



HAL
open science

Rôle du récepteur minéralocorticoïde et de la Neutrophil Gelatinase-Associated Lipocalin dans les lésions cardio-rénales de l'insuffisance rénale chronique

Benjamin Bonnard

► **To cite this version:**

Benjamin Bonnard. Rôle du récepteur minéralocorticoïde et de la Neutrophil Gelatinase-Associated Lipocalin dans les lésions cardio-rénales de l'insuffisance rénale chronique. Médecine humaine et pathologie. Sorbonne Université, 2020. Français. NNT : 2020SORUS018 . tel-03398614

HAL Id: tel-03398614

<https://theses.hal.science/tel-03398614>

Submitted on 23 Oct 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

École doctorale ED394 Physiologie et Physiopathologies

Centre de recherche des Cordeliers

MEDICIS Lab - MEtabolic diseases Diabetes and Comorbidities

Rôle du récepteur minéralocorticoïde et de la Neutrophil Gelatinase-Associated Lipocalin dans les lésions cardio- rénales de l'insuffisance rénale chronique

Par Benjamin Bonnard

Thèse de doctorat en Physiologie et Physiopathologie
Dirigée par le Dr Frédéric Jaisser

Présentée et soutenue publiquement le 21 octobre 2020

Composition du jury :

Dr Christos Chatziantoniou

Dr Claude Delcayre

Dr Patrick Lacolley

Dr Natalia López-Andrés

Dr Fabiola Terzi

Dr Frédéric Jaisser

Président du jury

Rapporteur

Rapporteur

Examinatrice

Examinatrice

Directeur de thèse

Sorbonne Université

École doctorale ED394 Physiologie et Physiopathologies

Centre de recherche des Cordeliers

MEDICIS Lab - MEtabolic diseases DIabetes and ComorbidityS

Rôle du récepteur minéralocorticoïde et de la Neutrophil Gelatinase-Associated Lipocalin dans les lésions cardio- rénales de l'insuffisance rénale chronique

Par Benjamin Bonnard

Thèse de doctorat en Physiologie et Physiopathologie
Dirigée par le Dr Frédéric Jaisser

Présentée et soutenue publiquement le 21 octobre 2020

Composition du jury :

Dr Christos Chatziantoniou

Président du jury

Dr Claude Delcayre

Rapporteur

Dr Patrick Lacolley

Rapporteur

Dr Natalia López-Andrés

Examinatrice

Dr Fabiola Terzi

Examinatrice

Dr Frédéric Jaisser

Directeur de thèse

*Le savant n'est pas l'homme qui fournit des réponses
mais c'est celui qui se pose des questions*

Claude Lévi-Strauss

*Choisissez un travail que vous aimez
et vous n'aurez pas à travailler un seul jour de votre vie*

Confucius

À mes parents et grands parents

REMERCIEMENTS

PRÉAMBULE

A travers son interaction avec le récepteur minéralocorticoïde (RM), l'aldostérone est connue pour son rôle dans l'homéostasie du sodium et de l'eau au niveau de l'épithélium rénal. Cependant le RM est exprimé dans une grande variété de tissus, et par conséquent est impliqué dans différentes fonctions telles que : la fonction cardiovasculaire, la signalisation immunitaire et la différenciation des adipocytes. De nombreuses études ont révélé le rôle pathologique du RM notamment en démontrant que son blocage réduit la mortalité et la morbidité chez des patients souffrant d'insuffisance cardiaque. De même, l'inhibition du RM permet une réduction de la protéinurie chez des patients atteints d'insuffisance rénale. Notre équipe a identifié une nouvelle cible du RM dans les pathologies cardiovasculaires appelé Neutrophil Gelatinase-Associated Lipocalin (NGAL). Cette protéine captatrice d'ion ferrique, a été mise en évidence pour son implication dans les pathologies cardiovasculaires et rénales. Ce travail a pour but d'étudier le rôle du RM et de NGAL dans le développement des lésions cardio-rénales induites par l'insuffisance rénale chronique.

SOMMAIRE

LISTE DES FIGURES ET TABLEAUX	P.13
LISTE DES ABREVIATIONS	P.15
I. INTRODUCTION	P.21
1. Le récepteur minéralocorticoïde : Définition, Physiologie et Physiopathologie	P.22
1.1. Structure du récepteur minéralocorticoïde : Du gène à la protéine	P.22
1.2. Ligands du récepteur minéralocorticoïde : Aldostérone vs glucocorticoïdes	P.23
1.2.1. Hormone minéralocorticoïde : l'aldostérone	P.23
1.2.2. Hormones glucocorticoïdes	P.24
1.2.3. Sélectivité enzymatique : la 11b-HSD2	P.25
1.2.4. Autres mécanismes de sélectivité minéralocorticoïde	P.25
1.2.5. Activations non classiques du récepteur minéralocorticoïde	P.26
1.3. Physiologie du récepteur minéralocorticoïde : Réabsorption de sodium	P.26
1.3.1. Mécanisme d'action du récepteur minéralocorticoïde	P.26
1.3.2. Effets génomiques du récepteur minéralocorticoïde dans l'épithélium rénal	P.27
1.3.2.1. Rôle du récepteur minéralocorticoïde dans le tubule contourné distal	P.27
1.3.2.2. Rôle du récepteur minéralocorticoïde dans le néphron distal	P.29
1.3.3. Effets non génomiques du récepteur minéralocorticoïde	P.32
1.4. Antagonistes du récepteur minéralocorticoïde : Stéroïdiens vs non stéroïdiens	P.33
1.4.1. Antagonistes stéroïdiens	P.33
1.4.2. Antagonistes non stéroïdiens	P.34
1.5. Physiopathologie du récepteur minéralocorticoïde : Du rein au cœur, études précliniques et cliniques	P.35
1.5.1. Rôle du récepteur minéralocorticoïde dans les pathologies rénales	P.35
1.5.1.1. Études précliniques	P.35
1.5.1.2. Études cliniques	P.37
1.5.2. Rôle du récepteur minéralocorticoïde dans les pathologies cardiaques	P.37
1.5.2.1. Études précliniques	P.38
1.5.2.2. Études cliniques	P.38
1.5.3. Implication du récepteur minéralocorticoïde dans l'inflammation et la fibrose	P.40

1.5.4. Le syndrome cardio-rénal	P.42
2. Neutrophil Gelatinase Associated Lipocalin : Une nouvelle cible du récepteur minéralocorticoïde	P.43
2.1. Identification de NGAL : Analyse transcriptomique	P.43
2.2. Du gène à la protéine, NGAL : Définition et fonction	P.43
2.2.1. La famille des lipocalines	P.43
2.2.2. Structure et expression de NGAL	P.44
2.2.3. Régulation de NGAL	P.45
2.2.4. Rôles physiologiques de NGAL	P.46
2.3. Rôles physiopathologiques de NGAL : Résultats controversés	P.47
2.3.1. Rôle de NGAL dans les pathologies cardiovasculaire	P.47
2.3.2. Rôles de NGAL dans les pathologies rénales	P.48
2.3.2.1. NGAL et insuffisance rénale aigüe	P.48
2.3.2.2. NGAL et insuffisance rénale chronique	P.49
3. Objectifs de thèse	P.50
II. MATERIEL & METHODES	P.51
1. Modèles animaux	P.52
1.1. Modèle d'insuffisance rénale chronique induite : Néphrectomie subtotale	P.52
1.1.1. Souris B6D2 et administration de finerenone	P.52
1.1.2. Souris FVB et administration de GP1	P.53
1.2. Modèle de surcharge minéralocorticoïde : Néphrectomie-aldostérone-sel	P.53
1.2.1. Souris KO NGAL	P.53
1.2.2. Souris KO BM	P.53
1.2.3. Administration de maraviroc et injection d'anticorps neutralisant anti-IL4	P.54
1.3. Modèle d'insuffisance cardiaque : Infarctus du myocarde	P.54
1.4. Modèle d'hypertension sensible au sel	P.54
2. Mesures des paramètres physiologiques	P.55
2.1. Mesures de la pression artérielle	P.55
2.2. Échocardiographie et mesures hémodynamiques	P.55
2.3. Collection des tissus et analyses plasmatiques	P.55

2.4. Histologie et immunohistochimie	P.56
3. Modèles cellulaires	P.56
3.1. Macrophages péritonéaux	P.56
3.2. Fibroblastes rénaux murins	P.57
3.3. Fibroblastes cardiaques humains et test de prolifération	P.57
4. Analyses moléculaires	P.58
4.1. Extraction d'ARN, RT et qPCR	P.58
4.2. Extraction de protéines, ELISA et Western Blot	P.58
4.3. Cytométrie en flux	P.58
5. Analyses statistiques	P.59
6. Tableaux	P.60
III. RESULTATS	P.63
1. Rôle du RM dans les lésions cardio-rénales de l'insuffisance rénale chronique	P.64
1.1. Introduction	P.64
1.2. Article	P.65
1.3. Discussion	P.65
2. Rôle de NGAL dans les lésions rénales induites par l'activation du RM	P.69
2.1. Introduction	P.69
2.2. Résultats	P.70
2.2.1. NGAL participe à la dysfonction rénale et au remodelage rénal induit par NAS	P.70
2.2.2. NGAL favorise l'expression de cytokines et chemokines dans les macrophages proinflammatoires	P.74
2.2.3. NGAL produit par les cellules myéloïdes est impliqué dans le développement des lésions rénales induites par NAS	P.76
2.2.4. Étude de la signalisation de NGAL dans le développement de la fibrose rénale induit par NAS	P.78
2.2.4.1. Le blocage de la signalisation CCL5 limite la fibrose rénale	P.78
2.2.4.2. Implication de CCL5 dans le recrutement des Th2 CD4 ⁺	P.81
2.2.4.3. Étude du rôle de l'IL4 dans le développement de la fibrose rénale	P.84

2.2.4.3.1.	La neutralisation de la cytokine Th2 IL4 limite la fibrose rénale	P.84
2.2.4.3.2.	L'inhibition de la signalisation de l'IL4 réduit le phénotype profibrotique et proinflammatoires des fibroblastes rénaux	P.86
2.2.5.	Conclusion	P.88
2.3.	Discussion	P.88
3.	Développement d'un antagoniste de NGAL : Effets bénéfiques dans des modèles <i>in vitro</i> et <i>in vivo</i>	P.92
3.1.	Introduction	P.92
3.2.	Résultats	P.93
3.2.1.	Identification de GP1 et preuve de concept dans l'infarctus du myocarde	P.93
3.2.1.1.	<i>in vitro</i> : inhibition des effets de NGAL par GP1 dans les HCFs	P.93
3.2.1.2.	<i>in vivo</i> : GP1 limite le remodelage cardiaque induit par IM	P.95
3.2.2.	L'inhibition de NGAL par GP1 limite le développement de la fibrose rénale	P.8
3.2.2.1.	GP1 limite l'activation des fibroblastes rénaux	P.98
3.2.2.2.	GP1 réduit le remodelage rénal induit par l'IRC	P.99
3.2.3.	L'inhibition de NGAL par GP1 limite l'hypertension sensible au sel	P.101
3.2.4.	Conclusion	P.101
3.3.	Discussion	P.102
IV.	DISCUSSION	P.106
1.	Résumé des résultats du travail de thèse	P.107
1.1.	Le blocage du RM améliore la dysfonction cardiaque et l'altération de l'homéostasie calcique induite par l'IRC	P.107
1.2.	Le NGAL produit par les macrophages est impliqué dans le développement de la fibrose rénale induite par l'excès minéralocorticoïde via la signalisation CCL5/IL4	P.108
1.3.	L'inhibition de NGAL par le composé GP1 améliore les lésions cardio-rénales dans un modèle d'IC et d'IRC	P.109
2.	Perspectives	P.109
2.1.	Le RM dans les complications cardiaques de l'IRC	P.109
2.2.	Le RM dans les complications métaboliques de l'IRC	P.110

2.3. Rôle de NGAL produit par d'autres cellules impliquées dans le développement de lésions rénales et les complications associées à l'IRC	P.112
2.4. NGAL comme cible thérapeutique prometteuse dans diverses pathologies	P.113
3. Conclusion	P.114
REFERENCES	P.115
ANNEXES	P.144

LISTE DES FIGURES ET TABLEAUX

Figure 1 :	Structure du récepteur minéralocorticoïde humain	P.23
Figure 2 :	Système Rénine-Angiotensine-Aldostérone	P.24
Figure 3 :	Mécanisme d'action du RM	P.27
Figure 4 :	Rôle du RM dans les cellules du tubule contourné distal 2	P.28
Figure 5 :	Rôle du RM dans les cellules principales du canal collecteur	P.30
Figure 6 :	Rôle du RM dans les cellules intercalaires β du canal collecteur	P.31
Figure 7 :	Implication du RM dans la réabsorption de Na^+ à travers le néphron distal	P.32
Figure 8 :	Suggestion schématique du rôle du RM dans l'inflammation et la fibrose	P.41
Figure 9 :	Structure de NGAL associé au complexe sidérophore/fer	P.45
Figure 10 :	La finerenone bloque les effets profibrotiques de l'isoprénaline dans l'IRC	P.68
Figure 11 :	L'inhibition de NGAL réduit la fibrose rénale induite par le challenge NAS	P.71
Figure 12 :	L'inhibition de NGAL réduit partiellement l'inflammation induite par le challenge NAS	P.73
Figure 13 :	NGAL est un médiateur de l'inflammation dans les macrophages	P.75
Figure 14 :	L'inhibition du NGAL immunitaire réduit la fibrose rénale induite par le challenge NAS	P.77
Figure 15 :	La délétion totale et cellule myéloïde spécifique de NGAL préviennent l'expression de CCL5 induite par le challenge NAS	P.78
Figure 16 :	Le blocage du récepteur au CCL5 réduit la fibrose rénale induite par le challenge NAS	P.80
Figure 17 :	Réduction d'expression des marqueurs Th2 CD4+ dans les différents modèles utilisés	P.82
Figure 18 :	Le challenge NAS induit une surexpression d'IL4 par les CD3+ CD4+ corrélée au développement de la fibrose rénale et des protéines associées	P.83
Figure 19 :	La neutralisation de l'IL4 réduit la fibrose rénale induite par le challenge NAS	P.85
Figure 20 :	La neutralisation de l'IL4 ne prévient ni l'inflammation ni la surexpression de CD4 induite par le challenge NAS	P.86
Figure 21 :	L'inhibition de STAT6 prévient l'effet proinflammatoire/profibrotique de l'IL4 dans des MKFs	P.87
Figure 22 :	L'inhibition de NGAL par le GP1 inhibe les effets prolifératifs et profibrotiques de NGAL dans les HCFs	P.94
Figure 23 :	L'inhibition de NGAL par le GP1 inhibe les effets prolifératifs et profibrotiques de l'aldostérone dans les HCFs	P.95
Figure 24 :	L'inhibition de NGAL par le GP1 prévient le remodelage cardiaque induit par l'IM	P.97
Figure 25 :	L'inhibition de NGAL par le GP1 inhibe les effets prolifératifs et profibrotiques de NGAL dans les MKFs	P.98
Figure 26 :	L'inhibition de NGAL par le GP1 prévient le développement de la fibrose rénale induite par l'IRC	P.100
Figure 27 :	L'inhibition de NGAL par le GP1 prévient l'hypertension induite par le co-traitement L-NAME + HSD	P.101
Figure 28 :	L'IRC altère l'homéostasie calcique dans les cardiomyocytes	P.107
Figure 29 :	Implication du NGAL produit par les macrophages dans la fibrose rénale induite par le challenge NAS via la signalisation CCL5/IL4	P.108

Tableau 1 :	Liste des séquences des primers utilisées	P.60
Tableau 2 :	Liste des anticorps utilisés pour les Western Blot et l'immunohistochimie	P.61
Tableau 3 :	Liste des plaques ELISA utilisées	P.61
Tableau 4 :	Liste des anticorps utilisés pour la cytométrie en flux	P.61
Tableau 5 :	Paramètres physiologiques des différents modèles utilisés	P.88
Tableau 6 :	L'inhibition de NGAL par le GP1 prévient la dysfonction cardiaque induit par l'IM	P.96
Tableau 7 :	L'inhibition de NGAL par le GP1 prévient l'hypertension sans amélioration de la dysfonction rénale induite par l'IRC	P.99

LISTE DES ABREVIATIONS

11b-HSD2	11-b-hydroxystéroïde déshydrogénase de type 2
ADP	Adénosine diphosphate
AF	Domaine d'action de la transcription
ARA	Antagonistes du récepteur de l'angiotensine
ARG1	<i>Arginase</i>
ARMs	Antagonistes du récepter minéralocorticoïde
ATP	Adénosine triphosphate
BM	Moelle osseuse
CamKII	Protéine kinase Ca ²⁺ /calmoduline-dépendante
CC	Canal collecteur
CCL	<i>Chemokine ligand</i>
CCR	<i>Chemokine receptor</i>
CKD	<i>Chronic kidney disease</i>
CML	Cellules musculaires lisses
CMLV	Cellules musculaires lisses vasculaires
CTGF	<i>Connective tissue growth factor</i>
DFG	Débit de filtration glomérulaire
DLA	Domaine central de liaison à l'ADN
DLL	Domaine de liaison du ligand hormonal
DOCA	Désoxycorticostérone
ECA	Enzyme de conversion de l'angiotensine
ENaC	Canal sodium épithélial
ERK	<i>Extracellular signal-regulated kinase</i>
FGF	<i>Fibroblast growth factor</i>
FKBP	<i>FK506-binding protein</i>
GBM	<i>Glomerular basement membrane</i>
GILZ	<i>Glucocorticoid-induced leucin zipper protein</i>
H ⁺ ATPase	Pompe ionique ATPasique H ⁺
HCFs	Fibroblastes cardiaques humains
HEK 293	<i>human embryonic kidney</i>
HRE	<i>Hormone Response Element</i>
HSD	Régime riche en sel
hsp90	<i>Heat shock protein 90</i>
IC	Insuffisance cardiaque
iECA	Inhibiteurs de l'ECA
IFN	Interferon
IL	<i>Interleukin</i>
IM	Infarctus du myocarde
iNOS	<i>Inducible nitric oxide synthase</i>
IR	Ischémie-reperfusion
IRA	Insuffisance rénale aiguë

IRC	Insuffisance rénale chronique
JNK	c-Jun N-terminal kinases
KO	<i>Knock out</i>
L-NAME	<i>N_ω-Nitro-L-arginine methyl ester</i>
lcn2	Lipocalin 2
LV	Ventricule gauche
LVEDP	Pression du ventricule gauche en fin de diastole
LVESP	Pression du ventricule gauche en fin de systole
MAPK	<i>Mitogen-activated protein kinases</i>
MARA	Maraviroc
MCP1	<i>Monocyte chemoattractant protein 1</i>
MFI	Intensité de fluorescence moyenne
MKFs	Fibroblastes rénaux murins
MMP	Métalloprotéinase matricielle
Na ⁺ /K ⁺ ATPase	Pompe ionique ATPasique Na ⁺ /K ⁺
NADPH	Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate
NAS	Néphrectomie aldostérone sel
NCC	Co-transporteur Na ⁺ /Cl ⁻
NCX	Echangeur Na ⁺ /Ca ²⁺
Nedd4-2	<i>Neutral precursor cell-expressed developmentally downregulated gene 4-number 2</i>
NGAL	<i>Neutrophil gelatinase associated lipocalin</i>
NR3C2	<i>Nuclear Receptor sub-family 3 group C member 2</i>
ON	Oxyde nitrique
OUU	Obstruction urétéral unilatérale
p300/CBP	<i>Histone acetyltransferase p300/CRER-binding</i>
PKC	protéine kinase C
PLN	Phospholamban
PPAR	<i>Peroxisome proliferator-activated receptors</i>
RG	Récepteur glucocorticoïde
RM	Récepteur minéralocorticoïde
RNT	Région N-terminale
ROMK	<i>Renal outer medullary potassium channel</i>
ROS	Espèces réactives à l'oxygène
SCR	Syndrome cardio-rénal
SGK1	<i>Serum and glucocorticoid-regulated kinase 1</i>
SPAK/OSR1	<i>Ste20-like proline alanine rich kinase / oxydative stress response kinase 1</i>
SRAA	Système Rénine-Angiotensine-Aldostérone
SRC1	<i>Steroid receptor coactivator</i>
STAT	<i>Signal Transducers and Activators of Transcription</i>
Tc	<i>Lymphocyte T cytotoxiques</i>
TCD	Tubule contourné distal
TGFβ	Transforming growth factor beta
Th	Lymphocytes T <i>helper</i>

TNF α	<i>Tumor necrosis factor alpha</i>
VTI	<i>Velocity time integral</i>
WNK	<i>Sérines thréonines kinases</i>
WT	<i>Wild type</i>
α SMA	<i>Alpha smooth muscle actin</i>

I. INTRODUCTION

1. Le récepteur minéralocorticoïde : Définition, Physiologie et Physiopathologies

1.1. Structure du récepteur minéralocorticoïde : Du gène à la protéine

Le récepteur minéralocorticoïde (RM) a été caractérisé la première fois au début des années 70 dans le rein^{1,2}. Ce récepteur est codé par le gène *NR3C2* (*Nuclear Receptor sub-family 3 group C member 2*) et appartient à la famille des récepteurs nucléaires, plus précisément à la famille des récepteurs stéroïdiens dont font partie les récepteurs de la progestérone, des androgènes, œstrogènes et des glucocorticoïdes (RG)³. Le RG comme le RM, agissent comme des facteurs de transcription lorsqu'ils sont activés par la liaison avec leur ligand.

Situé sur le chromosome 4 chez l'Homme⁴, le gène *NR3C2* a une taille de 450 kilobases et est composé de dix exons séparés par huit introns^{5,6}. Comme l'illustre la **Figure 1**, les deux premiers exons (1 α et 1 β) sont non-codants tandis que les huit autres exons codent pour une protéine de 984 acides aminés (978 chez la souris) d'une masse moléculaire de 107 KDa.

Le RM possède trois domaines fonctionnels majeurs :

- une région N-terminale (RNT) contenant des domaines d'activation de la transcription (AF) : AF-1a (résidu 1-167) et AF-1b (résidu 445-602)^{7,8}. Cette région comprend également un domaine inhibiteur central (résidu 163-437) suffisant pour atténuer la force de transactivation globale du RNT. Pris ensemble, ces trois domaines recrutent différents co-régulateurs modulants l'activité transcriptionnelle du RM de manière plus sélective comparé aux autres récepteurs stéroïdiens⁹.
- un domaine central de liaison à l'ADN (DLA) permettant au RM de reconnaître des séquences cibles spécifiques ou des éléments de réponses hormonaux (HRE, *Hormone Response Element*). Ce domaine codé par les exons 3 et 4, est composé de 66 acides aminés. Cette région comprenant deux motifs en doigt de zinc permet la liaison à l'ADN et la dimérisation du RM.
- en position C-terminal, un domaine de liaison du ligand hormonal (DLL) s'étend sur 251 acides aminés. En plus de son rôle permettant l'interaction entre le RM et son ligand, le DLL interagit avec les protéines chaperonnes qui retiennent le récepteur dans le cytoplasme de la cellule¹⁰. Cette région contient également un domaine d'activation

de la transcription (AF-2) servant de plateforme d'accueil pour les co-régulateurs transcriptionnels^{11,12}.

La complémentarité de ces différents domaines permet au RM de jouer son rôle de facteur de transcription une fois activé par ses ligands.

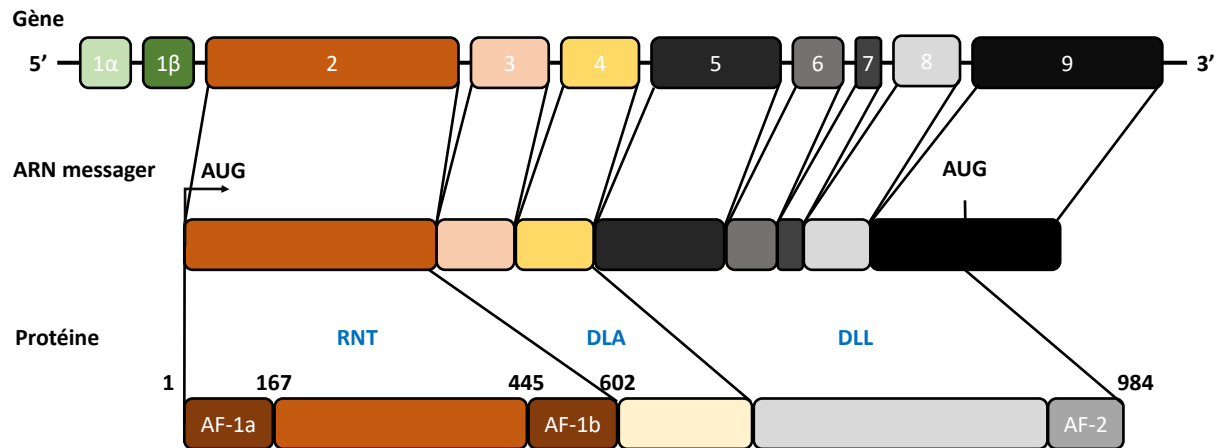


Figure 1 : Structure du récepteur minéralocorticoïde humain

RNT : région N-terminale ; DLA : domaine de liaison à l'ADN ; DLL : domaine de liaison du ligand ; AF : domaine d'action de la transcription. (Adapté de Viengchareun *et al.*)¹³.

1.2. Ligands du récepteur minéralocorticoïde : Aldostérone vs Glucocorticoïdes

Le RM a deux types de ligands physiologiques : l'hormone minéralocorticoïde (aldostérone) et les hormones glucocorticoïdes (cortisol chez l'Homme ou corticostérone chez le rongeur).

1.2.1. Hormone minéralocorticoïde : l'aldostérone

L'aldostérone est une hormone stéroïdienne de la classe des minéralocorticoïdes, synthétisée à partir du cholestérol dans la zone glomérulée des glandes surrénales. L'aldostérone est le dernier effecteur du système Rénine-Angiotensine-Aldostérone (SRAA) connu pour son rôle clef dans la régulation du volume extracellulaire, de l'homéostasie hydrosodée et de la pression artérielle.

Le SRAA peut être imagé comme une cascade de réactions dont le premier acteur est la rénine. La rénine est une enzyme synthétisée par les cellules juxtaglomérulaires du rein en réponse à une diminution de la perfusion rénale. Comme le montre la **Figure 2**, la rénine clive l'angiotensinogène hépatique pour former l'angiotensine I. A son tour, l'angiotensine I est

clivée par l'enzyme de conversion de l'angiotensine (ECA), sécrétée par l'épithélium pulmonaire, conduisant à la formation de l'angiotensine II. L'angiotensine II, connue pour être un vasoconstricteur puissant, induit une augmentation d'expression de l'aldostérone synthase (CYP11B2) aboutissant à la production d'aldostérone par les glandes surrénales.

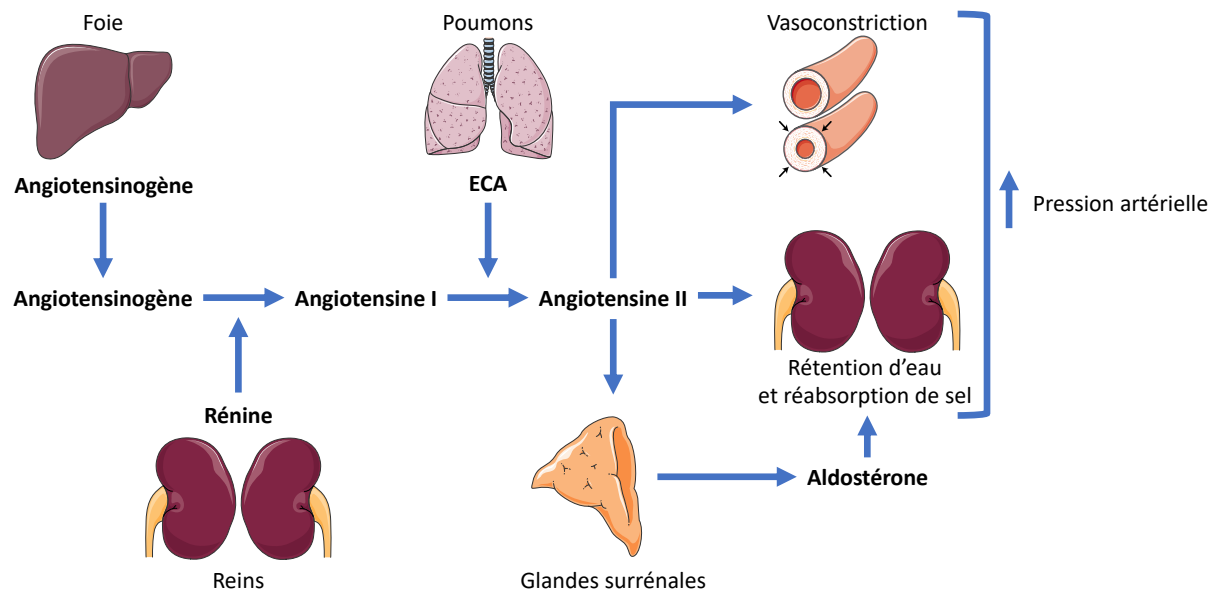


Figure 2 : Système Rénine-Angiotensine-Aldostérone
 ECA : Enzyme de conversion de l'angiotensine.

1.2.2. Hormones glucocorticoïdes

Comme pour l'aldostérone, les hormones glucocorticoïdes (cortisol pour l'Homme et corticostérone chez les rongeurs) sont des hormones stéroïdiennes synthétisées à partir du cholestérol dans la glande surrénale (dans la zone fasciculaire et réticulaire du cortex surrénalien). Les glucocorticoïdes se fixent à leur récepteur spécifique RG. Cependant ils sont également capables de se lier au RM et d'induire les voies de signalisation en aval.

Il est important de noter que la concentration plasmatique des glucocorticoïdes est 100 à 1000 fois supérieure à celle de l'aldostérone. De plus, l'aldostérone et les glucocorticoïdes peuvent se lier au RM avec une affinité similaire (constante de dissociation, $K_d = 0.5-2nM$)¹⁴. Dès lors, les glucocorticoïdes devraient saturer le RM bloquant ainsi les effets de l'aldostérone. Afin de permettre à l'aldostérone de remplir son rôle, des mécanismes de sélectivité interviennent¹⁴.

1.2.3. Sélectivité enzymatique : la 11 β -HSD2

Le principal mécanisme de sélectivité minéralocorticoïde est dépendant de l'activité d'une enzyme : la 11- β -hydroxystéroïde déshydrogénase de type 2 (11 β -HSD2)¹⁵. En effet, cette enzyme est capable de transformer le cortisol (chez l'Homme) ou la corticostérone (chez les rongeurs) en cortisone ou déhydrocorticostérone, possédant une faible affinité pour le RM¹⁶⁻¹⁸. La 11 β -HSD2 permet à l'aldostérone de se lier au RM malgré sa faible concentration plasmatique. Ainsi en absence de la 11 β -HSD2, le RM sera occupé par les glucocorticoïdes.

La co-localisation du RM et de la 11 β -HSD2 est donc essentielle à l'activité de l'aldostérone via son récepteur. Cependant la co-localisation, dans la même cellule, entre le RM et la 11 β -HSD2 est absente dans de nombreux tissus non-épithéliaux. Dès lors, d'autres mécanismes de sélectivité sont alors présents pour permettre à l'aldostérone de se lier à son récepteur.

1.2.4. Autres mécanismes de sélectivité minéralocorticoïde

La transcortine est une globuline qui lie 80-90% des glucocorticoïdes circulants. Cette protéine a été impliquée dans le processus de sélectivité minéralocorticoïde¹⁹. L'utilisation de souris ayant une délétion pour le gène codant de la transcortine sont résistantes aux effets de l'aldostérone induits par un régime pauvre en sel. En effet, l'absence de transcortine induit une augmentation de glucocorticoïdes libres dans le plasma favorisant leur liaison au RM et inhibant ainsi les effets de l'aldostérone²⁰.

Le RM possède des propriétés intrinsèques permettant de discriminer l'aldostérone et les hormones glucocorticoïdes. L'étude de la cinétique d'interaction entre le RM et ses ligands révèle que l'interaction entre l'aldostérone et le RM a une durée de vie prolongée comparée au complexe glucocorticoïdes/RM²¹. De plus, la transactivation du RM est plus efficace en présence d'aldostérone qu'en présence de glucocorticoïde⁵ : la dose d'aldostérone permettant l'activation du RM est 100 fois inférieure à celle des glucocorticoïdes. La dimérisation du RM serait également impliquée dans la sélectivité minéralocorticoïde²². L'hétérodimérisation entre le RM et le RG aurait un effet synergique dans l'activation de la transcription.

1.2.5. Activations non classiques du récepteur minéralocorticoïde

Nous avons vu que l'aldostérone et les glucocorticoïdes activent le RM. Cependant, à partir de cellules HEK 293 (*human embryonic kidney*) transfectées avec le RM, il a été montré que la protéine Rac1 (appartenance à la famille Rho GTPasique) est également capable d'activer le RM en présence ou en absence d'aldostérone²³. Rac1 est activée par divers facteurs tels que le stress mécanique, le régime riche en sel, le stress oxydatif ou directement par des cytokines (IFN α et IFN β)²⁴⁻²⁷. Le rôle de Rac1 dans les pathologies cardiovasculaires a été évalué. En effet, après une première étude montrant que l'activation du RM par le stress oxydatif est dépendante de Rac1²⁶, le groupe dirigé par Fujita T a montré que la délétion hétérozygote de Rac1 dans les cardiomyocytes limite la dysfonction et l'hypertrophie cardiaque induite par un modèle d'hypertension artérielle²⁸. Dans un modèle d'insuffisance rénale aiguë (IRA), notre laboratoire a démontré que l'inactivation de Rac1 dans les cellules musculaires lisses (CML) protège des lésions et de la dysfonction rénale, induites par l'ischémie/reperfusion (IR)²⁹.

1.3. Physiologie du récepteur minéralocorticoïde : Réabsorption de sodium

A travers son interaction avec le RM, l'aldostérone est connue pour son rôle dans l'homéostasie du sodium (Na⁺) et de l'eau au niveau de l'épithélium rénal. Cependant le RM est exprimé dans une grande variété de tissus, et par conséquent est impliqué dans différentes fonctions telles que : la fonction cardiovasculaire, la signalisation immunitaire et la différenciation des adipocytes.

1.3.1. Mécanisme d'action du récepteur minéralocorticoïde

Le RM agit comme un facteur de transcription lorsqu'il est lié avec son ligand. Quand le ligand n'est pas fixé au RM, le récepteur est maintenu dans une conformation inactive dans le cytoplasme (**Figure 3**). Cette conformation inactive est assurée par l'interaction du RM avec des protéines chaperonnes telles que *heat shock protein 90* (hsp90) et *FK506-binding protein 51* (FKBP51)³⁰⁻³².

L'interaction du RM avec son ligand (l'aldostérone en particulier) induit un changement de conformation, conduisant au recrutement de FKBP52 et permettant au complexe RM/hsp90/FKBP52 d'être internalisé dans le noyau de la cellule^{33,34}.

Une fois dans le noyau, les protéines chaperonnes hsp90 et FKBP52 se dissocient du RM conduisant à la dimérisation du récepteur et à son adressage à l'ADN sur ses régions spécifiques HRE. Dès lors, des protéines co-régulatrices telles que *steroid receptor coactivator* (SRC1)³⁵⁻³⁸ et *histone acetyltransferase p300/CRER-binding* (p300/CBP)⁷, ainsi que d'autres facteurs de transcription sont recrutés³⁹⁻⁴¹. La coopération entre ces différents acteurs permet la décompaction de la chromatine et la transcription des gènes cibles¹³.

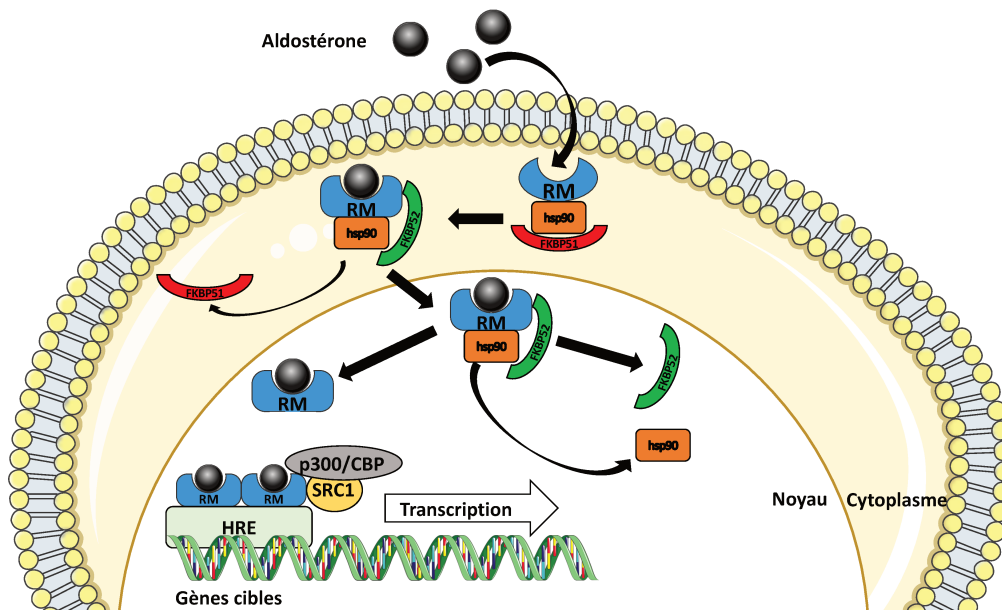


Figure 3 : Mécanisme d'action du RM

RM : récepteur minéralocorticoïde ; hsp90 : *heat shock protein* ; FKBP : *FK506-binding protein* ; SRC1 : *steroid receptor coactivator* ; p300/CBP : *histone acetyltransferase p300/CRER-binding* ; HRE : *hormone response element*. (Adapté de Yang & Fuller)⁴¹.

1.3.2. Effets génomiques du récepteur minéralocorticoïde dans l'épithélium rénal

Au début des années 50, il a été montré que l'aldostérone diminue l'excrétion de Na^+ et augmente l'excrétion de potassium (K^+)^{42,43}. En se fixant sur le RM, l'aldostérone participe à l'homéostasie ionique en induisant la transcription de gènes codant pour des protéines responsables du transport d'ions à travers la cellule.

1.3.2.1. Rôle du récepteur minéralocorticoïde dans le tubule contourné distal

Le néphron rénal est composé de différents segments permettant la réabsorption des différents électrolytes (Na^+ , K^+ , Cl^-). Cette réabsorption s'effectue principalement dans la partie distale du néphron et plus précisément au niveau du tubule contourné distal (TCD) et du canal collecteur (CC). Ces deux segments sont tapissés de cellules exprimant divers transporteurs et canaux permettant le transport de ces ions à travers l'épithélium rénal.

Le TCD régule la réabsorption de Na⁺ via le co-transporteur Na⁺/Cl⁻ (NCC) présent sur la membrane apicale des cellules. Le TCD se divise en deux segments : TCD1 et TCD2. Bien que le RM soit exprimé dans ces deux segments, la co-expression du RM et de la 11β-HSD2 est uniquement identifiée dans le TCD2⁴⁴. L'activation du NCC par l'aldostérone a été caractérisée à la fin des années 90^{45,46}. Depuis, il a été montré que la régulation du NCC s'effectue par l'activation des sérines thréonines kinases (WNK). WNK1, WNK3 et WNK4 sont associées au trafic, à la phosphorylation et à l'ubiquitination de NCC via Nedd4-2 (*neutral precursor cell-expressed developmentally downregulated gene 4-number 2*)⁴⁷⁻⁴⁹. La transcription de SGK1 (*serum and glucocorticoid-regulated kinase 1*), une cible du RM, joue un rôle essentiel dans l'homéostasie sodique. SGK1 phosphoryle l'ubiquitine ligase Nedd4-2 conduisant à son inhibition. Ainsi, il a été suggéré que l'aldostérone, via SGK1, pourrait réguler l'activation de NCC par l'inhibition de Nedd4-2⁵⁰. De plus, SGK1 induirait l'activation de WNT1 conduisant à la phosphorylation de SPAK/OSR1 (*Ste20-like proline alanine rich kinase / oxydative stress response kinase 1*) qui active NCC (**Figure 4**)⁵¹.

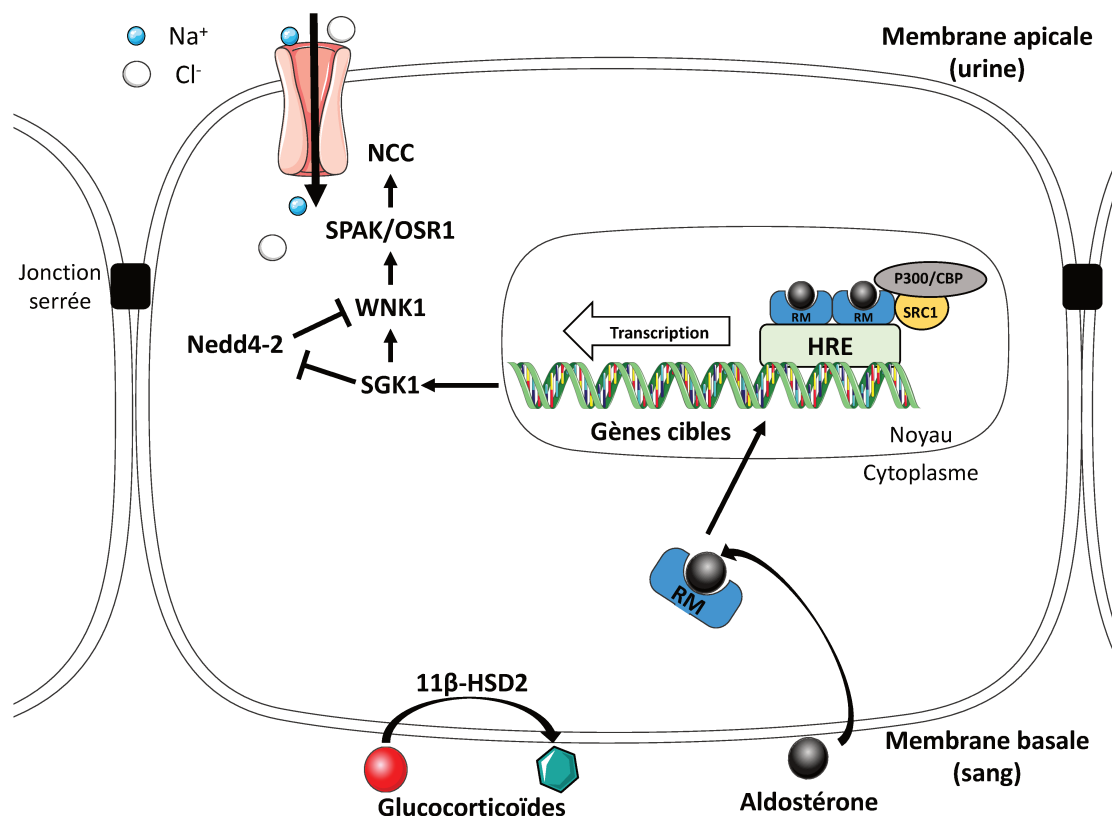


Figure 4 : Rôle du RM dans les cellules du tubule contourné distal 2

NCC : co-transporteur Na⁺/Cl⁻ ; WNK1 : *lysine deficient protein kinase 1* ; SPAK/OSR1 : *Ste20-like proline alanine rich kinase / oxydative stress response kinase 1* ; SGK1 : *serum and glucocorticoid-regulated kinase 1* ; Nedd4-2 : *neutral precursor cell-expressed developmentally downregulated gene 4-number 2* ; 11β-HSD2 : enzyme 11-β-hydroxystéroïde déshydrogénase de type 2.

1.3.2.2. Rôle du récepteur minéralocorticoïde dans le néphron distal

Le RM et la 11 β -HSD2 sont fortement exprimés dans les cellules principales du CC. Dans ces cellules, une des cibles génomiques du RM est le canal sodium épithélial (ENaC) présent dans les cellules principales du canal collecteur du rein⁵². Le canal ENaC est composé de différentes sous unités (α , β et γ) formant un hétérodimère adressé sur la membrane apicale des cellules épithéliales^{53,54}. Au niveau de l'épithélium rénal, cette orientation permet la réabsorption de Na⁺ urinaire vers l'intérieur de la cellule, et de là, vers le compartiment interstitiel (**Figure 5**).

Le RM transcrit également des gènes codant pour la pompe ionique ATPasique Na⁺/K⁺ (Na⁺/K⁺ ATPase) exprimée sur la membrane basale des cellules épithéliales. Cette pompe permet l'échange de trois ions Na⁺ à l'extérieur de la cellule contre deux ions K⁺ rentrant dans le milieu intracellulaire. S'effectuant contre le gradient de concentration, ce processus nécessite la consommation d'énergie sous la forme d'adénosine triphosphate (ATP) métabolisée en adénosine diphosphate (ADP)⁵⁵. Les ions K⁺ entrés dans la cellule, ressortent du côté apical en passant par le canal potassique ROMK (*renal outer medullary potassium channel*).

Comme pour le TCD, l'activation du RM conduit à la transcription de SGK1 dans les cellules principales du CC. L'inhibition de Nedd4-2 par SGK1 empêche l'adressage de ENaC vers le protéasome⁵⁶⁻⁵⁹. De plus, la *glucocorticoid-induced leucin zipper protein* (GILZ) est également un médiateur des effets du complexe RM/Aldostérone participant au maintien du canal ENaC à la membrane apicale des cellules épithéliales. Il a été montré que GILZ participait au transport de Na⁺ en inhibant ERK (*extracellular signal-regulated kinase*) qui, sous sa forme active, participe à la dégradation de ENaC⁶⁰. Plus récemment il a été montré que le recrutement de SGK1 par GILZ prévient l'ubiquitination de SGK1 et augmente même sa demi-vie⁶¹.

Le RM est donc impliqué directement ou indirectement dans la réabsorption de Na⁺ depuis l'urine vers le sang. Ce transport d'ions sodiques est accompagné par un flux d'eau entraînant une modification de la volémie et par conséquent une variation de la pression artérielle systémique⁶².

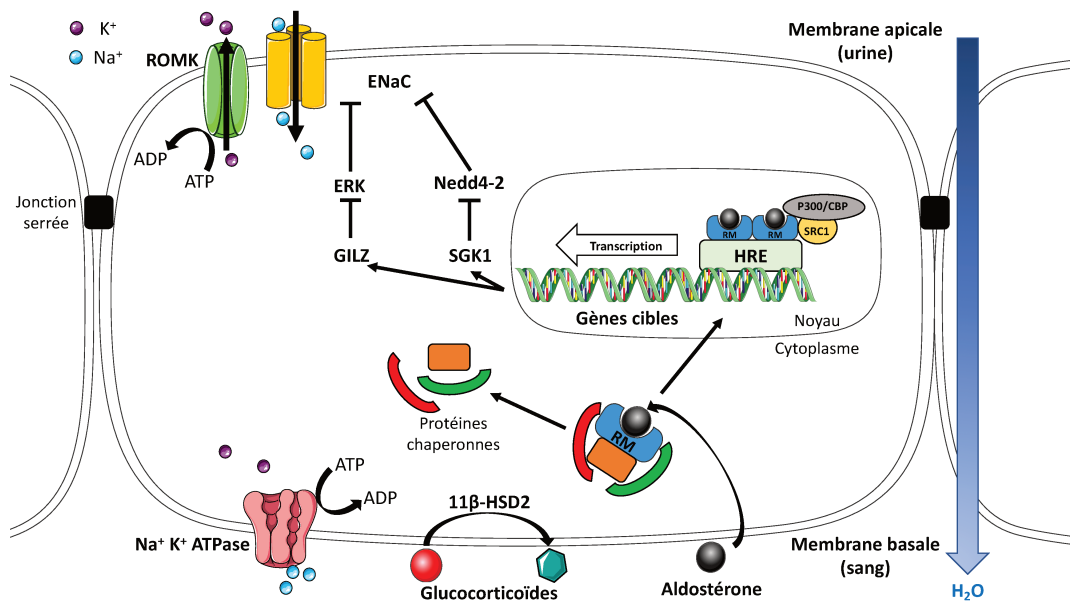


Figure 5 : Rôle du RM dans les cellules principales du canal collecteur

ENaC : canal sodium épithélial ; GILZ : *glucocorticoid-induced leucin zipper protein* ; ERK : *extracellular signal-regulated kinase* ; Na⁺/K⁺ ATPase : pompe ionique ATPasique Na⁺/K⁺ ; ROMK : *renal outer medullary potassium channel* ; AD(T)P : adénosine di(tri)phosphate ; K⁺ : potassium ; Na⁺ : sodium.

