **298**, R1143–1155 (2010).
235. Willecke, K. *et al.* Structural and functional diversity of connexin genes in the mouse and human genome. *Biol. Chem.* **383**, 725–737 (2002).
236. Axelsen, L. N., Calloe, K., Holstein-Rathlou, N.-H. & Nielsen, M. S. Managing the complexity of communication: regulation of gap junctions by post-translational modification. *Front. Pharmacol.* **4**, 130 (2013).
237. Solan, J. L. & Lampe, P. D. Specific Cx43 phosphorylation events regulate gap junction turnover in vivo. *FEBS Lett.* **588**, 1423–1429 (2014).
238. Giepman, B. N. G. Gap junctions and connexin-interacting proteins. *Cardiovasc. Res.* **62**, 233–245 (2004).
239. van Rijen, H. V., van Kempen, M. J., Postma, S. & Jongsma, H. J. Tumour necrosis factor alpha alters the expression of connexin43, connexin40, and connexin37 in human umbilical vein endothelial cells. *Cytokine* **10**, 258–264 (1998).
240. Mensink, A., de Haan, L. H., Lakemond, C. M., Koelman, C. A. & Koeman, J. H. Inhibition of gap junctional intercellular communication between primary human smooth muscle cells by tumor necrosis factor alpha. *Carcinogenesis* **16**, 2063–2067 (1995).
241. Chandross, K. J. Nerve injury and inflammatory cytokines modulate gap junctions in the peripheral nervous system. *Glia* **24**, 21–31 (1998).
242. Temme, A., Traub, O. & Willecke, K. Downregulation of connexin32 protein and gap-junctional intercellular communication by cytokine-mediated acute-phase response in immortalized mouse hepatocytes. *Cell Tissue Res.* **294**, 345–350 (1998).
243. Fernandez-Cobo, M., Gingalewski, C., Drujan, D. & De Maio, A. Downregulation of connexin 43 gene expression in rat heart during inflammation. The role of tumour necrosis factor. *Cytokine* **11**, 216–224 (1999).
244. Lerner, D. L., Yamada, K. A., Schuessler, R. B. & Saffitz, J. E. Accelerated onset and increased incidence of ventricular arrhythmias induced by ischemia in Cx43-deficient mice. *Circulation* **101**, 547–552 (2000).
245. Dupont, E. *et al.* Altered connexin expression in human congestive heart failure. *J. Mol. Cell. Cardiol.* **33**, 359–371 (2001).
246. Yu, J. *et al.* IL-1 β Inhibits Connexin 43 and Disrupts Decidualization of Human Endometrial Stromal Cells Through ERK1/2 and p38 MAP Kinase. *Endocrinology* **158**, 4270–4285 (2017).
247. Tang, M. & Fang, J. TNF- α regulates apoptosis of human vascular smooth muscle cells through gap junctions. *Mol. Med. Rep.* **15**, 1407–1411 (2017).

248. Branes, M. C., Contreras, J. E. & Sáez, J. C. Activation of human polymorphonuclear cells induces formation of functional gap junctions and expression of connexins. *Med. Sci. Monit. Int. Med. J. Exp. Clin. Res.* **8**, BR313-323 (2002).
249. Polacek, D., Lal, R., Volin, M. V. & Davies, P. F. Gap junctional communication between vascular cells. Induction of connexin43 messenger RNA in macrophage foam cells of atherosclerotic lesions. *Am. J. Pathol.* **142**, 593–606 (1993).
250. Eugenín, E. A. *et al.* Microglia at brain stab wounds express connexin 43 and in vitro form functional gap junctions after treatment with interferon-gamma and tumor necrosis factor-alpha. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **98**, 4190–4195 (2001).
251. Alves, L. A. *et al.* Are there functional gap junctions or junctional hemichannels in macrophages? *Blood* **88**, 328–334 (1996).
252. Hillis, G. S. *et al.* Upregulation and co-localization of connexin43 and cellular adhesion molecules in inflammatory renal disease. *J. Pathol.* **182**, 373–379 (1997).
253. Kwak, B. R., Mulhaupt, F., Veillard, N., Gros, D. B. & Mach, F. Altered pattern of vascular connexin expression in atherosclerotic plaques. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **22**, 225–230 (2002).