Bien que les cellules principales soient majoritaires dans le CC, un autre type de cellules est présente dans ce segment du néphron, il s'agit des cellules intercalaires. Ces cellules se divisent en trois sous types (α , β et non- α/β). Les cellules intercalaires α expriment une pompe ionique H⁺ et l'échangeur Cl⁻/HCO₃⁻ respectivement présents sur la membrane apicale et basale de la cellule. A l'inverse, les cellules intercalaires β expriment une pompe ionique H⁺ et l'échangeur Cl⁻/HCO₃⁻ (pendrine) respectivement présents sur la membrane basale et apicale de la cellule. Enfin les cellules intercalaires non- α/β sont caractérisées par l'expression de la pendrine et de la pompe ionique H⁺ sur la phase apicale de la cellule.

Comme vu précédemment l'activation de ENaC crée un gradient électrochimique conduisant à l'excrétion de K⁺. Cependant, la réabsorption de Cl⁻, via la pendrine, par les cellules intercalaires β est également une possibilité afin de rétablir l'équilibre électrophysiologique^{63,64}.

Comme pour les cellules principales, le RM est exprimé par les cellules intercalaires^{65,66}. De plus il a été montré que l'aldostérone conduit à une augmentation de l'expression de pendrine dans les cellules β ⁶⁷. Cette même étude montre que l'invalidation génétique de la pendrine prévient l'hypertension induite par le traitement de souris par la désoxycorticostérone (DOCA).

La phosphorylation du RM a été étudiée et près de 16 sites de phosphorylation ont été identifiés⁶⁸. Les études se sont focalisées sur la phosphorylation du résidu S843 qui a été rapporté comme étant le site responsable de la différence de sélectivité entre le RG et le RM⁶⁹. La forme phosphorylée du RM sur le site S843 a été uniquement identifiée dans le cytoplasme des cellules intercalaires β . Il a notamment été observé que l'hypotension et l'hypokaliémie contribuent à la déphosphorylation du RM au site S843⁶⁸. Shibata *et al.* ont également indiqué que la déphosphorylation du RM était dépendant de sa liaison à l'aldostérone, conduisant à une augmentation de l'expression de la pendrine et de la pompe ionique H^+ dans les cellules intercalaires β (**Figure 6**). Plus récemment, il a été montré que la délétion du RM dans les cellules intercalaires prévient l'augmentation d'expression de la pendrine induite par l'angiotensine II⁷⁰. De plus, l'inhibition de la voie de signalisation RM/pendrine contribue à la diminution de la pression artérielle. Pris ensemble, ces résultats montrent que le RM exprimé par les cellules intercalaires participe également à la régulation de la pression artérielle.

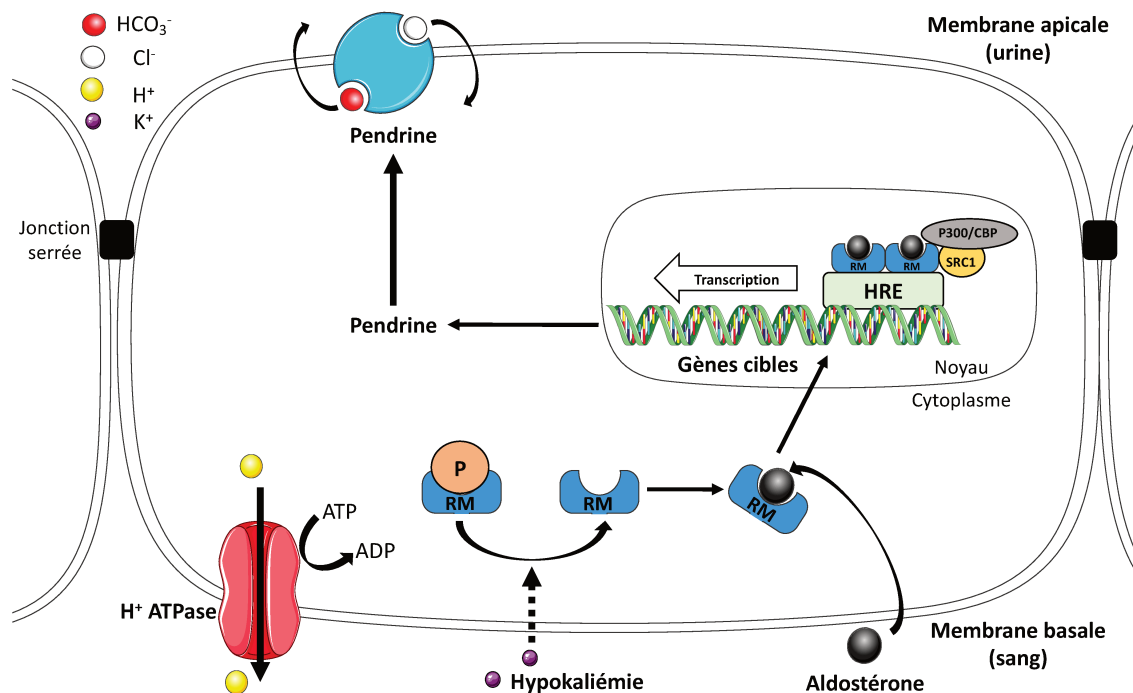


Figure 6 : Rôle du RM dans les cellules intercalaires β du canal collecteur
P : phosphorylation du RM au site S843 ; H^+ ATPase : pompe ionique ATPasique H^+

Pour résumer, le RM est directement impliqué dans la réabsorption de Na^+ en favorisant l'activation de ENaC et de NCC, présent respectivement à la membrane apicale des cellules principales du CC et des cellules épithéliales du TCD2 (**Figure 7**).

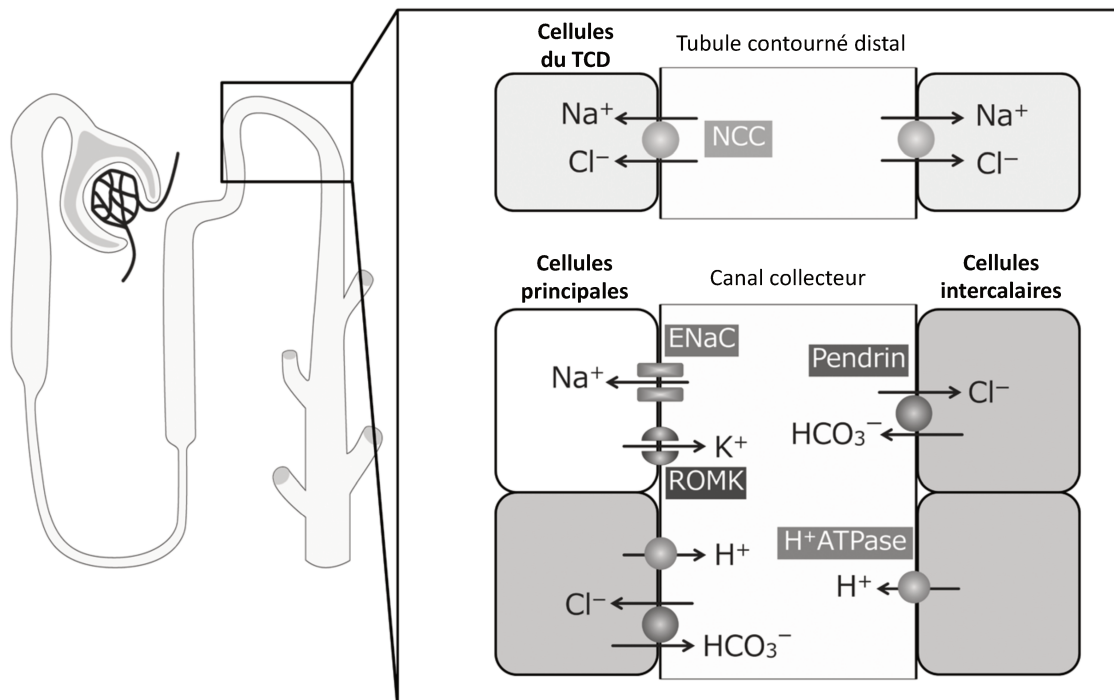


Figure 7 : Implication du RM dans la réabsorption de Na^+ à travers le néphron distal
(Adapté de Shibata)⁵⁰

1.3.3. Effets non génomiques du récepteur minéralocorticoïde

Les effets génomiques de l'aldostérone nécessitent un certain temps afin de permettre la transcription des gènes cibles et la traduction des ARN messagers en protéines.

Depuis qu'il a été montré que des bloqueurs de la synthèse protéique (actinomycine D et cycloheximide) n'étaient pas capables de bloquer tous les effets de l'aldostérone sur l'échangeur Na^+/H^+ dans des leucocytes mononucléaires humains, l'hypothèse d'un mécanisme d'action non-génomique de l'aldostérone a émergé⁷¹⁻⁷³. Les effets non-génomiques de l'aldostérone déclenchent rapidement des cascades de signalisation ou la régulation de transport d'ions et de protéines kinases. En effet, les effets rapides de l'aldostérone participent à la production de NADPH, ERK, JNK et PKC⁷⁴⁻⁷⁷. Physiologiquement ces effets non-génomiques sont également capables d'induire une augmentation du calcium et de changer le pH intracellulaire⁷⁸. Des études montrent que ces effets non-génomiques pourraient toutefois être dépendants du RM⁷⁹⁻⁸¹ localisé à proximité de la membrane cytoplasmique⁸²⁻⁸⁴. Cependant, d'autres études ont montré que les effets rapides de

l'aldostérone (activation de la voie ERK, apoptose, contraction des cellules musculaires lisses vasculaires CMLV) pouvaient être médiés par le récepteur couplé aux protéines G 30 (GPR30)⁸⁵⁻⁸⁷.

1.4. Antagonistes du récepteur minéralocorticoïde : Stéroïdiens vs non stéroïdiens

Les effets bénéfiques de l'administration d'antagonistes du récepteur minéralocorticoïde (ARMs) sont largement décrits dans diverses pathologies et seront abordés plus tard dans ce manuscrit.

Il existe deux familles d'ARMs, les ARMs stéroïdiens et les ARMs non stéroïdiens. Historiquement les ARMs stéroïdiens ont été les premiers à être découverts et testés afin de limiter les effets délétères de la sur-activation du RM dans de nombreuses pathologies. Parmi les ARMs stéroïdiens, la spironolactone (ARM de première génération) a été le premier ARM à être autorisé par la FDA (*Food and Drug Administration*) à être commercialisé pour lutter contre l'hyperaldostéronisme et l'hypertension artérielle. Dès 1966, une étude clinique montre que l'administration de cette molécule réduit la pression artérielle chez des patients souffrants d'hypertension⁸⁸.

1.4.1. Antagonistes stéroïdiens

La spironolactone se lie au RM avec une forte affinité et le déstabilise, l'empêchant ainsi d'interagir avec ses co-régulateurs^{89,90}. En ayant la capacité de se lier aux récepteurs à la progestérone et aux androgènes, la spironolactone est connue pour avoir des effets secondaires non désirables tels que la gynécomastie, des troubles du cycle menstruel et de l'impuissance⁹¹.

Les recherches sur les ARMs se sont alors portées sur la modélisation d'une molécule qui serait plus spécifique au RM afin de ne pas reproduire les effets secondaires liés à l'administration de spironolactone. L'éplerenone (ARM de seconde génération) a été synthétisé et a également démontré sa capacité à déstabiliser la conformation du RM^{92,93}. L'éplerenone est plus spécifique au RM que la spironolactone, mais a une moins bonne affinité pour le récepteur conduisant à une moins bonne efficacité⁹⁴. De plus, une fois métabolisée, la spironolactone a de nombreux métabolites actifs (canrenone, 7 α -thiométhyl-spironolactone

et 6 β -hydroxy-7 α -thiomethyl-spironolactone) allongeant par conséquent sa demi-vie (entre 13 et 17 heures)^{95,96} alors que l'eplerenone a une durée de demie vie de 4 heures⁹⁷. Par conséquent, l'administration de l'eplerenone doit être plus fréquente et à une dose plus élevée pour avoir un effet bénéfique similaire à la spironolactone.

La prescription des ARMs dans certaines pathologies telles que l'insuffisance cardiaque (IC) et/ou une insuffisance rénale est contre indiquée. Ceci est lié au risque de développer une hyperkaliémie (concentration de K⁺ > 5.5 mmol/L) qui est corrélée avec une augmentation de la mortalité de patients. En effet, il a été évalué que le risque de développer une hyperkaliémie était de 41.4% des patients souffrants d'IC traités avec 50 mg de spironolactone (13.5% pour 25 mg de spironolactone) et également de 11% chez des patients recevant 50 mg d'eplerenone^{98,99}. Dès lors, la recherche s'est portée sur une troisième génération d'ARMs qui pourraient combiner l'efficacité de la spironolactone et la spécificité de l'eplerenone tout en évitant le risque de développer une hyperkaliémie.

1.4.2. Antagonistes non stéroïdiens

De nombreux ARMs non stéroïdiens sont d'ores et déjà à l'étude avec des résultats précliniques encourageants. En effet, le PF-03882845 et le DSR-71167 réduisent respectivement le développement des lésions rénales et l'augmentation de la pression artérielle tout en limitant le risque d'hyperkaliémie^{100,101}. Cependant nous allons nous intéresser plus particulièrement à un troisième ARM non stéroïdien utilisé dans mon travail de thèse : la finerenone.

La finerenone est une molécule synthétisée par Bayer qui a une efficacité supérieure à la spironolactone et à l'eplerenone (concentration inhibitrice médiane de la finerenone : IC₅₀= 18 nM vs 24 et 990 nM pour la spironolactone et l'eplerenone respectivement) et possède une sélectivité 500 fois plus importante pour le RM que pour les autres récepteurs stéroïdiens¹⁰². Il a été démontré que la finerenone est plus efficace que la spironolactone pour retarder la translocation du RM dans le noyau induite par l'aldostérone¹⁰³. De plus, il a été montré que la finerenone inhibe le recrutement de SCR1 qui est essentiel à la transcription des gènes cibles du RM (vu précédemment, paragraphe 1.3.1). Une étude a suggéré que le risque d'hyperkaliémie serait moindre par le traitement à la finerenone du à la distribution de

la molécule dans l'organisme¹⁰⁴. En effet, le finerenone serait distribuée de manière équivalente entre les reins et le cœur alors que l'eplerenone est 3 fois plus présente dans les reins que dans le cœur. Ce même article montre l'effet protecteur cardiaque et rénal de la finerenone indépendamment d'une amélioration de la pression artérielle (avec 1 mg/kg de finerenone) dans un modèle de rats traités à la DOCA associée à un régime riche en sel (DOCA/sel). Afin d'évaluer l'efficacité de la finerenone sur l'Homme, différents essais cliniques ont été réalisés et d'autres sont actuellement en cours et seront détaillés plus tard dans ce manuscrit.

1.5. Physiopathologie du récepteur minéralocorticoïde : Du rein au cœur, études précliniques et cliniques.

L'étude des effets délétères de l'aldostérone remonte aux années 40 avec une étude montrant que la DOCA induit une néphropathie associée à une hypertrophie cardiaque chez des poussins.¹⁰⁵ Quelques années plus tard, le même groupe a démontré les effets protecteurs de l'administration d'ARM (la spironolactone), dans les lésions cardiaques induites par l'aldostérone¹⁰⁶.

1.5.1. Rôle du récepteur minéralocorticoïde dans les pathologies rénales

C'est en 1964 que la présence d'une protéinurie a été décrite pour la première fois chez 85% des patients atteints d'hyperaldostéronisme associé à une hypertension¹⁰⁷. Cependant la présence de protéines dans les urines de ces patients a été attribuée aux conséquences de l'hypertension. Une vingtaine d'années plus tard, il a été montré que l'aldostérone était capable d'induire une protéinurie sans augmentation de la pression artérielle dans un modèle de rat uninephrectomisé recevant de l'aldostérone¹⁰⁸. Depuis, de nombreuses études précliniques ont été publiées, utilisant différents modèles animaux afin d'étudier les effets des ARMs dans des modèles d'insuffisance rénale aiguë (IRA) et chronique (IRC).

1.5.1.1. Études précliniques

Dans un modèle IR bilatérale rénale chez le rat, le traitement par la spironolactone en amont de l'IR ou 3 heures après la reperfusion est suffisant pour avoir un effet protecteur. Cependant l'administration de spironolactone 6 heures après la reperfusion ne prévient que

partiellement les lésions rénales induites par l'IR^{109,110}. Les études de la tolérance et de l'efficacité des ARMs de nouvelle génération (non stéroïdiens) dans les pathologies rénales ont d'ores et déjà débuté. Récemment, une équipe a évalué l'effet d'un nouvel ARM non stéroïdien, l'esaxerenone (CS-3150), dans les lésions rénales induites par le diabète¹¹¹. Cette étude montre que ce nouvel ARM est plus efficace que la spironolactone pour protéger des lésions rénales induite par un régime riche en sel chez des souris diabétiques. Dans l'étude des effets des ARMs non stéroïdiens, notre équipe a montré les effets protecteurs de la finerenone dans un modèle d'IR chez le rat : le traitement par cet ARM protège des lésions aiguës et prévient le développement d'une IRC induite par l'IR¹¹².

Dans des modèles d'IRC associée à l'hypertension liée au sel, il a été montré que le blocage du RM par l'eplerenone prévient des lésions rénales indépendamment de variation de la pression artérielle¹¹³. De manière similaire, en utilisant des rats spontanément hypertendus, développant de lésions rénales et une protéinurie, Rocha *et al.* ont montré que le traitement par la spironolactone prévient les dommages rénaux sans diminution de l'hypertension¹¹⁴. Barrera-Chimal *et al.* ont étudié l'effet de la spironolactone (administrée 24H après l'IR sur une période de 5 ou 10 jours) sur la transition IRA/IRC chez le rat¹¹⁵. A l'issue des 5 mois de suivi, la spironolactone administrée en post intervention sur une durée de 10 jours améliore la dysfonction rénale (protéinurie) associée à des lésions rénales (hypertrophie des glomérules, fibrose interstitielle et glomérulaire) induites par l'IR. Les effets des ARMs ont également été étudiés dans un modèle d'obstruction urétéral unilatérale (OUU) démontrant que le traitement par la spironolactone et par l'eplerenone conduit à une réduction de la fibrose rénale, de l'inflammation, de l'infiltration de cellules immunitaires (macrophages, monocytes) et une diminution du stress oxydatif¹¹⁶⁻¹¹⁸.

Qu'il s'agisse de modèles aigus ou chroniques, les ARMs préviennent le développement de la fibrose rénale, limitent la production de protéines impliquées dans le remodelage tissulaire telles que collagène, fibronectine et TGF β et diminuent l'expression de molécules proinflammatoires^{116,119-122}.

Alors que les effets protecteurs des ARMs ont été démontrés pour limiter le développement des lésions rénales, l'effet de l'inactivation du RM dans des cellules spécifiques est moins tranché. Dans un modèle de dysfonction rénale induite par l'administration d'anticorps anti-GBM (*glomerular basement membrane*), la délétion du RM dans les podocytes n'améliore ni l'albuminurie, ni les lésions rénales induites¹²¹. De manière similaire, l'inactivation génétique du RM dans les cellules endothéliales ne limite pas la dysfonction les lésions rénales induites par le modèle d'hypertension DOCA/sel¹²³. Cependant, l'absence du RM dans les CML prévient les lésions rénales induites par l'IR²⁹.

1.5.1.2. Études cliniques

Au cours des deux dernières décennies, de nombreuses études cliniques ont montré les effets bénéfiques des ARMs chez des patients souffrants d'IRC. Deux articles publiés en 2014 et 2016, reprennent les résultats d'une vingtaine d'études cliniques réalisées respectivement de 2002 à 2011 et de 2005 à 2014^{124,125}. Ces deux études montrent que l'administration d'ARMs associée avec des inhibiteurs de l'ECA (iECA) d'une part ou avec des antagonistes du récepteur de l'angiotensine (ARA) améliorent la fonction rénale des patients en IRC avec une diminution de la protéinurie. Sur une courte durée (90 jours), l'étude clinique ARTS-DN a montré que la finerenone, associée à des iECA ou ARA, réduit également la protéinurie (de manière dose-dépendante) chez des patients souffrants de néphropathies liées au diabète¹²⁶. Alors qu'aucunes données ne montrent d'effet protecteur des ARMs sur le long terme, l'étude clinique FIDELIO-DKD en cours, cherche à établir l'effet du traitement par la finerenone sur la progression de l'IRC de patients atteints de diabète de type 2 sur une durée de 39 mois.

1.5.2. Rôle du récepteur minéralocorticoïde dans les pathologies cardiaques

Au début des années 90, les travaux pionniers de Brilla et Weber ont démontré le rôle du RM dans la fibrose cardiaque indépendamment d'un effet lié à l'hypertension artérielle chez le rat¹²⁷.

1.5.2.1. Études précliniques

Dès lors, de nombreuses études ont utilisé un modèle de surcharge minéralocorticoïde (perfusion d'aldostérone ou de DOCA) associé à un régime riche en sel chez des animaux ayant subi une uninephrectomie (NAS ou DOCA/sel). Ce modèle d'hypertension conduit à une hypertrophie rénale et cardiaque associées au développement d'une fibrose dans ces deux organes. Le blocage du RM par des ARMs (spironolactone et eplerenone) conduit à une amélioration de l'IC, du remodelage cardiaque, de l'inflammation et réduit le stress oxydatif¹²⁸⁻¹³⁰. Plus récemment, Kolkhof *et al.* ont montré que la finerenone prévient l'hypertrophie cardiaque et la surexpression des peptides natriurétiques induites dans un modèle DOCA/sel¹⁰⁴. Une étude visant à comparer l'effet de la finerenone à celui de l'eplerenone dans un modèle de contraction aortique, indique que les souris traitées par l'eplerenone ont une hypertrophie du ventricule gauche significativement plus importante que les souris traitées par la finerenone¹³¹.

Des modèles d'inactivation génétique du RM dans les cardiomyocytes ont montré une amélioration de la fibrose cardiaque dans des modèles DOCA et d'infarctus du myocarde (IM)^{132,133}. Les cellules endothéliales et CMLV (cellules musculaires lisses vasculaires) jouent un rôle prépondérant dans la physiologie vasculaire et ont par conséquent un effet sur la physiopathologie cardiaque. L'inactivation du RM dans les cellules endothéliales protège de l'inflammation et du remodelage cardiovasculaire dans un modèle d'obésité induit par un régime riche en graisse^{134,135}. L'implication du RM, exprimée par les CMLV, dans le remodelage pathologique a également été démontrée dans un modèle d'IM¹³⁶.

1.5.2.2. Études cliniques

En parallèle des études précliniques démontrant les effets bénéfiques des ARMs et de l'inactivation génétique du RM dans différents types cellulaires, de nombreuses études cliniques ont également été réalisées afin de déterminer si l'administration des ARMs serait bénéfique chez des patients souffrant de pathologies cardiaques.

La spironolactone a été le premier ARM à être testé en chez des patients avec une IC sévère. Cette première étude a démontré que la spironolactone induit une diminution de 30% de la mortalité et de la morbidité des patients traités¹³⁷. Suite aux effets secondaires non

désirés de la spironolactone, une seconde étude clinique a été réalisée avec l'éplerenone, une molécule beaucoup plus sélective au RM que la spironolactone. Cependant, du fait de sa faible affinité pour le RM (40 fois moins importante comparée à la spironolactone), l'éplerenone doit être administré à plus forte dose afin d'obtenir un effet similaire¹³⁸. Ainsi l'éplerenone a donc été administré dans deux essais cliniques, EPHEBUS et EMPHASIS, incluant respectivement des patients avec une dysfonction du ventricule gauche (à la suite d'un IM) puis des patients avec une forme modérée d'IC. Ensemble, ces deux études ont révélé les effets bénéfiques de l'éplerenone en réduisant la mortalité et la morbidité des patients traités^{139,140}. Les effets bénéfiques des ARMs sont maintenant étudiés aux phases précoces de l'IM (REMINDER)¹⁴¹. L'administration de spironolactone ou d'éplerenone améliore les dysfonctions cardiaques chez des patients souffrant d'IM^{141,142}. Une étude clinique récente s'est intéressée aux patients souffrant d'IC avec une fraction d'éjection préservée (TOPCAT)¹⁴³. A cause d'une forte variabilité géographique, ce dernier essai clinique ne montre pas d'effet de la spironolactone sur la mortalité des patients en IC. En effet, une analyse post-hoc de l'essai clinique TOPCAT a révélé que la cohorte des patients Russes et Géorgiens étaient plus jeunes, avec moins de fibrillations auriculaires et présentaient un phénotype diabétique moins prononcé¹⁴⁴. De plus, ces patients avaient une pression artérielle plus élevée. L'ensemble de ces paramètres ne permet pas d'observer un effet significatif de la spironolactone. Cependant, l'étude de la cohorte de patients américains montre que les décès et hospitalisations liés à des problèmes cardiovasculaires étaient réduits chez les patients traités par la spironolactone.

Parmi ces études cliniques, peu se sont intéressées aux effets bénéfiques des ARMs sur les pathologies cardiaques chez des patients souffrant d'IRC. En effet, les patients souffrant d'IRC sont généralement exclus des études cliniques impliquant des traitements par ARM lié au risque de développer une hyperkaliémie. Dans l'essai clinique EMPHASIS, il a été montré que les patients en IRC traités par l'éplerenone présentaient une hyperkaliémie conduisant à l'arrêt du traitement¹⁴⁵. Les ARMs restent sous-employés chez les patients souffrant d'IC et d'autant plus lorsque l'IC est présente chez des patients également atteints d'IRC^{146,147} alors que le bénéfice est démontré et que le risque de développer une hyperkaliémie est contrôlé si les patients sont correctement inclus et suivis.

1.5.3. Implication du récepteur minéralocorticoïde dans l'inflammation et la fibrose

Les lésions tissulaires induisent un processus inflammatoire essentiel à la régénération du tissu lésé et au développement de la fibrose. Dans un premier temps, l'inflammation participe au recrutement de cellules de l'immunité innée (neutrophiles, basophiles, éosinophiles, macrophages, cellules dendritiques) qui va tenter de « réparer » le tissu endommagé. Cependant si l'état d'inflammation persiste (inflammation chronique), les cellules du système immunitaire adaptatif (lymphocytes T, lymphocytes B) vont être recrutées au site de lésion tissulaire et contribuer au développement de la fibrose.

Les macrophages jouent un rôle prépondérant dans le développement de l'inflammation contribuant également à la fibrose. Le rôle du RM exprimé par les macrophages a été étudié à l'aide de souris ayant une invalidation génétique du gène codant pour le RM dans les macrophages (KO RM). A partir de modèles d'hypertension artérielle (DOCA/sel ou L-NAME/sel associé à une uninephrectomie), les souris KO RM macrophages ont une diminution de l'infiltration de macrophages dans le cœur, associée à une diminution d'expression de cytokines proinflammatoires (CCL5, TNF α , IL1 β) et d'une augmentation d'expression des marqueurs des macrophages de type M2 (PPAR γ , ARG1, IL10, YM1, FIZZ1)¹⁴⁸⁻¹⁵¹. L'invalidation du RM dans les macrophages conduit à une réduction du dépôt de collagène dans le cœur des souris KO RM macrophages. Ces différents éléments conduisent à une réduction de l'hypertrophie cardiaque dans ces modèles d'hypertension chez les souris KO RM. A partir d'un modèle d'IRC induit par l'administration d'anticorps anti-GBM, Huang *et al.* ont montré que le KO RM macrophage prévient l'augmentation du collagène et de la fibronectine et partiellement celle de molécules proinflammatoires telles que TNF α , MCP1¹²¹. Récemment, nous avons montré dans un modèle d'IRC induite par l'IR que l'invalidation du RM macrophage réduit l'augmentation d'expression de protéines profibrotiques (fibronectine et TGF β), limite le développement de la fibrose interstitielle rénale et prévient la dysfonction rénale¹⁵².

Les lymphocytes T CD4⁺ sont essentiels au processus de remodelage tissulaire. En effet ces cellules sont connues pour sécréter des cytokines participant directement au développement de la fibrose. L'invalidation du RM dans ces cellules réduit l'infiltration des cellules immunitaires (macrophages, neutrophiles et lymphocytes T) associée à une

diminution d'expression de molécules proinflammatoires (IFN γ , IL6) dans un modèle murin avec constriction aortique¹⁵³. Les souris KO RM dans les lymphocytes T CD4⁺ présentent une amélioration de la fraction d'éjection et une réduction de l'hypertrophie cardiaque. Dans un modèle d'hypertension induite par l'angiotensine II, il a été montré que la délétion du RM dans les lymphocytes T CD4⁺ protège de l'hypertrophie glomérulaire et de la fibrose rénale et est associé à une diminution rénale de l'infiltration de macrophages et de lymphocytes T¹⁵⁴.

Nous avons récemment proposé un schéma récapitulatif de la signalisation du RM dans le développement de l'inflammation et de la fibrose incluant le rôle central du stress oxydatif (**Figure 8**)¹⁵⁵. En effet, il y est suggéré que le RM favorise l'expression d'espèces réactives à l'oxygène (ROS) qui sont impliquées dans l'activation de la voie de signalisation NF- κ B conduisant à l'induction de cytokines proinflammatoires (IL6, TNF α , IFN γ). De plus, comme indiqué précédemment les ROS auraient un rôle de « feedback » positif en activant le RM via Rac1, amenant à amplifier cette activation initiale.

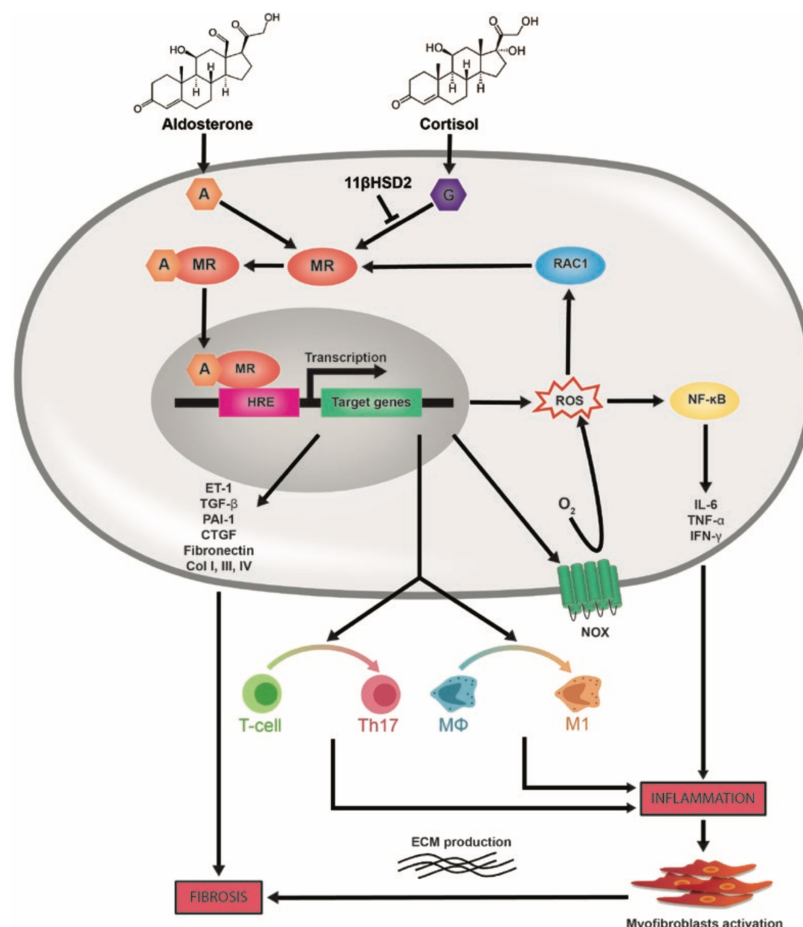


Figure 8 : Suggestion schématique du rôle du RM dans l'inflammation et la fibrose (A partir de Buonafine *et al.*)¹⁵⁵.

1.5.4. Syndrome cardio-rénal

Le syndrome cardio-rénal (SCR) a été défini en 2008 par l'association des dysfonctions cardiaques et rénales^{156,157}. Cette définition se divise en 2 principaux groupes basés sur la primauté de l'apparition de la pathologie cardiaque ou rénale : syndrome cardio-rénal et réno-cardiaque. Ces deux groupes sont sous-divisés en fonction de l'atteinte aiguë ou chronique des pathologies initiales. Pour résumer il y a 4 principaux sous-types de SCR :

- SCR type 1 : IC aiguë conduit à une IRA
- SCR type 2 : IC chronique conduit à une IRC
- SCR type 3 : IRA conduit à une IC aiguë
- SCR type 4 : IRC conduit à une IC chronique

Un cinquième type de SCR (SCR type 5) est également présenté comme étant une dysfonction conjointe du cœur et des reins dans un contexte systémique (diabète, sepsis).

Nous allons essentiellement nous intéresser au SCR de type 4.

Le SCR de type 4 est lié aux complications cardiovasculaires présentes chez les patients souffrant d'IRC. En effet, il existe une étroite relation entre l'IRC et l'augmentation des risques cardiovasculaires : 50% des décès des patients en IRC sont liés à des événements cardiaques¹⁵⁸. Afin de corréler ces données, une équipe a analysé le débit de filtration glomérulaire de plus d'un million de patients n'ayant subi ni dialyse, ni transplantation rénale. Ils sont arrivés à la conclusion que la diminution du débit de filtration glomérulaire étaient corrélée avec une augmentation des événements cardiovasculaires¹⁵⁹.

C'est dans ce contexte qu'ont débuté notamment deux essais cliniques visant à étudier les effets des ARMs sur les complications cardiovasculaires de patients en IRC. Le premier essai clinique, ALCHEMIST, évalue l'effet de la spironolactone sur la mortalité et la morbidité associées aux événements cardiovasculaires. Un second essai clinique (FIGARO-DKD), quant à lui, étudie l'effet de la finerenone sur les complications cardiovasculaires de près de 6400 patients atteints de néphropathie diabétique. Les résultats de ces essais cliniques sont attendus en 2021.

2. Neutrophil Gelatinase Associated Lipocalin : Une nouvelle cible du récepteur minéralocorticoïde

2.1. Identification de NGAL : Analyse transcriptomique

L'utilisation de modèles d'inactivation génétique ou le blocage pharmacologique du RM (dans les modèles animaux et chez l'Homme) et le rôle délétère du RM dans de nombreux contextes physiopathologiques est bien donc caractérisé. Afin de mieux comprendre les mécanismes moléculaires liés à l'activation du RM, de nouvelles molécules intervenant dans la signalisation du RM ont été identifiées telles que la galectine 3, la cardiotrophine 1 et la neutrophil gelatinase associated lipocalin (NGAL).

A partir d'une analyse transcriptomique réalisée à partir d'échantillons de cœur provenant de souris surexprimant le RM ou le RG dans les cardiomyocytes, notre laboratoire a étudié l'expression des gènes qui était uniquement modifiée par la surexpression du RM . Parmi ces gènes, notre équipe s'est particulièrement intéressée au gène de la lipocalin 2 (Lcn2 ou NGAL). Notre avons montré que le RM est capable de se lier aux séquences promotrices de NGAL¹⁶⁰. Cependant le RG peut également se fixer sur ces séquences. En traitant une lignée cellulaire de cardiomyocytes (transfectés avec le RM) par de la corticostérone, notre équipe a démontré que seul le blocage du RM parvenait à inhiber l'expression de NGAL. De plus, il a été décrit que l'expression de NGAL est augmentée de 150 fois dans le cœur des souris surexprimant le RM dans les cardiomyocytes alors que dans le cœur des souris surexprimant le RG dans les cardiomyocytes, l'expression de NGAL n'est augmentée que de 5 fois¹⁶⁰. Ces résultats suggèrent que l'expression de NGAL dans les cardiomyocytes sous l'effet des corticostéroïdes passe essentiellement par la voie de signalisation du RM

2.2. Du gène à la protéine NGAL : Définition et fonction

2.2.1. La famille des lipocalines

NGAL fait partie de la famille des lipocalines. Les différents membres de la famille des lipocalines n'ont qu'une faible similarité de séquences d'acides aminés mais ils possèdent tous une structure tertiaire commune composée de 8 feuillets β antiparallèles liés entre eux par des liaisons hydrogènes. Cette structure permet la liaison et le transport d'une grande

variété de petites molécules lipophiles telles que le rétinol ou certaines molécules odorantes^{161,162}.

2.2.2. Structure et expression de NGAL

Initialement purifié à partir de cellules rénales murines infectées par le virus SV40, NGAL a été identifié comme une petite glycoprotéine de 25kDa¹⁶³. Chez l'Homme, NGAL est codé par le gène *lcn2*, composé de 7 exons et situé sur le chromosome 9. Une fois transcrit, ce gène produit une protéine de 198 acides aminés¹⁶⁴. Chez la souris le gène *lcn2* est situé sur le chromosome 2 et est composé de 6 exons. Ce gène code pour une protéine plus longue que l'isoforme humaine cependant le NGAL humain et murin partagent 85% d'homologie dans la composition d'acides aminés.

La structure de NGAL est composée de 8 feuillets β antiparallèles formant un tonneau ouvert où se situe son site de liaison au ligand (**Figure 9A et B**). Son site de fixation est polaire et assez étendu pour pouvoir accueillir des protéines¹⁶⁶. En effet, NGAL présente la particularité d'être associé avec la métalloprotéinase matricielle 9 (MMP9). Chez l'Homme, la présence d'une cystéine sur le résidu 87 permet à NGAL d'interagir avec MMP9 en créant un pont disulfure¹⁶⁷. Cette association entre NGAL et MMP9 permet de stabiliser et de limiter la dégradation de NGAL^{167,168}. Cependant le résidu responsable de cette interaction est absent chez les rongeurs, suggérant que le complexe NGAL/MMP9 n'existera pas chez ces animaux mais ceci est sujet à controverse. En effet, le complexe NGAL/MMP9 a été détecté *in vitro* dans le surnageant de CML de rat traitées par l'IL1 β et *in vivo* dans des plaques d'athérome chez la souris dans un modèle d'IM^{169,170}. Connaissant l'implication des MMPs dans le remodelage tissulaire, NGAL est apparu comme un parfait candidat potentiellement impliqué dans les lésions cardiaques et rénales modulées par le RM.

Étant une protéine sécrétée, la présence de NGAL peut être évaluée dans le plasma (70 ng/ml chez l'Homme et 100 ng/ml chez la souris)¹⁷¹⁻¹⁷³. L'élimination de NGAL se fait essentiellement par la voie urinaire le rendant donc détectable dans les urines à une concentration de l'ordre de 20 ng/ml. En réponse à des dommages tubulaires, l'expression de NGAL est 1000 fois supérieure qu'en condition physiologique et est rapidement libéré dans le plasma et dans l'urine, ce qui en fait un bon biomarqueur de lésions rénales^{174,175}. De plus,

NGAL pourrait également servir de biomarqueurs chez des patients souffrants d'IC. En effet des niveaux élevés de NGAL dans le plasma ont été corrélés avec une augmentation de la mortalité de patients souffrants d'IC indépendamment de la présence d'une dysfonction rénale^{176,177}.

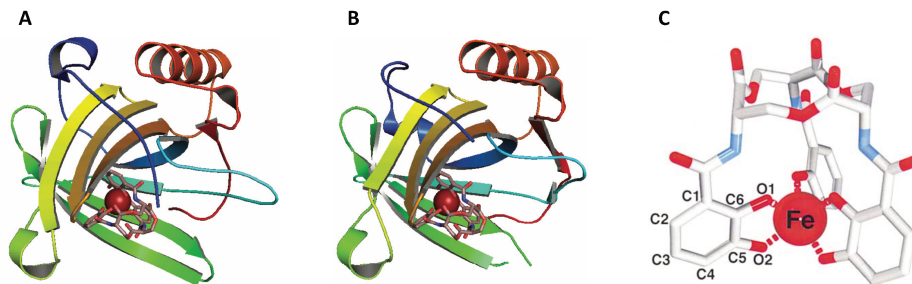


Figure 9 : Structure de NGAL associé au complexe sidérophore/fer

Structure 3D de NGAL humain (A) et murin (B) représentant les 8 feuillets β antiparallèles et son site de fixation associé au complexe sidérophore contenant un ion ferrique (sphère rouge). (C) Structure du sidérophore associé à l'ion de ferrique. (A partir de Xiao *et al.* et Goetz *et al.*)^{166,178}.

2.2.3. Régulation de NGAL

NGAL tire son nom de sa découverte dans le surnageant de neutrophiles humains stimulés par le *phorbol myristate acetate*^{168,179}. Cependant, NGAL est exprimé par une grande variété de cellules telles que les cellules rénales, endothéliales, CML, cardiomyocytes et par certaines cellules immunitaires (neutrophiles, macrophages et cellules dendritiques)^{171,179-183}.

NGAL possède deux récepteurs : 24p3R et la mégaline. Le récepteur 24p3R a une forte affinité pour NGAL et permet son internalisation dans la cellule. L'expression de ce récepteur a été identifiée dans le cœur (à la surface des cardiomyocytes) et également dans le néphron distal¹⁸⁴⁻¹⁸⁶. La mégaline est reconnue pour être le principal récepteur de NGAL puisque son affinité pour NGAL est plus importante que pour d'autres lipocalines¹⁸⁷. La mégaline est exprimée par différents types cellulaires : cellules immunitaires (lymphocytes T et B, granulocytes, macrophages), cardiomyocytes, et cellules épithéliales rénales¹⁸⁸⁻¹⁹⁰.

L'expression de NGAL est induite par de nombreux mécanismes proinflammatoires. L'une des premières études a indiqué que NGAL était surexprimé dans le cartilage et dans les chondrocytes stimulés au lipopolysaccharide (endotoxine proinflammatoire)¹⁹¹. Depuis, la régulation de NGAL est largement étudiée dans les processus inflammatoires. Ainsi, il a été

montré que le traitement des adipocytes (lignée 3T3 L1) par les cytokines proinflammatoires IFN γ et TNF α , induisent respectivement l'expression de NGAL via les voies de signalisation STAT1 et NF- κ B¹⁹². La voie de signalisation MAPK est également impliquée dans l'expression de NGAL. En effet, l'inhibition de p38 et ERK1/2, conduit à l'inhibition d'expression de NGAL par des cellules rénales stimulée par l'IL1 β ¹⁹³. Enfin, une autre étude a également montré que l'inhibition de la voie ERK1/2 prévient la formation du complexe NGAL/MMP9 induite par l'aldostérone dans des neutrophiles humains¹⁹⁴.

Alors que le niveau d'expression de NGAL peut être régulé par les différentes voies de signalisation énumérées jusqu'à présent, NGAL peut également participer à la régulation d'expression de gènes proinflammatoires et profibrotiques via ces mêmes voies de signalisation. Le traitement de cellules épithéliales par NGAL induit l'activation de la voie ERK1/2¹⁹⁵. Dans des neutrophiles, NGAL est capable d'induire l'expression de cytokines telles que IL6 et TNF α et d'avoir un effet chemoattractant dépendant de l'activation de ERK1/2 et p38¹⁹⁶. Nous avons également montré que NGAL est capable d'activer la voie de signalisation NF- κ B. Ainsi, le traitement de fibroblastes cardiaques humains par NGAL induit une surexpression de collagène I dépendante de l'activation de NF- κ B¹⁹⁷. L'implication pathologique de NGAL sera abordée plus loin.

2.2.4. Rôles physiologiques de NGAL

Le rôle de NGAL le plus décrit est certainement son rôle dans le système immunitaire inné et la réponse à une inflammation aiguë. En effet, le facteur limitant de la croissance bactérienne au cours d'une infection est leur capacité à capter le fer de l'hôte : les bactéries libèrent des protéines ayant la particularité de fixer le fer appelé sidérophores. Il a été montré que NGAL est capable de se lier avec une forte affinité aux sidérophores (**Figure 9C**) conduisant à la séquestration du fer par les sidérophores participant ainsi à un effet antibactérien^{166,198}. Une étude a notamment dévoilé que les souris dépourvues de NGAL (KO NGAL) étaient plus sensibles aux infections bactériennes et avaient une mortalité plus élevée que des souris contrôles lors d'une infection par *Escherichia Coli*¹⁹⁹.

NGAL est capable de se lier aux sidérophores (avec ou sans ion ferrique) mais ne peut pas interagir directement avec les ions ferriques¹⁶⁶. Cependant une étude a montré que NGAL peut agir sur l'homéostasie du fer dans un rein embryonnaire²⁰⁰. Dans une seconde étude, Bao *et al.* ont identifié un groupe de sidérophores eucaryotes, les catéchols, étant capables de se lier à NGAL permettant à la lipocalin de jouer son rôle dans l'homéostasie du fer²⁰¹.

2.3. Rôles physiopathologiques de NGAL : Résultats controversés

Jusqu'à présent nous avons vu que l'expression de NGAL pouvait être directement induite par un contexte proinflammatoire. Cependant NGAL est également perçu comme étant un médiateur de l'inflammation et du développement de la fibrose dans différents tissus et contextes pathologiques.

2.3.1. Rôle de NGAL dans les pathologies cardiovasculaires

Chez des patients ayant subi un IM, l'augmentation de la concentration plasmatique de NGAL a été associée avec une diminution de la fraction d'éjection du ventricule gauche¹⁹⁷. Il est important de noter qu'il existe deux formes de NGAL chez l'Homme : une forme poly-aminée qui s'élimine et une forme non-aminée qui stabilise la protéine et conduit à son accumulation dans les tissus^{202,203}. Chez des patients en IC, l'expression de NGAL non-aminée est augmentée dans le péricarde et plus spécifiquement dans les adipocytes matures et non matures de l'épicarde²⁰³. La délétion génétique de NGAL dans un modèle murin d'IM améliore la fonction cardiaque et limite le développement de la fibrose cardiaque. De même, l'absence d'expression de NGAL dans l'ensemble des tissus protège du développement de la fibrose péri-vasculaire cardiaque induite par le challenge NAS²⁰⁴. Le traitement de cardiomyocytes par NGAL induit une hypertrophie cellulaire et une apoptose due à l'accumulation de fer intracellulaire^{205,206}.

Alors que Gilet *et al.* ont déterminé que l'aldostérone est capable d'augmenter l'expression de NGAL dans les neutrophiles¹⁹⁴, le rôle de NGAL produit par des cellules de l'immunité a également été étudié. En effet, il a été montré que le NGAL produit par les cellules dendritiques favorise le phénotype proinflammatoire des lymphocytes T (TH1)¹⁸³. Dans notre groupe, nous avons récemment montré que l'excès minéralocorticoïde conduit à une surexpression de NGAL dans certaines populations de cellules immunitaires comme les

macrophages et cellules dendritiques²⁰⁷. En utilisant en modèle de délétion spécifique de NGAL dans cellules myéloïdes, nous avons publié des résultats montrant que le NGAL produit par les cellules myéloïdes participe au remodelage cardiaque et à l'inflammation chez des souris NAS²⁰⁷. Plus récemment, il a également été suggéré que le NGAL produit par les cellules dendritiques pouvait avoir un rôle déterminant dans le remodelage cardiaque induit par le challenge NAS²⁰⁸.

2.3.2. Rôle de NGAL dans les pathologies rénales

L'implication physiopathologique de NGAL dans les pathologies rénales donne lieu à des controverses, notamment pour son rôle opposé entre les pathologies rénales aiguës et chroniques.

2.3.2.1. NGAL et insuffisance rénale aiguë

NGAL est reconnu pour être un biomarqueur d'insuffisance rénale détectable précocement^{174,175}. En effet, la concentration de NGAL augmente massivement 3 heures après l'ischémie rénale alors que la créatinine, un autre biomarqueur couramment utilisé, n'augmente que légèrement²⁰⁹. De plus, la concentration plasmatique de créatine augmente seulement si l'ischémie bilatérale est sévère. Chez des patients souffrants d'IRA, la concentration plasmatique de NGAL est corrélée avec l'importance des lésions rénales²¹⁰. A l'aide d'un modèle murin d'IR, il a été montré que l'administration de NGAL recombinant en amont de l'IR, améliore les lésions rénales induites par l'IR^{172,211}. Un résultat similaire a également été obtenu par des injections de NGAL après l'intervention²¹². L'hypothèse émise est que NGAL favoriserait la prolifération et limiterait l'apoptose des cellules du tubule proximal. Dans un modèle murin de transplantation rénale, une étude indique que l'administration de NGAL limite le rejet dans les jours qui suivent l'intervention²¹³. L'effet protecteur de NGAL dans les lésions rénales induites par l'IR serait en partie lié aux lymphocytes T CD4⁺. En effet, il a été montré que la délétion de NGAL dans les lymphocytes T CD4⁺ favorise l'expression de IFN γ ce qui aggrave les lésions tubulaires et la dysfonction rénale induites par l'IR²¹⁴. Enfin dans un modèle OUU à court terme (prélèvement des animaux 9 à 15 jours après l'intervention), Guiteras *et al.* ont décrit que la surexpression de NGAL par les macrophages limite la fibrose rénale induite par l'OUU²¹⁵. En effet, la surexpression de NGAL

dans les macrophages induirait une réduction de l'infiltration des macrophages M1 et une augmentation des macrophages M2.