254. Goodenough, D. A. & Paul, D. L. Beyond the gap: functions of unpaired connexon channels. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **4**, 285–294 (2003).
255. Dosch, M. *et al.* Connexin-43-dependent ATP release mediates macrophage activation during sepsis. *eLife* **8**, (2019).
256. Oviedo-orta, E., Hoy, T. & Evans, W. H. Intercellular communication in the immune system: differential expression of connexin40 and 43, and perturbation of gap junction channel functions in peripheral blood and tonsil human lymphocyte subpopulations. *Immunology* **99**, 578–590 (2000).
257. Oviedo-Orta, E., Gasque, P. & Evans, W. H. Immunoglobulin and cytokine expression in mixed lymphocyte cultures is reduced by disruption of gap junction intercellular communication. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* **15**, 768–774 (2001).
258. Oviedo-Orta, E., Errington, R. J. & Evans, W. H. Gap junction intercellular communication during lymphocyte transendothelial migration. *Cell Biol. Int.* **26**, 253–263 (2002).
259. Oyamada, M. *et al.* The expression, phosphorylation, and localization of connexin 43 and gap-junctional intercellular communication during the establishment of a synchronized contraction of cultured neonatal rat cardiac myocytes. *Exp. Cell Res.* **212**, 351–358 (1994).
260. Tribulova, N., Szeiffova Bacova, B., Benova, T. & Vicenczova, C. Can we protect from malignant arrhythmias by modulation of cardiac cell-to-cell coupling? *J. Electrocardiol.* **48**, 434–440 (2015).
261. Fontes, M. S. C., van Veen, T. A. B., de Bakker, J. M. T. & van Rijen, H. V. M. Functional consequences of abnormal Cx43 expression in the heart. *Biochim. Biophys. Acta* **1818**, 2020–2029 (2012).
262. Teunissen, B. E. J., Jongasma, H. J. & Bierhuizen, M. F. A. Regulation of myocardial connexins during hypertrophic remodelling. *Eur. Heart J.* **25**, 1979–1989 (2004).
263. Danik, S. B. *et al.* Modulation of cardiac gap junction expression and arrhythmic susceptibility. *Circ. Res.* **95**, 1035–1041 (2004).
264. Saffitz, J. E. & Yamada, K. A. Do alterations in intercellular coupling play a role in cardiac contractile dysfunction? *Circulation* **97**, 630–632 (1998).
265. Severs, N. J., Bruce, A. F., Dupont, E. & Rothery, S. Remodelling of gap junctions and connexin expression in diseased myocardium. *Cardiovasc. Res.* **80**, 9–19 (2008).
266. Johansen, D., Cruciani, V., Sundset, R., Ytrehus, K. & Mikalsen, S.-O. Ischemia induces closure of gap junctional channels and opening of hemichannels in heart-derived cells and tissue. *Cell. Physiol. Biochem. Int. J. Exp. Cell. Physiol. Biochem. Pharmacol.* **28**, 103–114 (2011).
267. Beardslee, M. A. *et al.* Dephosphorylation and intracellular redistribution of ventricular connexin43 during electrical uncoupling induced by ischemia. *Circ. Res.* **87**, 656–662 (2000).

268. Severs, N. J. *et al.* Gap junction alterations in human cardiac disease. *Cardiovasc. Res.* **62**, 368–377 (2004).
269. Nagy, J. I., Li, W., Hertzberg, E. L. & Marotta, C. A. Elevated connexin43 immunoreactivity at sites of amyloid plaques in Alzheimer's disease. *Brain Res.* **717**, 173–178 (1996).
270. Mei, X., Ezan, P., Giaume, C. & Koulakoff, A. Astroglial connexin immunoreactivity is specifically altered at β -amyloid plaques in β -amyloid precursor protein/presenilin1 mice. *Neuroscience* **171**, 92–105 (2010).
271. Davidson, J. O. *et al.* A key role for connexin hemichannels in spreading ischemic brain injury. *Curr. Drug Targets* **14**, 36–46 (2013).
272. Davidson, J. O. *et al.* Connexin hemichannel blockade is neuroprotective after asphyxia in preterm fetal sheep. *PLoS One* **9**, e96558 (2014).