Bien que l'utilisation de NGAL exogène (ou la surexpression de NGAL dans les macrophages) semble protéger des lésions rénales induites par l'IRA ou OUU, ces résultats n'ont pas été confirmés dans un modèle de souris invalidant NGAL¹⁹⁹. Berger *et al.* ont montré que la dysfonction rénale (concentration de créatinine et d'urée élevée) et les lésions tubulaires induites par l'IR sont équivalentes entre des souris contrôles et des souris KO NGAL¹⁹⁹.

2.3.2.2. NGAL et insuffisance rénale chronique

Comme pour l'IRA, la mesure de NGAL dans le plasma et dans les urines est également utilisée comme biomarqueur dans l'IRC. En effet, diverses études indiquent que la concentration urinaire de NGAL est corrélée avec une diminution du débit de filtration glomérulaire et avec une augmentation de la protéinurie chez des patients atteints d'IRC^{216,217}. De plus, chez des patients souffrants de néphropathie diabétique, l'expression tubulaire de NGAL est positivement corrélée avec l'atrophie tubulaire et le développement de la fibrose interstitielle rénale²¹⁸.

L'IRC induite par une néphrectomie subtotale d'une part et par l'administration d'anticorps anti-GBM d'autre part, augmente également la concentration plasmatique et urinaire de NGAL dans des modèles murins^{216,219}. Dans des modèles précliniques d'IRC, l'invalidation totale de NGAL limite la protéinurie, des lésions tubulaires et glomérulaires ainsi que le développement de la fibrose rénale^{216,219}. Plus récemment, une étude montre que la délétion de NGAL dans le tissu adipeux préviendrait les lésions rénales et limiterait l'albuminurie induite par le challenge NAS²²⁰.

3. Objectifs de thèse

Les pathologies rénales représentent un enjeu majeur de santé publique. En effet, en 2017 près 1.2 million de personnes sont décédées des suites d'une insuffisance rénale et près de 697.5 millions de patients seraient atteints d'insuffisance rénale chronique²²¹. De plus, environ 1.4 million des décès et près de 25.3 millions de patients atteints par des pathologies cardiovasculaires seraient attribuables à une insuffisance rénale.

C'est dans ce contexte que mon projet de thèse a été élaboré visant à étudier l'implication du récepteur minéralocorticoïde et d'une nouvelle cible identifiée au laboratoire, NGAL, dans l'axe cardio-rénal au cours de l'insuffisance rénale chronique. Ce manuscrit se divise en différentes parties.

La première partie abordera le rôle du récepteur minéralocorticoïde dans les lésions cardio-rénales induites par l'insuffisance rénale chronique en utilisant une approche par blocage pharmacologique. Ainsi, le MRA non stéroïdien finerenone fourni par Bayer a été utilisé dans un modèle d'insuffisance rénale chronique induite par néphrectomie subtotale et j'ai étudié l'impact rénal et cardiovasculaire.

Une seconde partie sera focalisée sur le rôle de NGAL dans les lésions rénales induites dans le modèle d'hypertension NAS à l'aide de souris invalidées génétiquement pour NGAL. Nous examinerons l'implication du NGAL produit par les cellules immunitaires et analyserons les modes d'action impliquant le NGAL immunitaire et les cytokines CCL5 et IL4.

Enfin, la troisième partie présentera les effets d'un inhibiteur de NGAL récemment identifié dans notre laboratoire dans un modèle d'insuffisance rénale chronique induite par néphrectomie subtotale.

II. MATERIEL & MÉTHODES

1. Modèles animaux

Toutes les expérimentations sur les modèles animaux ont été approuvées par le comité institutionnel de protection et d'utilisation des animaux du Centre de Recherche de Cordeliers (CRC) en accord avec les normes d'éthiques de l'Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale pour la protection et l'utilisation des animaux de laboratoires. Les souris utilisées sont hébergées dans les installations du CRC avec une température constante, des cycles jour/nuit de 12H, une humidité de $50 \pm 5\%$ et de la nourriture standard (A04) et de l'eau sont distribuées de façon illimitée. L'ensemble des chirurgies ont été réalisées sous anesthésie kétamine/xylazine (100 mg/kg) avec des injections d'analgésique (buprénorphine ; 0.1 mg/kg) avant l'intervention et toutes les 8 heures en post-opératoire pendant 48 heures.

1.1. Modèle d'insuffisance rénale chronique induite : néphrectomie subtotale

L'insuffisance rénale chronique (IRC) a été induite par néphrectomie subtotale. Cette intervention a été réalisée en deux temps sur des souris âgées de 6 semaines (poids du corps d'environ 25-26 g). La première chirurgie consiste à l'ablation des 2/3 du rein gauche en se séparant le lobe supérieur et inférieur de la partie centrale à l'aide d'un fil de suture. Des compresses hémostatiques sont placées de part et d'autre de la partie restante du rein afin de permettre l'hémostase. Après 7 à 10 jours, l'ablation totale du rein gauche est réalisée. Les souris Sham sont soumis à la même procédure chirurgicale sans ablation rénale. Un mois après la seconde intervention, entre 100 et 150 μ l de sang sont prélevés en rétro-orbitale et la concentration plasmatique d'urée et de créatinine sont mesurées à l'aide d'un analyseur automatique (Konelab 20i). Dès lors, des groupes de souris ayant une dysfonction rénale homogène sont réalisés.

1.1.1. Souris B6D2 et administration de finerenone

Des souris B6D2F1 commerciales de 6 semaines ont été utilisées pour cette expérimentation. La finerenone (fournit par Bayer) est incorporé à la nourriture standard à la concentration de 12.5 mg/kg de nourriture standard afin que les souris reçoivent une dose de 2 mg/kg/j de finerenone. La durée du traitement est de 6 semaines.

1.1.2. Souris FVB et administration de l'inhibiteur de NGAL

Des souris FVB/N commerciales de 6 semaines ont été utilisées pour cette expérimentation. Le l'inhibiteur de NGAL (fournit par Greenpharma), appelé GP1, est incorporé à la nourriture standard à la concentration de 625 mg/kg de nourriture standard afin que les souris reçoivent une dose de 100 mg/kg/j de GP1. Le GP1 a été administré une semaine avant la première intervention jusqu'aux sacrifices des animaux (2 mois après la seconde intervention).

1.2. Modèle de surcharge minéralocorticoïde : néphrectomie-aldostérone-sel

La surcharge minéralocorticoïde est induite par l'association d'une ablation du rein gauche, l'implantation d'une mini-pompe (modèle 2006 ; ALZET) délivrant 200 µg/kg/j d'aldostérone et 1% de sel est ajouté à l'eau de boisson (NAS) sur une durée de 6 semaines.

1.2.1. Souris KO NGAL

Les souris de 12 semaines portant l'invalidation génétique totale de NGAL (KO NGAL) ont été obtenues sur fond génétique C57BL/6 dans le laboratoire de Tak W. Mal (Institut du Cancer de l'Ontario, Toronto, Canada). L'invalidation de NGAL est obtenue par l'insertion d'une cassette Néo dans le gène codant pour NGAL¹⁹⁹. Les souris sauvages (WT) servant de contrôles pour nos expériences sont des souris WT *littermates* provenant de la même lignée.

1.2.2. Souris KO BM

La délétion de NGAL dans les cellules myéloïdes (KO BM) a été obtenue à l'aide d'un modèle de transplantation de moelle osseuse réalisée en partenariat avec l'animalerie de la Pitié Salpêtrière, sous le suivi de Matthieu Buonafine, doctorant au laboratoire. Des souris C57BL/6 commerciales de 12 semaines ont été irradiées (deux irradiations de 5 Gy à 5 heures d'intervalle) puis injectées avec 10 millions cellules provenant de la moelle osseuse de souris WT et KO NGAL donnant respectivement les souris WT BM et KO BM. Après une récupération de 2 mois, les souris ont été soumises au challenge NAS.

1.2.3. Administration de maraviroc et injection d'anticorps neutralisant anti-IL4

Des souris C57BL/6 commerciales de 12 semaines ont été utilisées pour cette expérimentation. L'administration de l'antagoniste du récepteur au CCL5, le maraviroc (MARA ; ViiV Healthcare), est incorporé à la nourriture standard à la concentration de 312.5 mg/kg de nourriture standard afin que les souris reçoivent une dose de 50 mg/kg/j de MARA. Pour l'expérimentation étudiant l'effet de l'IL4 dans le développement des lésions rénales induites par le challenge NAS, les souris ont reçu 3 injections par semaine de 200 µg d'anticorps de rat neutralisant anti-IL4 souris (Clone 11B11 ; BioXCell) sur une durée de 6 semaines. Les souris servant de contrôles pour nos expériences ont été injectées avec une quantité similaire d'isotype IgG1 de rat.

1.3. Modèle d'insuffisance cardiaque : infarctus du myocarde

Dans ce modèle d'infarctus du myocarde (IM), l'insuffisance cardiaque (IC) a été induite par une ligature de l'artère coronaire gauche réalisée chez des souris C57BL/6 âgées de 8 semaines sous anesthésie. Pour les souris Sham, le fil permettant la ligature a été placé au niveau de l'artère coronaire gauche sans être serré. Les souris IM + GP1 ont reçu une dose de 100 mg/kg/j une semaine après la chirurgie pendant 4 mois. Ceci a été réalisé par nos collaborateurs à Rouen (A. Ouvrard-Pascaud, P. Mulder) et le travail suivi par E. Martinez, postdoctorant au laboratoire.

1.4. Modèle d'hypertension sensible au sel

Des souris C57BL/6 âgées de 8 semaines ont été exposées à un régime contenant 8% sel (HSD) associé à une administration de L-NAME (2.6 mg/kg/j) dans l'eau de boisson. Les souris L-NAME + HSD + GP1 ont reçu 100 mg/kg/j de GP1 également incorporé dans la nourriture durant 10 jours. Les mesures des pressions artérielles ont été enregistrés au cours des trois derniers jours de traitement après une habitude de 2 jours.

2. Mesures des paramètres physiologiques

2.1. Mesures de la pression artérielle

La pression artérielle systolique a été mesurée par pléthysmographie à la queue de souris conscientes. L'habituation des souris a duré 2 jours. Les valeurs décrites dans ce manuscrit représentent la moyenne de 10 mesures de la pression artérielle systolique par jour pendant 3 jours. L'habituation et l'enregistrement des valeurs effectives ont été réalisés au même moment de la journée à l'aide de l'appareil BP2000 (Visitech).

2.2. Échocardiographies et mesures hémodynamiques

Les échographies ont été réalisées respectivement à 8 semaines et 12 semaines après l'intervention pour les souris CKD et IM anesthésiées sous isoflurane (1% ; 1.5 ml/min) utilisant l'échographe par ultrason Vivid 7 délivrant 14MHz. Une vue bidimensionnelle de l'axe court du ventricule gauche (LV) a été obtenue au niveau de du muscle papillaire. *LV fractional shortening* et la fraction d'éjection ont été calculés en utilisant le mode M d'imagerie. Afin d'obtenir la fréquence cardiaque et la VTI (*velocity time integral*) une mesure Doppler a été réalisée à la sortie du LV permettant le calcul du *stroke volume* et du *cardiac output*. Les mesures Doppler ont été réalisées au niveau de la valve mitrale pour le profil de remplissage diastolique afin de déterminer la vitesse de remplissage précoce (E) et tardive (A) et de calculer le ratio E/A.

Les mesures hémodynamiques ont été réalisées chez des souris anesthésiées (Inactin 60 mg/kg). L'artère carotide des souris a été canulée avec un cathéter pression-volume (SPR839) enregistrant la pression artérielle et la HR avancé jusqu'au LV. Les courbes pression-volumes ont été obtenues en obstruant doucement l'aorte abdominale. Les pressions du LV obtenues en fin de systole et de diastole ont été calculées à l'aide du logiciel IOX (EMKA). Ceci a été réalisé par nos collaborateurs à Rouen (A. Ouvrard-Pascaud, P. Mulder) et le travail suivi par E. Martinez, postdoctorant au laboratoire.

2.3. Collection des tissus et analyses plasmatiques

Les cœurs et reins des souris ont été collectés puis rincés dans du PBS froid. Ces tissus ont été coupés transversalement : pour le cœur, la base est fixée dans 4% de formaldéhyde (pour l'histologie et l'immunohistochimie), l'apex est conservé pour l'analyse moléculaire (ARN et

protéines) ; pour le rein (ou rein résiduel pour les souris CKD), une partie est fixée dans 4% de formaldéhyde et la seconde partie est conservée pour l'analyse moléculaire.

Au moment du sacrifice, le sang des souris est collecté en intracardiaque dans des tubes héparinés et le plasma est isolé par centrifugation (1000 xg durant 10 minutes). La concentration de créatinine et d'urée plasmatique est mesurée à l'aide d'un analyseur automatique (Konelab 20i).

2.4. Histologie et immunohistochimie

Pour l'histologie, les cœurs et les reins fixés sont inclus dans la paraffine et des coupes de 6 µm ont été réalisées. Afin d'évaluer le dépôt de collagène dans ces tissus, les coupes ont été colorées au rouge Sirius et/ou Trichrome de Masson.

Pour l'immunofluorescence, les coupes de cœur ont été bloquées dans 5% de BSA pendant 30 minutes et incubées avec l'anticorps anti-vinculin (1/100 ; V9131) pendant toute la nuit à température ambiante puis rincées au PBS et re-incubées avec un anticorps secondaire (1/250 ; chèvre anti-souris IgG1 couplé au fluorochrome Alexa Fluor 488).

Les images des coupes ont été prises grâce au scanner de lames Axio Scan (Zeiss). L'analyse des coupes a été réalisée à l'aide du logiciel de bioanalyse QuPath. Ceci a été réalisé par nos collaborateurs à Pampelune (N. López-Andrés, A. Fernández de Celis) où j'ai pu me former.

3. Modèles cellulaires

3.1. Macrophages péritonéaux

L'isolation de macrophages péritonéaux a déjà été décrite²²². Brièvement, des souris KO NGAL et WT âgées de 7 à 8 semaines ont été injectés avec 1 ml d'une solution contenant 3% de thioglycollate. Après 4 jours, les souris sont sacrifiées par dislocation cervicale et les macrophages sont récupérés puis 1 millions de cellules sontensemencées par puit dans des plaques 12 puits. Après 2 heures, les cellules non adhérentes sont retirées par rinçage avec du PBS chaud. Dès lors, les macrophages ont été traités par l'aldostérone (10^{-8} M ; ALDO), le sel (40mM ; SALT) et le co-traitement aldostérone/sel (ALDO + SALT) pendant 24 heures. Comme contrôle de l'osmolarité, les macrophages ont été traités par le mannitol (80 mM) comme décrit précédemment²²³.

3.2. Fibroblastes rénaux murins

L'isolation des fibroblastes rénaux a déjà été décrite²²⁴. Brièvement, les fibroblastes rénaux murins (MKFs) ont été isolés à partir de reins issus de souris WT âgées de 7 à 8 semaines. Le cortex rénal a été émincé et incubé dans de la collagénase A (1 mg/ml ; Roche) durant 25 minutes à 37°C. La digestion est inactivée par ajout du milieu de culture composé de DMEM/F12 + 10% de sérum de veau fœtal (FBS) + 1% P/S. La suspension cellulaire est passée à travers des filtres de 100 µm. Après centrifugation, les cellules sontensemencées dans des flasques de 75 cm². Après 24 heures, les cellules non adhérentes sont retirées par rinçage avec du PBS chaud puis le milieu de culture est changé toutes les 48 heures jusqu'à ce que les cellules atteignent 70-80% de confluence. Les MKFs sont détachés par ajout de trypsine (0.25% ; Sigma) et sontensemencés dans les plaques 6 ou 12 puits. 8 heures avant de traiter les MKFs, les cellules sont placées dans un milieu contenant seulement 3% de FBS. Pour les expérimentations, les MKFs ont été traités par l'IL4 (100 ng/ml ; R&D System) associé ou non à l'inhibiteur de STAT6 (600 nM ; AS1517495) d'une part et d'autre part, les MKFs ont été traités par du NGAL (500 ng/ml; R&D System) associé ou non au GP1 (10 µM ; Greenpharma) pendant une durée de 6 heures (ARN) ou 24 heures (protéines).

3.3. Fibroblastes cardiaques humains et test de prolifération

Les fibroblastes cardiaques humains (HCFs) ont été cultivés en suivant les recommandations du fournisseur (Promocell). Les cellules utilisées pour les expérimentations étaient entre les passages 5 à 7. Les HCFs ont été traités par l'aldostérone (10⁻⁸ M) ou par NGAL (500 ng/ml) associé ou non au GP1 (10 µM) durant 24 heures.

La mesure de la prolifération des HCFs a été établie grâce au kit *Vybrant MTT Cell Proliferation* (ThermoFisher). Brièvement, les HCFs sontensemencés (3*10⁴ cellules/puit) dans des plaques 96 puits puis traitées comme décrit précédemment puis les HCFs sont incubés avec les réactifs du kit en suivant les instructions du fournisseur.

4. Analyses moléculaires

4.1. Extraction d'ARN, RT et qPCR

Les tissus (cœurs et reins) récupérés dans les différents modèles animaux sont placés dans des tubes à lyse contenant du TRIzol (Sigma). L'ARN issu des cellules est obtenu par simple ajout de TRIzol dans les puits. Les ARN issus des macrophages isolés par cytométrie en flux ont été obtenus à l'aide du kit RNeasy Plus Micro (Qiagen) en suivant les consignes du fournisseur. Les ADN complémentaires sont générés en utilisant l'enzyme MML-V (Invitrogen) ou Superscript II (Invitrogen) si la quantité en ARN des échantillons est <300 ng. Les niveaux de transcription ont été analysés par l'appareil CFX396 (Biorad). Pour normaliser l'expression génique, j'ai utilisé la moyenne géométrique de différents gènes de références (UBC, HPRT, 18S et GAPDH) comme décrit précédemment²²⁵. Les séquences des primers utilisés sont disponibles dans le **Tableau 1**.

4.2. Extraction de protéines, ELISA et Western Blot

Les protéines ont été extraites à l'aide d'un tampon contenant 1% de SDS associé à des inhibiteurs de protéases et de phosphatases (Roche). Les membranes ont été bloquées dans 5% de lait puis incubées avec les anticorps primaires à 4°C pendant toute la nuit puis rincées et re-incubées avec les anticorps secondaires. La liste des anticorps et des dilutions utilisés est présenté dans le **Tableau 2**. La détection des protéines cibles est réalisée par chimiluminescence en incubant les membranes avec une solution d'ECL. Le signal est détecté par l'appareil LAS-4000 (Biorad) et la densité a été déterminée en utilisant le logiciel Image Lab (Biorad). L'expression des différentes protéines est normalisée par l'expression de la bActin.

L'analyse d'expression de protéines par ELISA a été réalisée en suivant les instructions des fournisseurs (R&D System). Les références des plaques ELISA utilisées sont présentées dans le **Tableau 3**.

4.3. Cytométrie en flux

Un demi rein a été isolé et dissocié à l'aide du kit de dissociation gentleMACS (Miltenyi Biotec) en suivant les consignes du fournisseur. Pour le marquage intracellulaire, la moitié des cellules isolées sont co-traitées par la PMA (50 ng/ml) et la ionomycin (100 ng/ml) associées à la brefeldin A (5 µg/ml) pendant 4 heures. A l'issue de la stimulation ces cellules sont lavées

puis incubées avec le Fc Block (1/100) puis ces cellules sont incubées par des anticorps extracellulaires. Une fois perméabilisées, ces cellules sont incubées avec les anticorps des interleukines cibles (IL4 et IFN γ). Les cellules non stimulées sont incubées avec le Fc Block puis avec les anticorps extracellulaires. Pour l'analyse des différentes populations immunitaires, les cellules sont passées au cytomètre LSR Fortessa (Becton Dickinson). L'isolation des macrophages a été réalisée à l'aide du cytomètre Aria II (BD Bioscience). Les données de cytométrie en flux ont été analysées avec le logiciel FlowJo. La liste des anticorps associés aux fluorochromes et des dilutions utilisés est présenté dans le **Tableau 4**.

5. Analyses statistiques

L'ensemble des résultats sont présentés sous la forme moyenne \pm SEM. Les analyses statistiques ont été réalisées en utilisant le logiciel GraphPad Prism. Les expériences comprenant un ou deux facteurs de variabilités ont respectivement été analysées par une ANOVA à un ou deux facteurs avec le test de comparaisons multiples de Tukey. Le test t de Student non apparié a été utilisé pour comparer deux groupes d'échantillons. L'analyse de la corrélation entre 2 paramètres a été réalisée par le test de Pearson. Les valeurs de $P < 0.05$ sont considérées comme étant significatives.

6. Tableaux

	PRIMER	SEQUENCE SENS	SEQUENCE ANTI-SENS
Gène de références	<i>18S</i>	CGCCGCTAGAGGTGAAATTC	TCTTGGCAAATGCTTTCGC
	<i>GAPDH</i>	GTGGCAAAGTGGAGATTGTTGCC	GATGATGACCCGTTTGGCTCC
	<i>HPRT</i>	TCTAACTTTAACTGGAAAGAATGTC	TCCTTTTCACCAGCAAGCT
	<i>UBC</i>	CGGAGTCGCCCCGAGGTCACA	GGGCTCGACCTCCAGGGTGAT
Gènes cibles	<i>ARG1</i>	CGCCTTTCTCAAAGGACAG	CCAGCTCTTCATTGGCTTTC
	<i>αSMA</i>	TGTGCTGGACTCTGGAGATG	GAAGGAATAGCCACGCTCAG
	<i>CCL5</i>	GCCCTCACCATCATCCTCACT	GGCGGTTCTTCGAGTGACA
	<i>CD3e</i>	CTGCTACACACCAGCCTCAAA	TGGCTACTGCTGTCAGGTCC
	<i>CD4</i>	TTTGCTGGTTCTGGCAACCT	ATCTTGGGAGAGGTAGGTCCC
	<i>CD8</i>	CGGATTGGACTTCGCCTGTG	GGGACATTTGCAAACACGCT
	<i>CD80</i>	TTCACCTGGGAAAAACCCAGAA	ACGACGACTGTTACTACTGCGCC
	<i>CD86</i>	AGCAGACGCGTAAGAGTGGCT	CATGGTGCATCTGGGGTCCATC
	<i>Collagène I</i>	CCCCGGGACTCCTGGACTT	GCTCCGACACGCCCTCTCTC
	<i>Collagène III</i>	CTGGAGCCCTGGACTAATAG	GCCCATTTGCACCAGGTTCT
	<i>Collagène IV</i>	ATTCCTCGTGATGCACACC	GTGGGCTTCTTGACATCTC
	<i>F4/80</i>	TGACAACCAGACGGCTTGTG	GCAGGCGAGGAAAAGATAGTGT
	<i>FGF2</i>	CACCAGGCCACTTCAAGGAC	ATAGCAAGGTACCGGTTGGC
	<i>Fibrillin</i>	TCTCGGGAACCACCAAGGGT	CACGTCGATGCATTCGCCAC
	<i>Fibronectin</i>	CCTACGGCCACTGTGTACC	AGTCTGGGTCACGGCTGTCT
	<i>GAL3</i>	CAGTGCTCCTGGAGGCTATC	ATTGAAGCGGGGTTAAAGT
	<i>IFNγ</i>	TCAGCAACAGCAAGGCGAAA	CATTGAATGCTTGGCGCTGG
	<i>IL1β</i>	TCGCTCAGGGTCACAAGAAAC	CATCAGAGGCAAGGAGGAAAAC
	<i>IL4</i>	ACAGGAGGAAGGGACGCCAT	GAAGCCCTACAGACGAGCTCA
	<i>IL6</i>	CTCTGGGAAATCGTGAAATG	AAGTCATCATCGTTGTTATACA
	<i>Lcn2/NGAL</i>	GGACCAGGGCTGTCGCTACT	GGTGGCCACTTGACATTGT
	<i>MCP1</i>	GGCTGGAGAGCTACAAGAGG	TCTTGAGCTTGGTGACAAAAC
	<i>TGFβ</i>	TGCGCTTGACAGATTAAAA	CTGCCGTACAACTCCAGTGA
<i>TNFα</i>	GCCTCTTCTATTCTGCTTG	CTGATGAGAGGGAGGCCATT	
<i>Vimentin</i>	GGCTGCCAACCAGGAACAACGAT	ATCTCACGCATCTGGCGCTCCA	

Tableau 1 : Liste des séquences des primers utilisées

	ANTICORPS	DILUTION	REFERENCE
Western Blot	αSMA	1/100	AB7817
	Fibronectin	1/100	MAB1926
	CTGF	1/100	SC14939
	OPN	1/100	AB8448
	STAT6	1/200	AB28829
	P-STAT6	1/500	AB44718
	βActin	1/1000	AB8227
	Collagène IV	1/100	SC135231
Immunohistochimie	CD80	1/100	SC376012
	CD86	1/500	SC19617

Tableau 2 : Liste des anticorps utilisés pour les Western Blot et l'immunohistochimie

ELISA	REFERENCE
Human Pro-Collagen I alpha I DuoSet	DY6220-05
Human CCL5/RANTES DuoSet	DY278-05
Human IL6 DuoSet	DY206

Tableau 3 : Liste des kits ELISA utilisés

ANTICORPS	FLUOROCHROME	CLONE	DILUTION
CD3	PE	145-2C11	1/100
CD8	APC	53-6.7	1/200
CD4	PerCP	RM4-5	1/200
CD11b	APC/Cy7	M1/70	1/300
F4/80	PE/Cy7	BM8	1/200
CD206	FITC	C068C2	1/100
CD19	BV650	6D5	1/200
Ly6C	BV510	HK1.4	1/100
CD45	PE-CF594	30-F11	1/1000
IL4	A488	11B11	1/100
IFNγ	PE/Cy7	XMG1.2	1/100
Ly6G	APC	1A8	1/100

Tableau 4 : Liste des anticorps utilisés pour la cytométrie en flux

III. RESULTATS

1. Rôle du RM dans les lésions cardio-rénales de l'insuffisance rénale chronique

1.1. Introduction

Alors que les maladies cardiovasculaires représentent la première cause de mortalité dans le monde²²⁶, une partie de ces pathologies peuvent être associées à des comorbidités. Ainsi, comme énoncé dans l'introduction de ce travail, l'insuffisance cardiaque et les dysfonctions rénales peuvent coexister sous le nom de syndrome cardio-rénal^{227,228}. De plus, il a été montré que la diminution du débit de filtration glomérulaire était corrélée avec une augmentation des évènements cardiovasculaires¹⁵⁹.

Les effets bénéfiques des ARMs ont déjà été abordés au cours de l'introduction. Cependant afin d'introduire cette partie, il est nécessaire de rappeler les points principaux. Les effets protecteurs de l'administration d'ARM sur la mortalité et la morbidité chez des patients souffrant d'IC (modérée à sévère) ont été démontrés dans les études cliniques RALES, EMPHASIS et EPHEMUS^{137,139,140}. L'utilisation d'ARMs dans des modèles d'IC précliniques a également révélé des effets bénéfiques en réduisant le remodelage et la dysfonction cardiaque¹²⁸⁻¹³⁰. Alors que l'administration de ces ARMs stéroïdiens est associée à un risque hyperkaliémique chez des patients souffrant d'insuffisance rénale, un nouvel ARM non stéroïdien, la finerenone, représenterait une alternative possible afin de traiter ces patients ayant une diminution de leur fonction rénale. Une étude clinique a montré que l'administration de finerenone chez des patients en IC a un effet bénéfique équivalent sur un marqueur d'IC associé à une augmentation de la kaliémie moindre que chez les patients traités avec la spironolactone et l'eplerenone^{98,99}.

Dans cette première étude, nous avons évalué l'effet de la finerenone sur les lésions cardio-rénales induites par l'IRC. L'ablation de 5/6 des reins (néphrectomie subtotale) conduit à l'augmentation de la concentration plasmatique de créatinine et d'urée 1 mois après l'intervention confirmant le développement de l'IRC. A partir de ce point, un groupe de souris a été traité avec de la finerenone incorporée dans la nourriture afin que ces souris ingèrent 2 mg/kg/j de finerenone sur une durée de 6 semaines. L'évaluation de la fonction cardiaque a été réalisée en collaboration avec une équipe de l'U1096 INSERM basée à Rouen (Dr Antoine

Ouvrard-Pascaud). Ce travail montre que la finerenone n'améliore ni la fonction ni les lésions rénales induites par l'IRC. Cependant, les souris traitées présentent une amélioration du remodelage et de la dysfonction diastolique induite par l'IRC.

1.2. Article

Les résultats de cette étude ont été publiés en 2018 dans *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*.

Bonnard B, Pieronne-Deperrois M, Djerada Z, Elmoghrabi S, Kolkhof P, Ouvrard-Pascaud A, Mulder P, Jaisser F, Messaoudi S. Mineralocorticoid receptor antagonism improves diastolic dysfunction in chronic kidney disease in mice. *J Mol Cell Cardiol*. 2018 Aug;121:124-133. doi: 10.1016/j.yjmcc.2018.06.008. Epub 2018 Jul 6. PMID: 29981797

Cet article est inséré en annexe P.143.

1.3. Discussion

En clinique, l'administration de spironolactone permet de réduire les décès liés à des événements cardiovasculaires chez des patients en IRC²²⁹ mais le risque de développer une hyperkaliémie est important (31.5% des patients avec un DFG < 15 ml/min)²³⁰. Alors que l'utilisation des ARMs classiques (spironolactone et eplerenone) est limitée par l'effet hyperkaliémique chez des patients souffrant d'une dysfonction rénale, l'administration de finerenone, chez des patients souffrant d'IC avec un DFG compris entre 30-90 ml/min (étude clinique ARTS-HF), montre une réduction de l'incidence hyperkaliémique comparé aux patients recevant de l'eplerenone²³¹. De plus, le traitement par la finerenone conduit à une diminution de plus de 30% de la concentration plasmatique des peptides natriurétiques NT-proBNP chez des patients en IC associée à un diabète de type 2 ou à une IRC comparé aux patients traités par l'eplerenone²³¹.

Plus de 85% des patients souffrant d'IRC présentent une dysfonction diastolique fortement corrélée à leur mortalité^{232,233}. La présence d'une dysfonction diastolique a également été référencée dans des modèles d'IRC précliniques²³⁴⁻²³⁸. Nous avons également montré dans notre étude la présence d'une dysfonction diastolique chez des souris souffrant d'IRC induite par néphrectomie subtotale. En effet, les souris CKD présentent une altération de paramètres de la fonction diastolique tels que le rapport des ondes E et A (mitral E/A) et

de la relation pression/volume du ventricule gauche en fin de diastole (LVEDPVR). Ces modifications induites par l'IRC sont prévenues par la finerenone.

Les mécanismes d'action conduisant au développement de la dysfonction diastolique chez des patients en IRC sont mal connus mais il a été rapporté que l'altération de la voie calcique dans les cardiomyocytes contribue au développement de la dysfonction diastolique²³⁹. Dans notre étude, nous avons montré que l'IRC diminue la phosphorylation de phospholamban (PLN). Cette protéine est connue pour réguler négativement la pompe SERCA2a responsable de la réabsorption de Ca^{2+} dans le réticulum sarcoplasmique conduisant à la relaxation des cardiomyocytes. Ainsi la diminution de la phosphorylation de PLN réduit l'activation de SERCA2a empêchant la réabsorption de Ca^{2+} et donc la relaxation des cardiomyocytes contribuant au développement de la dysfonction diastolique. L'altération de la phosphorylation de PLN est prévenue par l'administration de la finerenone. La modification d'expression de protéines régulatrices des échanges calciques (PLN, CaMKII, SERCA2a et PKA) a également été montrée dans un modèle d'hypertension NAS (néphrectomie, infusion d'aldostérone et régime riche en sel) suggérant que le RM pourrait directement être impliqué dans l'homéostasie calcique dans les cardiomyocytes²⁴⁰. En effet, à partir de cardiomyocytes murins surexprimant le RM, l'aldostérone altère le flux calcique dans ces cellules par la réduction d'expression de protéines activatrices de RYR2 (FKBP12 et FKBP12.6)²⁴¹.

Au cours de cette étude nous nous sommes focalisés sur l'impact de l'IRC sur la régulation du calcium au niveau du réticulum sarcoplasmique avec l'étude de l'activation de SERCA2a, RyR2 et PLN. Cependant nous n'avons pas étudié le niveau d'expression de S100A1 qui a un rôle clef dans l'homéostasie calcique dans les cardiomyocytes. S100A1 est une protéine qui capte le Ca^{2+} intracellulaire et qui interagit avec le complexe SERCA2a/PLN favorisant ainsi la réabsorption calcique dans le réticulum sarcoplasmique²⁴². De plus cette protéine interagit également avec RyR2 en favorisant l'excrétion de Ca^{2+} du réticulum sarcoplasmique conduisant à la contraction des cardiomyocytes. Récemment, l'implication du RM dans la régulation de S100A1 a été suggérée dans une étude montrant que l'aldostérone favorise l'expression de S100A1 dans les cellules du tubule distal²⁴³. Dans la régulation du Ca^{2+} intracellulaire, l'échangeur $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ (NCX) exprimé à la surface des cardiomyocytes permet

l'excrétion de Ca^{2+} dans le milieu extracellulaire. Très récemment, il a été montré que dans un modèle d'IRC, l'expression de NCX tend à être augmentée suggérant un effet compensatoire de l'échangeur afin de réduire le Ca^{2+} intracellulaire²⁴⁴. Alors que l'expression de la sous unité β du canal Ca^{2+} voltage dépendant (L-VDCC) permettant l'entrée de Ca^{2+} dans le milieu intracellulaire est diminuée chez les patients souffrant de dysfonction diastolique, la mesure du Ca^{2+} intracellulaire aurait pu donner une donnée supplémentaire sur l'homéostasie calcique dans les cardiomyocytes dans le contexte de l'IRC²⁴⁵. De nombreuses études ont évalué l'implication du RM dans l'homéostasie ionique des cardiomyocytes. En effet, l'activation du RM favorise l'expression de nombreux canaux ioniques tels que les canaux Na^+ K^+ et Ca^{2+} voltages dépendants^{246–250}. Notre équipe a notamment montré que la surexpression du RM dans le cœur de souris induit un trouble du rythme (rallongement de la durée des potentiels d'actions) conduisant à une arythmie ventriculaire²⁵¹. Dans cette étude, il a été suggéré que l'activation du RM cardiaque participerait au remodelage électrique en réduisant le courant potassique et en augmentant le courant calcique de type L. Plus récemment, il a été montré que le RM participe à la transcription d'une sous unité ($\text{Ca}_v1.2$) du canal calcique (LTCC) médiateur du courant calcique de type L dans les cardiomyocytes et CMVL²⁵². Ces différentes publications montrent le rôle clef du RM dans la signalisation calcique des cardiomyocytes. A l'aide de la lignée de cardiomyocytes H9C2 surexprimant le RM, nous aurions pu identifier plus spécifiquement le rôle du blocage du RM par la finerenone dans la régulation calcique au sein des cardiomyocytes.

Alors que la dysfonction diastolique induite par l'IRC a été mis en évidence dans cette étude, nous avons montré que le développement de la fibrose cardiaque n'est pas significatif. Afin d'obtenir un phénotype plus net, nous pourrions faire induire une IRC par néphrectomie subtotale chez des souris surexprimant le RM dans les cardiomyocytes. Cependant, en parallèle de ces travaux présentés, nous avons réalisé un modèle d'IRC associée à une IC induite par l'injection d'isoprénaline (100 mg/kg, 1 injection journalière durant 5 jours), un agoniste des récepteurs adrénergiques (CKD + ISO). Les résultats ont montré un effet additif de l'IRC et de l'IC sur le développement de la fibrose interstitielle cardiaque comparé aux souris SHAM + ISO (**Figure 10A**). Celle-ci est diminuée par le blocage du RM par la finerenone (CKD + ISO + FINE). L'analyse moléculaire tend à confirmer ce résultat : l'expression génique de *collagène I* et *collagène III* tend à être augmentée chez les souris CKD + ISO comparé aux

souris CKD (**Figure 10B**). De plus, l'expression de *galectin 3*, médiateur du remodelage cardiaque dépendant de l'aldostérone^{253,254}, est augmentée par l'injection d'isoprénaline chez les souris CKD. Ces modifications d'expression des gènes profibrotiques sont prévenues par l'administration de finerenone (Résultats non publiés).

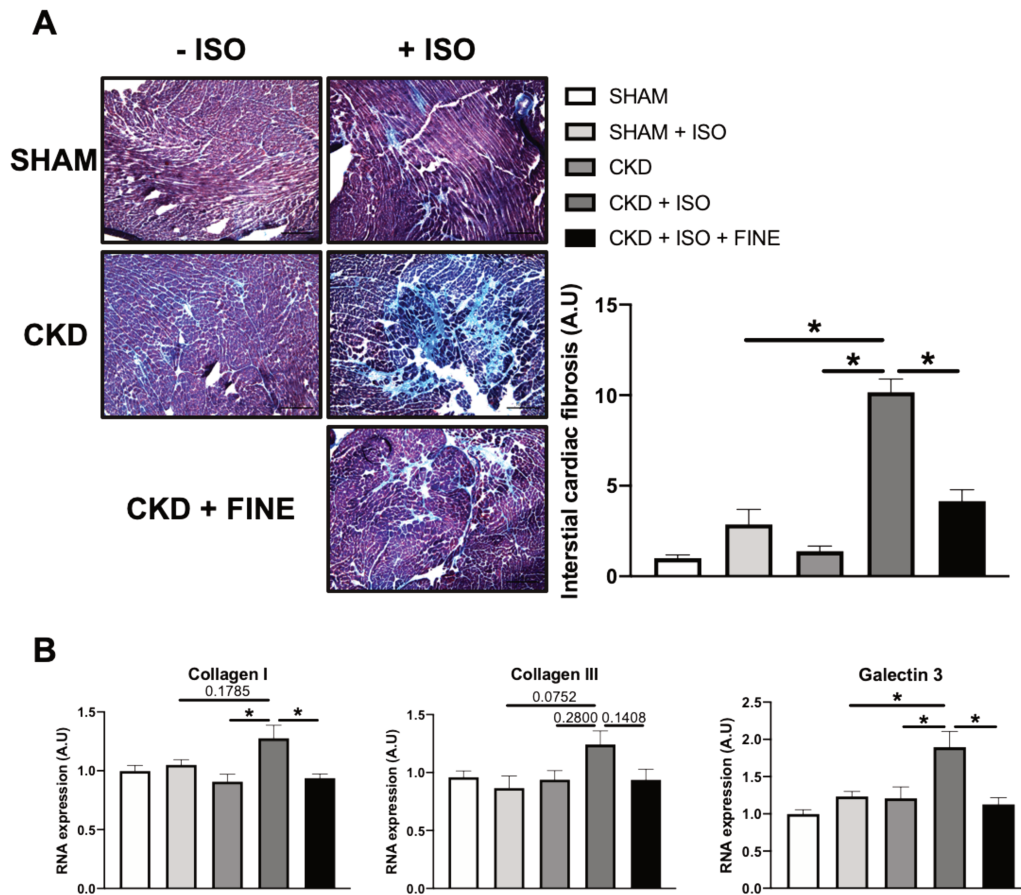


Figure 10 : La finerenone bloque les effets profibrotiques de l'isoprénaline dans l'IRC (A) Coupes de cœur colorées au Trichrome de Masson et quantification de la fibrose interstitielle cardiaque ; (B) Expression en ARN (*collagène I*, *collagène III* et *galectin 3*) ; *P<0.05

En conclusion, nous avons montré que le blocage du RM par la finerenone prévient de la fibrose cardiaque et la dysfonction diastolique induite par l'IRC. De plus, l'altération de la phosphorylation de protéines intervenant dans l'homéostasie calcique induite par l'IRC est prévenue par la finerenone. A noter, que l'administration de finerenone ne prévient ni la dysfonction rénale ni l'hypertension artérielle mesurées chez les souris CKD.

2. Rôle de NGAL dans les lésions rénales induites par l'activation du RM

2.1. Introduction

Nous venons de voir que le blocage pharmacologique du RM permet une amélioration du remodelage cardiaque induit par l'IRC dans un modèle de néphrectomie subtotale. Comme énoncé dans l'introduction générale, nous avons identifié au sein du laboratoire une nouvelle cible directe du RM dans le système cardiovasculaire : NGAL¹⁶⁰.

L'implication de NGAL dans le remodelage cardiovasculaire présent dans un modèle d'excès minéralocorticoïde (Néphrectomie Aldostérone Sel, NAS) et dans un modèle d'IM a également été démontré par notre équipe^{197,204} : l'absence d'expression de NGAL, dans un modèle avec inactivation génétique global de NGAL, améliore la fonction cardiaque et prévient les lésions cardiaques induites par l'IC. Plus récemment, le rôle délétère du NGAL produit par les cellules myéloïdes dans l'inflammation et le développement de la fibrose cardiaque a été étudié dans notre équipe²⁰⁷ : l'absence d'expression de NGAL dans les cellules dérivées de la moelle prévient les lésions cardiaques induites par NAS. Alors que NGAL est aujourd'hui reconnu comme étant un biomarqueur d'insuffisance rénale^{174,175}, son implication dans les pathologies rénales est controversée. En effet, NGAL aurait un rôle protecteur dans l'IRA^{172,211} alors que d'autres publications ont montré que l'inactivation de NGAL limite la protéinurie, les lésions tubulaires et glomérulaires ainsi que le développement de la fibrose rénale^{216,219}. Cependant le mécanisme d'action de NGAL dans les lésions rénales est mal connu.

Dans cette seconde étude, j'ai donc évalué dans un premier temps le rôle de NGAL dans les lésions rénales induites par une surcharge minéralocorticoïde dans le modèle NAS puis, je me suis intéressé plus spécifiquement aux mécanismes d'action impliquant le NGAL produit par les cellules myéloïdes dans le remodelage rénal induit par le challenge NAS. Ces résultats ont été obtenus dans le cadre d'une collaboration internationale avec l'équipe dirigée par le Dr Natalia López-Andrés (Navarrabiomed, Pamplona). J'ai ainsi démontré le rôle délétère de NGAL total et plus spécifiquement du NGAL produit par les cellules myéloïdes dans le développement des lésions rénales induites par le challenge NAS. J'ai également montré l'implication de la voie de signalisation impliquant le CCL5 et l'IL4 dans le développement de la fibrose rénale induite par l'excès minéralocorticoïde.

Ces résultats seront prochainement soumis P.143.

Bonnard B, Genty M, Ibarrola J, Fernández-Celis A, López-Andrés N, Jaisser F. Neutrophil Gelatinase-Associated Lipocalin has a critical role in aldosterone-induced renal fibrosis via the macrophages-CCL5-IL4 pathways.

2.2. Résultats

2.2.1. NGAL participe à la dysfonction rénale et au remodelage rénal induit par NAS

Le challenge NAS conduit à une dysfonction rénale avec une augmentation de la concentration plasmatique de créatinine et d'urée (**Tableau 5A**). L'inactivation totale de NGAL (KO NGAL) prévient l'augmentation de la créatinine et de l'urée induit par NAS. Le challenge NAS induit également une augmentation de la pression artérielle systolique comparé aux souris WT contrôles et une hypertrophie rénale (**Tableau 5A**). Cette hypertension est prévenue chez le souris KO NGAL NAS, mais pas l'hypertrophie rénale.

La coloration des coupes de reins par rouge Sirius révèle que le challenge NAS conduit au développement d'une fibrose interstitielle rénale chez les souris WT (**Figure 11A**). Cette augmentation est totalement prévenue par la délétion génétique de NGAL. Les analyses moléculaires confirment ce résultat avec une augmentation des protéines profibrotiques telles que collagène I, collagène IV, fibronectine et α SMA dans les reins des souris WT NAS (**Figure 11B-E**). Ces modifications sont prévenues chez les souris KO NGAL NAS.

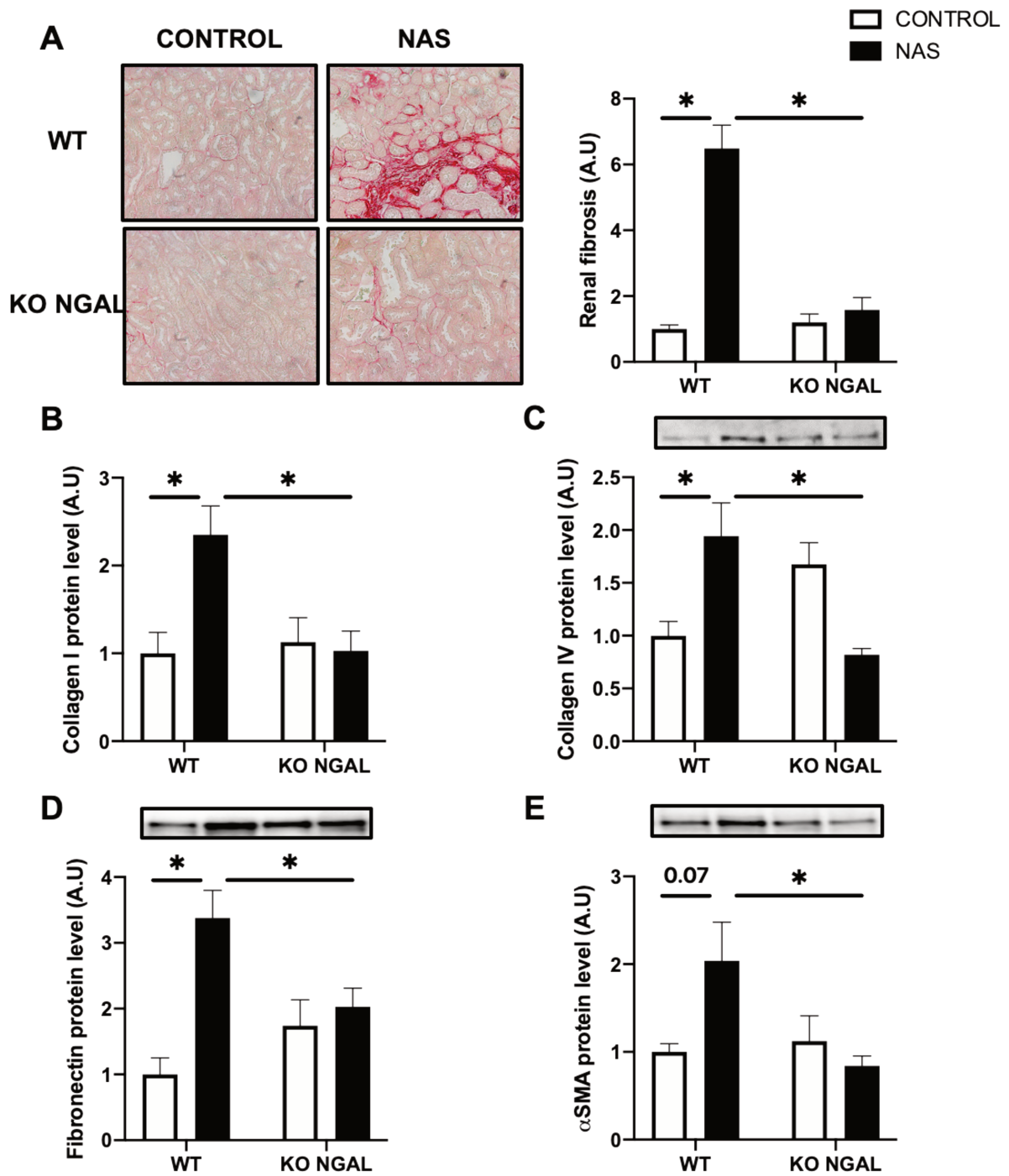


Figure 11 : L'inhibition de NGAL réduit la fibrose rénale induite par le challenge NAS (A) Coupes de reins colorées au rouge Sirius et quantification de la fibrose rénale ; (B) Expression protéique par ELISA (collagène I) et (C-E) Western Blot (collagène IV, fibronectine et α SMA) ; * $P < 0.05$.

Nous avons également évalué le rôle de NGAL sur l'infiltration des macrophages induite par le challenge NAS. L'analyse par cytométrie de flux révèle que les souris WT NAS ont une augmentation de l'infiltration de deux sous-types de macrophages : CD11b⁺ F4/80^{high} (R2) et CD11b⁺ F4/80^{low} (R1) (**Figure 12A-C**). L'implication de ces deux différentes populations dans le développement de lésions rénales déjà été décrite dans la littérature²⁵⁵⁻²⁵⁷ indiquant que la population CD11b⁺ F4/80^{high} (R2) correspond à des macrophages matures et les CD11b⁺ F4/80^{low} (R1) incluent des macrophages et des monocytes en cours de différenciation pour devenir des macrophages. La délétion de NGAL prévient l'infiltration des CD11b⁺ F4/80^{low} (R1) mais n'a pas d'effet sur le recrutement des CD11b⁺ F4/80^{high} (R2) (**Figure 12A-C**). NAS challenge augmente également l'infiltration de monocytes proinflammatoires (CD11b⁺ Ly6C^{high}) et de monocytes profibrotiques (CD11b⁺ Ly6C^{low}) chez les souris WT. Ces modifications sont limitées chez les souris KO NGAL NAS (**Figure 12D et E**). Les souris WT NAS présentent une augmentation d'expression de cytokines proinflammatoires telles que *IL1 β* , *IL6*, *TNF α* et de chemokines (*MCP1* et *CCL5*) (**Figure 12F**). Alors que l'augmentation d'expression de *IL1 β* n'est pas altérée par la délétion de NGAL, l'expression des autres cytokines/chemokines est partiellement (*IL6*, *TNF α* et *MCP1*) ou totalement (*CCL5*) prévenue chez les souris KO NGAL NAS (**Figure 12F**).

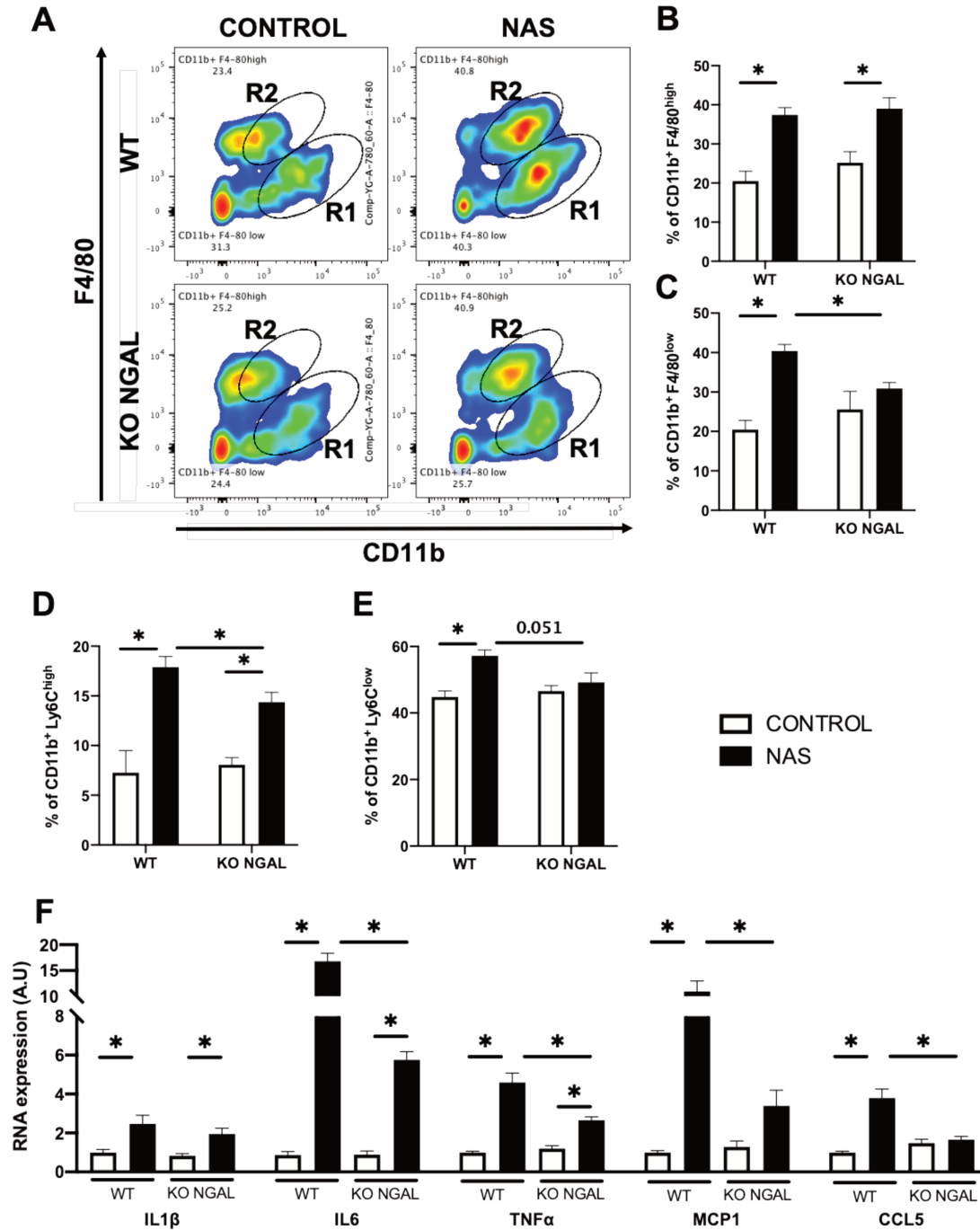


Figure 12 : L'inhibition de NGAL réduit partiellement l'inflammation induite par le challenge NAS

(A-B) Analyse de la population CD11b⁺ F4/80^{high} et CD11b⁺ F4/80^{low} dans la population CD45⁺ CD3⁻ CD19⁻ Ly6G⁻ (D-E) Analyse de la population CD11b⁺ Ly6C^{high} et CD11b⁺ Ly6C^{low} dans la population CD45⁺ CD3⁻ CD19⁻ Ly6G⁻ (F) Expression ARN de cytokines proinflammatoires ; *P<0.05.

Pris ensemble, ces résultats montrent que NGAL participe à la dysfonction et au développement des lésions rénales induites par l'excès minéralocorticoïde.

2.2.2. NGAL favorise l'expression de cytokines et chemokines dans les macrophages proinflammatoires

Le rôle des macrophages dans les lésions rénales induites par l'aldostérone a déjà été démontré. En effet, la délétion de macrophages conduit à une réduction de la fibrose rénale induite par l'aldostérone²⁵⁸. De plus, notre laboratoire a également démontré que le challenge NAS induit surexpression de NGAL dans les macrophages²⁰⁷. Bien que les souris WT NAS présentent une augmentation de l'infiltration de la population CD11b⁺ F4/80^{high} non prévenue chez les souris KO NGAL NAS, l'analyse des cytokines/chemokines (*IL1 β* , *IL6*, *TNF α* , *MCP1* et *CCL5*) exprimées par ces cellules montre que la délétion de NGAL réduit leur expression (**Figure 13A**). Afin d'analyser plus en détail le rôle de NGAL exprimé par les macrophages, j'ai isolé des macrophages péritonéaux issus de souris WT (M Φ WT) et KO NGAL (M Φ KO NGAL). Une fois mis en culture ces macrophages ont été co-traités par l'aldostérone et sel (A/S). Les M Φ WT traités par A/S montrent une surexpression de NGAL (**Figure 13B**) et de cytokines/chemokines proinflammatoires (*IL1 β* , *IL6*, *TNF α* , *MCP1* et *CCL5*) (**Figure 13C**). Cependant, l'augmentation d'expression de l'*IL6* et de *CCL5* sont respectivement partiellement et totalement prévenue dans les M Φ KO NGAL co-traités.

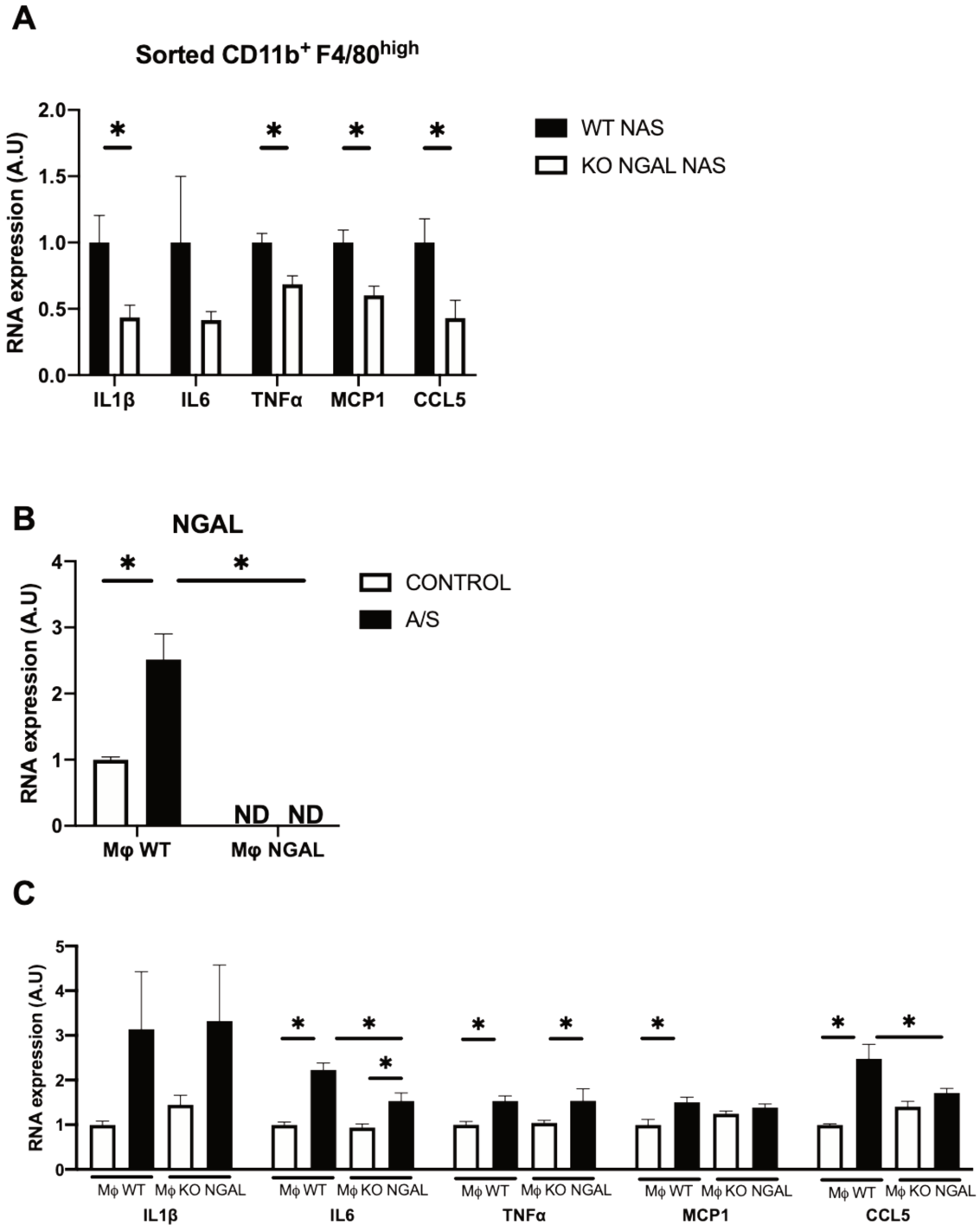


Figure 13 : NGAL est un médiateur de l'inflammation dans les macrophages

(A) Expression ARN de cytokines proinflammatoires issus des CD11b⁺ F4/80^{high} ; (B-C) Expression ARN de NGAL et de cytokines proinflammatoires issus des MΦ péritonéaux co-traités par l'aldostérone et A/S ; *P<0.05.

Ces résultats montrent que NGAL est nécessaire à l'expression de cytokines/chemokines des macrophages impliquées dans les processus inflammatoires.

2.2.3. NGAL produit par les cellules myéloïdes est impliqué dans le développement des lésions rénales induites par NAS

Afin d'étudier le rôle spécifique du NGAL produit par les cellules myéloïdes, dont font partis les macrophages, nous avons réalisé un transfert de moelle osseuse (BM) à partir de souris KO NGAL vers des souris WT irradiées formant ainsi des souris portant la délétion spécifique de NGAL dans les cellules dérivées de la moelle osseuse (KO BM). Comme contrôles (WT BM), des souris WT ont également reçu de la moelle osseuse provenant de souris WT *littermate* aux souris KO NGAL.

Le challenge NAS induit une hypertrophie rénale et une hypertension par rapport aux souris WT BM (**Tableau 5B**), comme cela a été montré précédemment dans les souris WT. Cependant l'augmentation de la concentration de créatinine et de l'urée plasmatique induite par le challenge NAS n'est pas significativement différente entre les souris WT BM NAS et les souris WT BM. Ceci peut être expliqué par les valeurs élevées de créatinine et d'urée plasmatique dans le groupe de souris WT BM, probablement due à un effet secondaire de l'irradiation impactant la fonction rénale des souris. Cependant, l'inactivation de NGAL dans les cellules myéloïdes réduit l'hypertrophie rénale et l'hypertension dans les souris KO BM NAS mais sans effets sur la dysfonction rénale induite par le challenge NAS.

L'absence d'expression de NGAL dans les cellules dérivées de la moelle osseuse, prévient partiellement la fibrose interstitielle rénale induite par le challenge NAS (**Figure 14A**). Cependant l'analyse moléculaire montre que les souris KO BM NAS sont totalement protégées en ce qui concerne l'augmentation d'expression des protéines profibrotiques (collagène I, collagène IV, fibronectine et α SMA) induite par le challenge NAS (**Figure 14B-E**). L'analyse de l'inflammation rénale des souris KO BM NAS révèle que la délétion de NGAL dans les cellules myéloïdes n'améliore pas l'augmentation d'expression géniques de plusieurs cytokines/chemokines proinflammatoires ($IL1\beta$, $IL6$, $TNF\alpha$ et $MCP1$) (**Figure 14F**) mais l'expression en ARN de $CCL5$ est partiellement prévenue chez les souris KO BM NAS (**Figure 14F**).

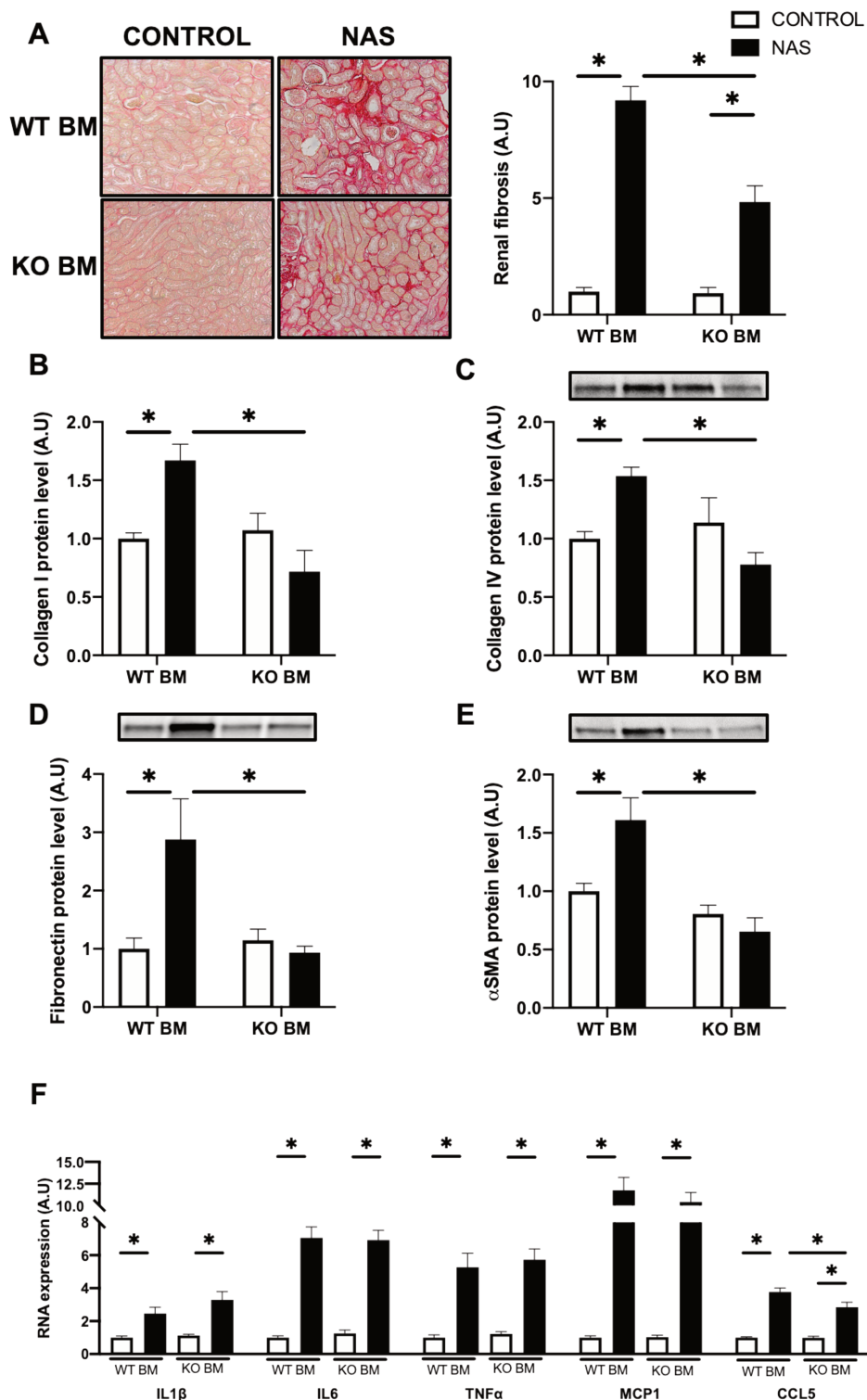


Figure 14 : L'inhibition du NGAL immunitaire réduit la fibrose rénale induite par le challenge NAS

(A) Coupes de reins colorées au rouge Sirius et quantification de la fibrose rénale ; (B) Expression protéique par ELISA (collagène I) et (C-E) Western Blot (collagène IV, fibronectine et αSMA) ; (F) Expression ARN de cytokines proinflammatoires ; *P<0.05.

Ces résultats montrent que le NGAL produit par les cellules myéloïdes est impliqué dans le développement de la fibrose rénale induite par le challenge NAS.

L'analyse de l'expression de CCL5 dans les différents modèles montrent que la délétion de NGAL limite la surexpression de cette chemokine dans les reins de souris KO NGAL et KO BM (Figure 12A et 14F), dans les macrophages CD11b⁺ F4/80^{high} et péritonéaux (Figure 13A et C). L'analyse des reins des souris KO NGAL NAS et KO BM NAS montre que l'augmentation d'expression protéique de CCL5 induite par le challenge NAS, est prévenue par la délétion totale de NGAL ou spécifique aux cellules myéloïdes (Figure 15A et B).

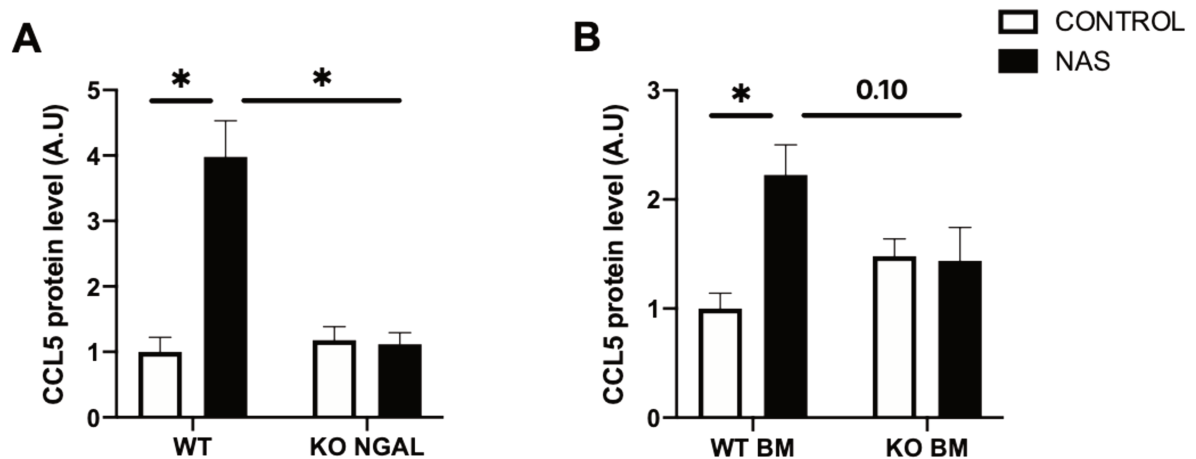


Figure 15 : La délétion totale et cellule myéloïde spécifique de NGAL préviennent l'expression de CCL5 induite par le challenge NAS

(A-B) Expression de CCL5 par ELISA ; *P<0.05.

Ces résultats suggèrent que CCL5 pourrait participer aux effets délétères de NGAL activé par l'excès minéralocorticoïde.

2.2.4. Étude de la signalisation de NGAL dans le développement de la fibrose rénale induit par NAS

2.2.4.1. Le blocage de la signalisation CCL5 limite la fibrose rénale

La chemokine CCL5 est impliquée dans le recrutement de cellules immunitaires et a déjà été identifiée comme étant un médiateur de la dysfonction rénale et du développement de la fibrose rénale notamment par une diminution de l'infiltration des lymphocytes T²⁵⁹⁻²⁶². Afin d'étudier le rôle de CCL5 dans les lésions rénales induites par le challenge NAS, nous avons traité un groupe de souris NAS par un antagoniste du récepteur de CCL5 : le maraviroc (MARA).

Les souris NAS recevant le maraviroc (NAS + MARA) n'ont pas d'amélioration de leur fonction rénale ou de l'hypertrophie rénale, ni de l'hypertension induite par le challenge NAS (**Tableau 5C**). Cependant, la fibrose interstitielle rénale analysée chez les souris NAS est réduite de 33% chez les souris NAS + MARA (**Figure 16A**). De manière similaire, l'analyse de l'expression des protéines profibrotiques montre que l'expression de collagène I, collagène IV et α SMA qui est augmentée par le challenge NAS, est prévenue par l'administration de MARA (**Figure 16B-C et E**). L'hétérogénéité des résultats pour la fibronectine ne permet pas de conclure sur l'effet du MARA sur l'expression de cette protéine (**Figure 16F**). L'analyse des paramètres inflammatoires montre que le MARA ne modifie pas l'augmentation d'expression génique des cytokines/chemokines proinflammatoires (*IL1 β , IL6, TNF α , MCP1 et CCL5*) induite par le challenge NAS (**Figure 16F**).

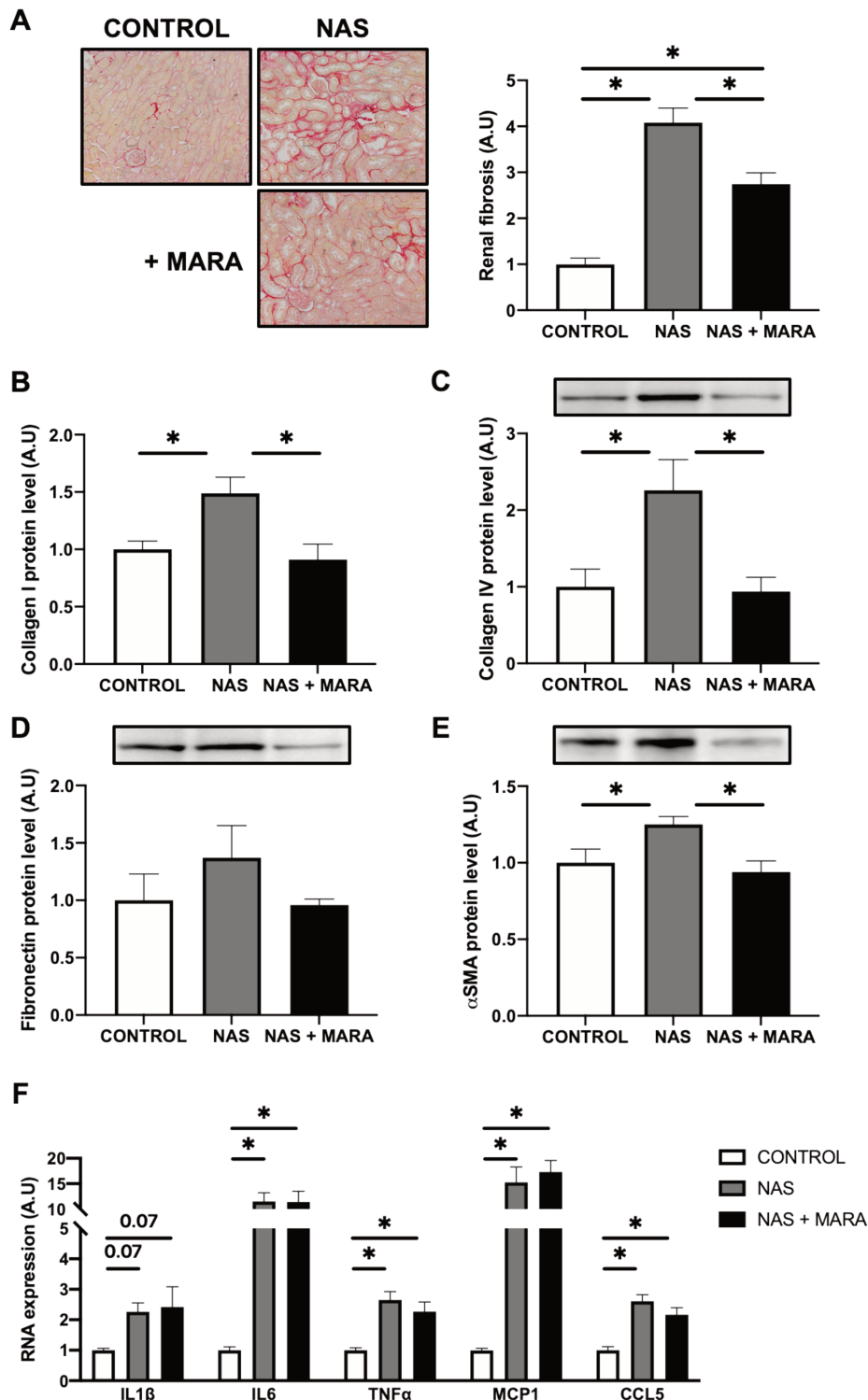


Figure 16 : Le blocage du récepteur au CCL5 réduit la fibrose rénale induite par le challenge NAS sans modification de l'inflammation

(A) Coupes de reins colorées au rouge Sirius et quantification de la fibrose rénale ; (B) Expression protéique par ELISA (collagène I) et (C-E) Western Blot (collagène IV, fibronectine et α SMA) ; (F) Expression ARN de cytokines proinflammatoires ; *P<0.05.

Ces résultats montrent que CCL5 est impliquée dans le développement de la fibrose rénale induite par le challenge NAS.

2.2.4.2. Implication de la CCL5 dans le recrutement des Th2 CD4⁺

CCL5 est une des nombreuses chemokines sécrétées qui jouent un rôle prépondérant dans le recrutement des lymphocytes T au site d'inflammation²⁶³. Les lymphocytes T sont impliqués dans la réponse immunitaire adaptative et participent au développement de la fibrose rénale²⁶⁴. Les lymphocytes T sont sous divisés en différents sous types avec diverses fonctions dans l'inflammation. Cependant, les 2 principaux sous types sont les lymphocyte T cytotoxiques CD8⁺ (Tc) et les lymphocytes T *helper* CD4⁺ (Th) pour leur rôle respectif dans la lyse des cellules et dans la régulation de l'inflammation. Au sein du sous type Th CD4⁺, nous pouvons différencier les Th1 et les Th2 qui ont des rôles opposés dans le remodelage tissulaire. Alors que les Th1 ont un rôle proinflammatoire et antifibrotique (via l'expression de IFN γ), les Th2 contribuent directement au développement de la fibrose via la sécrétion de cytokines profibrotiques tels que IL13 et IL4. Cependant, le rôle des Th2 CD4⁺ dans le développement de la fibrose rénale est controversé. Shapell *et al.* ont montré que les Th CD4⁺ ne contribuent pas aux lésions rénales dans un modèle OUU²⁶⁵ mais deux différentes équipes ont démontré que les Th2 CD4⁺ participent spécifiquement au développement de la fibrose rénale^{266,267}. J'ai donc étudié l'implication de CCL5 dans le recrutement des différents sous types de lymphocytes T dans le rein lors d'un challenge NAS.

Le challenge NAS induit une augmentation d'expression de *CD3*, marqueur commun des différents sous types de lymphocytes, qui est prévenue chez les souris NAS + MARA (**Figure 17A**). L'expression génique de *CD8* et *CD4* qui sont respectivement les marqueurs des Tc et Th est augmentée chez les souris NAS et est partiellement prévenue par le traitement de MARA (**Figure 17A**). De plus, l'analyse d'expression des cytokines *IFN γ* et *IL4* (respectivement marqueurs spécifiques des Th1 et Th2) montre que le challenge NAS induit une surexpression de *IL4* mais pas de *IFN γ* (**Figure 17A**). L'augmentation d'expression génique de *CD4* et *IL4* induit chez les souris NAS suggère que le challenge NAS conduit au recrutement des Th2 CD4⁺. L'administration de MARA prévient l'augmentation d'expression de *IL4* suggérant que la signalisation de la chemokine CCL5 est impliquée (**Figure 17A**). De façon cruciale pour mon travail, j'ai pu montrer des résultats similaires sont obtenus chez les souris KO NGAL et KO BM (**Figure 17B-C**) : la délétion totale de NGAL permet de réduire l'infiltration des lymphocytes T (*CD3*, *CD8* et *CD4*) induite par le challenge NAS (**Figure 17B**). De plus, j'ai montré que l'expression de *CD4* et *IL4* est respectivement limitée et prévenue chez les souris KO BM NAS,

suggérant que le NGAL produit par les cellules dérivées de la moelle osseuse participerait directement au recrutement des Th2 CD4⁺ aux sites de lésions rénales induites par l'excès minéralocorticoïde (**Figure 17C**).

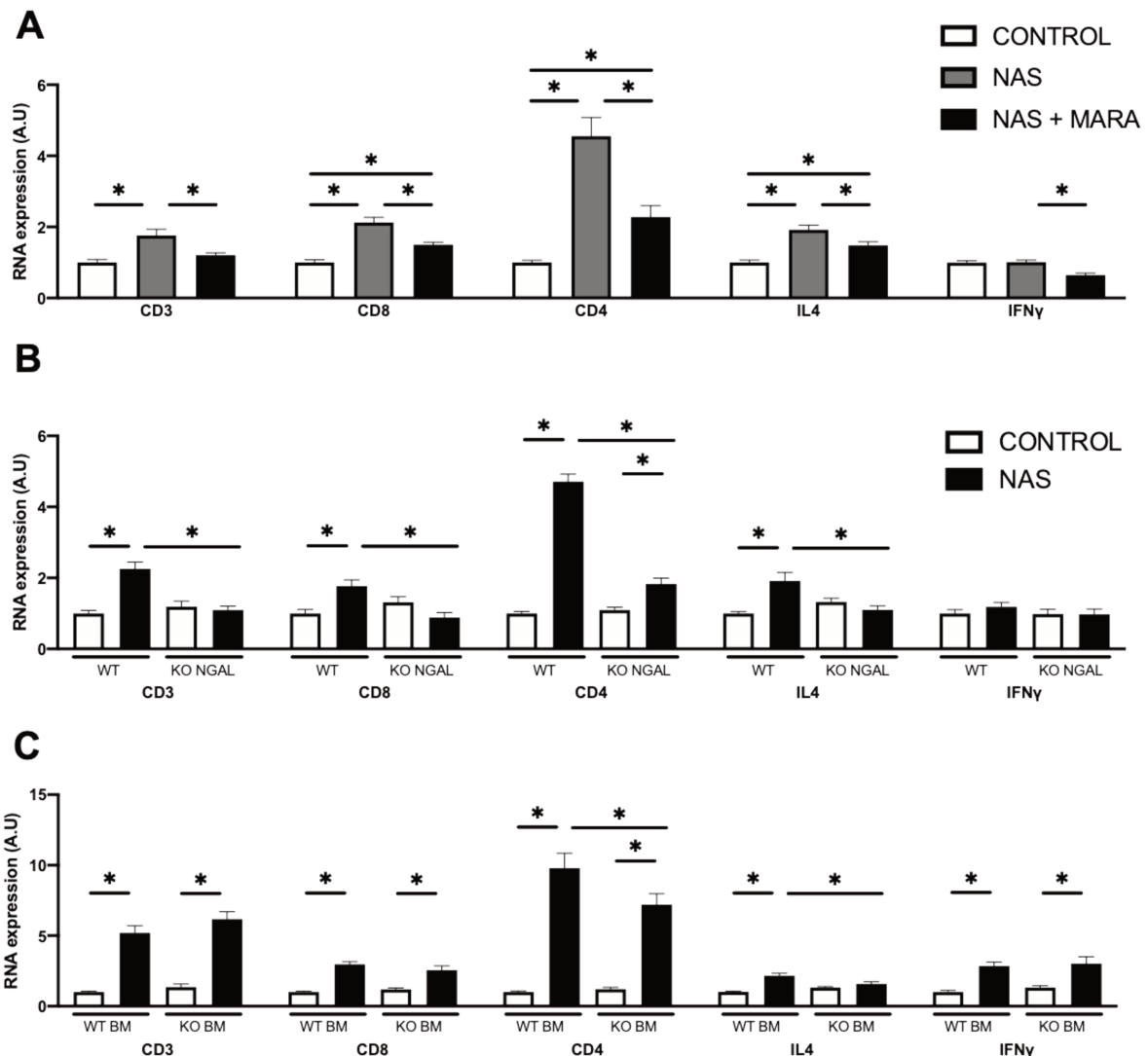


Figure 17 : Réduction d'expression des marqueurs Th2 CD4⁺ dans les différents modèles utilisés

(A-C) Expression ARN de marqueurs lymphocytes T totaux (CD3), Tc (CD8), Th (CD4) et des cytokines IL4 et IFN γ ; *P<0.05.

L'analyse par cytométrie en flux montre que le challenge NAS induit une augmentation de l'infiltration des lymphocytes T CD3⁺ CD4⁺ (**Figure 18A**) associée à une surexpression de l'IL4 par ces cellules (**Figure 18B**). D'autre part, j'ai également montré que l'expression d'IL4 est corrélée à la fibrose rénale et à l'expression des protéines impliquées dans le développement de la fibrose telles que collagène I, collagène IV et fibronectine (**Figure 18C-F**).

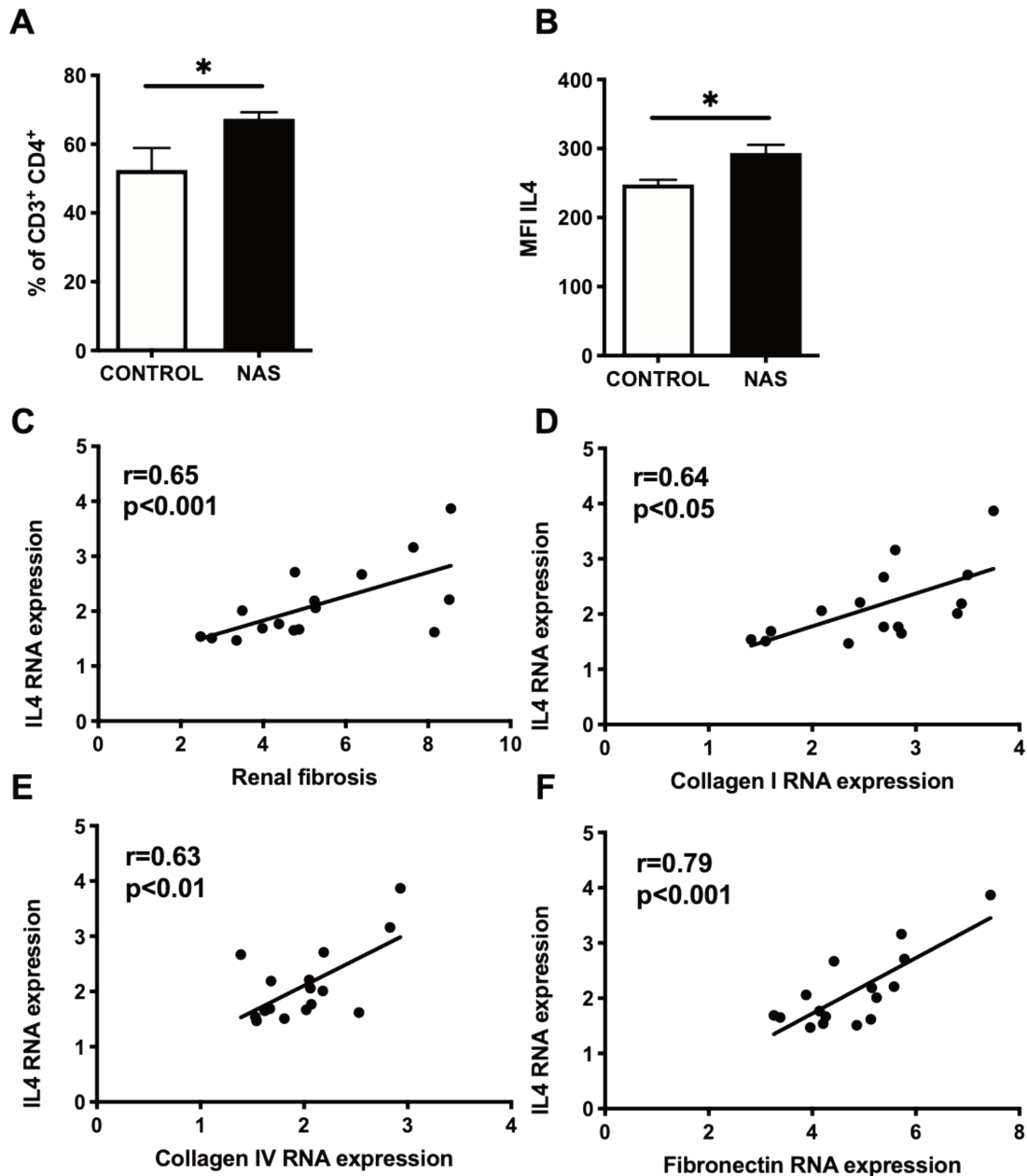


Figure 18 : Le challenge NAS induit une surexpression d'IL4 par les CD3⁺ CD4⁺ corrélée au développement de la fibrose rénale et des protéines associées

(A) Analyse de la population CD3⁺ CD4⁺ dans la population CD45⁺ CD3⁻ CD19⁻ Ly6G⁻ ; (B) MFI IL4 dans la population CD3⁺ CD4⁺ ; (C-F) Étude de la corrélation entre l'expression d'IL4 et la fibrose rénale (C) et de l'expression des protéines profibrotiques (D-F) ; *p<0.05

Pris ensemble ces résultats suggèrent que NGAL, via la signalisation de CCL5, est impliquée dans le recrutement des Th2 CD4⁺ qui favoriserait le développement de la fibrose rénale via la sécrétion d'IL4.

2.2.4.3. Étude du rôle de l'IL4 dans le développement de la fibrose rénale

2.2.4.3.1. La neutralisation de la cytokine Th2 IL4 limite la fibrose rénale

Le rôle profibrotique de l'IL4 est décrit dans divers tissus (reins, cœur, foie et peau) et contextes pathologiques²⁶⁸⁻²⁷². Afin d'évaluer le rôle de l'IL4 dans le développement de la fibrose rénale induite par le challenge NAS, j'ai injecté un groupe de souris NAS avec des anticorps anti-IL4 neutralisant (NAS + IL4 AB). Des souris NAS injectées par l'isotype IgG1 (NAS + IgG1) ont servi de contrôles à l'effet des anticorps anti-IL4 neutralisant.

Les souris NAS + IL4 AB ont une hypertension artérielle et une dysfonction rénale (concentration plasmatique de créatinine) similaires aux souris NAS + IgG1 (**Tableau 5D**). De plus, l'hypertrophie rénale induite par le challenge NAS n'est pas améliorée par l'administration d'anticorps anti-IL4. Cependant les souris NAS + IL4 AB présentent une atténuation de la fibrose rénale induite par le challenge NAS (**Figure 19A**). Ces résultats sont soutenus par l'analyse de l'expression des protéines profibrotiques (collagène I, fibronectine et α SMA) qui est augmentée par le challenge NAS et prévenue par l'administration d'anticorps anti-IL4 (**Figure 19B et D-E**). L'hétérogénéité des résultats concernant l'expression de collagène IV ne permet pas de conclure mais le groupe de souris NAS + IL4 AB montre une tendance à la réduction de l'expression de collagène IV (**Figure 19C**).

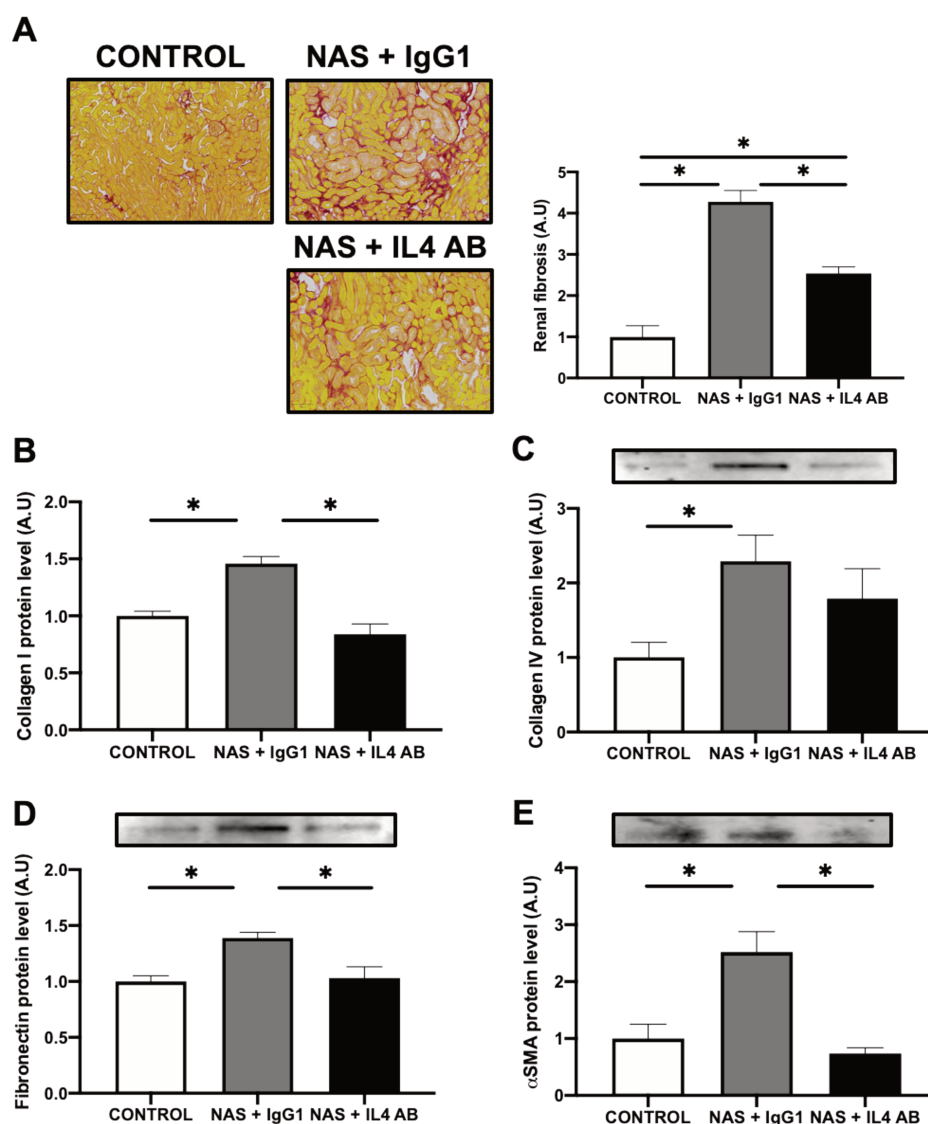


Figure 19 : La neutralisation de l'IL4 réduit la fibrose rénale induite par le challenge NAS

(A) Coupes de reins colorées au rouge Sirius et quantification de la fibrose rénale ; (B) Expression protéique par ELISA (collagène I) et (C-E) Western Blot (collagène IV, fibronectine et α SMA) ; * $P < 0.05$.

Les souris NAS + IgG1 présentent une augmentation d'expression des cytokines proinflammatoires ($IL1\beta$, $IL6$, $TNF\alpha$, $MCP1$ et $CCL5$). L'administration d'anticorps neutralisant anti-IL4 n'a pas d'effet chez les souris NAS + IL4 AB (Figure 20A). Il est important de noter que dans cette expérience que l'augmentation de l'expression de $CD4$ induite par le challenge NAS, n'est pas modifiée par l'administration d'anticorps anti-IL4 (Figure 20B). Dès lors, on ne peut pas attribuer les effets bénéfiques de l'inhibition de l'IL4 à une diminution de l'infiltration des Th2 $CD4^+$ mais bien à une diminution de l'activité IL4.

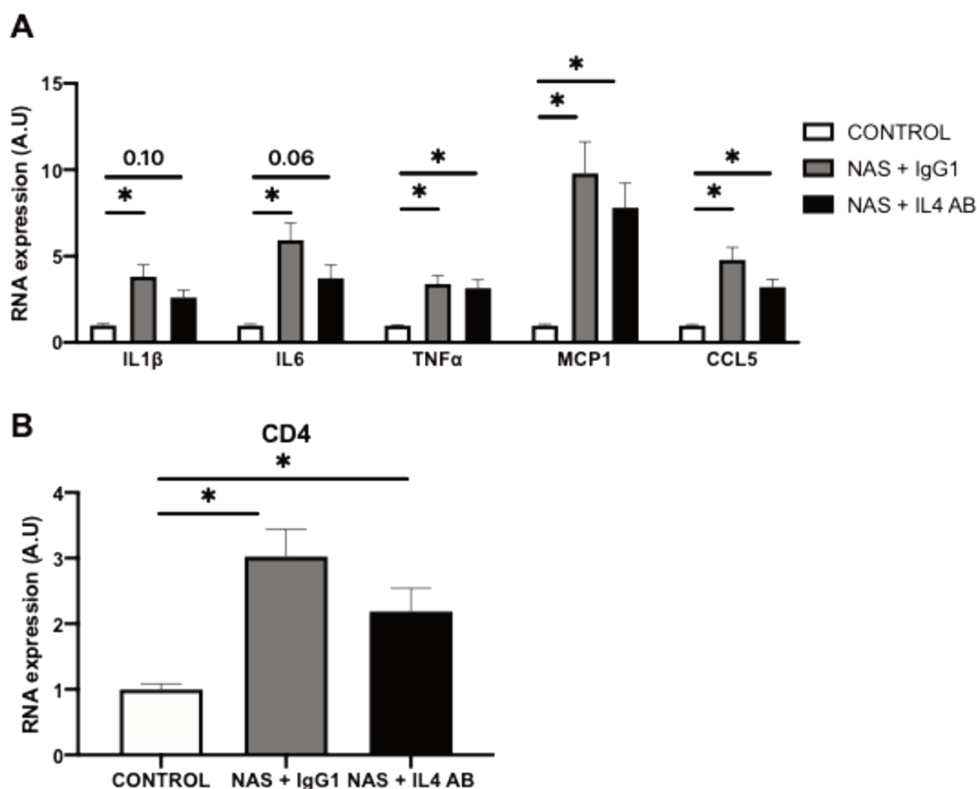


Figure 20 : La neutralisation de l'IL4 ne prévient ni l'inflammation ni la surexpression de CD4 induite par le challenge NAS

(A) Expression ARN de cytokines proinflammatoires (B) et de *CD4* ; *P<0.05

Pris ensemble, ces résultats montrent que l'IL4 est impliquée dans le développement de la fibrose rénale induite par l'excès minéralocorticoïde sans modification de l'inflammation rénale.