273. Ma, D. *et al.* Astrocytic gap junction inhibition by carbenoxolone enhances the protective effects of ischemic preconditioning following cerebral ischemia. *J. Neuroinflammation* **15**, 198 (2018).
274. Kim, Y. *et al.* Connexins and Pannexins in cerebral ischemia. *Biochim. Biophys. Acta Biomembr.* **1860**, 224–236 (2018).
275. Schwanke, U. *et al.* No ischemic preconditioning in heterozygous connexin43-deficient mice. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* **283**, H1740-1742 (2002).
276. Li, G., Whittaker, P., Yao, M., Kloner, R. A. & Przyklenk, K. The gap junction uncoupler heptanol abrogates infarct size reduction with preconditioning in mouse hearts. *Cardiovasc. Pathol. Off. J. Soc. Cardiovasc. Pathol.* **11**, 158–165 (2002).
277. Boengler, K., Schulz, R. & Heusch, G. Connexin 43 signalling and cardioprotection. *Heart* **92**, 1724–1727 (2006).
278. Waza, A. A., Andrabi, K. & Hussain, M. U. Protein kinase C (PKC) mediated interaction between connexin43 (Cx43) and K(+)(ATP) channel subunit (Kir6.1) in cardiomyocyte mitochondria: Implications in cytoprotection against hypoxia induced cell apoptosis. *Cell. Signal.* **26**, 1909–1917 (2014).
279. Ruiz-Meana, M. *et al.* Glycine protects cardiomyocytes against lethal reoxygenation injury by inhibiting mitochondrial permeability transition. *J. Physiol.* **558**, 873–882 (2004).
280. Rodriguez-Sinovas, A. *et al.* Translocation of connexin 43 to the inner mitochondrial membrane of cardiomyocytes through the heat shock protein 90-dependent TOM pathway and its importance for cardioprotection. *Circ. Res.* **99**, 93–101 (2006).
281. Freund-Michel, V., Muller, B., Marthan, R., Savineau, J.-P. & Guibert, C. Expression and role of connexin-based gap junctions in pulmonary inflammatory diseases. *Pharmacol. Ther.* **164**, 105–119 (2016).
282. Abed, A. *et al.* Targeting connexin 43 protects against the progression of experimental chronic kidney disease in mice. *Kidney Int.* **86**, 768–779 (2014).
283. Kavvadas, P. *et al.* Decreased Expression of Connexin 43 Blunts the Progression of Experimental GN. *J. Am. Soc. Nephrol. JASN* **28**, 2915–2930 (2017).
284. Toubas, J. *et al.* Alteration of connexin expression is an early signal for chronic kidney disease. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* **301**, F24-32 (2011).
285. Eltzschig, H. K. *et al.* ATP release from activated neutrophils occurs via connexin 43 and modulates adenosine-dependent endothelial cell function. *Circ. Res.* **99**, 1100–1108 (2006).
286. Dosch, M., Gerber, J., Jebbawi, F. & Beldi, G. Mechanisms of ATP Release by Inflammatory Cells. *Int. J. Mol. Sci.* **19**, (2018).
287. Hills, C. *et al.* Transforming Growth Factor Beta 1 Drives a Switch in Connexin Mediated Cell-to-Cell Communication in Tubular Cells of the Diabetic Kidney. *Cell. Physiol. Biochem. Int. J. Exp. Cell. Physiol. Biochem. Pharmacol.* **45**, 2369–2388 (2018).
288. Vergara, L., Bao, X., Bello-Reuss, E. & Reuss, L. Do connexin 43 gap-junctional hemichannels activate and cause cell damage during ATP depletion of renal-tubule cells? *Acta Physiol. Scand.* **179**, 33–38 (2003).

289. Yaoita, E. *et al.* Up-regulation of connexin43 in glomerular podocytes in response to injury. *Am. J. Pathol.* **161**, 1597–1606 (2002).
290. Yan, Q. *et al.* NADPH oxidase-mediated upregulation of connexin43 contributes to podocyte injury. *Free Radic. Biol. Med.* **53**, 1286–1297 (2012).