2.2.4.3.2. L'inhibition de la signalisation de l'IL4 réduit le phénotype profibrotique et proinflammatoires de fibroblastes rénaux

J'ai ensuite étudié le rôle profibrotique direct de l'IL4 sur des fibroblastes de reins isolés à partir de souris WT (MKF). La **Figure 21A** montre que le traitement des MKF par l'IL4 induit une augmentation de la phosphorylation de STAT6. De plus, l'IL4 induit l'activation des fibroblastes comme le montre l'augmentation d'expression de α SMA et *vimentin* (**Figure 21B**). Le traitement des fibroblastes par l'IL4 favorise l'expression de facteurs autocrines (*IL1 β* , *IL6*, *TGF β* et *FGF2*) (**Figure 21C**) et induit également une augmentation des gènes profibrotiques (*collagène I*, *collagène IV*, *fibronectine* et *fibrillin*) participant au développement de la fibrose (**Figure 21D**). De plus, l'analyse du surnageant des MKF traités par l'IL4 révèle une augmentation de collagène I sécrété comparé aux cellules contrôles (**Figure 21E**). L'inhibition

de la voie de signalisation STAT6 (IL4 + AS) prévient l'ensemble de ces modifications démontrant le rôle profibrotique de l'IL4 en activant la signalisation STAT6 dans les fibroblastes rénaux.

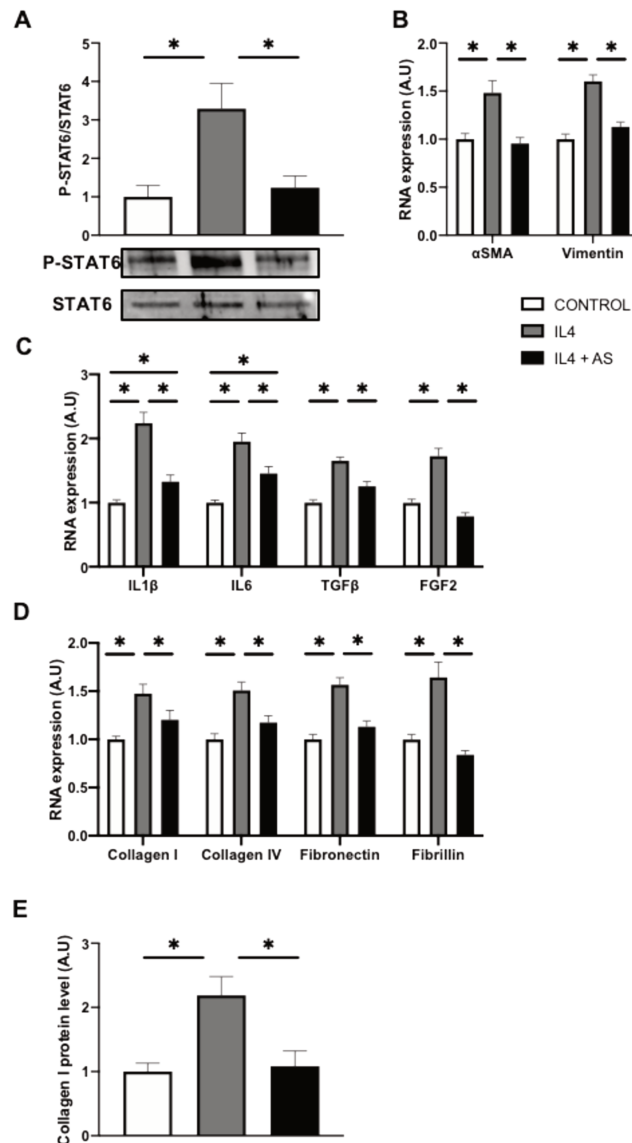


Figure 21 : L'inhibition de STAT6 prévient l'effet proinflammatoire/profibrotique de l'IL4 dans des MKFs

(A) Expression protéique de STAT6 et de sa forme phosphorylée par Western Blot (B-D) Expression ARN des marqueurs d'activation des fibroblastes (A) cytokines proinflammatoires (C) et de gènes profibrotiques (D) ; (E) Expression protéique de collagène I par ELISA dans le surnageant des MKFs traités ; *P<0.05

Ces résultats suggèrent que l'IL4 sécrétée par les Th2 CD4⁺ contribuerait au développement de la fibrose rénale induite par le challenge NAS via l'activation de la voie de signalisation STAT6 au sein des fibroblastes qui vont ainsi contribuer à la surexpression de protéines impliquée dans le remodelage tissulaire.

2.2.5. Conclusion

L'ensemble des résultats de cette étude suggère que la surcharge minéralocorticoïde favorise l'expression de NGAL produit par les macrophages proinflammatoires conduisant à l'expression de CCL5 qui, par son rôle chemoattractant, participe au recrutement des TH2 CD4⁺ qui sécrètent de l'IL4 induisant l'activation des fibroblastes rénaux conduisant à la sécrétion de protéines impliquées dans le développement de la fibrose rénale (**FIGURE**).

A

General characteristics	WT CONTROL	WT NAS	KO NGAL CONTROL	KO NGAL NAS
Body weight (g)	27.91±0.91	25.04±0.93*	30.40±0.35	27.41±0.44*
Kidney weight/Tibia Length (mg/mm)	8.95±0.44	18.25±1.38*	9.70±0.45	18.78±0.53*
Systolic Blood Pressure (mmHg)	117.2±2.01	132.3±4.60*	111.8±1.75	116.8±1.34#
Plasma Creatinine level (μM)	9.71±0.40	14.14±0.77*	8.44±0.62	11.17±0.46#
Plasma Urea level (mM)	5.84±0.32	7.11±0.20*	6.15±0.37	5.82±0.25#

B

General characteristics	WT BM CONTROL	WT BM NAS	KO BM CONTROL	KO BM NAS
Body weight (g)	27.0±1.69	23.75±1.35	27.27±1.44	21.75±2.84
Kidney weight/Tibia Length (mg/mm)	11.81±1.26	14.69±1.45*	12.05±1.66	11.75±2.35#
Systolic Blood Pressure (mmHg)	102.9±11.58	133.1±11.8*	100.4±9.53	115.8±12.6\$#
Plasma Creatinine level (μM)	12.61±1.38	15.34±1.61	17.55±2.76	17.14±1.90
Plasma Urea level (mM)	6.18±0.37	7.26±0.39	9.12±1.12	11.12±1.32

C

General characteristics	CONTROL	NAS	NAS + MARA
Body weight (g)	28.12±0.66	26.03±0.27*	25.67±0.37*
Kidney weight/Tibia Length (mg/mm)	9.03±0.28	15.81±0.60*	15.79±0.50*
Systolic Blood Pressure (mmHg)	118.6±1.90	130.3±1.38*	131.3±2.20*
Plasma Creatinine level (μM)	11.02±0.54	18.60±0.67*	16.41±1.13*
Plasma Urea level (mM)	7.76±0.27	9.98±0.47*	9.75±0.25*

D

General characteristics	CONTROL	NAS + IgG1	NAS + IL4 AB
Body weight (g)	26.20±0.26	24.56±0.38	24.93±0.50
Kidney weight/Tibia Length (mg/mm)	8.64±0.21	19.30±0.73*	17.57±0.43*
Systolic Blood Pressure (mmHg)	121.2±4.11	141.7±2.70*	142.2±3.07*
Plasma Creatinine level (μM)	8.48±0.63	12.40±0.84*	12.22±0.41*
Plasma Urea level (mM)	6.62±0.57	8.31±0.61	9.59±0.80*

Tableau 5 : Paramètres physiologiques des différents modèles utilisés

(A) *P<0.05 vs WT CONTROL #p<0.05 vs WT NAS ; (B) *P<0.05 vs WT BM CONTROL #p<0.05 vs WT BM NAS \$p<0.05 vs KO BM CONTROL ; (C-D) *P<0.05 vs CONTROL

2.3. Discussion

NGAL est connu comme étant un biomarqueur de dysfonction rénale. En effet, l'augmentation de la concentration plasmatique de NGAL est associée aux lésions rénales présentes chez des patients en IRC et est corrélée à la progression de l'IRC^{273,274}. Au cours de cette étude, nous avons montré que l'absence totale d'expression de NGAL dans un modèle

de délétion génique prévient la dysfonction et les lésions rénales induites par le challenge NAS. Précédemment, *Viau et al.* ont montré que des souris KO NGAL sont également protégées de la fibrose rénale et des lésions tubulaires et glomérulaires dans un modèle d'IRC induite par néphrectomie subtotale²¹⁶. Dans un autre modèle d'IRC induite par l'injection d'anticorps anti-GBM, les souris portant la délétion de NGAL ont une protéinurie réduite comparé aux souris WT²¹⁹.

Les cellules immunitaires jouent un rôle prépondérant dans les processus inflammatoires notamment dans les pathologies rénales²⁷⁵. Notre équipe a récemment publié un article montrant que la délétion spécifique de NGAL dans les cellules myéloïdes protège les souris du remodelage cardiaque induit par le challenge NAS²⁰⁷. Dans cette étude, j'ai montré que les souris KO BM sont partiellement protégées du développement de la fibrose rénale induite par l'excès minéralocorticoïde. La délétion spécifique de NGAL par le tissu adipeux prévient l'infiltration de macrophages et du développement de la fibrose rénale induite par le challenge NAS²²⁰. Cette étude montre que la délétion de NGAL dans le rein ne prévient pas les lésions tubulaires et glomérulaires induites par NAS. Les auteurs de l'étude suggèrent alors que le NGAL produit le tissu adipeux représenterait une source majeure de NGAL pouvant provoquer les lésions rénales indépendamment de l'expression génique locale. Ceci diffère de nos conclusions puisque je montre un effet important du NGAL produit par les macrophages dans la production de CCL5 sous l'effet de la stimulation aldostérone-sel.

NGAL exprimé par les macrophages est déterminant dans leur polarisation^{276,277}. En effet, l'inhibition de NGAL réduit l'expression de marqueurs de macrophages M1 (iNOS) et augmente l'expression de marqueurs de macrophages M2 (ARG1) dans un modèle de transplantation cardiaque²⁷⁶. Au cours de ce travail j'ai démontré que NGAL est un médiateur de l'expression de cytokines proinflammatoires et de la polarisation des macrophages M1 (résultats préliminaires) lors du co-traitement A/S. Pour parfaire ce résultat nous développons actuellement un modèle avec délétion ciblée de *Lcn2*/NGAL dans les macrophages. Ce modèle sera soumis à un challenge NAS et nous pourrions ainsi étudier l'impact rénal.

Parmi les cytokines surexprimées par les macrophages co-traités avec A/S, j'ai identifié la chemokine CCL5, connue pour son rôle chemoattractant de cellules immunitaires. Il a d'ailleurs été précédemment montré que CCL5 est une cytokine modulée par l'angiotensine II

dans le rein^{278,279}. J'ai également montré que l'expression de CCL5 est prévenue dans les reins des souris KO NGAL et KO BM exposées au challenge NAS. Dans la littérature, il a été rapporté que CCL5 est impliqué dans les lésions rénales dans divers modèles d'IRA et d'IRC²⁸⁰. Au cours de notre étude, j'ai démontré le rôle profibrotique de CCL5 dans les lésions rénales induites par l'excès minéralocorticoïde. D'autres études ont également montré l'effet protecteur du blocage du CCR5 : l'utilisation d'anticorps neutralisant anti-CCL5 montre une réduction de l'inflammation (diminution de l'infiltration de lymphocytes T et de macrophages) et du développement de la fibrose interstitielle rénale associée à une diminution de l'activation des fibroblastes dans un modèle d'OUU²⁶⁰. A partir du même modèle pathologique, Lefebvre *et al.* ont démontré que le co-blocage de CCR2 et CCR5 permet une réduction du développement de la fibrose rénale²⁵⁹. Il faut noter toutefois que la délétion génétique de CCR5 dans un modèle DOCA + angiotensine II n'améliore pas les lésions rénales²⁸¹. Cependant cette étude montre une surexpression compensatoire de CCL3 qui en se liant au récepteur CCR1 serait également impliquée dans l'infiltration de macrophages dans un modèle d'IR²⁸². De manière similaire, dans un modèle de lésions rénales induites par infusion d'angiotensine II, la délétion de CCL5 aggraverait l'inflammation et la fibrose rénale²⁸³. Cependant, il est également montré que les souris KO CCL5 présentent une augmentation d'expression de CCL2 (MCP1) qui est directement impliquée dans le développement de lésions rénales²⁸⁴. Comme CCL5 est impliquée dans le recrutement de cellules immunitaires, j'ai pu montrer que les Th2 CD4⁺, via la sécrétion d'IL4, pourraient être impliqués dans le développement de la fibrose rénale induite par le challenge NAS.

Le rôle des lymphocytes T CD4⁺ dans les pathologies rénales est plus controversé. Bien qu'une étude montre que l'infiltration des lymphocytes n'est pas nécessaire dans le développement des lésions tubulaires dans un modèle OUU²⁶⁵, deux études plus récentes montrent le rôle essentiel des Th2 CD4⁺ dans le développement de la fibrose rénale^{266,267}. En effet, Liu *et al.* ont montré que le sous type de lymphocytes T Th2 CD4⁺ était le plus produit par la rate dans la phase tardive de l'OUU alors que les Th1 CD4⁺ sont plus présents dans la phase précoce suite à l'intervention. De plus, les auteurs de cette étude ont montré que l'administration de Th2 CD4⁺ a un effet additif à l'OUU sur l'activation des fibroblastes et le dépôt de fibrose rénale.

Le rôle profibrotique de l'IL4 est décrit dans divers tissus et pathologies²⁶⁸⁻²⁷², Dans notre étude j'ai montré que la neutralisation de l'IL4, une cytokine essentiellement sécrétée par les Th2 CD4⁺, réduit de 40% le développement de la fibrose rénale induite par la surcharge minéralocorticoïde. De plus j'ai montré que l'IL4 favorise l'activation des fibroblastes et induit l'expression de gènes profibrotiques par des fibroblastes rénaux via la voie de signalisation STAT6. Dans la littérature, l'implication de l'IL4 dans le développement dans les lésions rénales a déjà été référencée. En effet, la délétion du récepteur α à l'IL4 (IL4R α) dans les fibroblastes issus de la moelle osseuse protège les souris du développement de la fibrose rénale induite par l'OUU²⁶⁸. De plus, l'inhibition de la voie de signalisation JAK3/STAT6 a également montré une diminution de l'infiltration immunitaire et du développement de la fibrose rénale dans un modèle d'OUU²⁸⁵. Le rôle profibrotique de l'IL4 a également été évalué dans d'autres tissus tels que le foie où la délétion de IL4R α prévient de l'inflammation et de la fibrose hépatique induite par l'administration de CCL4²⁷¹. L'administration d'anticorps neutralisant anti-IL4 protège les souris de la fibrose dermique dans un modèle de sclérose systémique²⁷². Les souris portant une délétion génétique pour IL4 sont protégées du remodelage cardiaque induit par l'administration d'angiotensine II²⁶⁹. Des résultats similaires ont été obtenus par l'injection d'anticorps neutralisant anti-IL4 dans un modèle de constriction aortique²⁷⁰. Enfin, il a été montré que chez les patients souffrant d'IC, la concentration urinaire de l'IL4 est positivement corrélée à la fibrose cardiaque²⁸⁶.

Cette étude a permis de montrer que le NGAL produit par les cellules issues de la moelle osseuse, via la signalisation CCL5/IL4, est impliqué dans les lésions rénales induites par la surcharge minéralocorticoïde.

3. Développement d'un antagoniste de NGAL : Effets bénéfiques dans des modèles *in vitro* et *in vivo*

3.1. Introduction

L'identification et le rôle pathologique de NGAL ont déjà été abordés dans l'introduction générale de ce manuscrit et dans la partie précédente. Dès lors, NGAL est désigné comme étant une cible thérapeutique potentielle dans les pathologies cardiovasculaires, rénales et métaboliques. Il est donc nécessaire de trouver un inhibiteur de NGAL qui pourrait ainsi prévenir ses effets délétères dans le remodelage et l'inflammation tissulaire.

Afin d'identifier un inhibiteur de NGAL, le laboratoire a collaboré avec la société Greenpharma basée à Orléans. La stratégie a été de trouver une molécule pouvant interagir avec NGAL en empêchant son interaction avec son récepteur bloquant ainsi la signalisation induite par la protéine NGAL. L'analyse de la structure 3D de NGAL a révélé que 2 sites périphériques contenant de nombreux résidus permettant son interaction avec d'autres protéines pouvaient servir de cible à ces inhibiteurs. Un vaste screening virtuel visant à tester l'interaction entre diverses petites molécules et NGAL a permis de sélectionner 32 molécules pouvant avoir une forte interaction avec les sites de liaison de NGAL. Une fois synthétisées, ces 32 molécules ont été testées *in vitro* à l'aide de fibroblastes cardiaques humains (HCF). La première étape était d'identifier un contrôle positif simple pour suivre les effets de NGAL recombinant. Le laboratoire a montré précédemment que NGAL recombinant induit directement la sécrétion d'IL6 et de collagène I dans le surnageant des HCF traités par NGAL recombinant. De plus l'effet de l'aldostérone sur la production d'IL6 et de collagène I est bloqué par des siRNA empêchant l'expression de NGAL¹⁹⁷. La sélection des inhibiteurs de NGAL a ainsi été réalisée sur leur capacité d'inhiber la sécrétion d'IL6 induite par NGAL humaine recombinante dans les HCF (en cours de publication, brevet déposé). Ainsi, nous avons sélectionné plusieurs molécules inhibitrices de NGAL dont une qu'on appellera GP1.

L'objet de cette étude était de tester l'effet de GP1 sur le remodelage et l'inflammation rénale dans un modèle d'IRC induite par néphrectomie subtotale, ainsi que dans un modèle d'hypertension sensible au sel. Ces résultats ont été obtenus avec l'étroite collaboration de

Greenpharma qui a fourni le GP1. Les résultats montrent l'effet de GP1 sur des fibroblastes primaires de rein de souris stimulés par NGAL murin recombinant et la preuve de concept de l'efficacité du GP1 dans un modèle d'IRC induite par néphrectomie subtotale. De plus nous montrons que GP1 prévient l'hypertension sensible au sel.

Les résultats de cette étude ont été soumis au journal *Scientific Report* P.143.

Bonnard B, Martínez-Martínez E, Fernández-Celis A, Do QT, Ramos I, Rossignol P, Faiez Z, Mulder P, Ouvrard-Pascaud A, López-Andrés N, Jaisser F. Antifibrotic effect of novel neutrophil gelatinase-associated lipocalin inhibitors in cardiac and renal disease models

3.2. Résultats

3.2.1. Identification de GP1 et preuve de concept dans l'infarctus du myocarde

3.2.1.1. *in vitro* : inhibition des effets de NGAL par GP1 dans les HCFs

Ce travail a été réalisé par le chercheur postdoctoral Ernesto Martínez-Martínez et présente l'efficacité de GP1 sur les processus proinflammatoires et profibrotiques dans des fibroblastes cardiaques humains et dans un modèle d'infarctus du myocarde chez la souris

Le traitement des HCFs par du NGAL recombinant induit une augmentation de 40% de la prolifération cellulaire prévenue chez les HCFs co-traités par NGAL + GP1 (**Figure 22A**). NGAL favorise l'expression de protéines profibrotiques et proinflammatoires : l'analyse du sécrétome des HCFs révèle une augmentation de la sécrétion de collagène I et d'IL6 (**Figure 22B**). De plus, NGAL recombinant induit une surexpression intracellulaire de collagène I, collagène III et de fibronectine (**Figure 22C**). Ces modifications sont prévenues par le GP1.

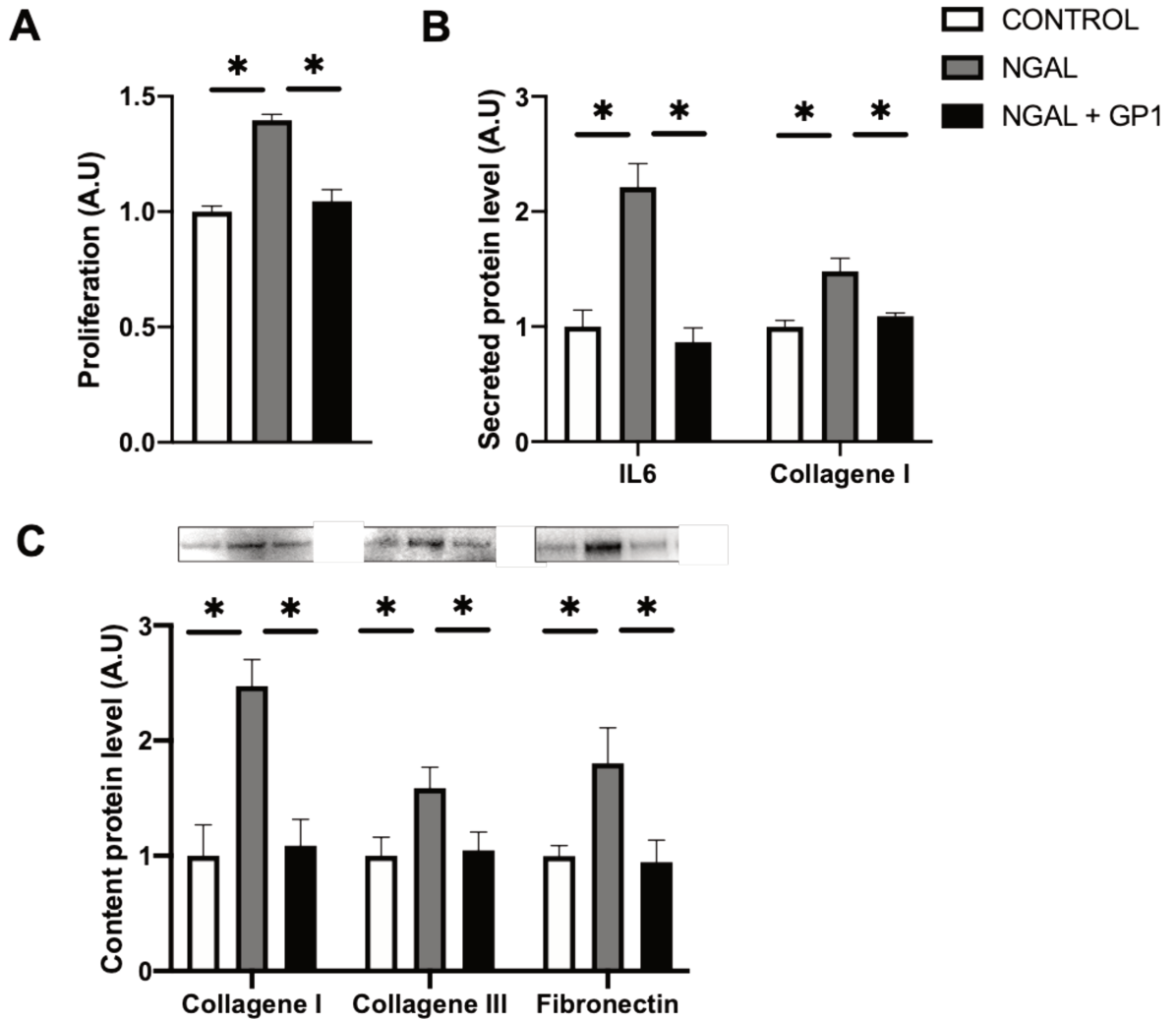


Figure 22 : L'inhibition de NGAL par le GP1 inhibe les effets prolifératifs et profibrotiques de NGAL dans les HCFs

(A) Prolifération des HCFs ; (B) Expression de IL6 et collagène I dans le surnageant des HCFs ; (C) Expression des protéines intracellulaires par Western Blot ; *P<0.05

Il a été montré au laboratoire que l'inhibition de NGAL par siRNA bloque la production de collagène I induit par l'aldostérone dans les HCFs¹⁹⁷. Nous avons donc étudié l'effet de l'inhibition de NGAL par le GP1 dans ce contexte profibrotique. Le traitement des HCFs par l'aldostérone induit une augmentation d'expression de l'IL6 et de collagène I prévenue par le GP1 (Figure 23).

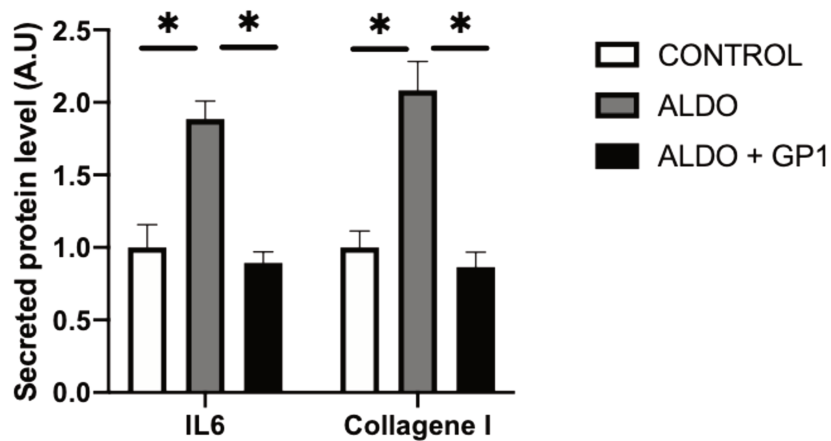


Figure 23 : Le GP1 inhibe la sécrétion d'IL6 et de collagène I induite par l'aldostérone dans les HCFs

Expression de IL6 et collagène I dans le surnageant des HCFs ; *P<0.05

Ces résultats montrent que le GP1 prévient le rôle profibrotique et proinflammatoire induit par NGAL et l'aldostérone dans les HCFs.

3.2.1.2. *in vivo* : GP1 limite le remodelage cardiaque induit par IM

Il a été montré au laboratoire que l'inactivation génétique de NGAL prévient le remodelage et la dysfonction cardiaque induite par l'IM¹⁹⁷. L'administration de GP1 (100 mg/kg/j) à des souris post-IM (MI + GP1) améliore la diminution de la fraction de raccourcissement résultant de la diminution relative (non significative) du diamètre du ventricule gauche (en diastole et systole ; LVEDD et LVESD) comparé au souris IM non traitées (MI) (**Tableau 6**). Les paramètres LV dP/dt_{max} ($p=0.07$) et dP/dt_{min} représentant respectivement l'augmentation et la diminution de la pression dans le ventricule gauche (LV) servant d'indicateurs globales de la contractilité du LV et de la fonction diastolique sont altérés par l'IM et améliorés chez les souris MI + GP1 (**Tableau 6**). De plus, les courbes pression/volume montrent une amélioration de la LVEDP chez les souris traitées par le GP1 indiquant une amélioration de la compliance du LV alors que l'augmentation de la LVESP (indiquant un défaut de contractilité du LV) n'est pas modifiée par le GP1 (**Tableau 6**). Des résultats similaires ont été obtenus avec l'inhibition génétique de NGAL¹⁹⁷.

<u>General characteristics</u>	SHAM	MI	MI + GP1
HW/TL (mg/mm)	8.5±0.4	10.9±0.4*	11.3±0.8*
LVW/TL (mg/mm)	6.2±0.3	8.3±0.3*	8.8±0.6*
LVEDD (mm)	3.33±0.08	6.31±0.12*	5.88±0.39*
LVESD (mm)	2.03±0.05	5.47±0.13*	4.90±0.39*
FS (%)	39±0.93	13.4±1.0*	17.2±1.3*
SV (ml/beat)	0.092±0.003	0.062±0.005*	0.086±0.004#
CO (ml/min)	39.7±2.0	29.4±1.9*	47.1±3.3#
LVEDP (mmHg)	2.73±0.95	5.91±0.49*	4.41±0.57
LVESP (mmHg)	85.05±1.39	78.82±2.76	82.31±4.22
LV dp/dt _{max}	5220±229	3894±259*	4501±320
LV dp/dt _{min}	4874±550	3117±253*	4487±413#
tau e	6.05±0.30	7.97±0.45*	6.08±0.27#
tau 1/2	4.43±0.20	5.82±0.32*	4.33±0.21#

Tableau 6 : L'inhibition de NGAL par le GP1 prévient la dysfonction cardiaque induit par l'IM

*P<0.05 vs SHAM #p<0.05 vs MI

L'analyse de la fibrose cardiaque révèle que les souris MI présentent une augmentation de la fibrose interstitielle cardiaque prévenue chez les souris MI + GP1 (**Figure 24A**). Ce résultat est confirmé par l'analyse moléculaire montrant une augmentation d'expression de protéines profibrotiques (collagène I, CTGF et α SMA) induite par l'IM et limité par l'administration de GP1 (**Figure 24B-D**). De plus, les cœurs des souris MI + GP1 ont une réduction de paramètres proinflammatoires (IL6, CD80 et CD86) induite par l'IM (**Figure 24E**).

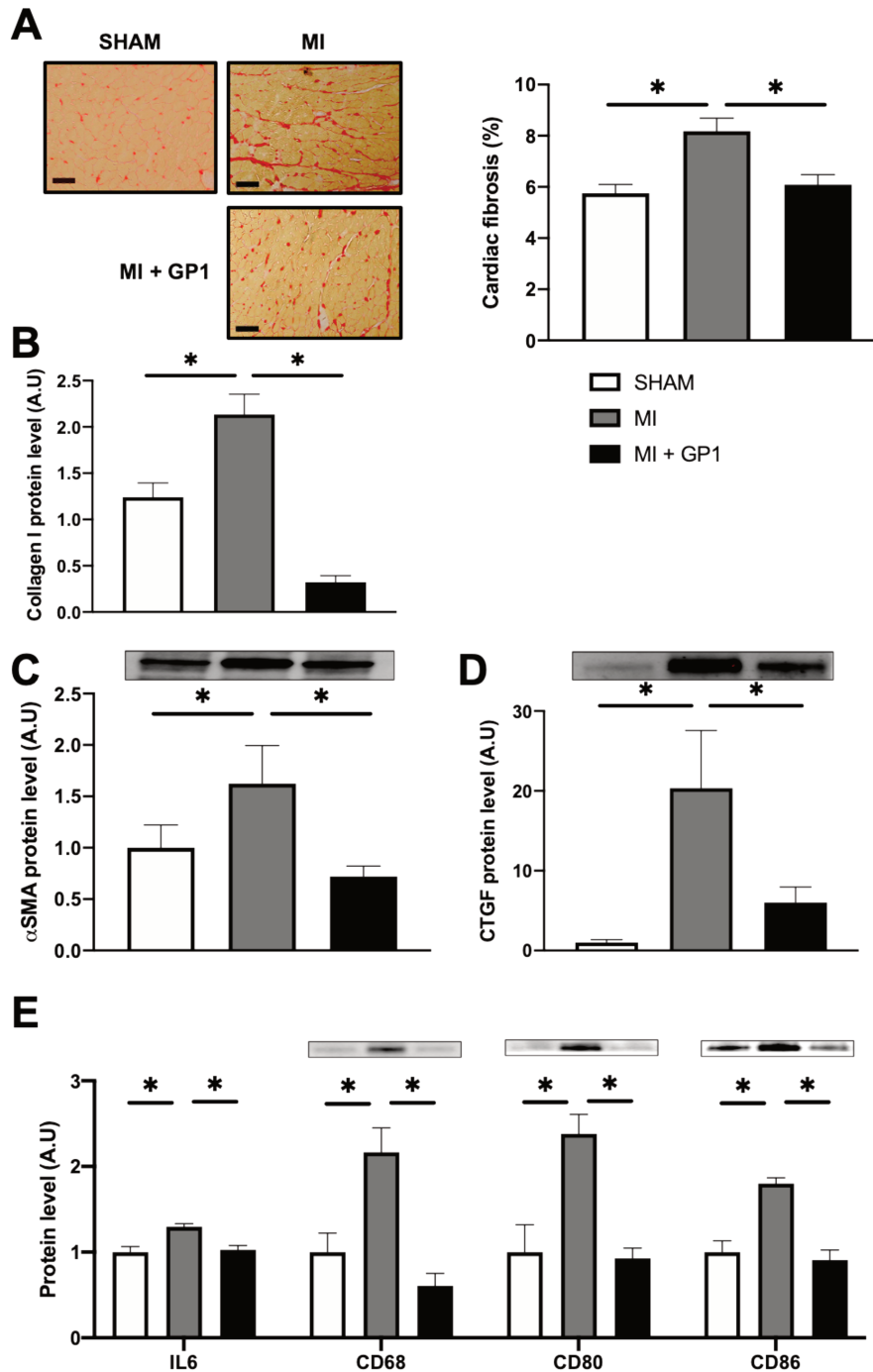


Figure 24 : L'inhibition de NGAL par le GP1 prévient le remodelage cardiaque induit par l'IM

(A) Coupes de cœur colorées au rouge Sirius et quantification de la fibrose cardiaque ; (B) Expression des protéines profibrotiques ; (C) Expression des protéines proinflammatoires ; *P<0.05

Pris ensemble, ces résultats montrent le rôle protecteur du GP1 dans les dysfonctions et lésions cardiaques induites par l'IM. Ces effets reproduisent parfaitement ce qui est observé dans le modèle murin avec inactivation génique globale de NGAL.

3.2.2. L'inhibition de NGAL par GP1 limite le développement de la fibrose rénale

3.2.2.1. GP1 limite l'activation des fibroblastes rénaux

J'ai étudié l'effet de GP1 sur les effets profibrotiques de NGAL dans des MKFs. NGAL recombinant murin induit l'activation des MKFs par l'augmentation d'expression de α SMA et vimentin (Figure 25A). De plus, le traitement des fibroblastes rénaux par NGAL favorise l'expression de facteurs autocrines ($IL1\beta$, $IL6$ et $FGF2$) (Figure 25B) et également une augmentation des gènes profibrotiques (collagène I, fibronectin et fibrillin) participant au développement de la fibrose (Figure 25C). Ces modifications sont prévenues par l'inhibition de NGAL par GP1 (NGAL + GP1).

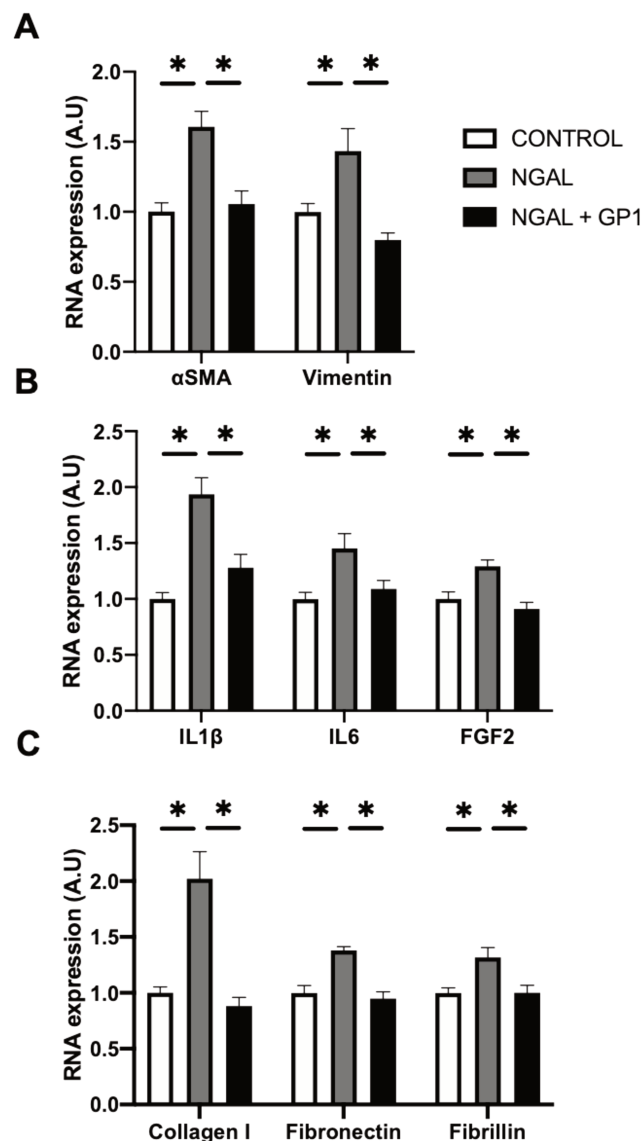


Figure 25 : L'inhibition de NGAL par le GP1 inhibe les effets proinflammatoires et profibrotiques de NGAL dans les MKFs

(A-C) Expression ARN des marqueurs d'activation des fibroblastes (A) facteurs autocrines (B) et de gènes profibrotiques (C) ; *P<0.05

3.2.2.2. GP1 réduit le remodelage rénal induit par l'IRC

Viau *et al.* ont démontré que l'inactivation génétique de NGAL protège des lésions rénales dans un modèle d'IRC induit par néphrectomie subtotale²¹⁶. La néphrectomie subtotale induit une dysfonction rénale illustrée par l'augmentation de la concentration plasmatique de créatinine et d'urée chez les souris CKD (**Tableau 7**). L'administration de GP1 (100 mg/kg/j) n'améliore pas la dysfonction rénale des souris CKD + GP1. Cependant, l'hypertension induite par l'IRC est largement diminuée chez les souris traitées par le GP1 (**Tableau 7**).

La coloration au rouge Sirius révèle que le GP1 prévient le développement de la fibrose rénale induite par l'IRC (**Figure 26A**). De manière similaire, l'expression de gènes codant pour des protéines profibrotiques (*collagène I*, fibronectin et α SMA) (**Figure 26B**) est prévenue dans le rein des souris CKD + GP1 alors que l'expression des gènes proinflammatoires (*IL6*, *MCP1* et *TNF α*) est inchangée (**Figure 26C**).

<u>General characteristics</u>	SHAM	CKD	CKD + GP1
Body weight (g)	30.9±0.45	31.9±0.42	31.7±0.46
Kidney weight/Tibia Length (mg/mm)	9.40±0.26	11.5±0.42*	11.3±0.23*
Systolic Blood Pressure (mmHg)	115±0.75	139.3±2.22*	122.1±2.58#
Plasma Creatinine level (μ M)	4.14±1.30	21.5±1.45*	20.4±1.54*
Plasma Urea level (mM)	7.11±0.34	15.2±0.36*	16.74±1.86*

Tableau 7 : L'inhibition de NGAL par le GP1 prévient l'hypertension sans amélioration de la dysfonction rénale induite par l'IRC

*P<0.05 vs SHAM #p<0.05 vs CKD

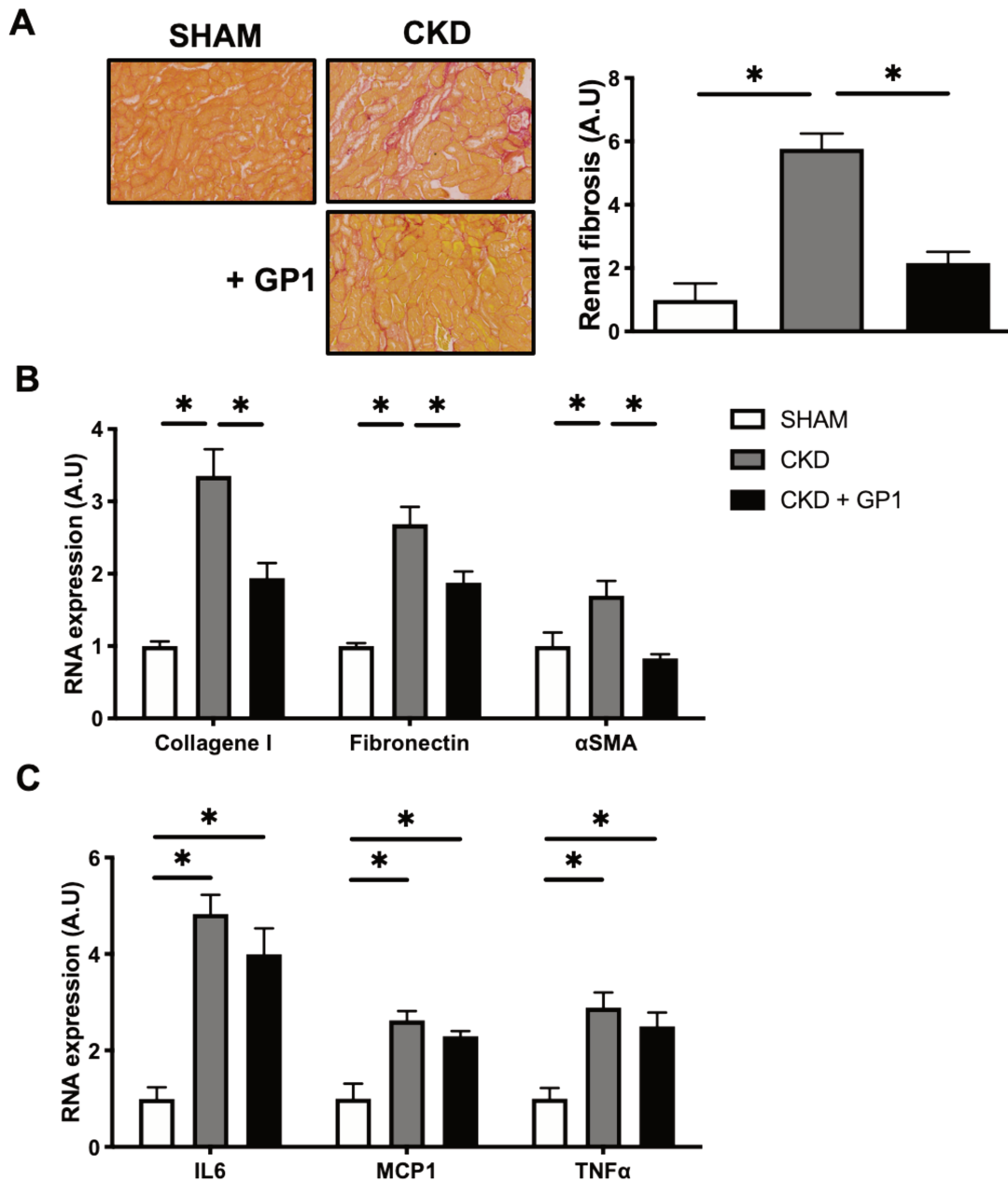


Figure 26 : L'inhibition de NGAL par le GP1 prévient le développement de la fibrose rénale induite par l'IRC
 (A) Coupes de reins colorées au rouge Sirius et quantification de la fibrose rénale ; (B-C) Expression ARN de gènes profibrotiques (B) et proinflammatoires (C) ; *P<0.05

L'inhibition de NGAL par le GP1 prévient le développement de la fibrose interstielle rénale induite par l'IRC.

3.2.3. L'inhibition de NGAL par GP1 limite l'hypertension sensible au sel

Nous avons vu précédemment (paragraphe 2.2.1, P.66) que la délétion de NGAL prévient l'hypertension induite par le challenge NAS (**Tableau 5A**) suggérant l'implication de NGAL dans la régulation de la pression artérielle. Des résultats préliminaires montrent que les souris KO NGAL sous régime pauvre en sel (0%) présentent une diminution de leur pression artérielle systolique comparé aux souris WT (Résultats en cours de publication). Cette diminution est prévenue lors de la reprise à un régime normale contenant 0.3% de sel. Dans ce travail, j'ai montré que le GP1 prévient l'hypertension des souris CKD (**Tableau 7**) et j'ai donc étudié l'effet de GP1 dans un modèle d'hypertension sensible au sel (modèle traité par L-NAME associé à un régime riche en sel (HSD)).

L'hypertension observée chez les souris L-NAME + HSD est prévenue par l'administration du GP1, montrant ainsi que l'inhibition de NGAL par le GP1 module la pression artérielle pathologique (**Figure 27**).

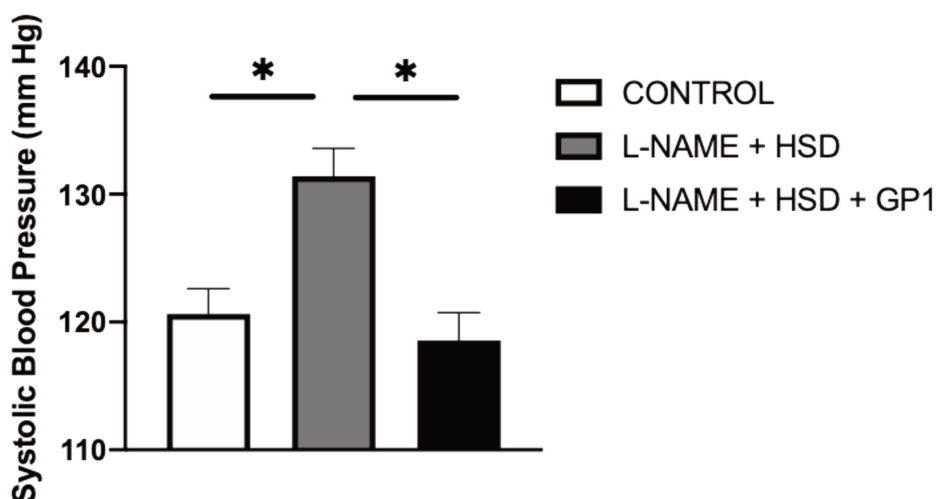


Figure 27 : L'inhibition de NGAL par le GP1 prévient l'hypertension induite par le co-traitement L-NAME + HSD

*P<0.05

L'inhibition de NGAL par le GP1 prévient l'augmentation de la pression artérielle dans un modèle d'hypertension sensible au sel.

3.2.4. Conclusion

L'ensemble de ces résultats confirment que NGAL est une cible thérapeutique potentielle dans le développement des lésions cardio-rénales et de l'hypertension artérielle et que le développement de l'antagoniste de NGAL, GP1, réduit les effets délétères de NGAL.

3.3. Discussion

La mesure de la concentration plasmatique de NGAL est utilisée comme biomarqueur de l'insuffisance rénale^{174,175}. Cependant, l'augmentation de la concentration plasmatique NGAL dans le plasma est également associée à la mortalité de patients souffrant d'IC¹⁷⁷, indépendamment d'une dysfonction rénale¹⁷⁶. Dans notre étude nous nous sommes intéressés à l'effet de l'inhibition de NGAL par le GP1 dans un contexte d'IC puis dans l'IRC.

Notre laboratoire a déjà identifié NGAL comme médiateur du remodelage et de l'inflammation cardiovasculaire dans des modèles d'IC^{197,204,207}. Dans le modèle d'IC induite par le challenge NAS, notre équipe a montré que la délétion génétique de NGAL prévient le développement de la fibrose périvasculaire cardiaque associée à une diminution d'expression de collagène I dans l'aorte²⁰⁴. De plus cette étude montre que la concentration plasmatique de PINP (marqueur de maturation du collagène I) augmentée par le challenge NAS, est prévenue chez les souris KO NGAL. Dans un modèle d'IM, similaire à celui utilisé dans ce travail, notre équipe a pu mettre en évidence l'implication de NGAL dans la dysfonction et le remodelage cardiaque induit par l'IM¹⁹⁷. Cet article suggère que la voie de signalisation NF- κ B serait impliquée dans les effets profibrotiques de NGAL. Dans ce manuscrit nous avons pu voir que le GP1 mime les effets de la délétion génétique de NGAL pour la prévention de la dysfonction et du remodelage cardiaque bien que nous n'ayons pas répété ici le groupe de souris KO NGAL + MI afin de comparer statistiquement l'effet du GP1 à l'effet du KO NGAL.

Pour étudier les effets de GP1 dans un modèle d'IRC induit par néphrectomie subtotale, j'ai utilisé la souche de souris FVB/N identique à celle utilisée par Viau *et al*²¹⁶ avec le modèle KO NGAL. Dans un précédent article, cette équipe avait démontré que la souche de souris FVB/N développait d'avantages de lésions induites par néphrectomie subtotale que la souche B6D2F1²⁸⁷. De plus, Viau *et al.* montrent que l'induction de NGAL est 10 fois supérieure dans le rein des souris FVB/N néphrectomisées comparé aux souris B6D2F1 néphrectomisées. Dans cet article, il est montré que les souris ayant la délétion génétique de NGAL sont protégées du développement de fibrose interstitielle rénale et des lésions tubulaires et glomérulaires. Ceci est associé à une réduction de l'apoptose. De plus, les souris KO NGAL présentent une amélioration de la dysfonction rénale (réduction de la concentration plasmatique de créatinine et d'urée) par l'IRC. Le traitement par le GP1 permet également

une réduction de la fibrose rénale. Cependant j'ai observé une dysfonction rénale similaire entre les souris CKD traitées ou non par le GP1. A l'inverse de l'étude utilisant les souris KO NGAL, j'ai montré que le GP1 limite l'hypertension induite par l'IRC. Enfin la différence majeure entre notre étude et celle réalisée par l'équipe dirigée par le Dr F. Terzi est le genre des souris utilisées. En effet, dans leur article, *Viau et al.* ont utilisé des souris femelles alors que j'ai utilisé des souris mâles pour mon étude. Il a déjà été rapporté que des lésions rénales induites dans des modèles d'IRC sont moindres chez les femelles : les lésions rénales induites par l'inhibition d'oxyde nitrique (ON) via administration de L-NAME (inhibiteur de la synthèse d'ON) sont largement réduites chez les femelles rats comparées aux rats mâles²⁸⁸. Des résultats similaires ont également été obtenus dans un modèle d'IRC induit par IR : les rats mâles présentent une fibrose interstitielle rénale de 38% alors que la fibrose des rats femelles n'est que de 12% 4 mois après l'IR²⁸⁹. Nous devrions refaire ce modèle à partir de souris femelles FVB/N et administrer le traitement GP1 pour voir si cela améliore la fonction rénale. Une autre explication pourrait être que la concentration effective de GP1 est efficace pour prévenir la fibrose mais pas la dysfonction rénale. Il serait intéressant d'essayer une dose plus forte mais nous sommes limités par la disponibilité du produit GP1 pour un traitement chronique de plusieurs mois et la capacité de synthèse de l'entreprise Greenpharma.

La prévalence de l'hypertension artérielle est établie à 30% dans la population globale mais passe à 90% chez les patients souffrant d'une IRC^{290,291}. L'hypertension est un facteur de risque de développer une IRC mais est également le résultat de la progression de l'IRC causée par la rétention d'eau et de Na⁺, par la sur-activation du SRAA ou d'une dysfonction endothéliale²⁹²⁻²⁹⁴. L'ON a un rôle clef dans la modulation de la pression artérielle en modifiant la résistance vasculaire et l'excrétion d'ions²⁹⁵. La synthèse d'ON est augmentée en réponse à une consommation élevée de Na⁺^{296,297}. L'association d'un régime riche en sel et de l'inhibition de la synthèse d'ON à faible dose (L-NAME + HSD) est capable d'induire une hypertension artérielle dans un modèle murin^{298,299}. De plus, *Yamada et al.* ont montré que l'administration de L-NAME seule à la concentration de 3 mg/kg/j ne modifie pas la pression artérielle⁹³. Dans notre étude nous avons montré que l'administration de GP1 réduit la pression artérielle comparé aux souris L-NAME + HSD suggérant que NGAL est impliqué dans la régulation de la pression artérielle dans un modèle d'hypertension sensible au sel. Dans un modèle de rat développant de manière spontanée une hypertension, le rôle du RM dans

l'hypertension lié au sel a été démontré : le blocage du RM par l'eplerenone protège des lésions cardio-rénales induites par l'hypertension^{300,301}. Dès lors ce résultat pourrait être expliqué par le rôle clef de NGAL dans la régulation de la pression artérielle. Afin de vérifier cette hypothèse, les mécanismes de la régulation de la pression artérielle par NGAL pourraient être évalués avec l'utilisation de souris KO NGAL dans un modèle d'hypertension sensible au sel. En effet le rôle de NGAL dans la régulation de la pression artérielle n'est pas encore bien connu. Cependant, il a été montré que la concentration plasmatique de NGAL est augmentée chez des patients souffrant d'hypertension et est corrélée positivement avec l'augmentation de la pression artérielle³⁰²⁻³⁰⁴. Enfin, l'administration de NGAL recombinant chez la souris induit une augmentation de la pression artérielle²⁰². Dans notre laboratoire, un projet initié par notre équipe montre que NGAL est directement impliqué dans la phosphorylation du transporteur ionique NCC conduisant à la réabsorption de Na⁺ par les cellules du TCD ce qui va participer à l'augmentation de la pression artérielle (Résultats en cours de publication).

Alors que NGAL représente une potentielle cible thérapeutique dans le développement des lésions cardio-rénales, quelques études ont utilisé des anticorps anti-NGAL neutralisant dans des modèles *in vivo* et *in vitro*. Dans un modèle d'IR cardiaque, l'administration d'anticorps anti-NGAL limite le recrutement de cellules immunitaires telles que les neutrophiles et macrophages associés à une réduction d'expression des marqueurs de macrophages M1 et une augmentation d'expression des marqueurs de macrophages M2²⁷⁶. Le rôle de NGAL dans le recrutement des neutrophiles a également été évalué dans le foie : l'inhibition de NGAL par injections d'anticorps neutralisant protège les souris de lésions hépatiques et de l'infiltration de neutrophiles induites par une exposition à l'alcool³⁰⁵. De manière similaire, l'administration d'anticorps anti-NGAL neutralisant réduit l'infiltration de neutrophiles Ly6G dans deux modèles de psoriasis³⁰⁶ conduisant à la diminution d'expression de gènes proinflammatoires (IL6, IL8, IL17, IL1 α and IL23)¹⁹⁶. Chez les patients souffrant d'anévrisme de l'aorte abdominale (AAA), la quantité de NGAL est largement augmentée dans le plasma et l'aorte^{307,308}. Dans un modèle murin d'AAA, Tarín *et al.* ont montré que la délétion génétique de NGAL ou l'injection d'anticorps anti-NGAL neutralisant, protège des lésions induites par AAA avec une diminution de l'infiltration de neutrophiles et de l'activité des MMPs³⁰⁹. A l'inverse, Saha *et al.* ont révélé que l'inhibition de NGAL exacerbe l'inflammation et les lésions intestinales dans un modèle de colite induite par l'administration de sulfate de

dextran sodique³¹⁰. En oncologie, NGAL promeut la transition épithélio-mésenchymateuse des cellules cancéreuses favorisant la progression du cancer³¹¹. L'administration d'anticorps anti-NGAL réduit la concentration de fer dans les tissus de façon dose-dépendant réduisant la biodisponibilité du fer (source de croissance des cellules cancéreuses) qui conduirait à la réduction des métastases³¹². En effet, les anticorps anti-NGAL neutralisant protègent des métastases pulmonaires dans le modèle murin 4T1 du cancer du sein³¹³. Notre approche a montré que l'utilisation d'une petite molécule antagoniste de NGAL, GP1, était capable de réduire les effets délétères de NGAL dans les lésions cardiaques et rénales dans deux modèles *in vivo* et d'inhiber directement les effets profibrotiques de NGAL dans les fibroblastes.

IV. DISCUSSION

1. Résumé des résultats du travail de thèse

1.1. Le blocage du RM améliore la dysfonction cardiaque et l'altération de l'homéostasie calcique induite par l'IRC

Au cours de ma première étude, j'ai montré que le blocage du RM par la finerenone n'améliore ni la dysfonction ni les lésions rénales induites par l'IRC une fois celles-ci installées. La collaboration du Dr A. Ouvrard-Pascaud (Rouen) a permis de montrer que les souris CKD présentaient une dysfonction diastolique (altération du ratio E/A et une augmentation de la relation pression/volume du ventricule gauche en fin de diastole) prévenue par la finerenone. L'IRC tend à augmenter la fibrose interstitielle cardiaque qui est prévenue chez les souris traitées par la finerenone. L'analyse moléculaire des cœurs des souris CKD révèle que l'IRC diminue la phosphorylation de PLN et de CaMKII suggérant une altération de la réabsorption du Ca^{2+} dans le réticulum sarcoplasmique des cardiomyocytes (**Figure 28**). L'activation de PKA et l'expression de Ryr2 et de SERCA2a ne sont pas modulées par l'IRC suggérant que la diminution de l'activation de PLN et de CaMKII chez les souris CKD seraient directement impliqués dans le défaut de relaxation des cardiomyocytes conduisant à la dysfonction diastolique. L'altération des protéines régulant l'homéostasie calcique au sein des cardiomyocytes est prévenue par le blocage du RM.

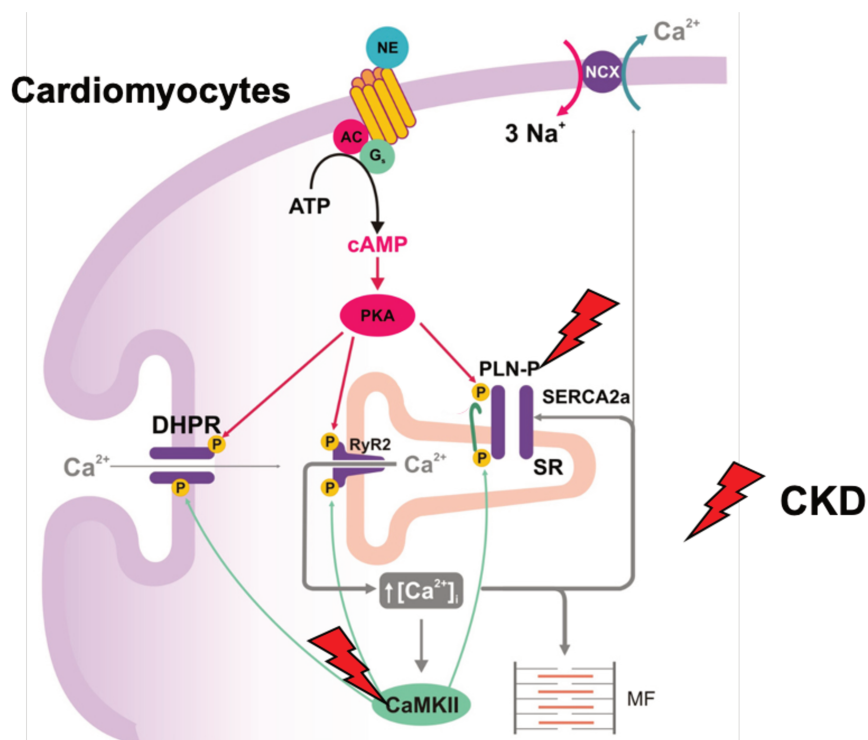


Figure 28 : L'IRC altère l'homéostasie calcique dans les cardiomyocytes (Adapté de Mattiazzi & Kranias)³¹⁴.

1.2. Le NGAL produit par les macrophages est impliqué dans le développement de la fibrose rénale induite par l'excès minéralocorticoïde via la signalisation CCL5/IL4

Au cours de cette seconde étude réalisée en collaboration avec l'équipe dirigée par le Dr N. López-Andrés (Pampelune), j'ai montré que NGAL produit par les cellules myéloïdes joue un rôle critique dans le développement des lésions rénales induites par l'excès minéralocorticoïde. Le challenge NAS induit une augmentation de l'inflammation rénale illustrée par l'infiltration de monocytes proinflammatoires $CD11b^+ Ly6C^{high}$ (données préliminaires) qui en arrivant au site de lésion rénales se différencieraient en macrophages proinflammatoires $CD11b^+ F4/80^{high} Ly6C^{high}$ qui sécrètent des cytokines ($IL1\beta$, $IL6$ et $TNF\alpha$) et chemokines proinflammatoires (MCP1 et CCL5). La délétion génétique de NGAL dans les cellules myéloïdes prévient uniquement la surexpression de CCL5 suggérant que NGAL est un médiateur du rôle chemoattractant. En effet l'inhibition de NGAL et le blocage de la signalisation de CCL5 limitent l'expression des marqueurs des Th2 $CD4^+$. Nous avons également montré que le blocage des effets profibrotiques de l'IL4 permet de réduire les dommages rénaux induit par le challenge NAS. Ces résultats montrent que le NGAL produit par les macrophages serait impliqué dans le développement de la fibrose rénale induite par l'excès minéralocorticoïde via la signalisation CCL5/IL4 (**Figure 29**).

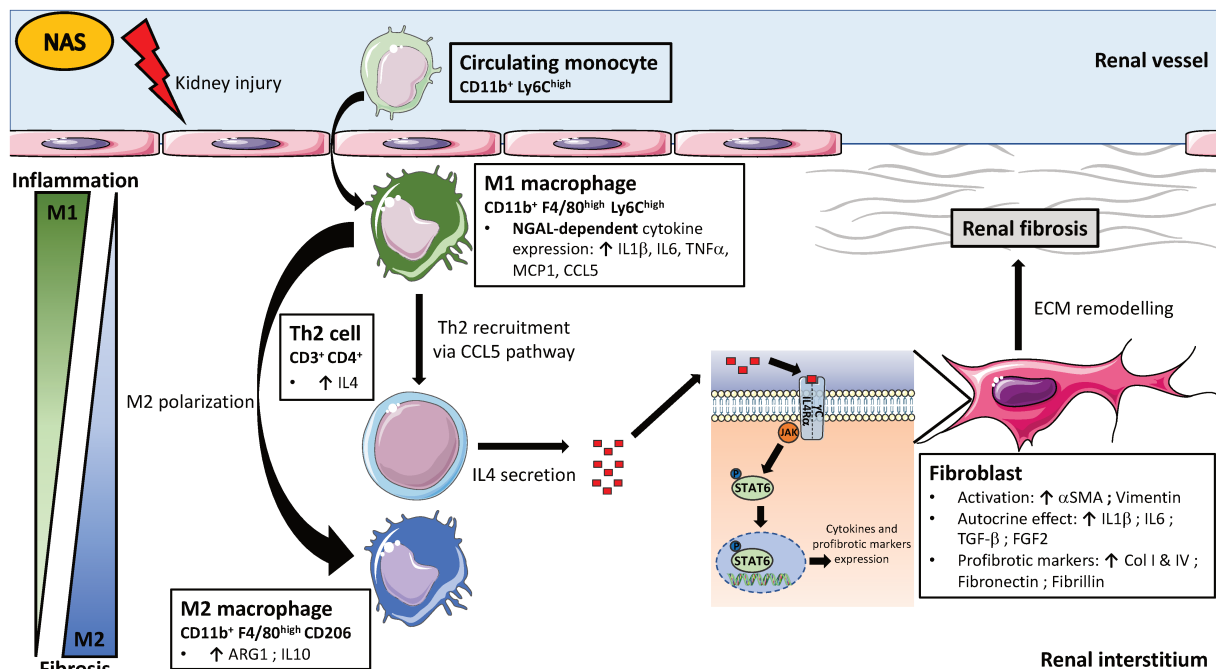


Figure 29 : Implication du NGAL produit par les macrophages dans la fibrose rénale induite par le challenge NAS via la signalisation CCL5/IL4

1.3. L'inhibition de NGAL par le composé GP1 améliore les lésions cardio-rénales dans un modèle d'IC et d'IRC

Dans cette dernière étude, avec les résultats préliminaires obtenus par le Dr E. Martínez-Martínez et avec la collaboration des équipes du Dr N. López-Andrés et du Dr A. Ouvrard-Pascaud, nous avons identifié une molécule possédant une potentielle activité inhibitrice des effets délétères de NGAL. En effet, GP1 inhibe les effets profibrotiques et proinflammatoires de NGAL dans des fibroblastes cardiaques et rénaux. A partir d'expériences *in vivo*, l'administration de GP1 a montré des effets bénéfiques sur la fonction cardiaque, le développement de la fibrose et de l'inflammation cardiaque reproduisant les résultats obtenus à partir de souris KO NGAL dans le même modèle d'IC induite par MI¹⁹⁷. Dans le modèle d'IRC induite par néphrectomie subtotale, l'effet inhibiteur du GP1 est partiel lorsqu'on le compare aux effets observés dans le même modèle d'IRC chez des souris KO NGAL²¹⁶ : bien que le GP1 prévient le développement de la fibrose rénale de manière identique aux souris ayant une délétion génétique de NGAL, la fonction rénale et l'inflammation induites par l'IRC ne sont pas limitées par l'administration de GP1. La raison de ces différences pourrait être liée à la distribution du composé dans le tissu rénal n'ayant pas d'impact sur la fonction glomérulaire. Cependant l'effet dissocié du GP1 sur l'inflammation cardiaque et rénale est plus singulier et le rôle de GP1 sur le recrutement des diverses populations immunitaires dans ces deux modèles pourrait être exploré.

2. Perspectives

2.1. Le RM dans les complications cardiaques de l'IRC

Dans ce travail j'ai montré que le blocage du RM prévient la dysfonction cardiaque induite par l'IRC. Cependant le rôle cellule-spécifique du RM dans les complications cardiovasculaires de l'IRC reste à déterminer. L'implication du RM dans le remodelage et l'inflammation cardiaque a été montrée à partir de modèles d'inactivation génétique du RM dans des cellules spécifiques du système cardiovasculaire telles que : cardiomyocytes, cellules endothéliales et CMLV¹³²⁻¹³⁶. De manière similaire, le rôle du RM exprimé par les cellules myéloïdes¹⁴⁸⁻¹⁵¹ et par les lymphocytes T¹⁵³ a déjà été décrite. Au sein de notre équipe, nous étudions actuellement le rôle RM exprimé par les macrophages dans les complications vasculaires induites par l'IRC.

J'ai également montré que le blocage pharmacologique du RM prévient l'altération de l'expression de protéines intervenant dans la signalisation calcique pouvant être à l'origine de la dysfonction diastolique observée chez les souris en IRC. Notre équipe et d'autres ont également démontré le rôle du RM dans la régulation des canaux ioniques impliqués dans la signalisation calcique dans les cardiomyocytes. En effet, nous avons montré que la surexpression du RM cardiaque induit une augmentation du courant calcique de type L²⁵¹. Plus récemment, il a été montré que l'activation du promoteur P1 par le RM participe à la transcription du canal Ca_v1.2 directement impliqué dans le courant calcique de type L²⁵². La délétion du RM cardiaque prévient l'augmentation de la phosphorylation de CaMKII induit par un excès minéralocorticoïde conduisant à une amélioration de fonction cardiaque³¹⁵.

Présentes chez plus de 2/3 des patients souffrant d'IRC, les complications cardiaques associées à une fraction d'éjection conservée (HFpEF) seraient plus élevées comparées aux patients en IC avec une fraction d'éjection réduite³¹⁶. Dans ce travail, le blocage du RM prévient la dysfonction diastolique induite par l'IRC sans variation de la pression artérielle systolique, mais les souris en IRC présentent également une réduction de la fraction d'éjection prévenue par la finerenone ce qui ne semble pas être un bon modèle pour l'étude de l'HFpEF induite par l'IRC. Cependant, un groupe a montré que l'IRC induite par néphrectomie subtotale induit une HFpEF chez le rat³¹⁷. Chez l'Homme, à partir de la cohorte des patients américains issue de l'essai clinique TOPCAT, une étude recommande l'administration de la spironolactone pour traiter l'HFpEF chez des patients souffrant d'IRC³¹⁸. Bayer a lancé très récemment l'essai clinique FINEARTS-HF afin d'évaluer l'efficacité de la finerenone sur la morbidité et mortalité de 5500 patients atteints d'HFpEF à travers le monde³¹⁹. Cependant, à travers ces différentes études, le mécanisme d'action du blocage du RM dans l'HFpEF n'est pas encore décrit dans la littérature.

2.2. Le RM dans les complications métaboliques de l'IRC

L'IRC est également associée à des perturbations métaboliques telles que : la dyslipidémie et la résistance à l'insuline^{320,321}. Il a également été montré que l'IRC induit une inflammation du tissu adipeux associée à une augmentation du stress oxydatif³²². L'IRC altère le métabolisme lipidique conduisant à une augmentation de la concentration plasmatique de cholestérol chez les patients atteints d'IRC³²³. Ces altérations métaboliques participeraient au

développement et à la progression des complications cardiovasculaires de l'IRC³²³. Dans ce contexte pathologique, le rôle du RM n'est actuellement pas décrit cependant et des résultats de notre équipe en cours de publication montrent que le blocage pharmacologique du RM améliore la fonction métabolique dans un contexte d'IRC.

La dérégulation du microbiote intestinal (dysbiose) joue un important rôle dans de nombreuses pathologies chroniques et son amélioration pourrait être une potentielle cible thérapeutique dans l'IRC. En effet, des souris dépourvues de microbiote intestinale (« *germ free* »), développent des lésions rénales³²⁴. Chez l'Homme, les populations microbiennes sont clairement distinctes entre les patients atteints d'IRC et des patients sains³²⁵. Ce résultat est également observé dans un modèle murin d'IRC induite par néphrectomie subtotale³²⁵. La dysbiose, induite par l'IRC, fait émerger des populations bactériennes qui favoriseraient l'expression de toxines urémiques telles que le TMAO (*triméthylamineN-oxyde*), *p*-cresyl sulfate et indoxyle sulfate. L'augmentation de la concentration plasmatique de ces toxines urémiques est positivement corrélée à l'augmentation des événements cardiovasculaires^{326,327} et avec la progression de l'IRC. Ces toxines urémiques induisent une inflammation gastro-intestinale en augmentant la perméabilité intestinale conduisant à la pénétration des bactéries à travers la paroi intestinale dans un modèle d'IRC³²⁸⁻³³⁰. Une fois dans la circulation systémique, ces toxines urémiques participent à l'inflammation vasculaire, au développement d'une dysfonction endothéliale³³¹ et active le SRAA³³². De plus, l'accumulation de ces toxines urémiques va agir comme une boucle de rétrocontrôle positive³³³. Aujourd'hui le rôle du RM dans la dysbiose n'a pas été décrit. Chez des rats soumis à un régime pauvre en sel associé à une administration continue d'aldostérone, une équipe a montré que l'activation du RM réduit la perméabilité entre les cellules épithéliales situées au niveau des cryptes coloniques en favorisant l'expression de protéines de jonctions cellulaires telles que claudin IV et E-cadherin^{334,335}. Les auteurs montrent également que la sécrétion du facteur de croissance EGF par les myofibroblastes, induit par le traitement à l'aldostérone, conduit à une augmentation de la prolifération de cellules épithéliales coloniques ce qui participerait à la réduction de la perméabilité intestinale³³⁶. Ces études suggèrent que le RM participerait au remodelage de la perméabilité intestinale ce qui pourrait avoir un impact sur le microbiote. Comme pour l'IRC, la dysbiose a

été rapporté dans l'hypertension chez l'Homme et dans des modèles animaux³³⁷ suggérant que l'étude du rôle du RM dans l'axe IRC-dysbiose-hypertension est nécessaire.

2.3. Rôle de NGAL produit par d'autres cellules impliquées dans le développement de lésions rénales et les complications associées à l'IRC

Dans ce travail j'ai évalué le rôle de NGAL exprimé par les cellules myéloïdes dans les lésions rénales induites par l'excès minéralocorticoïde. Des approches complémentaires pourraient être envisagées pour étudier le rôle proinflammatoire/fibrotique de NGAL produit par les cellules myéloïdes : 1) l'irradiation de souris KO NGAL total transplantées avec de la moelle osseuse issue de souris WT (les résultats initiaux déjà obtenus confortent nos résultats sur le KO global); 2) l'utilisation de souris KO NGAL dans les cellules myéloïdes qui pourraient confirmer les résultats déjà obtenus (modèle en cours d'étude au laboratoire). De plus, il pourrait être intéressant d'évaluer le rôle de NGAL exprimé par d'autres cellules (cellules endothéliales, cellules tubulaires épithéliales, fibroblastes rénaux) pouvant être également impliquées dans le développement des dommages rénaux dans l'IRC. En effet la dysfonction endothéliale induit une réduction de l'apport en oxygène au tissu rénal conduisant à l'inflammation et au développement de fibrose rénale^{338,339} et la transition endothéliale/mésenchymateuse est un processus contribuant directement à la mise en place de la fibrose interstitielle et aux dommages rénaux chroniques³⁴⁰. Les cellules épithéliales tubulaires (CET) sont les cellules les plus exposées aux lésions rénales. Les CET produisent une large variété de cytokines proinflammatoires (IL6, IL1 β et TNF α) permettant le recrutement de cellules immunitaires telles que les macrophages^{341,342}. Comme pour les cellules endothéliales, les CET sont soumises à une transition épithéliale/mésenchymateuse participant au développement des lésions rénales³⁴³. L'utilisation de modèle de délétion génétique spécifique à ces cellules permettrait d'étudier l'implication de NGAL exprimé par ces deux types cellulaires afin de déterminer son rôle spécifique dans le développement des lésions rénales induites par l'IRC.

Nous avons également vu au cours de ce travail que le co-traitement de macrophages péritonéaux par l'aldostérone et le sel confère aux macrophages issus de souris WT un phénotype M1 sécrétant des cytokines proinflammatoires alors que les KO NGAL se polarisent en M2 (données préliminaires). Nous aurions pu analyser le sécrétome des macrophages WT

et KO NGAL traitées et utiliser les surnageants pour traiter des fibroblastes rénaux afin d'évaluer le pouvoir activateur potentiel des cytokines spécifiquement libérées par les macrophages dans ces conditions. En traitant des fibroblastes issus de souris WT et KO NGAL par une cytokine profibrotique telle que l'IL4, nous pourrions évaluer le rôle du NGAL produit par les fibroblastes sur l'activation de ces cellules et sur la sécrétion de protéines participant au remodelage matriciel.

L'expression de NGAL est altérée chez des patients souffrant de troubles métaboliques comme l'obésité^{344,345}. Alors que la concentration plasmatique de NGAL est augmentée chez les patients souffrant de syndromes métaboliques, la corrélation entre la concentration plasmatique de NGAL et les complications métaboliques n'est pas significative³⁴⁴. Il a été montré que des adipocytes traités par des cytokines proinflammatoires telles que IFN γ et TNF α conduit à une augmentation d'expression de NGAL^{192,346}. Cependant le rôle spécifique de NGAL dans les pathologies métaboliques est sujet à controverse : dans une étude, des souris KO NGAL soumises à un régime riche en graisse montre une augmentation du poids corporel, de la dyslipidémie et de la résistance à l'insuline³⁴⁷ alors que dans une seconde étude, la délétion de NGAL réduit la résistance à l'insuline et l'inflammation dans le tissu adipeux³⁴⁸. L'implication de NGAL dans les complications métaboliques induites par l'IRC est actuellement à l'étude dans notre équipe.

2.4. NGAL comme cible thérapeutique prometteuse dans diverses pathologies

Les récepteurs de NGAL (24p3R et megalin) sont exprimés par de nombreux types cellulaires tels que : cellules immunitaires (macrophages, neutrophiles), cellules épithéliales pulmonaires, intestinales et rénales, cellules vasculaires, cardiomyocytes et cellules du système nerveux central (astrocytes, cellules microgliales et neurones).

L'utilisation de modèles animaux génétiquement modifiés présentant une délétion du gène codant pour NGAL montrent un effet protecteur de l'inhibition de NGAL dans des modèles d'IC et d'IRC^{197,207,216}. Dès lors, NGAL représente une cible thérapeutique potentielle afin de limiter les lésions cardio-rénales dans ces modèles. Dans ce travail collaboratif, nous avons montré que le composé GP1 est capable d'inhiber directement les effets délétères de NGAL *in vitro* et dans deux modèles *in vivo*. Cependant l'étude du mécanisme d'action de l'inhibition de NGAL par le GP1 reste à définir. Des études pharmacocinétiques et pharmacodynamiques

seraient nécessaires afin de compléter la caractérisation du composé GP1. L'inhibition de NGAL par le GP1 devrait également être testée dans des modèles de pathologies métaboliques et de cancer (cancer de sein et de la prostate) où l'effet bénéfique de l'inactivation ou de la neutralisation de NGAL a été déjà montré^{312,313}.

3. Conclusion

Le RM est identifié comme une cible thérapeutique pour traiter l'IC. Nos résultats suggèrent que le blocage du RM pourrait être également utilisé afin de limiter les complications cardiovasculaires induites par l'IRC. Les résultats de l'essai clinique FIGARO-DKD, évaluant les effets de la finerenone sur la morbidité et la mortalité d'origine cardiovasculaire chez des patients souffrant d'IRC lié au diabète, devraient être publiés sous peu. L'étude FIDELIO présente des résultats significatifs positifs sur le critère composite principal rénal, ainsi que sur le critère composite secondaire principal cardiovasculaire.

Ce travail de thèse a été également focalisé sur le mécanisme d'action du rôle délétère de NGAL produit par les cellules myéloïdes dans le développement des lésions rénales induites par un excès minéralocorticoïde. Ces résultats renforcent l'idée que NGAL représente une cible thérapeutique potentielle afin de limiter les lésions rénales et extrarénales dans le contexte de l'IRC. La dernière partie de ce travail nous a permis d'identifier une molécule inhibitrice des effets délétères de NGAL, dans deux modèles *in vivo* et *in vitro*, qui devrait être testée dans d'autres modèles pathologiques.

REFERENCES

1. Funder JW, Feldman D, Edelman IS. Specific aldosterone binding in rat kidney and parotid. *Journal of Steroid Biochemistry*. 1972; 3:209-218. <[https://doi.org/10.1016/0022-4731\(72\)90052-0](https://doi.org/10.1016/0022-4731(72)90052-0)>.
2. Rousseau G, Baxter JD, Funder JW, Edelman IS, Tomkins GM. Glucocorticoid and mineralocorticoid receptors for aldosterone. *Journal of Steroid Biochemistry*. 1972; 3:219-227. <[https://doi.org/10.1016/0022-4731\(72\)90053-2](https://doi.org/10.1016/0022-4731(72)90053-2)>.
3. Evans RM. The steroid and thyroid hormone receptor superfamily. *Science*. 1988; 240:889-895. <<https://doi.org/10.1126/science.3283939>>.
4. MORRISON N, NICKSON DA, MCBRIDE MW, MUELLER UW, BOYD E, SUTCLIFFE RG. Regional chromosomal assignment of human 3-beta-hydroxy-5-ene steroid dehydrogenase to 1p13.1 by non-isotopic in situ hybridisation. *Hum genet*. 1991; 87:223-225.
5. Arriza JL, Weinberger C, Cerelli G, Glaser TM, Handelin BL, Housman DE, Evans RM. Cloning of human mineralocorticoid receptor complementary DNA: Structural and functional kinship with the glucocorticoid receptor. *Science*. 1987; 237:268-275.
6. Zennaro M-C, Keightley M-C, Kotelevtsev Y, Conway GS, Soubrier F, Fuller PJ. Human Mineralocorticoid Receptor Genomic Structure and Identification of Expressed Isoforms. *J Biol Chem*. 1995; 270:21016-21020. <<https://doi.org/10.1074/jbc.270.36.21016>>.
7. Fuse H, Kitagawa H, Kato S. Characterization of transactivational property and coactivator mediation of rat mineralocorticoid receptor activation function-1 (AF-1). *Mol Endocrinol*. 2000; 14:889-899. <<https://doi.org/10.1210/mend.14.6.0467>>.
8. Tallec LP-L, Kirsh O, Lecomte M-C, Viengchareun S, Zennaro M-C, Dejean A, Lombès M. Protein inhibitor of activated signal transducer and activator of transcription 1 interacts with the N-terminal domain of mineralocorticoid receptor and represses its transcriptional activity: implication of small ubiquitin-related modifier 1 modification. *Mol Endocrinol*. 2003; 17:2529-2542. <<https://doi.org/10.1210/me.2003-0299>>.
9. Pascual-Le Tallec L, Lombès M. The mineralocorticoid receptor: a journey exploring its diversity and specificity of action. *Mol Endocrinol*. 2005; 19:2211-2221. <<https://doi.org/10.1210/me.2005-0089>>.
10. Faresse N, Ruffieux-Daidie D, Salamin M, Gomez-Sanchez CE, Staub O. Mineralocorticoid receptor degradation is promoted by Hsp90 inhibition and the ubiquitin-protein ligase CHIP. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2010; 299:F1462-1472. <<https://doi.org/10.1152/ajprenal.00285.2010>>.
11. Darimont BD, Wagner RL, Apriletti JW, Stallcup MR, Kushner PJ, Baxter JD, Fletterick RJ, Yamamoto KR. Structure and specificity of nuclear receptor-coactivator interactions. *Genes Dev*. 1998; 12:3343-3356. <<https://doi.org/10.1101/gad.12.21.3343>>.
12. Heery DM, Kalkhoven E, Hoare S, Parker MG. A signature motif in transcriptional co-activators mediates binding to nuclear receptors. *Nature*. 1997; 387:733-736. <<https://doi.org/10.1038/42750>>.
13. Viengchareun S, Le Menuet D, Martinerie L, Munier M, Pascual-Le Tallec L, Lombès M. The mineralocorticoid receptor: insights into its molecular and (patho)physiological biology. *Nucl Recept Signal*. 2007; 5:e012. <<https://doi.org/10.1621/nrs.05012>>.
14. Farman N, Rafestin-Oblin M-E. Multiple aspects of mineralocorticoid selectivity. *American Journal of Physiology-Renal Physiology*. 2001; 280:F181-F192. <<https://doi.org/10.1152/ajprenal.2001.280.2.F181>>.
15. White PC, Mune T, Agarwal AK. 11 beta-Hydroxysteroid dehydrogenase and the syndrome of apparent mineralocorticoid excess. *Endocr Rev*. 1997; 18:135-156.

<<https://doi.org/10.1210/edrv.18.1.0288>>.

16. Funder JW, Pearce PT, Smith R, Smith AI. Mineralocorticoid Action: Target Tissue Specificity is Enzyme, not Receptor, Mediated. *Science*. 1988; 242:583-585.
17. Bocchi B, Fagart J, Cluzeaud F, Fay M, Rafestin-Oblin M-E, Farman N. Glucocorticoid metabolism by 11- β hydroxysteroid dehydrogenase type 2 modulates human mineralocorticoid receptor transactivation activity. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology*. 2003; 84:239-44. <[https://doi.org/10.1016/S0960-0760\(03\)00036-0](https://doi.org/10.1016/S0960-0760(03)00036-0)>.
18. Rebuffat A, Tam S, Nawrocki A, Baker M, Frey B, Frey F, Odermatt A. The 11-ketosteroid 11-ketodexamethasone is a glucocorticoid receptor agonist. *Molecular and cellular endocrinology*. 2004; 214:27-37. <<https://doi.org/10.1016/j.mce.2003.11.027>>.
19. Funder JW, Feldman D, Edelman IS. The roles of plasma binding and receptor specificity in the mineralocorticoid action of aldosterone. *Endocrinology*. 1973; 92:994-1004. <<https://doi.org/10.1210/endo-92-4-994>>.
20. Sorensen MV, Praetorius HA, Nykjaer A, Willnow T, Leipziger J. Impaired aldosterone responsiveness in corticosteroid binding globulin deficient mice. *Acta Physiol (Oxf)*. 2011; 201:169-177. <<https://doi.org/10.1111/j.1748-1716.2010.02208.x>>.
21. Lombes M, Kenouch S, Souque A, Farman N, Rafestin-Oblin ME. The mineralocorticoid receptor discriminates aldosterone from glucocorticoids independently of the 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase. *Endocrinology*. 1994; 135:834-840. <<https://doi.org/10.1210/endo.135.3.8070376>>.
22. Trapp T, Holsboer F. Heterodimerization between mineralocorticoid and glucocorticoid receptors increases the functional diversity of corticosteroid action. *Trends Pharmacol Sci*. 1996; 17:145-149. <[https://doi.org/10.1016/0165-6147\(96\)81590-2](https://doi.org/10.1016/0165-6147(96)81590-2)>.
23. Shibata S, Nagase M, Yoshida S, Kawarazaki W, Kurihara H, Tanaka H, Miyoshi J, Takai Y, Fujita T. Modification of mineralocorticoid receptor function by Rac1 GTPase: implication in proteinuric kidney disease. *Nat Med*. 2008; 14:1370-1376. <<https://doi.org/10.1038/nm.1879>>.
24. Uddin S, Lekmine F, Sharma N, Majchrzak B, Mayer I, Young PR, Bokoch GM, Fish EN, Platanias LC. The Rac1/p38 mitogen-activated protein kinase pathway is required for interferon alpha-dependent transcriptional activation but not serine phosphorylation of Stat proteins. *J Biol Chem*. 2000; 275:27634-27640. <<https://doi.org/10.1074/jbc.M003170200>>.
25. Shibata S, Mu S, Kawarazaki H, Muraoka K, Ishizawa K, Yoshida S, Kawarazaki W, Takeuchi M, Ayuzawa N, Miyoshi J, Takai Y, Ishikawa A, Shimosawa T, Ando K, Nagase M, Fujita T. Rac1 GTPase in rodent kidneys is essential for salt-sensitive hypertension via a mineralocorticoid receptor-dependent pathway. *J Clin Invest*. 2011; 121:3233-3243. <<https://doi.org/10.1172/JCI43124>>.
26. Nagase M, Ayuzawa N, Kawarazaki W, Ishizawa K, Ueda K, Yoshida S, Fujita T. Oxidative stress causes mineralocorticoid receptor activation in rat cardiomyocytes: role of small GTPase Rac1. *Hypertension*. 2012; 59:500-506. <<https://doi.org/10.1161/HYPERTENSIONAHA.111.185520>>.
27. Aikawa R, Komuro I, Yamazaki T, Zou Y, Kudoh S, Zhu W, Kadowaki T, Yazaki Y. Rho family small G proteins play critical roles in mechanical stress-induced hypertrophic responses in cardiac myocytes. *Circ Res*. 1999; 84:458-466. <<https://doi.org/10.1161/01.res.84.4.458>>.
28. Ayuzawa N, Nagase M, Ueda K, Nishimoto M, Kawarazaki W, Marumo T, Aiba A, Sakurai T, Shindo T, Fujita T. Rac1-Mediated Activation of Mineralocorticoid Receptor in Pressure Overload-Induced Cardiac Injury. *Hypertension*. 2016; 67:99-106.

<<https://doi.org/10.1161/HYPERTENSIONAHA.115.06054>>.

29. Barrera-Chimal J, André-Grégoire G, Nguyen Dinh Cat A, Lechner SM, Cau J, Prince S, Kolkhof P, Loirand G, Sauzeau V, Hauet T, Jaisser F. Benefit of Mineralocorticoid Receptor Antagonism in AKI: Role of Vascular Smooth Muscle Rac1. *J Am Soc Nephrol*. 2017; 28:1216-1226. <<https://doi.org/10.1681/ASN.2016040477>>.
30. Binart N, Lombès M, Baulieu EE. Distinct functions of the 90 kDa heat-shock protein (hsp90) in oestrogen and mineralocorticosteroid receptor activity: effects of hsp90 deletion mutants. *Biochem J*. 1995; 311 (Pt 3):797-804. <<https://doi.org/10.1042/bj3110797>>.
31. Huyet J, Pinon GM, Fay MR, Rafestin-Oblin M-E, Fagart J. Structural determinants of ligand binding to the mineralocorticoid receptor. *Mol Cell Endocrinol*. 2012; 350:187-195. <<https://doi.org/10.1016/j.mce.2011.07.035>>.
32. Pratt WB, Toft DO. Steroid receptor interactions with heat shock protein and immunophilin chaperones. *Endocr Rev*. 1997; 18:306-360. <<https://doi.org/10.1210/edrv.18.3.0303>>.
33. Galigniana MD, Echeverría PC, Erlejman AG, Piwien-Pilipuk G. Role of molecular chaperones and TPR-domain proteins in the cytoplasmic transport of steroid receptors and their passage through the nuclear pore. *Nucleus*. 2010; 1:299-308. <<https://doi.org/10.4161/nucl.1.4.11743>>.
34. Galigniana MD, Erlejman AG, Monte M, Gomez-Sanchez C, Piwien-Pilipuk G. The hsp90-FKBP52 complex links the mineralocorticoid receptor to motor proteins and persists bound to the receptor in early nuclear events. *Mol Cell Biol*. 2010; 30:1285-1298. <<https://doi.org/10.1128/MCB.01190-09>>.
35. Hultman ML, Krasnoperova NV, Li S, Du S, Xia C, Dietz JD, Lala DS, Welsch DJ, Hu X. The ligand-dependent interaction of mineralocorticoid receptor with coactivator and corepressor peptides suggests multiple activation mechanisms. *Mol Endocrinol*. 2005; 19:1460-1473. <<https://doi.org/10.1210/me.2004-0537>>.
36. Meijer OC, Kalkhoven E, van der Laan S, Steenbergen PJ, Houtman SH, Dijkmans TF, Pearce D, de Kloet ER. Steroid receptor coactivator-1 splice variants differentially affect corticosteroid receptor signaling. *Endocrinology*. 2005; 146:1438-1448. <<https://doi.org/10.1210/en.2004-0411>>.
37. Wang Q, Anzick S, Richter WF, Meltzer P, Simons SS. Modulation of transcriptional sensitivity of mineralocorticoid and estrogen receptors. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 2004; 91:197-210. <<https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2004.04.007>>.
38. Zennaro MC, Souque A, Viengchareun S, Poisson E, Lombès M. A new human MR splice variant is a ligand-independent transactivator modulating corticosteroid action. *Mol Endocrinol*. 2001; 15:1586-1598. <<https://doi.org/10.1210/mend.15.9.0689>>.
39. Griekspoor A, Zwart W, Neefjes J, Michalides R. Visualizing the action of steroid hormone receptors in living cells. *Nucl Recept Signal*. 2007; 5:e003. <<https://doi.org/10.1621/nrs.05003>>.
40. Rogerson FM, Fuller PJ. Interdomain interactions in the mineralocorticoid receptor. *Mol Cell Endocrinol*. 2003; 200:45-55. <[https://doi.org/10.1016/s0303-7207\(02\)00413-6](https://doi.org/10.1016/s0303-7207(02)00413-6)>.
41. Yang J, Fuller PJ. Interactions of the mineralocorticoid receptor--within and without. *Mol Cell Endocrinol*. 2012; 350:196-205. <<https://doi.org/10.1016/j.mce.2011.07.001>>.
42. Barger AC, Berlin RD, Tulenko JF. Infusion of aldosterone, 9-alpha-fluorohydrocortisone and antidiuretic hormone into the renal artery of normal and adrenalectomized, unanesthetized dogs: effect on electrolyte and water excretion. *Endocrinology*. 1958; 62:804-815. <<https://doi.org/10.1210/endo-62-6-804>>.

43. Bartter FC. The role of aldosterone in normal homeostasis and in certain disease states. *Metab Clin Exp*. 1956; 5:369-383.
44. Câmpean V, Kricke J, Ellison D, Luft FC, Bachmann S. Localization of thiazide-sensitive Na⁺-Cl⁻ cotransport and associated gene products in mouse DCT. *American Journal of Physiology-Renal Physiology*. 2001; 281:F1028-F1035. <<https://doi.org/10.1152/ajprenal.0148.2001>>.
45. Kim GH, Masilamani S, Turner R, Mitchell C, Wade JB, Knepper MA. The thiazide-sensitive Na-Cl cotransporter is an aldosterone-induced protein. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1998; 95:14552-14557. <<https://doi.org/10.1073/pnas.95.24.14552>>.
46. Velázquez H, Bartiss A, Bernstein P, Ellison DH. Adrenal steroids stimulate thiazide-sensitive NaCl transport by rat renal distal tubules. *Am J Physiol*. 1996; 270:F211-219. <<https://doi.org/10.1152/ajprenal.1996.270.1.F211>>.
47. Argaiz ER, Chavez-Canales M, Ostrosky-Frid M, Rodríguez-Gama A, Vázquez N, Gonzalez-Rodríguez X, Garcia-Valdes J, Hadchouel J, Ellison D, Gamba G. Kidney-specific WNK1 isoform (KS-WNK1) is a potent activator of WNK4 and NCC. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2018; 315:F734-F745. <<https://doi.org/10.1152/ajprenal.00145.2018>>.
48. Argaiz ER, Gamba G. The regulation of Na⁺Cl⁻ cotransporter by with-no-lysine kinase 4. *Curr Opin Nephrol Hypertens*. 2016; 25:417-423. <<https://doi.org/10.1097/MNH.0000000000000247>>.
49. Bazúa-Valenti S, Chávez-Canales M, Rojas-Vega L, González-Rodríguez X, Vázquez N, Rodríguez-Gama A, Argaiz ER, Melo Z, Plata C, Ellison DH, García-Valdés J, Hadchouel J, Gamba G. The Effect of WNK4 on the Na⁺-Cl⁻ Cotransporter Is Modulated by Intracellular Chloride. *J Am Soc Nephrol*. 2015; 26:1781-1786. <<https://doi.org/10.1681/ASN.2014050470>>.
50. Shibata S. 30 YEARS OF THE MINERALOCORTICOID RECEPTOR: Mineralocorticoid receptor and NaCl transport mechanisms in the renal distal nephron. *Journal of Endocrinology*. 2017; 234:T35-T47. <<https://doi.org/10.1530/JOE-16-0669>>.
51. Roy A, Al-Qusairi L, Donnelly BF, Ronzaud C, Marciszyn AL, Gong F, Chang YPC, Butterworth MB, Pastor-Soler NM, Hallows KR, Staub O, Subramanya AR. Alternatively spliced proline-rich cassettes link WNK1 to aldosterone action. *J Clin Invest*. 2015; 125:3433-3448. <<https://doi.org/10.1172/JCI75245>>.
52. Pearce D, Soundararajan R, Trimpert C, Kashlan OB, Deen PMT, Kohan DE. Collecting Duct Principal Cell Transport Processes and Their Regulation. *CJASN*. 2015; 10:135-146. <<https://doi.org/10.2215/CJN.05760513>>.
53. Canessa CM, Schild L, Buell G, Thorens B, Gautschi I, Horisberger JD, Rossier BC. Amiloride-sensitive epithelial Na⁺ channel is made of three homologous subunits. *Nature*. 1994; 367:463-467. <<https://doi.org/10.1038/367463a0>>.
54. Rossier BC, Pradervand S, Schild L, Hummler E. Epithelial sodium channel and the control of sodium balance: interaction between genetic and environmental factors. *Annu Rev Physiol*. 2002; 64:877-897. <<https://doi.org/10.1146/annurev.physiol.64.082101.143243>>.
55. Horisberger JD, Jaunin P, Good PJ, Rossier BC, Geering K. Coexpression of alpha 1 with putative beta 3 subunits results in functional Na⁺/K⁺ pumps in *Xenopus* oocytes. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1991; 88:8397-8400. <<https://doi.org/10.1073/pnas.88.19.8397>>.
56. Bhargava A, Fullerton MJ, Myles K, Purdy TM, Funder JW, Pearce D, Cole TJ. The serum- and glucocorticoid-induced kinase is a physiological mediator of aldosterone action. *Endocrinology*. 2001; 142:1587-1594. <<https://doi.org/10.1210/endo.142.4.8095>>.

57. Chen SY, Bhargava A, Mastroberardino L, Meijer OC, Wang J, Buse P, Firestone GL, Verrey F, Pearce D. Epithelial sodium channel regulated by aldosterone-induced protein sgk. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1999; 96:2514-2519. <<https://doi.org/10.1073/pnas.96.5.2514>>.
58. Debonneville C, Flores SY, Kamynina E, Plant PJ, Tauxe C, Thomas MA, Münster C, Chraïbi A, Pratt JH, Horisberger JD, Pearce D, Loffing J, Staub O. Phosphorylation of Nedd4-2 by Sgk1 regulates epithelial Na(+) channel cell surface expression. *EMBO J*. 2001; 20:7052-7059. <<https://doi.org/10.1093/emboj/20.24.7052>>.
59. Náray-Fejes-Tóth A, Canessa C, Cleaveland ES, Aldrich G, Fejes-Tóth G. sgk is an aldosterone-induced kinase in the renal collecting duct. Effects on epithelial na+ channels. *J Biol Chem*. 1999; 274:16973-16978. <<https://doi.org/10.1074/jbc.274.24.16973>>.
60. Soundararajan R, Zhang TT, Wang J, Vandewalle A, Pearce D. A novel role for glucocorticoid-induced leucine zipper protein in epithelial sodium channel-mediated sodium transport. *J Biol Chem*. 2005; 280:39970-39981. <<https://doi.org/10.1074/jbc.M508658200>>.
61. Soundararajan R, Wang J, Melters D, Pearce D. Glucocorticoid-induced Leucine zipper 1 stimulates the epithelial sodium channel by regulating serum- and glucocorticoid-induced kinase 1 stability and subcellular localization. *J Biol Chem*. 2010; 285:39905-39913. <<https://doi.org/10.1074/jbc.M110.161133>>.
62. Wadei HM, Textor SC. The role of the kidney in regulating arterial blood pressure. *Nat Rev Nephrol*. 2012; 8:602-609. <<https://doi.org/10.1038/nrneph.2012.191>>.
63. Royaux IE, Wall SM, Karniski LP, Everett LA, Suzuki K, Knepper MA, Green ED. Pendrin, encoded by the Pendred syndrome gene, resides in the apical region of renal intercalated cells and mediates bicarbonate secretion. *PNAS*. 2001; 98:4221-4226. <<https://doi.org/10.1073/pnas.071516798>>.
64. Wall Susan M., Kim Young Hee, Stanley Lorraine, Glapion Dawn M., Everett Lorraine A., Green Eric D., Verlander Jill W. NaCl Restriction Upregulates Renal Slc26a4 Through Subcellular Redistribution. *Hypertension*. 2004; 44:982-987. <<https://doi.org/10.1161/01.HYP.0000145863.96091.89>>.
65. Ackermann D, Gresko N, Carrel M, Loffing-Cueni D, Habermehl D, Gomez-Sanchez C, Rossier BC, Loffing J. In vivo nuclear translocation of mineralocorticoid and glucocorticoid receptors in rat kidney: differential effect of corticosteroids along the distal tubule. *American Journal of Physiology-Renal Physiology*. 2010; 299:F1473-F1485. <<https://doi.org/10.1152/ajprenal.00437.2010>>.
66. Izumi Y, Hori K, Nakayama Y, Kimura M, Hasuie Y, Nanami M, Kohda Y, Otaki Y, Kuragano T, Obinata M, Kawahara K, Tanoue A, Tomita K, Nakanishi T, Nonoguchi H. Aldosterone Requires Vasopressin V1a Receptors on Intercalated Cells to Mediate Acid-Base Homeostasis. *JASN*. 2011; 22:673-680. <<https://doi.org/10.1681/ASN.2010050468>>.
67. Verlander Jill W., Hassell Kathryn A., Royaux Ines E., Glapion Dawn M., Wang Mou-Er, Everett Lorraine A., Green Eric D., Wall Susan M. Deoxycorticosterone Upregulates PDS (Slc26a4) in Mouse Kidney. *Hypertension*. 2003; 42:356-362. <<https://doi.org/10.1161/01.HYP.0000088321.67254.B7>>.
68. Shibata S, Rinehart J, Zhang J, Moeckel G, Castañeda-Bueno M, Stiegler AL, Boggon TJ, Gamba G, Lifton RP. Mineralocorticoid receptor phosphorylation regulates ligand binding and renal response to volume depletion and hyperkalemia. *Cell Metab*. 2013; 18:660-671. <<https://doi.org/10.1016/j.cmet.2013.10.005>>.
69. Ortlund EA, Bridgham JT, Redinbo MR, Thornton JW. Crystal Structure of an Ancient Protein: Evolution by Conformational Epistasis. *Science*. 2007; 317:1544-1548. <<https://doi.org/10.1126/science.1142819>>.