291. Yang, M., Wang, B., Li, M. & Jiang, B. Connexin 43 is involved in aldosterone-induced podocyte injury. *Cell. Physiol. Biochem. Int. J. Exp. Cell. Physiol. Biochem. Pharmacol.* **34**, 1652–1662 (2014).
292. Fischer, K. G., Saueressig, U., Jacobshagen, C., Wichelmann, A. & Pavenstädt, H. Extracellular nucleotides regulate cellular functions of podocytes in culture. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* **281**, F1075-1081 (2001).
293. Burford, J. L. *et al.* Intravital imaging of podocyte calcium in glomerular injury and disease. *J. Clin. Invest.* **124**, 2050–2058 (2014).
294. Zhao, Y., Li, G., Wang, Y. & Liu, Z. Alteration of Connexin43 expression in a rat model of obesity-related glomerulopathy. *Exp. Mol. Pathol.* **104**, 12–18 (2018).
295. Morioka, T. *et al.* Glomerular expression of connexin 40 and connexin 43 in rat experimental glomerulonephritis. *Clin. Exp. Nephrol.* **17**, 191–204 (2013).
296. Xie, X. *et al.* RhoA/rho kinase signaling reduces connexin43 expression in high glucose-treated glomerular mesangial cells with zonula occludens-1 involvement. *Exp. Cell Res.* **327**, 276–286 (2014).
297. Zhang, A., Han, Y., Wang, B., Li, S. & Gan, W. Beyond Gap Junction Channel Function: the Expression of Cx43 Contributes to Aldosterone-Induced Mesangial Cell Proliferation via the ERK1/2 and PKC Pathways. *Cell. Physiol. Biochem. Int. J. Exp. Cell. Physiol. Biochem. Pharmacol.* **36**, 1210–1222 (2015).
298. Lafkas, D. *et al.* Notch3 marks clonogenic mammary luminal progenitor cells in vivo. *J. Cell Biol.* **203**, 47–56 (2013).
299. Ragot, H. *et al.* Loss of Notch3 Signaling in Vascular Smooth Muscle Cells Promotes Severe Heart Failure Upon Hypertension. *Hypertens. Dallas Tex 1979* **68**, 392–400 (2016).
300. Palevsky, P. M. Epidemiology of acute renal failure: the tip of the iceberg. *Clin. J. Am. Soc. Nephrol. CJASN* **1**, 6–7 (2006).
301. Holloway, T. M., Snijders, T., VAN Kranenburg, J., VAN Loon, L. J. C. & Verdijk, L. B. Temporal Response of Angiogenesis and Hypertrophy to Resistance Training in Young Men. *Med. Sci. Sports Exerc.* **50**, 36–45 (2018).
302. Morland, C. *et al.* Exercise induces cerebral VEGF and angiogenesis via the lactate receptor HCAR1. *Nat. Commun.* **8**, 15557 (2017).
303. Soori, R. *et al.* Exercise attenuates myocardial fibrosis and increases angiogenesis-related molecules in the myocardium of aged rats. *Arch. Physiol. Biochem.* 1–6 (2019) doi:10.1080/13813455.2019.1660370.
304. Prabhu, S. D. & Frangogiannis, N. G. The Biological Basis for Cardiac Repair After Myocardial Infarction: From Inflammation to Fibrosis. *Circ. Res.* **119**, 91–112 (2016).
305. Kong, P., Christia, P. & Frangogiannis, N. G. The Pathogenesis of Cardiac Fibrosis. *Cell. Mol. Life Sci. CMLS* **71**, 549–574 (2014).
306. Zhang, M. *et al.* Notch3 Ameliorates Cardiac Fibrosis After Myocardial Infarction by Inhibiting the TGF- β 1/Smad3 Pathway. *Cardiovasc. Toxicol.* **16**, 316–324 (2016).
307. Lai, J.-M. *et al.* Redox-sensitive MAPK and Notch3 regulate fibroblast differentiation and activation: a dual role of ERK1/2. *Oncotarget* **7**, 43731–43745 (2016).
308. Huang, M. *et al.* The TGF β -ERK pathway contributes to Notch3 upregulation in the renal tubular epithelial cells of patients with obstructive nephropathy. *Cell. Signal.* **51**, 139–151 (2018).