70. Ayuzawa N, Nishimoto M, Ueda K, Hirohama D, Kawarazaki W, Shimosawa T, Marumo T, Fujita T. Two Mineralocorticoid Receptor–Mediated Mechanisms of Pendrin Activation in Distal Nephrons. *JASN*. 2020; 31:748-764. <<https://doi.org/10.1681/ASN.2019080804>>.
71. Wehling M, Käsmayr J, Theisen K. Rapid effects of mineralocorticoids on sodium-proton exchanger: genomic or nongenomic pathway? *Am J Physiol*. 1991; 260:E719-726. <<https://doi.org/10.1152/ajpendo.1991.260.5.E719>>.
72. Wehling M, Eisen C, Aktas J, Christ M, Theisen K. Photoaffinity labeling of plasma membrane receptors for aldosterone from human mononuclear leukocytes. *Biochem Biophys Res Commun*. 1992; 189:1424-1428. <[https://doi.org/10.1016/0006-291x\(92\)90233-b](https://doi.org/10.1016/0006-291x(92)90233-b)>.
73. Christ M, Sippel K, Eisen C, Wehling M. Non-classical receptors for aldosterone in plasma membranes from pig kidneys. *Mol Cell Endocrinol*. 1994; 99:R31-34. <[https://doi.org/10.1016/0303-7207\(94\)90027-2](https://doi.org/10.1016/0303-7207(94)90027-2)>.
74. Gekle M, Freudinger R, Mildenerger S, Schenk K, Marschitz I, Schramek H. Rapid activation of Na⁺/H⁺-exchange in MDCK cells by aldosterone involves MAP-kinase ERK1/2. *Pflugers Arch*. 2001; 441:781-786. <<https://doi.org/10.1007/s004240000507>>.
75. Alzamora R, Brown LR, Harvey BJ. Direct binding and activation of protein kinase C isoforms by aldosterone and 17beta-estradiol. *Mol Endocrinol*. 2007; 21:2637-2650. <<https://doi.org/10.1210/me.2006-0559>>.
76. Hayashi H, Kobara M, Abe M, Tanaka N, Gouda E, Toba H, Yamada H, Tatsumi T, Nakata T, Matsubara H. Aldosterone nongenomically produces NADPH oxidase-dependent reactive oxygen species and induces myocyte apoptosis. *Hypertens Res*. 2008; 31:363-375. <<https://doi.org/10.1291/hypres.31.363>>.
77. Grossmann C, Benesic A, Krug AW, Freudinger R, Mildenerger S, Gassner B, Gekle M. Human mineralocorticoid receptor expression renders cells responsive for nongenotropic aldosterone actions. *Mol Endocrinol*. 2005; 19:1697-1710. <<https://doi.org/10.1210/me.2004-0469>>.
78. Wehling M, Bauer MM, Ulsenheimer A, Schneider M, Neylon CB, Christ M. Nongenomic effects of aldosterone on intracellular pH in vascular smooth muscle cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 1996; 223:181-186. <<https://doi.org/10.1006/bbrc.1996.0866>>.
79. Liu SL, Schmuck S, Chorazczyewski JZ, Gros R, Feldman RD. Aldosterone regulates vascular reactivity: short-term effects mediated by phosphatidylinositol 3-kinase-dependent nitric oxide synthase activation. *Circulation*. 2003; 108:2400-2406. <<https://doi.org/10.1161/01.CIR.0000093188.53554.44>>.
80. Callera GE, Touyz RM, Tostes RC, Yogi A, He Y, Malkinson S, Schiffrin EL. Aldosterone activates vascular p38MAP kinase and NADPH oxidase via c-Src. *Hypertension*. 2005; 45:773-779. <<https://doi.org/10.1161/01.HYP.0000154365.30593.d3>>.
81. McEneaney V, Dooley R, Harvey BJ, Thomas W. Protein kinase D stabilizes aldosterone-induced ERK1/2 MAP kinase activation in M1 renal cortical collecting duct cells to promote cell proliferation. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 2010; 118:18-28. <<https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2009.09.014>>.
82. Ashton AW, Le TYL, Gomez-Sanchez CE, Morel-Kopp M-C, McWhinney B, Hudson A, Mihailidou AS. Role of Nongenomic Signaling Pathways Activated by Aldosterone During Cardiac Reperfusion Injury. *Mol Endocrinol*. 2015; 29:1144-1155. <<https://doi.org/10.1210/ME.2014-1410>>.

83. Grossmann C, Husse B, Mildenerger S, Schreier B, Schuman K, Gekle M. Colocalization of mineralocorticoid and EGF receptor at the plasma membrane. *Biochim Biophys Acta*. 2010; 1803:584-590. <<https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2010.02.008>>.
84. Callera GE, Yogi A, Briones AM, Montezano ACI, He Y, Tostes RCA, Schiffrin EL, Touyz RM. Vascular proinflammatory responses by aldosterone are mediated via c-Src trafficking to cholesterol-rich microdomains: role of PDGFR. *Cardiovasc Res*. 2011; 91:720-731. <<https://doi.org/10.1093/cvr/cvr131>>.
85. Gros R, Ding Q, Davis M, Shaikh R, Liu B, Chorazyczewski J, Pickering JG, Feldman RD. Delineating the receptor mechanisms underlying the rapid vascular contractile effects of aldosterone and estradiol. *Can J Physiol Pharmacol*. 2011; 89:655-663. <<https://doi.org/10.1139/y11-062>>.
86. Gros R, Ding Q, Liu B, Chorazyczewski J, Feldman RD. Aldosterone mediates its rapid effects in vascular endothelial cells through GPER activation. *Am J Physiol, Cell Physiol*. 2013; 304:C532-540. <<https://doi.org/10.1152/ajpcell.00203.2012>>.
87. Gros R, Ding Q, Sklar LA, Prossnitz EE, Arterburn JB, Chorazyczewski J, Feldman RD. GPR30 expression is required for the mineralocorticoid receptor-independent rapid vascular effects of aldosterone. *Hypertension*. 2011; 57:442-451. <<https://doi.org/10.1161/HYPERTENSIONAHA.110.161653>>.
88. Wolf RL, Mendlowitz M, Roboz J, Styan GP, Kornfeld P, Weigl A. Treatment of hypertension with spironolactone. Double-blind study. *JAMA*. 1966; 198:1143-1149.
89. Couette B, Lombes M, Baulieu EE, Rafestin-Oblin ME. Aldosterone antagonists destabilize the mineralocorticosteroid receptor. *Biochem J*. 1992; 282 (Pt 3):697-702. <<https://doi.org/10.1042/bj2820697>>.
90. Fagart J, Wurtz JM, Souque A, Hellal-Levy C, Moras D, Rafestin-Oblin ME. Antagonism in the human mineralocorticoid receptor. *EMBO J*. 1998; 17:3317-3325. <<https://doi.org/10.1093/emboj/17.12.3317>>.
91. Greenblatt DJ, Koch-Weser J. Adverse reactions to spironolactone. A report from the Boston Collaborative Drug Surveillance Program. *JAMA*. 1973; 225:40-43. <<https://doi.org/10.1001/jama.225.1.40>>.
92. de Gasparo M, Joss U, Ramjoué HP, Whitebread SE, Haenni H, Schenkel L, Kraehenbuehl C, Biollaz M, Grob J, Schmidlin J. Three new epoxy-spirolactone derivatives: characterization in vivo and in vitro. *J Pharmacol Exp Ther*. 1987; 240:650-656.
93. Rogerson FM, Yao Y, Smith BJ, Fuller PJ. Differences in the determinants of eplerenone, spironolactone and aldosterone binding to the mineralocorticoid receptor. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 2004; 31:704-709. <<https://doi.org/10.1111/j.1440-1681.2004.04079.x>>.
94. Hu X, Li S, McMahon EG, Lala DS, Rudolph AE. Molecular mechanisms of mineralocorticoid receptor antagonism by eplerenone. *Mini Rev Med Chem*. 2005; 5:709-718. <<https://doi.org/10.2174/1389557054553811>>.
95. Karim A. Spironolactone: disposition, metabolism, pharmacodynamics, and bioavailability. *Drug Metab Rev*. 1978; 8:151-188. <<https://doi.org/10.3109/03602537808993782>>.
96. Garthwaite SM, McMahon EG. The evolution of aldosterone antagonists. *Mol Cell Endocrinol*. 2004; 217:27-31. <<https://doi.org/10.1016/j.mce.2003.10.005>>.
97. Cook CS, Berry LM, Bible RH, Hribar JD, Hajdu E, Liu NW. Pharmacokinetics and metabolism of [14C]eplerenone after oral administration to humans. *Drug Metab Dispos*. 2003; 31:1448-1455. <<https://doi.org/10.1124/dmd.31.11.1448>>.

98. Rossignol P, Dobre D, McMurray JJV, Swedberg K, Krum H, van Veldhuisen DJ, Shi H, Messig M, Vincent J, Girerd N, Bakris G, Pitt B, Zannad F. Incidence, determinants, and prognostic significance of hyperkalemia and worsening renal function in patients with heart failure receiving the mineralocorticoid receptor antagonist eplerenone or placebo in addition to optimal medical therapy: results from the Eplerenone in Mild Patients Hospitalization and Survival Study in Heart Failure (EMPHASIS-HF). *Circ Heart Fail.* 2014; 7:51-58. <<https://doi.org/10.1161/CIRCHEARTFAILURE.113.000792>>.
99. Vardeny O, Claggett B, Anand I, Rossignol P, Desai AS, Zannad F, Pitt B, Solomon SD, Randomized Aldactone Evaluation Study (RALES) Investigators. Incidence, predictors, and outcomes related to hypo- and hyperkalemia in patients with severe heart failure treated with a mineralocorticoid receptor antagonist. *Circ Heart Fail.* 2014; 7:573-579. <<https://doi.org/10.1161/CIRCHEARTFAILURE.114.001104>>.
100. Orena S, Maurer TS, She L, Eudy R, Bernardo V, Dash D, Loria P, Banker ME, Tugnait M, Okerberg CV, Qian J, Boustany-Kari CM. PF-03882845, a non-steroidal mineralocorticoid receptor antagonist, prevents renal injury with reduced risk of hyperkalemia in an animal model of nephropathy. *Front Pharmacol.* 2013; 4:115. <<https://doi.org/10.3389/fphar.2013.00115>>.
101. Nariai T, Fujita K, Kawane K, Mori M, Nakayama R, Matsuda K, Katayama S, Fukuda N, Hori S, Iwata M, Hasegawa F, Suzuki K, Kato H. DSR-71167, a novel mineralocorticoid receptor antagonist with carbonic anhydrase inhibitory activity, separates urinary sodium excretion and serum potassium elevation in rats. *J Pharmacol Exp Ther.* 2015; 354:2-9. <<https://doi.org/10.1124/jpet.114.221341>>.
102. Kolkhof P, Bäracker L. 30 YEARS OF THE MINERALOCORTICOID RECEPTOR: Mineralocorticoid receptor antagonists: 60 years of research and development. *Journal of Endocrinology.* 2017; 234:T125-T140. <<https://doi.org/10.1530/JOE-16-0600>>.
103. Amazit L, Le Billan F, Kolkhof P, Lamribet K, Viengchareun S, Fay MR, Khan JA, Hillisch A, Lombès M, Rafestin-Oblin M-E, Fagart J. Finerenone Impedes Aldosterone-dependent Nuclear Import of the Mineralocorticoid Receptor and Prevents Genomic Recruitment of Steroid Receptor Coactivator-1. *J Biol Chem.* 2015; 290:21876-21889. <<https://doi.org/10.1074/jbc.M115.657957>>.
104. Kolkhof P, Delbeck M, Kretschmer A, Steinke W, Hartmann E, Bäracker L, Eitner F, Albrecht-Küpper B, Schäfer S. Finerenone, a novel selective nonsteroidal mineralocorticoid receptor antagonist protects from rat cardiorenal injury. *J Cardiovasc Pharmacol.* 2014; 64:69-78. <<https://doi.org/10.1097/FJC.000000000000091>>.
105. Selye H. Production of Nephrosclerosis by Overdosage with Desoxycorticosterone Acetate. *Can Med Assoc J.* 1942; 47:515-519.
106. Selye H. Protection by a steroid-spirolactone against certain types of cardiac necroses. *Proc Soc Exp Biol Med.* 1960; 104:212-213. <<https://doi.org/10.3181/00379727-104-25782>>.
107. Conn JW, Knopf RF, Nesbit RM. CLINICAL CHARACTERISTICS OF PRIMARY ALDOSTERONISM FROM AN ANALYSIS OF 145 CASES. *Am J Surg.* 1964; 107:159-172.
108. Greene EL, Kren S, Hostetter TH. Role of aldosterone in the remnant kidney model in the rat. *J Clin Invest.* 1996; 98:1063-1068. <<https://doi.org/10.1172/JCI118867>>.
109. Mejía-Vilet JM, Ramírez V, Cruz C, Uribe N, Gamba G, Bobadilla NA. Renal ischemia-reperfusion injury is prevented by the mineralocorticoid receptor blocker spironolactone. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2007; 293:F78-86. <<https://doi.org/10.1152/ajprenal.00077.2007>>.

110. Sánchez-Pozos K, Barrera-Chimal J, Garzón-Muvdi J, Pérez-Villalva R, Rodríguez-Romo R, Cruz C, Gamba G, Bobadilla NA. Recovery from ischemic acute kidney injury by spironolactone administration. *Nephrol Dial Transplant*. 2012; 27:3160-3169. <<https://doi.org/10.1093/ndt/gfs014>>.
111. Bhuiyan AS, Rafiq K, Kobara H, Masaki T, Nakano D, Nishiyama A. Effect of a novel nonsteroidal selective mineralocorticoid receptor antagonist, esaxerenone (CS-3150), on blood pressure and renal injury in high salt-treated type 2 diabetic mice. *Hypertens Res*. 2019; 42:892-902. <<https://doi.org/10.1038/s41440-019-0211-0>>.
112. Lattenist L, Lechner SM, Messaoudi S, Mercier AL, Moghrabi SE, Prince S, Bobadilla NA, Kolkhof P, Jaisser F, Barrera-Chimal J. Nonsteroidal Mineralocorticoid Receptor Antagonist Finerenone Protects Against Acute Kidney Injury–Mediated Chronic Kidney Disease Novelty and Significance: Role of Oxidative Stress. *Hypertension*. 2017; 69:870-878. <<https://doi.org/10.1161/HYPERTENSIONAHA.116.08526>>.
113. Kobayashi N, Hara K, Tojo A, Onozato ML, Honda T, Yoshida K, Mita S, Nakano S, Tsubokou Y, Matsuoka H. Eplerenone shows renoprotective effect by reducing LOX-1-mediated adhesion molecule, PKCepsilon-MAPK-p90RSK, and Rho-kinase pathway. *Hypertension*. 2005; 45:538-544. <<https://doi.org/10.1161/01.HYP.0000157408.43807.5a>>.
114. Rocha R, Chander PN, Zuckerman A, Stier CT. Role of aldosterone in renal vascular injury in stroke-prone hypertensive rats. *Hypertension*. 1999; 33:232-237. <<https://doi.org/10.1161/01.hyp.33.1.232>>.
115. Barrera-Chimal J, Rocha L, Amador-Martínez I, Pérez-Villalva R, González R, Cortés-González C, Uribe N, Ramírez V, Berman N, Gamba G, Bobadilla NA. Delayed spironolactone administration prevents the transition from acute kidney injury to chronic kidney disease through improving renal inflammation. *Nephrol Dial Transplant*. <<https://doi.org/10.1093/ndt/gfy246>>.
116. Trachtman H, Weiser AC, Valderrama E, Morgado M, Palmer LS. Prevention of renal fibrosis by spironolactone in mice with complete unilateral ureteral obstruction. *J Urol*. 2004; 172:1590-1594. <<https://doi.org/10.1097/01.ju.0000140445.82949.54>>.
117. Chen H, Sun F, Zhong X, Shao Y, Yoshimura A, Liu Y. Eplerenone-mediated aldosterone blockade prevents renal fibrosis by reducing renal inflammation, interstitial cell proliferation and oxidative stress. *Kidney Blood Press Res*. 2013; 37:557-566. <<https://doi.org/10.1159/000355736>>.
118. Wang C-H, Wang Z, Liang L-J, Wang X-T, Ma X-L, Liu B-B, He J-Q, Shimomura T, Xu Q-Y. The Inhibitory Effect of Eplerenone on Cell Proliferation in the Contralateral Kidneys of Rats with Unilateral Ureteral Obstruction. *Nephron*. 2017; 136:328-338. <<https://doi.org/10.1159/000473702>>.
119. Kang YS, Ko GJ, Lee MH, Song HK, Han SY, Han KH, Kim HK, Han JY, Cha DR. Effect of eplerenone, enalapril and their combination treatment on diabetic nephropathy in type II diabetic rats. *Nephrol Dial Transplant*. 2009; 24:73-84. <<https://doi.org/10.1093/ndt/gfn448>>.
120. Sun Q-L, Li M, Rui H-L, Chen Y-P. Inhibition of local aldosterone by eplerenone reduces renal structural damage in a novel model of chronic cyclosporine A nephrotoxicity. *J Renin Angiotensin Aldosterone Syst*. 2015; 16:301-310. <<https://doi.org/10.1177/1470320314561248>>.
121. Huang LL, Nikolic-Paterson DJ, Han Y, Ozols E, Ma FY, Young MJ, Tesch GH. Myeloid Mineralocorticoid Receptor Activation Contributes to Progressive Kidney Disease. *JASN*. 2014; 25:2231-2240. <<https://doi.org/10.1681/ASN.2012111094>>.

122. Zhou G, Johansson U, Peng X-R, Bamberg K, Huang Y. An additive effect of eplerenone to ACE inhibitor on slowing the progression of diabetic nephropathy in the db/db mice. *Am J Transl Res*. 2016; 8:1339-1354.
123. Lothar A, Fürst D, Bergemann S, Gilsbach R, Grahammer F, Huber TB, Hilgendorf I, Bode C, Moser M, Hein L. Deoxycorticosterone Acetate/Salt–Induced Cardiac But Not Renal Injury Is Mediated By Endothelial Mineralocorticoid Receptors Independently From Blood Pressure Novelty and Significance. *Hypertension*. 2016; 67:130-138. <<https://doi.org/10.1161/HYPERTENSIONAHA.115.06530>>.
124. Bolignano D, Palmer SC, Navaneethan SD, Strippoli GFM. Aldosterone antagonists for preventing the progression of chronic kidney disease. *Cochrane Database Syst Rev*. 2014:CD007004. <<https://doi.org/10.1002/14651858.CD007004.pub3>>.
125. Currie G, Taylor AHM, Fujita T, Ohtsu H, Lindhardt M, Rossing P, Boesby L, Edwards NC, Ferro CJ, Townend JN, van den Meiracker AH, Saklayen MG, Oveisi S, Jardine AG, Delles C, Preiss DJ, Mark PB. Effect of mineralocorticoid receptor antagonists on proteinuria and progression of chronic kidney disease: a systematic review and meta-analysis. *BMC Nephrol*. 2016; 17:127. <<https://doi.org/10.1186/s12882-016-0337-0>>.
126. Bakris GL, Agarwal R, Chan JC, Cooper ME, Gansevoort RT, Haller H, Remuzzi G, Rossing P, Schmieder RE, Nowack C, Kolkhof P, Joseph A, Pieper A, Kimmeskamp-Kirschbaum N, Ruilope LM, Mineralocorticoid Receptor Antagonist Tolerability Study–Diabetic Nephropathy (ARTS-DN) Study Group. Effect of Finerenone on Albuminuria in Patients With Diabetic Nephropathy: A Randomized Clinical Trial. *JAMA*. 2015; 314:884-894. <<https://doi.org/10.1001/jama.2015.10081>>.
127. Brilla CG, Maisch B, Weber KT. Renin-angiotensin system and myocardial collagen matrix remodeling in hypertensive heart disease: in vivo and in vitro studies on collagen matrix regulation. *Clin Investig*. 1993; 71:S35-41.
128. Brilla CG. Aldosterone and myocardial fibrosis in heart failure. *Herz*. 2000; 25:299-306. <<https://doi.org/10.1007/s000590050024>>.
129. Brilla CG, Weber KT. Mineralocorticoid excess, dietary sodium, and myocardial fibrosis. *J Lab Clin Med*. 1992; 120:893-901.
130. Kuster GM, Kotlyar E, Rude MK, Siwik DA, Liao R, Colucci WS, Sam F. Mineralocorticoid receptor inhibition ameliorates the transition to myocardial failure and decreases oxidative stress and inflammation in mice with chronic pressure overload. *Circulation*. 2005; 111:420-427. <<https://doi.org/10.1161/01.CIR.0000153800.09920.40>>.
131. Grune J, Benz V, Brix S, Salatzki J, Blumrich A, Höft B, Klopffleisch R, Foryst-Ludwig A, Kolkhof P, Kintscher U. Steroidal and Nonsteroidal Mineralocorticoid Receptor Antagonists Cause Differential Cardiac Gene Expression in Pressure Overload-induced Cardiac Hypertrophy. *J Cardiovasc Pharmacol*. 2016; 67:402-411. <<https://doi.org/10.1097/FJC.0000000000000366>>.
132. Fraccarollo D, Berger S, Galuppo P, Kneitz S, Hein L, Schütz G, Frantz S, Ertl G, Bauersachs J. Deletion of cardiomyocyte mineralocorticoid receptor ameliorates adverse remodeling after myocardial infarction. *Circulation*. 2011; 123:400-408. <<https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.110.983023>>.
133. Rickard AJ, Morgan J, Bienvenu LA, Fletcher EK, Cranston GA, Shen JZ, Reichelt ME, Delbridge LM, Young MJ. Cardiomyocyte mineralocorticoid receptors are essential for deoxycorticosterone/salt-mediated inflammation and cardiac fibrosis. *Hypertension*. 2012; 60:1443-1450. <<https://doi.org/10.1161/HYPERTENSIONAHA.112.203158>>.
134. Schäfer N, Lohmann C, Winnik S, van Tits LJ, Miranda MX, Vergopoulos A, Ruschitzka

- F, Nussberger J, Berger S, Lüscher TF, Verrey F, Matter CM. Endothelial mineralocorticoid receptor activation mediates endothelial dysfunction in diet-induced obesity. *Eur Heart J*. 2013; 34:3515-3524. <<https://doi.org/10.1093/eurheartj/eh095>>.
135. Rickard AJ, Morgan J, Chrissobolis S, Miller AA, Sobey CG, Young MJ. Endothelial cell mineralocorticoid receptors regulate deoxycorticosterone/salt-mediated cardiac remodeling and vascular reactivity but not blood pressure. *Hypertension*. 2014; 63:1033-1040. <<https://doi.org/10.1161/HYPERTENSIONAHA.113.01803>>.
136. Gueret A, Harouki N, Favre J, Galmiche G, Nicol L, Henry J-P, Besnier M, Thuillez C, Richard V, Kolkhof P, Mulder P, Jaisser F, Ouvrard-Pascaud A. Vascular Smooth Muscle Mineralocorticoid Receptor Contributes to Coronary and Left Ventricular Dysfunction After Myocardial Infarction. *Hypertension*. 2016; 67:717-723. <<https://doi.org/10.1161/HYPERTENSIONAHA.115.06709>>.
137. Pitt B, Zannad F, Remme WJ, Cody R, Castaigne A, Perez A, Palensky J, Wittes J. The effect of spironolactone on morbidity and mortality in patients with severe heart failure. Randomized Aldactone Evaluation Study Investigators. *N Engl J Med*. 1999; 341:709-717. <<https://doi.org/10.1056/NEJM199909023411001>>.
138. Kolkhof P, Borden SA. Molecular pharmacology of the mineralocorticoid receptor: prospects for novel therapeutics. *Mol Cell Endocrinol*. 2012; 350:310-317. <<https://doi.org/10.1016/j.mce.2011.06.025>>.
139. Pitt B, Remme W, Zannad F, Neaton J, Martinez F, Roniker B, Bittman R, Hurley S, Kleiman J, Gatlin M, Eplerenone Post-Acute Myocardial Infarction Heart Failure Efficacy and Survival Study Investigators. Eplerenone, a selective aldosterone blocker, in patients with left ventricular dysfunction after myocardial infarction. *N Engl J Med*. 2003; 348:1309-1321. <<https://doi.org/10.1056/NEJMoa030207>>.
140. Zannad F, McMurray JJV, Krum H, van Veldhuisen DJ, Swedberg K, Shi H, Vincent J, Pocock SJ, Pitt B, EMPHASIS-HF Study Group. Eplerenone in patients with systolic heart failure and mild symptoms. *N Engl J Med*. 2011; 364:11-21. <<https://doi.org/10.1056/NEJMoa1009492>>.
141. Montalescot G, Pitt B, Lopez de Sa E, Hamm CW, Flather M, Verheugt F, Shi H, Turgonyi E, Orri M, Vincent J, Zannad F, REMINDER Investigators, REMINDER Investigators. Early eplerenone treatment in patients with acute ST-elevation myocardial infarction without heart failure: the Randomized Double-Blind Reminder Study. *Eur Heart J*. 2014; 35:2295-2302. <<https://doi.org/10.1093/eurheartj/ehu164>>.
142. Beygui F, Cayla G, Roule V, Roubille F, Delarche N, Silvain J, Van Belle E, Belle L, Galinier M, Motreff P, Cornillet L, Collet J-P, Furber A, Goldstein P, Ecollan P, Legallois D, Lebon A, Rousseau H, Machecourt J, Zannad F, Vicaut E, Montalescot G, ALBATROSS Investigators. Early Aldosterone Blockade in Acute Myocardial Infarction: The ALBATROSS Randomized Clinical Trial. *J Am Coll Cardiol*. 2016; 67:1917-1927. <<https://doi.org/10.1016/j.jacc.2016.02.033>>.
143. Pitt B, Pfeffer MA, Assmann SF, Boineau R, Anand IS, Claggett B, Clausell N, Desai AS, Diaz R, Fleg JL, Gordeev I, Harty B, Heitner JF, Kenwood CT, Lewis EF, O'Meara E, Probstfield JL, Shaburishvili T, Shah SJ, Solomon SD, Sweitzer NK, Yang S, McKinlay SM, TOPCAT Investigators. Spironolactone for heart failure with preserved ejection fraction. *N Engl J Med*. 2014; 370:1383-1392. <<https://doi.org/10.1056/NEJMoa1313731>>.
144. Pfeffer MA, Claggett B, Assmann SF, Boineau R, Anand IS, Clausell N, Desai AS, Diaz R, Fleg JL, Gordeev I, Heitner JF, Lewis EF, O'Meara E, Rouleau J-L, Probstfield JL, Shaburishvili T, Shah SJ, Solomon SD, Sweitzer NK, McKinlay SM, Pitt B. Regional variation in patients and

outcomes in the Treatment of Preserved Cardiac Function Heart Failure With an Aldosterone Antagonist (TOPCAT) trial. *Circulation*. 2015; 131:34-42.

<<https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.114.013255>>.

145. Eschalier R, McMurray JJV, Swedberg K, van Veldhuisen DJ, Krum H, Pocock SJ, Shi H, Vincent J, Rossignol P, Zannad F, Pitt B, EMPHASIS-HF Investigators. Safety and efficacy of eplerenone in patients at high risk for hyperkalemia and/or worsening renal function: analyses of the EMPHASIS-HF study subgroups (Eplerenone in Mild Patients Hospitalization And Survival Study in Heart Failure). *J Am Coll Cardiol*. 2013; 62:1585-1593.

<<https://doi.org/10.1016/j.jacc.2013.04.086>>.

146. Ponikowski P, Voors AA, Anker SD, Bueno H, Cleland JGF, Coats AJS, Falk V, González-Juanatey JR, Harjola V-P, Jankowska EA, Jessup M, Linde C, Nihoyannopoulos P, Parissis JT, Pieske B, Riley JP, Rosano GMC, Ruilope LM, Ruschitzka F, Rutten FH, van der Meer P, ESC Scientific Document Group. 2016 ESC Guidelines for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure: The Task Force for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure of the European Society of Cardiology (ESC) Developed with the special contribution of the Heart Failure Association (HFA) of the ESC. *Eur Heart J*. 2016; 37:2129-2200. <<https://doi.org/10.1093/eurheartj/ehw128>>.

147. Maggioni AP, Anker SD, Dahlström U, Filippatos G, Ponikowski P, Zannad F, Amir O, Chioncel O, Leiro MC, Drozd J, Erglis A, Fazlibegovic E, Fonseca C, Fruhwald F, Gatzov P, Goncalvesova E, Hassanein M, Hradec J, Kavoliuniene A, Lainscak M, Logeart D, Merkely B, Metra M, Persson H, Seferovic P, Temizhan A, Tousoulis D, Tavazzi L, Heart Failure Association of the ESC. Are hospitalized or ambulatory patients with heart failure treated in accordance with European Society of Cardiology guidelines? Evidence from 12,440 patients of the ESC Heart Failure Long-Term Registry. *Eur J Heart Fail*. 2013; 15:1173-1184.

<<https://doi.org/10.1093/eurjhf/hft134>>.

148. Rickard AJ, Morgan J, Tesch G, Funder JW, Fuller PJ, Young MJ. Deletion of mineralocorticoid receptors from macrophages protects against deoxycorticosterone/salt-induced cardiac fibrosis and increased blood pressure. *Hypertension*. 2009; 54:537-543.

<<https://doi.org/10.1161/HYPERTENSIONAHA.109.131110>>.

149. Usher MG, Duan SZ, Ivaschenko CY, Frieler RA, Berger S, Schütz G, Lumeng CN, Mortensen RM. Myeloid mineralocorticoid receptor controls macrophage polarization and cardiovascular hypertrophy and remodeling in mice. *J Clin Invest*. 2010; 120:3350-3364.

<<https://doi.org/10.1172/JCI41080>>.

150. Shen JZ, Morgan J, Tesch GH, Rickard AJ, Chrissobolis S, Drummond GR, Fuller PJ, Young MJ. Cardiac Tissue Injury and Remodeling Is Dependent Upon MR Regulation of Activation Pathways in Cardiac Tissue Macrophages. *Endocrinology*. 2016; 157:3213-3223.

<<https://doi.org/10.1210/en.2016-1040>>.

151. Bienvenu LA, Morgan J, Rickard AJ, Tesch GH, Cranston GA, Fletcher EK, Delbridge LMD, Young MJ. Macrophage mineralocorticoid receptor signaling plays a key role in aldosterone-independent cardiac fibrosis. *Endocrinology*. 2012; 153:3416-3425.

<<https://doi.org/10.1210/en.2011-2098>>.

152. Barrera-Chimal J, Estrela GR, Lechner SM, Giraud S, El Moghrabi S, Kaaki S, Kolkhof P, Hauet T, Jaisser F. The myeloid mineralocorticoid receptor controls inflammatory and fibrotic responses after renal injury via macrophage interleukin-4 receptor signaling. *Kidney Int*. 2018; 93:1344-1355. <<https://doi.org/10.1016/j.kint.2017.12.016>>.

153. Li C, Sun X-N, Zeng M-R, Zheng X-J, Zhang Y-Y, Wan Q, Zhang W-C, Shi C, Du L-J, Ai T-J, Liu Y, Liu Y, Du L-L, Yi Y, Yu Y, Duan S-Z. Mineralocorticoid Receptor Deficiency in T Cells

- Attenuates Pressure Overload-Induced Cardiac Hypertrophy and Dysfunction Through Modulating T-Cell Activation. *Hypertension*. 2017; 70:137-147. <<https://doi.org/10.1161/HYPERTENSIONAHA.117.09070>>.
154. Sun X-N, Li C, Liu Y, Du L-J, Zeng M-R, Zheng X-J, Zhang W-C, Liu Y, Zhu M, Kong D, Zhou L, Lu L, Shen Z-X, Yi Y, Du L, Qin M, Liu X, Hua Z, Sun S, Yin H, Zhou B, Yu Y, Zhang Z, Duan S-Z. T-Cell Mineralocorticoid Receptor Controls Blood Pressure by Regulating Interferon-Gamma Novelty and Significance. *Circulation Research*. 2017; 120:1584-1597. <<https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.116.310480>>.
155. Buonafina M, Bonnard B, Jaisser F. Mineralocorticoid Receptor and Cardiovascular Disease. *Am J Hypertens*. <<https://doi.org/10.1093/ajh/hpy120>>.
156. Ronco C, House AA, Haapio M. Cardiorenal syndrome: refining the definition of a complex symbiosis gone wrong. *Intensive Care Med*. 2008; 34:957-962. <<https://doi.org/10.1007/s00134-008-1017-8>>.
157. Ronco C. The Cardiorenal Syndrome: Basis and Common Ground for a Multidisciplinary Patient-Oriented Therapy. *Cardiorenal Med*. 2011; 1:3-4. <<https://doi.org/10.1159/000323352>>.
158. Bagshaw SM, Cruz DN, Aspromonte N, Daliento L, Ronco F, Sheinfeld G, Anker SD, Anand I, Bellomo R, Berl T, Bobek I, Davenport A, Haapio M, Hillege H, House A, Katz N, Maisel A, Mankad S, McCullough P, Mebazaa A, Palazzuoli A, Ponikowski P, Shaw A, Soni S, Vescovo G, Zamperetti N, Zanco P, Ronco C, Acute Dialysis Quality Initiative Consensus Group. Epidemiology of cardio-renal syndromes: workgroup statements from the 7th ADQI Consensus Conference. *Nephrol Dial Transplant*. 2010; 25:1406-1416. <<https://doi.org/10.1093/ndt/gfq066>>.
159. Go AS, Chertow GM, Fan D, McCulloch CE, Hsu C. Chronic kidney disease and the risks of death, cardiovascular events, and hospitalization. *N Engl J Med*. 2004; 351:1296-1305. <<https://doi.org/10.1056/NEJMoa041031>>.
160. Latouche C, Moghrabi SE, Messaoudi S, Cat AND, Hernandez-Diaz I, Rosa DA de la, Perret C, Andrés NL, Rossignol P, Zannad F, Farman N, Jaisser F. Neutrophil Gelatinase-Associated Lipocalin Is a Novel Mineralocorticoid Target in the Cardiovascular System. *Hypertension*. 2012; 59:966-972. <<https://doi.org/10.1161/HYPERTENSIONAHA.111.187872>>.
161. Flower DR, North AC, Attwood TK. Structure and sequence relationships in the lipocalins and related proteins. *Protein Sci*. 1993; 2:753-761. <<https://doi.org/10.1002/pro.5560020507>>.
162. Flower DR, North AC, Attwood TK. Mouse oncogene protein 24p3 is a member of the lipocalin protein family. *Biochem Biophys Res Commun*. 1991; 180:69-74. <[https://doi.org/10.1016/s0006-291x\(05\)81256-2](https://doi.org/10.1016/s0006-291x(05)81256-2)>.
163. Hraba-Renevey S, Türler H, Kress M, Salomon C, Weil R. SV40-induced expression of mouse gene 24p3 involves a post-transcriptional mechanism. *Oncogene*. 1989; 4:601-608.
164. Salier JP. Chromosomal location, exon/intron organization and evolution of lipocalin genes. *Biochim Biophys Acta*. 2000; 1482:25-34. <[https://doi.org/10.1016/s0167-4838\(00\)00144-8](https://doi.org/10.1016/s0167-4838(00)00144-8)>.
165. Kjeldsen L, Cowland JB, Borregaard N. Human neutrophil gelatinase-associated lipocalin and homologous proteins in rat and mouse. *Biochim Biophys Acta*. 2000; 1482:272-283. <[https://doi.org/10.1016/s0167-4838\(00\)00152-7](https://doi.org/10.1016/s0167-4838(00)00152-7)>.
166. Goetz DH, Holmes MA, Borregaard N, Bluhm ME, Raymond KN, Strong RK. The neutrophil lipocalin NGAL is a bacteriostatic agent that interferes with siderophore-mediated

- iron acquisition. *Mol Cell*. 2002; 10:1033-1043. <[https://doi.org/10.1016/s1097-2765\(02\)00708-6](https://doi.org/10.1016/s1097-2765(02)00708-6)>.
167. Yan L, Borregaard N, Kjeldsen L, Moses MA. The high molecular weight urinary matrix metalloproteinase (MMP) activity is a complex of gelatinase B/MMP-9 and neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL). Modulation of MMP-9 activity by NGAL. *J Biol Chem*. 2001; 276:37258-37265. <<https://doi.org/10.1074/jbc.M106089200>>.
168. Triebel S, Bläser J, Reinke H, Tschesche H. A 25 kDa alpha 2-microglobulin-related protein is a component of the 125 kDa form of human gelatinase. *FEBS Lett*. 1992; 314:386-388. <[https://doi.org/10.1016/0014-5793\(92\)81511-j](https://doi.org/10.1016/0014-5793(92)81511-j)>.
169. Bu D, Hemdahl A-L, Gabrielsen A, Fuxe J, Zhu C, Eriksson P, Yan Z. Induction of neutrophil gelatinase-associated lipocalin in vascular injury via activation of nuclear factor-kappaB. *Am J Pathol*. 2006; 169:2245-2253. <<https://doi.org/10.2353/ajpath.2006.050706>>.
170. Hemdahl A-L, Gabrielsen A, Zhu C, Eriksson P, Hedin U, Kastrup J, Thorén P, Hansson GK. Expression of neutrophil gelatinase-associated lipocalin in atherosclerosis and myocardial infarction. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2006; 26:136-142. <<https://doi.org/10.1161/01.ATV.0000193567.88685.f4>>.
171. Flo TH, Smith KD, Sato S, Rodriguez DJ, Holmes MA, Strong RK, Akira S, Aderem A. Lipocalin 2 mediates an innate immune response to bacterial infection by sequestering iron. *Nature*. 2004; 432:917. <<https://doi.org/10.1038/nature03104>>.
172. Mori K, Lee HT, Rapoport D, Drexler IR, Foster K, Yang J, Schmidt-Ott KM, Chen X, Li JY, Weiss S, Mishra J, Cheema FH, Markowitz G, Suganami T, Sawai K, Mukoyama M, Kunis C, D'Agati V, Devarajan P, Barasch J. Endocytic delivery of lipocalin-siderophore-iron complex rescues the kidney from ischemia-reperfusion injury. *J Clin Invest*. 2005; 115:610-621. <<https://doi.org/10.1172/JCI200523056>>.
173. Axelsson L, Bergenfeldt M, Ohlsson K. Studies of the release and turnover of a human neutrophil lipocalin. *Scand J Clin Lab Invest*. 1995; 55:577-588. <<https://doi.org/10.3109/00365519509110257>>.
174. Schmidt-Ott KM, Mori K, Li JY, Kalandadze A, Cohen DJ, Devarajan P, Barasch J. Dual Action of Neutrophil Gelatinase-Associated Lipocalin. *JASN*. 2007; 18:407-413. <<https://doi.org/10.1681/ASN.2006080882>>.
175. Devarajan P. Neutrophil gelatinase-associated lipocalin: a promising biomarker for human acute kidney injury. *Biomarkers in Medicine*. 2010; 4:265-280. <<https://doi.org/10.2217/bmm.10.12>>.
176. Wu G, Li H, Fang Q, Jiang S, Zhang L, Zhang J, Hou X, Lu J, Bao Y, Xu A, Jia W. Elevated circulating lipocalin-2 levels independently predict incident cardiovascular events in men in a population-based cohort. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2014; 34:2457-2464. <<https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.114.303718>>.
177. van Deursen VM, Damman K, Voors AA, van der Wal MH, Jaarsma T, van Veldhuisen DJ, Hillege HL. Prognostic value of plasma neutrophil gelatinase-associated lipocalin for mortality in patients with heart failure. *Circ Heart Fail*. 2014; 7:35-42. <<https://doi.org/10.1161/CIRCHEARTFAILURE.113.000242>>.
178. Xiao X, Yeoh BS, Vijay-Kumar M. Lipocalin 2: An Emerging Player in Iron Homeostasis and Inflammation. *Annu Rev Nutr*. 2017; 37:103-130. <<https://doi.org/10.1146/annurev-nutr-071816-064559>>.
179. Kjeldsen L, Johnsen AH, Sengeløv H, Borregaard N. Isolation and primary structure of NGAL, a novel protein associated with human neutrophil gelatinase. *J Biol Chem*. 1993; 268:10425-10432.

180. Liu F, Yang H, Chen H, Zhang M, Ma Q. High expression of neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL) in the kidney proximal tubules of diabetic rats. *Advances in Medical Sciences*. 2015; 60:133-138. <<https://doi.org/10.1016/j.advms.2015.01.001>>.
181. Hamzic N, Blomqvist A, Nilsberth C. Immune-Induced Expression of Lipocalin-2 in Brain Endothelial Cells: Relationship with Interleukin-6, Cyclooxygenase-2 and the Febrile Response. *Journal of Neuroendocrinology*. 2013; 25:271-280. <<https://doi.org/10.1111/jne.12000>>.
182. Eilenberg W, Stojkovic S, Piechota-Polanczyk A, Kaun C, Rauscher S, Gröger M, Klinger M, Wojta J, Neumayer C, Huk I, Demyanets S. Neutrophil Gelatinase-Associated Lipocalin (NGAL) is Associated with Symptomatic Carotid Atherosclerosis and Drives Pro-inflammatory State In Vitro. *European Journal of Vascular and Endovascular Surgery*. 2016; 51:623-631. <<https://doi.org/10.1016/j.ejvs.2016.01.009>>.
183. Floderer M, Prchal-Murphy M, Vizzardelli C. Dendritic Cell-Secreted Lipocalin2 Induces CD8+ T-Cell Apoptosis, Contributes to T-Cell Priming and Leads to a TH1 Phenotype. *PLOS ONE*. 2014; 9:e101881. <<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0101881>>.
184. Langelueddecke C, Roussa E, Fenton RA, Wolff NA, Lee W-K, Thévenod F. Lipocalin-2 (24p3/neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL)) receptor is expressed in distal nephron and mediates protein endocytosis. *J Biol Chem*. 2012; 287:159-169. <<https://doi.org/10.1074/jbc.M111.308296>>.
185. Ding L, Hanawa H, Ota Y, Hasegawa G, Hao K, Asami F, Watanabe R, Yoshida T, Toba K, Yoshida K, Ogura M, Kodama M, Aizawa Y. Lipocalin-2/neutrophil gelatinase-B associated lipocalin is strongly induced in hearts of rats with autoimmune myocarditis and in human myocarditis. *Circ J*. 2010; 74:523-530. <<https://doi.org/10.1253/circj.cj-09-0485>>.
186. Devireddy LR, Gazin C, Zhu X, Green MR. A cell-surface receptor for lipocalin 24p3 selectively mediates apoptosis and iron uptake. *Cell*. 2005; 123:1293-1305. <<https://doi.org/10.1016/j.cell.2005.10.027>>.
187. Hvidberg V, Jacobsen C, Strong RK, Cowland JB, Moestrup SK, Borregaard N. The endocytic receptor megalin binds the iron transporting neutrophil-gelatinase-associated lipocalin with high affinity and mediates its cellular uptake. *FEBS Lett*. 2005; 579:773-777. <<https://doi.org/10.1016/j.febslet.2004.12.031>>.
188. Moestrup SK, Verroust PJ. Megalin- and cubilin-mediated endocytosis of protein-bound vitamins, lipids, and hormones in polarized epithelia. *Annu Rev Nutr*. 2001; 21:407-428. <<https://doi.org/10.1146/annurev.nutr.21.1.407>>.
189. Van Dijk A, Vermond RA, Krijnen PAJ, Juffermans LJM, Hahn NE, Makker SP, Aarden LA, Hack E, Spreuuenberg M, van Rossum BC, Meischl C, Paulus WJ, Van Milligen FJ, Niessen HWM. Intravenous clusterin administration reduces myocardial infarct size in rats. *Eur J Clin Invest*. 2010; 40:893-902. <<https://doi.org/10.1111/j.1365-2362.2010.02345.x>>.
190. Miharada K, Hiroyama T, Sudo K, Danjo I, Nagasawa T, Nakamura Y. Lipocalin 2-mediated growth suppression is evident in human erythroid and monocyte/macrophage lineage cells. *J Cell Physiol*. 2008; 215:526-537. <<https://doi.org/10.1002/jcp.21334>>.
191. Zerega B, Cermelli S, Michelis B, Cancedda R, Cancedda FD. Expression of NRL/NGAL (neu-related lipocalin/neutrophil gelatinase-associated lipocalin) during mammalian embryonic development and in inflammation. *Eur J Cell Biol*. 2000; 79:165-172. <[https://doi.org/10.1078/s0171-9335\(04\)70019-9](https://doi.org/10.1078/s0171-9335(04)70019-9)>.
192. Zhao P, Stephens JM. STAT1, NF-κB and ERKs play a role in the induction of lipocalin-2 expression in adipocytes. *Mol Metab*. 2013; 2:161-170. <<https://doi.org/10.1016/j.molmet.2013.04.003>>.