309. Morris, J. H. & Chen, L. Exercise Training and Heart Failure: A Review of the Literature. *Card. Fail. Rev.* **5**, 57–61 (2019).
310. Fernandes, T., Soci, U. P. R. & Oliveira, E. M. Eccentric and concentric cardiac hypertrophy induced by exercise training: microRNAs and molecular determinants. *Braz. J. Med. Biol. Res. Rev. Bras. Pesqui. Medicas E Biol.* **44**, 836–847 (2011).

311. Weiner, R. B. & Baggish, A. L. Exercise-induced cardiac remodeling. *Prog. Cardiovasc. Dis.* **54**, 380–386 (2012).
312. Fulghum, K. & Hill, B. G. Metabolic Mechanisms of Exercise-Induced Cardiac Remodeling. *Front. Cardiovasc. Med.* **5**, 127 (2018).
313. Boulos, N. *et al.* Notch3 is essential for regulation of the renal vascular tone. *Hypertens. Dallas Tex 1979* **57**, 1176–1182 (2011).
314. Chanson, M. *et al.* Gap junctional communication in tissue inflammation and repair. *Biochim. Biophys. Acta* **1711**, 197–207 (2005).
315. Xu, C.-Y., Zhang, W.-S., Zhang, H., Cao, Y. & Zhou, H.-Y. The Role of Connexin-43 in the Inflammatory Process: A New Potential Therapy to Influence Keratitis. *J. Ophthalmol.* **2019**, 9312827 (2019).
316. Wong, P., Laxton, V., Srivastava, S., Chan, Y. W. F. & Tse, G. The role of gap junctions in inflammatory and neoplastic disorders (Review). *Int. J. Mol. Med.* **39**, 498–506 (2017).
317. Kim, Y. *et al.* Role of Hemichannels in CNS Inflammation and the Inflammasome Pathway. *Adv. Protein Chem. Struct. Biol.* **104**, 1–37 (2016).
318. Sarriddine, M. Z. R. *et al.* Connexin43 modulates neutrophil recruitment to the lung. *J. Cell. Mol. Med.* **13**, 4560–4570 (2009).
319. Morel, S. *et al.* Titration of the gap junction protein Connexin43 reduces atherogenesis. *Thromb. Haemost.* **112**, 390–401 (2014).
320. Lohman, A. W. & Isakson, B. E. Differentiating connexin hemichannels and pannexin channels in cellular ATP release. *FEBS Lett.* **588**, 1379–1388 (2014).
321. Faigle, M., Seessle, J., Zug, S., El Kasmi, K. C. & Eltzschig, H. K. ATP Release from Vascular Endothelia Occurs Across Cx43 Hemichannels and Is Attenuated during Hypoxia. *PLoS ONE* **3**, (2008).
322. Sica, A., Erreni, M., Allavena, P. & Porta, C. Macrophage polarization in pathology. *Cell. Mol. Life Sci. CMLS* **72**, 4111–4126 (2015).
323. Murray, P. J. Macrophage Polarization. *Annu. Rev. Physiol.* **79**, 541–566 (2017).
324. Parthasarathi, K. *et al.* Connexin 43 mediates spread of Ca²⁺-dependent proinflammatory responses in lung capillaries. *J. Clin. Invest.* **116**, 2193–2200 (2006).
325. Pfenniger, A., Chanson, M. & Kwak, B. R. Connexins in atherosclerosis. *Biochim. Biophys. Acta* **1828**, 157–166 (2013).
326. Chadjichristos, C. E. *et al.* Reduced connexin43 expression limits neointima formation after balloon distension injury in hypercholesterolemic mice. *Circulation* **113**, 2835–2843 (2006).
327. Yuan, D. *et al.* Connexin 43 expressed in endothelial cells modulates monocyte-endothelial adhesion by regulating cell adhesion proteins. *Mol. Med. Rep.* **12**, 7146–7152 (2015).
328. Li, X. *et al.* Down-regulation of Cx43 expression on PIH-HUVEC cells attenuates monocyte-endothelial adhesion. *Thromb. Res.* **179**, 104–113 (2019).
329. Ji, H. *et al.* Propofol attenuates monocyte-endothelial adhesion via modulating connexin43 expression in monocytes. *Life Sci.* **232**, 116624 (2019).
330. Alonso, F. *et al.* An angiotensin II- and NF-kappaB-dependent mechanism increases connexin 43 in murine arteries targeted by renin-dependent hypertension. *Cardiovasc. Res.* **87**, 166–176 (2010).
331. Véliz, L. P., González, F. G., Duling, B. R., Sáez, J. C. & Boric, M. P. Functional role of gap junctions in cytokine-induced leukocyte adhesion to endothelium in vivo. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* **295**, H1056–H1066 (2008).
332. Murdoch, C., Tazzyman, S., Webster, S. & Lewis, C. E. Expression of Tie-2 by human monocytes and their responses to angiopoietin-2. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **178**, 7405–7411 (2007).
333. Han, W. K., Bailly, V., Abichandani, R., Thadhani, R. & Bonventre, J. V. Kidney Injury Molecule-1 (KIM-1): a novel biomarker for human renal proximal tubule injury. *Kidney Int.* **62**, 237–244 (2002).

334. Moresco, R. N. *et al.* Urinary kidney injury molecule-1 in renal disease. *Clin. Chim. Acta Int. J. Clin. Chem.* **487**, 15–21 (2018).
335. Yang, L. *et al.* KIM-1-mediated phagocytosis reduces acute injury to the kidney. *J. Clin. Invest.* **125**, 1620–1636 (2015).
336. Qiu, C. *et al.* Targeting connexin43 expression accelerates the rate of wound repair. *Curr. Biol. CB* **13**, 1697–1703 (2003).
337. Cronin, M., Anderson, P. N., Cook, J. E., Green, C. R. & Becker, D. L. Blocking connexin43 expression reduces inflammation and improves functional recovery after spinal cord injury. *Mol. Cell. Neurosci.* **39**, 152–160 (2008).
338. Calder, B. W. *et al.* Inhibition of connexin 43 hemichannel-mediated ATP release attenuates early inflammation during the foreign body response. *Tissue Eng. Part A* **21**, 1752–1762 (2015).
339. Shi, J., Hua, L., Harmer, D., Li, P. & Ren, G. Cre Driver Mice Targeting Macrophages. *Methods Mol. Biol. Clifton NJ* **1784**, 263–275 (2018).
340. Zhang, Y., Wang, H., Kovacs, A., Kanter, E. M. & Yamada, K. A. Reduced expression of Cx43 attenuates ventricular remodeling after myocardial infarction via impaired TGF-beta signaling. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* **298**, H477-487 (2010).
341. Li, G. *et al.* Upregulation of connexin43 contributes to PX-12-induced oxidative cell death. *Tumour Biol. J. Int. Soc. Oncodevelopmental Biol. Med.* **37**, 7535–7546 (2016).
342. Yuan, D. *et al.* Inhibition of gap junction composed of Cx43 prevents against acute kidney injury following liver transplantation. *Cell Death Dis.* **10**, (2019).
343. Morel, S. Multiple roles of connexins in atherosclerosis- and restenosis-induced vascular remodelling. *J. Vasc. Res.* **51**, 149–161 (2014).
344. Liao, Y. *et al.* Smooth muscle-targeted knockout of connexin43 enhances neointimal formation in response to vascular injury. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **27**, 1037–1042 (2007).
345. Gonzalez, J. P., Ramachandran, J., Xie, L.-H., Contreras, J. E. & Fraidenraich, D. Selective Connexin43 Inhibition Prevents Isoproterenol-Induced Arrhythmias and Lethality in Muscular Dystrophy Mice. *Sci. Rep.* **5**, 13490 (2015).
346. Hawat, G., Benderdour, M., Rousseau, G. & Baroudi, G. Connexin 43 mimetic peptide Gap26 confers protection to intact heart against myocardial ischemia injury. *Pflugers Arch.* **460**, 583–592 (2010).
347. Wang, N. *et al.* Selective inhibition of Cx43 hemichannels by Gap19 and its impact on myocardial ischemia/reperfusion injury. *Basic Res. Cardiol.* **108**, 309 (2013).
348. Tonkin, R. S. *et al.* Gap junction proteins and their role in spinal cord injury. *Front. Mol. Neurosci.* **7**, 102 (2014).