193. Konno T, Nakano R, Mamiya R, Tsuchiya H, Kitanaka T, Namba S, Kitanaka N, Okabayashi K, Narita T, Sugiya H. Expression and Function of Interleukin-1 β -Induced Neutrophil Gelatinase-Associated Lipocalin in Renal Tubular Cells. *PLOS ONE*. 2016; 11:e0166707. <<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0166707>>.
194. Gilet A, Zou F, Boumenir M, Fripiat J-P, Thornton SN, Lacolley P, Ropars A. Aldosterone up-regulates MMP-9 and MMP-9/NGAL expression in human neutrophils through p38, ERK1/2 and PI3K pathways. *Experimental Cell Research*. 2015; 331:152-163. <<https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2014.11.004>>.
195. Gwira JA, Wei F, Ishibe S, Ueland JM, Barasch J, Cantley LG. Expression of neutrophil gelatinase-associated lipocalin regulates epithelial morphogenesis in vitro. *J Biol Chem*. 2005; 280:7875-7882. <<https://doi.org/10.1074/jbc.M413192200>>.
196. Shao S, Cao T, Jin L, Li B, Fang H, Zhang J, Zhang Y, Hu J, Wang G. Increased Lipocalin-2 Contributes to the Pathogenesis of Psoriasis by Modulating Neutrophil Chemotaxis and Cytokine Secretion. *J Invest Dermatol*. 2016; 136:1418-1428. <<https://doi.org/10.1016/j.jid.2016.03.002>>.
197. Martínez-Martínez E, Buonafine M, Boukhalfa I, Ibarrola J, Fernández-Celis A, Kolkhof P, Rossignol P, Girerd N, Mulder P, López-Andrés N, Ouvrard-Pascaud A, Jaisser F. Aldosterone Target NGAL (Neutrophil Gelatinase-Associated Lipocalin) Is Involved in Cardiac Remodeling After Myocardial Infarction Through NF κ B Pathway. *Hypertension*. December 2017.
198. Holmes MA, Paulsene W, Jide X, Ratledge C, Strong RK. Siderocalin (Lcn 2) also binds carboxymycobactins, potentially defending against mycobacterial infections through iron sequestration. *Structure*. 2005; 13:29-41. <<https://doi.org/10.1016/j.str.2004.10.009>>.
199. Berger T, Togawa A, Duncan GS, Elia AJ, You-Ten A, Wakeham A, Fong HEH, Cheung CC, Mak TW. Lipocalin 2-deficient mice exhibit increased sensitivity to Escherichia coli infection but not to ischemia-reperfusion injury. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006; 103:1834-1839. <<https://doi.org/10.1073/pnas.0510847103>>.
200. Yang J, Goetz D, Li JY, Wang W, Mori K, Setlik D, Du T, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Strong R, Barasch J. An iron delivery pathway mediated by a lipocalin. *Mol Cell*. 2002; 10:1045-1056. <[https://doi.org/10.1016/s1097-2765\(02\)00710-4](https://doi.org/10.1016/s1097-2765(02)00710-4)>.
201. Bao G, Clifton M, Hoette TM, Mori K, Deng S-X, Qiu A, Viltard M, Williams D, Paragas N, Leete T, Kulkarni R, Li X, Lee B, Kalandadze A, Ratner AJ, Pizarro JC, Schmidt-Ott KM, Landry DW, Raymond KN, Strong RK, Barasch J. Iron traffics in circulation bound to a siderocalin (Ngal)-catechol complex. *Nat Chem Biol*. 2010; 6:602-609. <<https://doi.org/10.1038/nchembio.402>>.
202. Song E, Fan P, Huang B, Deng H-B, Cheung BM, Félétou M, Vilaine J-P, Villeneuve N, Xu A, Vanhoutte PM, Wang Y. Deamidated lipocalin-2 induces endothelial dysfunction and hypertension in dietary obese mice. *J Am Heart Assoc*. 2014; 3:e000837. <<https://doi.org/10.1161/JAHA.114.000837>>.
203. Yang K, Deng H, Man AWC, Song E, Zhang J, Luo C, Cheung BM, Yuen K, Jensen PS, Irmukhamedov A, Elie AGIM, Vanhoutte PM, Xu A, De Mey JGR, Wang Y. Measuring non-polyaminated lipocalin-2 for cardiometabolic risk assessment. *ESC Heart Fail*. 2017; 4:563-575. <<https://doi.org/10.1002/ehf2.12183>>.
204. Tarjus A, Martínez-Martínez E, Amador C, Latouche C, Moghrabi SE, Berger T, Mak TW, Fay R, Farman N, Rossignol P, Zannad F, López-Andrés N, Jaisser F. Neutrophil Gelatinase-Associated Lipocalin, a Novel Mineralocorticoid Biotarget, Mediates Vascular Profibrotic Effects of Mineralocorticoids Novelty and Significance. *Hypertension*. 2015;

- 66:158-166. <<https://doi.org/10.1161/HYPERTENSIONAHA.115.05431>>.
205. Marques FZ, Prestes PR, Byars SG, Ritchie SC, Würtz P, Patel SK, Booth SA, Rana I, Minoda Y, Berzins SP, Curl CL, Bell JR, Wai B, Srivastava PM, Kangas AJ, Soyninen P, Ruohonen S, Kähönen M, Lehtimäki T, Raitoharju E, Havulinna A, Perola M, Raitakari O, Salomaa V, Ala-Korpela M, Kettunen J, McGlynn M, Kelly J, Wlodek ME, Lewandowski PA, Delbridge LM, Burrell LM, Inouye M, Harrap SB, Charchar FJ. Experimental and Human Evidence for Lipocalin-2 (Neutrophil Gelatinase-Associated Lipocalin [NGAL]) in the Development of Cardiac Hypertrophy and heart failure. *J Am Heart Assoc.* 2017; 6. <<https://doi.org/10.1161/JAHA.117.005971>>.
206. Xu G, Ahn J, Chang S, Eguchi M, Ogier A, Han S, Park Y, Shim C, Jang Y, Yang B, Xu A, Wang Y, Sweeney G. Lipocalin-2 Induces Cardiomyocyte Apoptosis by Increasing Intracellular Iron Accumulation. *J Biol Chem.* 2012; 287:4808-4817. <<https://doi.org/10.1074/jbc.M111.275719>>.
207. Buonafina M, Martínez-Martínez E, Amador C, Gravez B, Ibarrola J, Fernández-Celis A, El Moghrabi S, Rossignol P, López-Andrés N, Jaisser F. Neutrophil Gelatinase-Associated Lipocalin from immune cells is mandatory for aldosterone-induced cardiac remodeling and inflammation. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology.* 2018; 115:32-38. <<https://doi.org/10.1016/j.yjmcc.2017.12.011>>.
208. Araos P, Prado C, Lozano M, Figueroa S, Espinoza A, Berger T, Mak T, Jaisser F, Pacheco R, Michea L, Amador C. Dendritic cells are crucial for cardiovascular remodeling and modulate neutrophil gelatinase-associated lipocalin expression upon mineralocorticoid receptor activation. *Journal of Hypertension.* 2019; Publish Ahead of Print. <<https://doi.org/10.1097/HJH.0000000000002067>>.
209. Mishra J, Ma Q, Prada A, Mitsnefes M, Zahedi K, Yang J, Barasch J, Devarajan P. Identification of neutrophil gelatinase-associated lipocalin as a novel early urinary biomarker for ischemic renal injury. *J Am Soc Nephrol.* 2003; 14:2534-2543. <<https://doi.org/10.1097/01.asn.0000088027.54400.c6>>.
210. Kümpers P, Hafer C, Lukasz A, Lichtinghagen R, Brand K, Fliser D, Faulhaber-Walter R, Kielstein JT. Serum neutrophil gelatinase-associated lipocalin at inception of renal replacement therapy predicts survival in critically ill patients with acute kidney injury. *Crit Care.* 2010; 14:R9. <<https://doi.org/10.1186/cc8861>>.
211. Mishra J, Mori K, Ma Q, Kelly C, Yang J, Mitsnefes M, Barasch J, Devarajan P. Amelioration of Ischemic Acute Renal Injury by Neutrophil Gelatinase-Associated Lipocalin. *JASN.* 2004; 15:3073-3082. <<https://doi.org/10.1097/01.ASN.0000145013.44578.45>>.
212. Zhang Y-L, Qiao S-K, Wang R-Y, Guo X-N. NGAL attenuates renal ischemia/reperfusion injury through autophagy activation and apoptosis inhibition in rats. *Chem Biol Interact.* 2018; 289:40-46. <<https://doi.org/10.1016/j.cbi.2018.04.018>>.
213. Ashraf MI, Schwelberger HG, Brendel KA, Feurle J, Andrassy J, Kotsch K, Regele H, Pratschke J, Maier HT, Aigner F. Exogenous Lipocalin 2 Ameliorates Acute Rejection in a Mouse Model of Renal Transplantation. *Am J Transplant.* 2016; 16:808-820. <<https://doi.org/10.1111/ajt.13521>>.
214. Lee SA, Noel S, Kurzhagen JT, Sadasivam M, Pierorazio PM, Arend LJ, Hamad AR, Rabb H. CD4+ T Cell-Derived NGAL Modifies the Outcome of Ischemic Acute Kidney Injury. *J Immunol.* 2020; 204:586-595. <<https://doi.org/10.4049/jimmunol.1900677>>.
215. Guiteras R, Sola A, Flaquer M, Hotter G, Torras J, Grinyó JM, Cruzado JM. Macrophage Overexpressing NGAL Ameliorated Kidney Fibrosis in the UUO Mice Model. *Cell Physiol Biochem.* 2017; 42:1945-1960. <<https://doi.org/10.1159/000479835>>.

216. Viau A, Karoui KE, Laouari D, Burtin M, Nguyen C, Mori K, Pillebout E, Berger T, Mak TW, Knebelmann B, Friedlander G, Barasch J, Terzi F. Lipocalin 2 is essential for chronic kidney disease progression in mice and humans. *J Clin Invest*. 2010; 120:4065-4076. <<https://doi.org/10.1172/JCI42004>>.
217. Nickolas TL, Forster CS, Sise ME, Barasch N, Solá-Del Valle D, Viltard M, Buchen C, Kupferman S, Carnevali ML, Bennett M, Mattei S, Bovino A, Argentiero L, Magnano A, Devarajan P, Mori K, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Allegri L, Barasch J. NGAL (Lcn2) monomer is associated with tubulointerstitial damage in chronic kidney disease. *Kidney Int*. 2012; 82:718-722. <<https://doi.org/10.1038/ki.2012.195>>.
218. Hwang S, Park J, Kim J, Jang HR, Kwon GY, Huh W, Kim Y-G, Kim DJ, Oh HY, Lee JE. Tissue expression of tubular injury markers is associated with renal function decline in diabetic nephropathy. *J Diabetes Complicat*. 2017; 31:1704-1709. <<https://doi.org/10.1016/j.jdiacomp.2017.08.009>>.
219. Pawar RD, Pitashny M, Gindea S, Tieng AT, Levine B, Goilav B, Campbell SR, Xia Y, Qing X, Thomas D, Herlitz L, Berger T, Mak TW, Putterman C. Neutrophil Gelatinase Associated Lipocalin is Instrumental in the Pathogenesis of Antibody-Mediated Nephritis. *Arthritis Rheum*. 2012; 64:1620-1631. <<https://doi.org/10.1002/art.33485>>.
220. Sun WY, Bai B, Luo C, Yang K, Li D, Wu D, Félétou M, Villeneuve N, Zhou Y, Yang J, Xu A, Vanhoutte PM, Wang Y. Lipocalin-2 derived from adipose tissue mediates aldosterone-induced renal injury. :20.
221. Global, Regional, and National Burden of Chronic Kidney Disease, 1990-2017: A Systematic Analysis for the Global Burden of Disease Study 2017. *Lancet* (London, England). https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32061315/?from_term=Global%2C+regional%2C+and+national+burden+of+chronic+kidney&from_filter=pubt.review. Accessed April 8, 2020.
222. Zhang X, Goncalves R, Mosser DM. The isolation and characterization of murine macrophages. *Curr Protoc Immunol*. 2008; Chapter 14:Unit 14.1. <<https://doi.org/10.1002/0471142735.im1401s83>>.
223. Hucke S, Eschborn M, Liebmann M, Herold M, Freise N, Engbers A, Ehling P, Meuth SG, Roth J, Kuhlmann T, Wiendl H, Klotz L. Sodium chloride promotes pro-inflammatory macrophage polarization thereby aggravating CNS autoimmunity. *J Autoimmun*. 2016; 67:90-101. <<https://doi.org/10.1016/j.jaut.2015.11.001>>.
224. Lawson JS, Syme HM, Wheeler-Jones CPD, Elliott J. Characterisation of feline renal cortical fibroblast cultures and their transcriptional response to transforming growth factor β 1. *BMC Vet Res*. 2018; 14. <<https://doi.org/10.1186/s12917-018-1387-2>>.
225. Vandesompele J, De Preter K, Pattyn F, Poppe B, Van Roy N, De Paepe A, Speleman F. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biology*. 2002; 3:research0034.1. <<https://doi.org/10.1186/gb-2002-3-7-research0034>>.
226. Roth GA, Huffman MD, Moran AE, Feigin V, Mensah GA, Naghavi M, Murray CJL. Global and regional patterns in cardiovascular mortality from 1990 to 2013. *Circulation*. 2015; 132:1667-1678. <<https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.114.008720>>.
227. Bui AL, Horwich TB, Fonarow GC. Epidemiology and risk profile of heart failure. *Nat Rev Cardiol*. 2011; 8:30-41. <<https://doi.org/10.1038/nrcardio.2010.165>>.
228. Mann JF, Gerstein HC, Pogue J, Bosch J, Yusuf S. Renal insufficiency as a predictor of cardiovascular outcomes and the impact of ramipril: the HOPE randomized trial. *Ann Intern Med*. 2001; 134:629-636. <<https://doi.org/10.7326/0003-4819-134-8-200104170-00007>>.
229. Matsumoto Y, Mori Y, Kageyama S, Arihara K, Sugiyama T, Ohmura H, Yakushigawa T,

- Sugiyama H, Shimada Y, Nojima Y, Shio N. Spironolactone reduces cardiovascular and cerebrovascular morbidity and mortality in hemodialysis patients. *J Am Coll Cardiol*. 2014; 63:528-536. <<https://doi.org/10.1016/j.jacc.2013.09.056>>.
230. Sarafidis PA, Blacklock R, Wood E, Rumjon A, Simmonds S, Fletcher-Rogers J, Ariyanayagam R, Al-Yassin A, Sharpe C, Vinen K. Prevalence and Factors Associated with Hyperkalemia in Predialysis Patients Followed in a Low-Clearance Clinic. *Clin J Am Soc Nephrol*. 2012; 7:1234-1241. <<https://doi.org/10.2215/CJN.01150112>>.
231. Filippatos G, Anker SD, Böhm M, Gheorghide M, Køber L, Krum H, Maggioni AP, Ponikowski P, Voors AA, Zannad F, Kim S-Y, Nowack C, Palombo G, Kolkhof P, Kimmeskamp-Kirschbaum N, Pieper A, Pitt B. A randomized controlled study of finerenone vs. eplerenone in patients with worsening chronic heart failure and diabetes mellitus and/or chronic kidney disease. *Eur Heart J*. 2016; 37:2105-2114. <<https://doi.org/10.1093/eurheartj/ehw132>>.
232. Farshid A, Pathak R, Shadbolt B, Arnolda L, Talaulikar G. Diastolic function is a strong predictor of mortality in patients with chronic kidney disease. *BMC Nephrol*. 2013; 14:280. <<https://doi.org/10.1186/1471-2369-14-280>>.
233. Park M, Hsu C, Li Y, Mishra RK, Keane M, Rosas SE, Dries D, Xie D, Chen J, He J, Anderson A, Go AS, Shlipak MG, Chronic Renal Insufficiency Cohort (CRIC) Study Group. Associations between kidney function and subclinical cardiac abnormalities in CKD. *J Am Soc Nephrol*. 2012; 23:1725-1734. <<https://doi.org/10.1681/ASN.2012020145>>.
234. Winterberg PD, Jiang R, Maxwell JT, Wang B, Wagner MB. Myocardial dysfunction occurs prior to changes in ventricular geometry in mice with chronic kidney disease (CKD). *Physiol Rep*. 2016; 4. <<https://doi.org/10.14814/phy2.12732>>.
235. Kennedy DJ, Elkareh J, Shidyak A, Shapiro AP, Smaili S, Mutgi K, Gupta S, Tian J, Morgan E, Khouri S, Cooper CJ, Periyasamy SM, Xie Z, Malhotra D, Fedorova OV, Bagrov AY, Shapiro JI. Partial nephrectomy as a model for uremic cardiomyopathy in the mouse. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2008; 294:F450-F454. <<https://doi.org/10.1152/ajprenal.00472.2007>>.
236. Yuen DA, Connelly KA, Advani A, Liao C, Kuliszewski MA, Trogadis J, Thai K, Advani SL, Zhang Y, Kelly DJ, Leong-Poi H, Keating A, Marsden PA, Stewart DJ, Gilbert RE. Culture-modified bone marrow cells attenuate cardiac and renal injury in a chronic kidney disease rat model via a novel antifibrotic mechanism. *PLoS ONE*. 2010; 5:e9543. <<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0009543>>.
237. Kennedy DJ, Vetteth S, Periyasamy SM, Kanj M, Fedorova L, Khouri S, Kahaleh MB, Xie Z, Malhotra D, Kolodkin NI, Lakatta EG, Fedorova OV, Bagrov AY, Shapiro JI. Central role for the cardiotonic steroid marinobufagenin in the pathogenesis of experimental uremic cardiomyopathy. *Hypertension*. 2006; 47:488-495. <<https://doi.org/10.1161/01.HYP.0000202594.82271.92>>.
238. Elkareh J, Kennedy DJ, Yashaswi B, Vetteth S, Shidyak A, Kim EGR, Smaili S, Periyasamy SM, Hariri IM, Fedorova L, Liu J, Wu L, Kahaleh MB, Xie Z, Malhotra D, Fedorova OV, Kashkin VA, Bagrov AY, Shapiro JI. Marinobufagenin stimulates fibroblast collagen production and causes fibrosis in experimental uremic cardiomyopathy. *Hypertension*. 2007; 49:215-224. <<https://doi.org/10.1161/01.HYP.0000252409.36927.05>>.
239. Asp ML, Martindale JJ, Heinis FI, Wang W, Metzger JM. Calcium mishandling in diastolic dysfunction: mechanisms and potential therapies. *Biochim Biophys Acta*. 2013; 1833:895-900. <<https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2012.09.007>>.
240. Tanaka K, Wilson RM, Essick EE, Duffen JL, Scherer PE, Ouchi N, Sam F. Effects of adiponectin on calcium-handling proteins in heart failure with preserved ejection fraction. *Circ Heart Fail*. 2014; 7:976-985. <<https://doi.org/10.1161/CIRCHEARTFAILURE.114.001279>>.

241. Gómez AM, Rueda A, Sainte-Marie Y, Pereira L, Zissimopoulos S, Zhu X, Schaub R, Perrier E, Perrier R, Latouche C, Richard S, Picot M-C, Jaisser F, Lai FA, Valdivia HH, Benitah J-P. Mineralocorticoid modulation of cardiac ryanodine receptor activity is associated with downregulation of FK506-binding proteins. *Circulation*. 2009; 119:2179-2187. <<https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.108.805804>>.
242. Rohde D, Ritterhoff J, Voelkers M, Katus HA, Parker TG, Most P. S100A1: A Multifaceted Therapeutic Target in Cardiovascular Disease. *Journal of Cardiovascular Translational Research*. 2010; 3:525. <<https://doi.org/10.1007/s12265-010-9211-9>>.
243. Poulsen SB, Limbutara K, Fenton RA, Pisitkun T, Christensen BM. RNA sequencing of kidney distal tubule cells reveals multiple mediators of chronic aldosterone action. *Physiol Genomics*. 2018; 50:343-354. <<https://doi.org/10.1152/physiolgenomics.00084.2017>>.
244. Ke H, Chin L, Tsai C, Lin F, Chen Y, Chang Y, Huang S, Chen Y, Lin C. Cardiac calcium dysregulation in mice with chronic kidney disease. *J Cell Mol Med*. 2020; 24:3669-3677. <<https://doi.org/10.1111/jcmm.15066>>.
245. Hullin Roger, Asmus Friedrich, Ludwig Andreas, Hersel Joachim, Boekstegers Peter. Subunit Expression of the Cardiac L-Type Calcium Channel Is Differentially Regulated in Diastolic Heart Failure of the Cardiac Allograft. *Circulation*. 1999; 100:155-163. <<https://doi.org/10.1161/01.CIR.100.2.155>>.
246. Bénitah JP, Vassort G. Aldosterone upregulates Ca(2+) current in adult rat cardiomyocytes. *Circ Res*. 1999; 85:1139-1145. <<https://doi.org/10.1161/01.res.85.12.1139>>.
247. Lalevée N, Rebsamen MC, Barrère-Lemaire S, Perrier E, Nargeot J, Bénitah J-P, Rossier MF. Aldosterone increases T-type calcium channel expression and in vitro beating frequency in neonatal rat cardiomyocytes. *Cardiovasc Res*. 2005; 67:216-224. <<https://doi.org/10.1016/j.cardiores.2005.05.009>>.
248. Maturana A, Lenglet S, Python M, Kuroda S, Rossier MF. Role of the T-type calcium channel CaV3.2 in the chronotropic action of corticosteroids in isolated rat ventricular myocytes. *Endocrinology*. 2009; 150:3726-3734. <<https://doi.org/10.1210/en.2008-1727>>.
249. Boixel C, Gavillet B, Rougier J-S, Abriel H. Aldosterone increases voltage-gated sodium current in ventricular myocytes. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2006; 290:H2257-2266. <<https://doi.org/10.1152/ajpheart.01060.2005>>.
250. Perrier E, Kerfant B-G, Lalevée N, Bideaux P, Rossier MF, Richard S, Gómez AM, Benitah J-P. Mineralocorticoid receptor antagonism prevents the electrical remodeling that precedes cellular hypertrophy after myocardial infarction. *Circulation*. 2004; 110:776-783. <<https://doi.org/10.1161/01.CIR.0000138973.55605.38>>.
251. Ouvrard-Pascaud A, Sainte-Marie Y, Bénitah J-P, Perrier R, Soukaseum C, Cat AND, Royer A, Le Quang K, Charpentier F, Demolombe S, Mechta-Grigoriou F, Beggah AT, Maison-Blanche P, Oblin M-E, Delcayre C, Fishman GI, Farman N, Escoubet B, Jaisser F. Conditional Mineralocorticoid Receptor Expression in the Heart Leads to Life-Threatening Arrhythmias. *Circulation*. 2005; 111:3025-3033. <<https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.104.503706>>.
252. Mesquita TR, Auguste G, Falcón D, Ruiz-Hurtado G, Salazar-Enciso R, Sabourin J, Lefebvre F, Viengchareun S, Kobeissy H, Lechène P, Nicolas V, Fernandez-Celis A, Gómez S, Lauton Santos S, Morel E, Rueda A, López-Andrés N, Gómez AM, Lombès M, Benitah J-P. Specific Activation of the Alternative Cardiac Promoter of *Cacna1c* by the Mineralocorticoid Receptor. *Circ Res*. 2018; 122:e49-e61. <<https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.117.312451>>.
253. Calvier L, Martinez-Martinez E, Miana M, Cachafeiro V, Rousseau E, Sádaba JR, Zannad F, Rossignol P, López-Andrés N. The impact of galectin-3 inhibition on aldosterone-

- induced cardiac and renal injuries. *JACC Heart Fail.* 2015; 3:59-67.
<<https://doi.org/10.1016/j.jchf.2014.08.002>>.
254. Martínez-Martínez E, Calvier L, Fernández-Celis A, Rousseau E, Jurado-López R, Rossoni LV, Jaisser F, Zannad F, Rossignol P, Cachofeiro V, López-Andrés N. Galectin-3 Blockade Inhibits Cardiac Inflammation and Fibrosis in Experimental Hyperaldosteronism and Hypertension Novelty and Significance. *Hypertension.* 2015; 66:767-775.
<<https://doi.org/10.1161/HYPERTENSIONAHA.115.05876>>.
255. Belliere J, Casemayou A, Ducasse L, Zakaroff-Girard A, Martins F, Iacovoni JS, Guilbeau-Frugier C, Buffin-Meyer B, Pipy B, Chauveau D, Schanstra JP, Bascands J-L. Specific macrophage subtypes influence the progression of rhabdomyolysis-induced kidney injury. *J Am Soc Nephrol.* 2015; 26:1363-1377. <<https://doi.org/10.1681/ASN.2014040320>>.
256. Clements M, Gershenovich M, Chaber C, Campos-Rivera J, Du P, Zhang M, Ledbetter S, Zuk A. Differential Ly6C Expression after Renal Ischemia-Reperfusion Identifies Unique Macrophage Populations. *J Am Soc Nephrol.* 2016; 27:159-170.
<<https://doi.org/10.1681/ASN.2014111138>>.
257. Fujii K, Manabe I, Nagai R. Renal collecting duct epithelial cells regulate inflammation in tubulointerstitial damage in mice. *J Clin Invest.* 2011; 121:3425-3441.
<<https://doi.org/10.1172/JCI57582>>.
258. Martín-Fernández B, Rubio-Navarro A, Cortegano I, Ballesteros S, Alía M, Cannata-Ortiz P, Olivares-Álvaro E, Egido J, de Andrés B, Gaspar ML, de Las Heras N, Lahera V, Moreno JA. Aldosterone Induces Renal Fibrosis and Inflammatory M1-Macrophage Subtype via Mineralocorticoid Receptor in Rats. *PLoS ONE.* 2016; 11:e0145946.
<<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0145946>>.
259. Lefebvre E, Moyle G, Reshef R, Richman LP, Thompson M, Hong F, Chou H, Hashiguchi T, Plato C, Poulin D, Richards T, Yoneyama H, Jenkins H, Wolfgang G, Friedman SL. Antifibrotic Effects of the Dual CCR2/CCR5 Antagonist Cenicriviroc in Animal Models of Liver and Kidney Fibrosis. *PLoS One.* 2016; 11. <<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0158156>>.
260. Peng X, Xiao Z, Zhang J, Li Y, Dong Y, Du J. IL-17A produced by both $\gamma\delta$ T and Th17 cells promotes renal fibrosis via RANTES-mediated leukocyte infiltration after renal obstruction. *J Pathol.* 2015; 235:79-89. <<https://doi.org/10.1002/path.4430>>.
261. Lloyd CM, Dorf ME, Proudfoot A, Salant DJ, Gutierrez-Ramos JC. Role of MCP-1 and RANTES in inflammation and progression to fibrosis during murine crescentic nephritis. *J Leukoc Biol.* 1997; 62:676-680.
262. Vielhauer V, Berning E, Eis V, Kretzler M, Segerer S, Strutz F, Horuk R, Gröne H-J, Schlöndorff D, Anders H-J. CCR1 blockade reduces interstitial inflammation and fibrosis in mice with glomerulosclerosis and nephrotic syndrome. *Kidney Int.* 2004; 66:2264-2278.
<<https://doi.org/10.1111/j.1523-1755.2004.66038.x>>.
263. Luther SA, Cyster JG. Chemokines as regulators of T cell differentiation. *Nat Immunol.* 2001; 2:102-107. <<https://doi.org/10.1038/84205>>.
264. Strutz F, Neilson EG. The role of lymphocytes in the progression of interstitial disease. *Kidney Int Suppl.* 1994; 45:S106-110.
265. Shappell SB, Gurpinar T, Lechago J, Suki WN, Truong LD. Chronic obstructive uropathy in severe combined immunodeficient (SCID) mice: lymphocyte infiltration is not required for progressive tubulointerstitial injury. *J Am Soc Nephrol.* 1998; 9:1008-1017.
266. Tapmeier TT, Fearn A, Brown K, Chowdhury P, Sacks SH, Sheerin NS, Wong W. Pivotal role of CD4+ T cells in renal fibrosis following ureteric obstruction. *Kidney International.* 2010; 78:351-362. <<https://doi.org/10.1038/ki.2010.177>>.

267. Liu L, Kou P, Zeng Q, Pei G, Li Y, Liang H, Xu G, Chen S. CD4+ T Lymphocytes, Especially Th2 Cells, Contribute to the Progress of Renal Fibrosis. *AJN*. 2012; 36:386-396. <<https://doi.org/10.1159/000343283>>.
268. Liang H, Zhang Z, Yan J, Wang Y, Hu Z, Mitch WE, Wang Y. The IL-4 receptor α has a critical role in bone marrow-derived fibroblast activation and renal fibrosis. *Kidney Int*. 2017; 92:1433-1443. <<https://doi.org/10.1016/j.kint.2017.04.021>>.
269. Peng H, Sarwar Z, Yang X-P, Peterson EL, Xu J, Janic B, Rhaleb N, Carretero OA, Rhaleb N-E. Profibrotic Role for Interleukin-4 in Cardiac Remodeling and Dysfunction. *Hypertension*. 2015; 66:582-589. <<https://doi.org/10.1161/HYPERTENSIONAHA.115.05627>>.
270. Kanellakis P, Ditiatkovski M, Kostolias G, Bobik A. A pro-fibrotic role for interleukin-4 in cardiac pressure overload. *Cardiovasc Res*. 2012; 95:77-85. <<https://doi.org/10.1093/cvr/cvs142>>.
271. Weng S-Y, Wang X, Vijayan S, Tang Y, Kim YO, Padberg K, Regen T, Molokanova O, Chen T, Bopp T, Schild H, Brombacher F, Crosby JR, McCaleb ML, Waisman A, Bockamp E, Schuppan D. IL-4 Receptor Alpha Signaling through Macrophages Differentially Regulates Liver Fibrosis Progression and Reversal. *EBioMedicine*. 2018; 29:92-103. <<https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2018.01.028>>.
272. Ong C, Wong C, Roberts CR, Teh HS, Jirik FR. Anti-IL-4 treatment prevents dermal collagen deposition in the tight-skin mouse model of scleroderma. *Eur J Immunol*. 1998; 28:2619-2629. <[https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1521-4141\(199809\)28:09<2619::AID-IMMU2619>3.0.CO;2-M](https://doi.org/10.1002/(SICI)1521-4141(199809)28:09<2619::AID-IMMU2619>3.0.CO;2-M)>.
273. Bolignano D, Donato V, Coppolino G, Campo S, Buemi A, Lacquaniti A, Buemi M. Neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL) as a marker of kidney damage. *Am J Kidney Dis*. 2008; 52:595-605. <<https://doi.org/10.1053/j.ajkd.2008.01.020>>.
274. Bolignano D, Lacquaniti A, Coppolino G, Donato V, Campo S, Fazio MR, Nicocia G, Buemi M. Neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL) and progression of chronic kidney disease. *Clin J Am Soc Nephrol*. 2009; 4:337-344. <<https://doi.org/10.2215/CJN.03530708>>.
275. Imig JD, Ryan MJ. Immune and Inflammatory Role in Renal Disease. *Compr Physiol*. 2013; 3:957-976. <<https://doi.org/10.1002/cphy.c120028>>.
276. Cheng L, Xing H, Mao X, Li L, Li X, Li Q. Lipocalin-2 Promotes M1 Macrophages Polarization in a Mouse Cardiac Ischaemia-Reperfusion Injury Model. *Scandinavian Journal of Immunology*. 2015; 81:31-38. <<https://doi.org/10.1111/sji.12245>>.
277. Nguyen VT, Farman N, Palacios-Ramirez R, Sbeih M, Behar-Cohen F, Aractingi S, Jaisser F. Cutaneous Wound Healing in Diabetic Mice Is Improved by Topical Mineralocorticoid Receptor Blockade. *Journal of Investigative Dermatology*. 2020; 140:223-234.e7. <<https://doi.org/10.1016/j.jid.2019.04.030>>.
278. Yu C, Gong R, Rifai A, Tolbert EM, Dworkin LD. Long-term, high-dosage candesartan suppresses inflammation and injury in chronic kidney disease: nonhemodynamic renal protection. *J Am Soc Nephrol*. 2007; 18:750-759. <<https://doi.org/10.1681/ASN.2006070770>>.
279. Wolf G, Ziyadeh FN, Thaiss F, Tomaszewski J, Caron RJ, Wenzel U, Zahner G, Helmchen U, Stahl RA. Angiotensin II stimulates expression of the chemokine RANTES in rat glomerular endothelial cells. Role of the angiotensin type 2 receptor. *J Clin Invest*. 1997; 100:1047-1058.
280. Krensky AM, Ahn Y-T. Mechanisms of disease: regulation of RANTES (CCL5) in renal disease. *Nat Clin Pract Nephrol*. 2007; 3:164-170. <<https://doi.org/10.1038/ncpneph0418>>.

281. Krebs C, Fraune C, Schmidt-Haupt R, Turner J-E, Panzer U, Quang MN, Tannapfel A, Velden J, Stahl RA, Wenzel UO. CCR5 deficiency does not reduce hypertensive end-organ damage in mice. *Am J Hypertens*. 2012; 25:479-486. <<https://doi.org/10.1038/ajh.2011.243>>.
282. Furuichi K, Gao J-L, Horuk R, Wada T, Kaneko S, Murphy PM. Chemokine Receptor CCR1 Regulates Inflammatory Cell Infiltration after Renal Ischemia-Reperfusion Injury. *J Immunol*. 2008; 181:8670-8676.
283. Rudemiller NP, Patel MB, Zhang J, Jeffs AD, Karlovich NS, Griffiths R, Kan MJ, Buckley AF, Gunn MD, Crowley SD. C-C Motif Chemokine 5 Attenuates Angiotensin II-Dependent Kidney Injury by Limiting Renal Macrophage Infiltration. *Am J Pathol*. 2016; 186:2846-2856. <<https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2016.07.015>>.
284. Kashyap S, Osman M, Ferguson CM, Nath MC, Roy B, Lien KR, Nath KA, Garovic VD, Lerman LO, Grande JP. Ccl2 deficiency protects against chronic renal injury in murine renovascular hypertension. *Scientific Reports*. 2018; 8:1-12. <<https://doi.org/10.1038/s41598-018-26870-y>>.
285. Yan J, Zhang Z, Yang J, Mitch WE, Wang Y. JAK3/STAT6 Stimulates Bone Marrow-Derived Fibroblast Activation in Renal Fibrosis. *JASN*. 2015; 26:3060-3071. <<https://doi.org/10.1681/ASN.2014070717>>.
286. Roselló-Lletí E, Rivera M, Bertomeu V, Cortés R, Jordán A, González-Molina A. [Interleukin-4 and cardiac fibrosis in patients with heart failure]. *Rev Esp Cardiol*. 2007; 60:777-780.
287. Pillebout E, Burtin M, Yuan HT, Briand P, Woolf AS, Friedlander G, Terzi F. Proliferation and Remodeling of the Peritubular Microcirculation after Nephron Reduction. *Am J Pathol*. 2001; 159:547-560.
288. Fanelli C, Dellê H, Cavaglieri RC, Dominguez WV, Noronha IL. Gender Differences in the Progression of Experimental Chronic Kidney Disease Induced by Chronic Nitric Oxide Inhibition. *Biomed Res Int*. 2017; 2017. <<https://doi.org/10.1155/2017/2159739>>.
289. Lima-Posada I, Portas-Cortés C, Pérez-Villalva R, Fontana F, Rodríguez-Romo R, Prieto R, Sánchez-Navarro A, Rodríguez-González GL, Gamba G, Zambrano E, Bobadilla NA. Gender Differences in the Acute Kidney Injury to Chronic Kidney Disease Transition. *Sci Rep*. 2017; 7. <<https://doi.org/10.1038/s41598-017-09630-2>>.
290. Muntner P, Anderson A, Charleston J, Chen Z, Ford V, Makos G, O'Connor A, Perumal K, Rahman M, Steigerwalt S, Teal V, Townsend R, Weir M, Wright JT, Chronic Renal Insufficiency Cohort (CRIC) Study Investigators. Hypertension awareness, treatment, and control in adults with CKD: results from the Chronic Renal Insufficiency Cohort (CRIC) Study. *Am J Kidney Dis*. 2010; 55:441-451. <<https://doi.org/10.1053/j.ajkd.2009.09.014>>.
291. Kearney PM, Whelton M, Reynolds K, Muntner P, Whelton PK, He J. Global burden of hypertension: analysis of worldwide data. *Lancet*. 2005; 365:217-223. <[https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(05\)17741-1](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(05)17741-1)>.
292. Bidani AK, Griffin KA. Pathophysiology of hypertensive renal damage: implications for therapy. *Hypertension*. 2004; 44:595-601. <<https://doi.org/10.1161/01.HYP.0000145180.38707.84>>.
293. Kestenbaum B, Rudser KD, de Boer IH, Peralta CA, Fried LF, Shlipak MG, Palmas W, Stehman-Breen C, Siscovick DS. Differences in kidney function and incident hypertension: the multi-ethnic study of atherosclerosis. *Ann Intern Med*. 2008; 148:501-508. <<https://doi.org/10.7326/0003-4819-148-7-200804010-00006>>.
294. Brantsma AH, Bakker SJL, de Zeeuw D, de Jong PE, Gansevoort RT. Urinary albumin

- excretion as a predictor of the development of hypertension in the general population. *J Am Soc Nephrol*. 2006; 17:331-335. <<https://doi.org/10.1681/ASN.2005111153>>.
295. Kone BC, Baylis C. Biosynthesis and homeostatic roles of nitric oxide in the normal kidney. *Am J Physiol*. 1997; 272:F561-578. <<https://doi.org/10.1152/ajprenal.1997.272.5.F561>>.
296. Hayakawa H, Raij L. Nitric oxide synthase activity and renal injury in genetic hypertension. *Hypertension*. 1998; 31:266-270. <<https://doi.org/10.1161/01.hyp.31.1.266>>.
297. Mattson DL, Higgins DJ. Influence of dietary sodium intake on renal medullary nitric oxide synthase. *Hypertension*. 1996; 27:688-692. <<https://doi.org/10.1161/01.hyp.27.3.688>>.
298. Mattson DL, Meister CJ. Sodium Sensitivity of Arterial Blood Pressure in L-NAME Hypertensive but not eNOS Knockout Mice. *Am J Hypertens*. 2006; 19:327-329. <<https://doi.org/10.1016/j.amjhyper.2005.09.012>>.
299. Yamada SS, Sasaki AL, Fujihara CK, Malheiros DM, De Nucci G, Zatz R. Effect of salt intake and inhibitor dose on arterial hypertension and renal injury induced by chronic nitric oxide blockade. *Hypertension*. 1996; 27:1165-1172. <<https://doi.org/10.1161/01.hyp.27.5.1165>>.
300. Matsui H, Ando K, Kawarazaki H, Nagae A, Fujita M, Shimosawa T, Nagase M, Fujita T. Salt excess causes left ventricular diastolic dysfunction in rats with metabolic disorder. *Hypertension*. 2008; 52:287-294. <<https://doi.org/10.1161/HYPERTENSIONAHA.108.111815>>.
301. Nagase M, Matsui H, Shibata S, Gotoda T, Fujita T. Salt-induced nephropathy in obese spontaneously hypertensive rats via paradoxical activation of the mineralocorticoid receptor: role of oxidative stress. *Hypertension*. 2007; 50:877-883. <<https://doi.org/10.1161/HYPERTENSIONAHA.107.091058>>.
302. Malyszko J, Bachorzewska-Gajewska H, Malyszko JS, Pawlak K, Dobrzycki S. Serum neutrophil gelatinase-associated lipocalin as a marker of renal function in hypertensive and normotensive patients with coronary artery disease. *Nephrology (Carlton)*. 2008; 13:153-156. <<https://doi.org/10.1111/j.1440-1797.2007.00899.x>>.
303. Park CG, Choi KM. Lipocalin-2, A-FABP and inflammatory markers in relation to flow-mediated vasodilatation in patients with essential hypertension. *Clin Exp Hypertens*. 2014; 36:478-483. <<https://doi.org/10.3109/10641963.2013.863320>>.
304. Wang Y, Lam KSL, Kraegen EW, Sweeney G, Zhang J, Tso AWK, Chow W-S, Wat NMS, Xu JY, Hoo RLC, Xu A. Lipocalin-2 is an inflammatory marker closely associated with obesity, insulin resistance, and hyperglycemia in humans. *Clin Chem*. 2007; 53:34-41. <<https://doi.org/10.1373/clinchem.2006.075614>>.
305. Wieser V, Tymoszuk P, Adolph TE, Grander C, Grabherr F, Enrich B, Pfister A, Lichtmanegger L, Gerner R, Drach M, Moser P, Zoller H, Weiss G, Moschen AR, Theurl I, Tilg H. Lipocalin 2 drives neutrophilic inflammation in alcoholic liver disease. *J Hepatol*. 2016; 64:872-880. <<https://doi.org/10.1016/j.jhep.2015.11.037>>.
306. Shao S, Fang H, Dang E, Xue K, Zhang J, Li B, Qiao H, Cao T, Zhuang Y, Shen S, Zhang T, Qiao P, Li C, Gudjonsson JE, Wang G. Neutrophil Extracellular Traps Promote Inflammatory Responses in Psoriasis via Activating Epidermal TLR4/IL-36R Crosstalk. *Front Immunol*. 2019; 10. <<https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.00746>>.
307. Folkesson M, Kazi M, Zhu C, Silveira A, Hemdahl A-L, Hamsten A, Hedin U, Swedenborg J, Eriksson P. Presence of NGAL/MMP-9 complexes in human abdominal aortic aneurysms. *Thromb Haemost*. 2007; 98:427-433.

308. Ramos-Mozo P, Madrigal-Matute J, Vega de Ceniga M, Blanco-Colio LM, Meilhac O, Feldman L, Michel J-B, Clancy P, Golledge J, Norman PE, Egido J, Martín-Ventura JL. Increased plasma levels of NGAL, a marker of neutrophil activation, in patients with abdominal aortic aneurysm. *Atherosclerosis*. 2012; 220:552-556. <<https://doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2011.11.023>>.
309. Tarín C, Fernandez-Garcia CE, Burillo E, Pastor-Vargas C, Llamas-Granda P, Castejón B, Ramos-Mozo P, Torres-Fonseca MM, Berger T, Mak TW, Egido J, Blanco-Colio LM, Martín-Ventura JL. Lipocalin-2 deficiency or blockade protects against aortic abdominal aneurysm development in mice. *Cardiovasc Res*. 2016; 111:262-273. <<https://doi.org/10.1093/cvr/cvw112>>.
310. Saha P, Singh V, Xiao X, Yeoh BS, Vijay-Kumar M. Data on importance of hematopoietic cell derived Lipocalin 2 against gut inflammation. *Data Brief*. 2016; 8:812-816. <<https://doi.org/10.1016/j.dib.2016.06.047>>.
311. Yang J, Bielenberg DR, Rodig SJ, Doiron R, Clifton MC, Kung AL, Strong RK, Zurakowski D, Moses MA. Lipocalin 2 promotes breast cancer progression. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2009; 106:3913-3918. <<https://doi.org/10.1073/pnas.0810617106>>.
312. Duan X, He K, Li J, Cheng M, Song H, Liu J, Liu P. Tumor associated macrophages deliver iron to tumor cells via Lcn2. *Int J Physiol Pathophysiol Pharmacol*. 2018; 10:105-114.
313. Leng X, Ding T, Lin H, Wang Y, Hu L, Hu J, Feig B, Zhang W, Pusztai L, Symmans WF, Wu Y, Arlinghaus RB. Inhibition of Lipocalin 2 Impairs Breast Tumorigenesis and Metastasis. *Cancer Res*. 2009; 69:8579-8584. <<https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-09-1934>>.
314. Mattiazzi A, Kranias E. The role of CaMKII regulation of phospholamban activity in heart disease. *Front Pharmacol*. 2014; 5. <<https://doi.org/10.3389/fphar.2014.00005>>.
315. Bienvenu LA, Reichelt ME, Morgan J, Fletcher EK, Bell JR, Rickard AJ, Delbridge LM, Young MJ. Cardiomyocyte Mineralocorticoid Receptor Activation Impairs Acute Cardiac Functional Recovery After Ischemic Insult. *Hypertension*. 2015; 66:970-977. <<https://doi.org/10.1161/HYPERTENSIONAHA.115.05981>>.
316. Ahmed A, Rich MW, Sanders PW, Perry GJ, Bakris GL, Zile MR, Love TE, Aban IB, Shlipak MG. Chronic Kidney Disease Associated Mortality in Diastolic Versus Systolic Heart Failure: A Propensity Matched Study. *Am J Cardiol*. 2007; 99:393-398. <<https://doi.org/10.1016/j.amjcard.2006.08.042>>.
317. Primessnig U, Schönleitner P, Höll A, Pfeiffer S, Bracic T, Rau T, Kapl M, Stojakovic T, Glasnov T, Leineweber K, Wakula P, Antoons G, Pieske B, Heinzel FR. Novel pathomechanisms of cardiomyocyte dysfunction in a model of heart failure with preserved ejection fraction. *Eur J Heart Fail*. 2016; 18:987-997. <<https://doi.org/10.1002/ejhf.524>>.
318. Beldhuis IE, Myhre PL, Claggett B, Damman K, Fang JC, Lewis EF, O'Meara E, Pitt B, Shah SJ, Voors AA, Pfeffer MA, Solomon SD, Desai AS. Efficacy and Safety of Spironolactone in Patients With HFpEF and Chronic Kidney Disease. *JACC: Heart Failure*. 2019; 7:25-32. <<https://doi.org/10.1016/j.jchf.2018.10.017>>.
319. Communications BA. Bayer extends clinical development program for finerenone with Phase III study in patients with heart failure and preserved ejection fraction. Bayer extends clinical development program for finerenone with Phase III study in patients with heart failure and preserved ejection fraction. <http://media.bayer.com/baynews/baynews.nsf/id/Bayer-extends-clinical-development-program-finerenone-Phase-III-study-patients-heart-failure>. Accessed July 7, 2020.
320. de Boer IH, Zelnick L, Afkarian M, Ayers E, Curtin L, Himmelfarb J, Ikizler TA, Kahn SE, Kestenbaum B, Utzschneider K. Impaired Glucose and Insulin Homeostasis in Moderate-

- Severe CKD. *J Am Soc Nephrol*. 2016; 27:2861-2871.
<<https://doi.org/10.1681/ASN.2015070756>>.
321. Keane WF, Tomassini JE, Neff DR. Lipid abnormalities in patients with chronic kidney disease: implications for the pathophysiology of atherosclerosis. *J Atheroscler Thromb*. 2013; 20:123-133. <<https://doi.org/10.5551/jat.12849>>.
322. Xiang DM, Song XZ, Zhou ZM, Liu Y, Dai XY, Huang XL, Hou FF, Zhou QG. Chronic kidney disease promotes chronic inflammation in visceral white adipose tissue. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2017; 312:F689-F701. <<https://doi.org/10.1152/ajprenal.00584.2016>>.
323. Vaziri ND. Disorders of lipid metabolism in nephrotic syndrome: mechanisms and consequences. *Kidney Int*. 2016; 90:41-52. <<https://doi.org/10.1016/j.kint.2016.02.026>>.
324. Werder AA, Amos MA, Nielsen AH, Wolfe GH. Comparative effects of germfree and ambient environments on the development of cystic kidney disease in CFWwd mice. *J Lab Clin Med*. 1984; 103:399-407.
325. Vaziri ND, Wong J, Pahl M, Piceno YM, Yuan J, DeSantis TZ, Ni Z, Nguyen T-H, Andersen GL. Chronic kidney disease alters intestinal microbial flora. *Kidney International*. 2013; 83:308-315. <<https://doi.org/10.1038/ki.2012.345>>.
326. Tang WHW, Wang Z, Levison BS, Koeth RA, Britt EB, Fu X, Wu Y, Hazen SL. Intestinal microbial metabolism of phosphatidylcholine and cardiovascular risk. *N Engl J Med*. 2013; 368:1575-1584. <<https://doi.org/10.1056/NEJMoa1109400>>.
327. Xu K-Y, Xia G-H, Lu J-Q, Chen M-X, Zhen X, Wang S, You C, Nie J, Zhou H-W, Yin J. Impaired renal function and dysbiosis of gut microbiota contribute to increased trimethylamine-N-oxide in chronic kidney disease patients. *Sci Rep*. 2017; 7:1445. <<https://doi.org/10.1038/s41598-017-01387-y>>.
328. Magnusson M, Magnusson KE, Sundqvist T, Denneberg T. Increased intestinal permeability to differently sized polyethylene glycols in uremic rats: effects of low- and high-protein diets. *Nephron*. 1990; 56:306-311.
329. Magnusson M, Magnusson KE, Sundqvist T, Denneberg T. Impaired intestinal barrier function measured by differently sized polyethylene glycols in patients with chronic renal failure. *Gut*. 1991; 32:754-759.
330. Duarte JB de A, Aguilar-Nascimento JE de, Nascimento M, Nochi RJ. Bacterial translocation in experimental uremia. *Urol Res*. 2004; 32:266-270. <<https://doi.org/10.1007/s00240-003-0381-7>>.
331. Ito S, Yoshida M. Protein-bound uremic toxins: new culprits of cardiovascular events in chronic kidney disease patients. *Toxins (Basel)*. 2014; 6:665-678. <<https://doi.org/10.3390/toxins6020665>>.
332. Sun C-Y, Chang S-C, Wu M-S. Uremic toxins induce kidney fibrosis by activating intrarenal renin-angiotensin-aldosterone system associated epithelial-to-mesenchymal transition. *PLoS ONE*. 2012; 7:e34026. <<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0034026>>.
333. Kikuchi M, Ueno M, Itoh Y, Suda W, Hattori M. Uremic Toxin-Producing Gut Microbiota in Rats with Chronic Kidney Disease. *NEF*. 2017; 135:51-60. <<https://doi.org/10.1159/000450619>>.
334. Moret  M, Cristi  E, Pérez-Bosque A, Afzal-Ahmed I, Amat C, Naftalin RJ. Aldosterone reduces crypt colon permeability during low-sodium adaptation. *J Membr Biol*. 2005; 206:43-51. <<https://doi.org/10.1007/s00232-005-0772-5>>.
335. Cristi  E, Afzal-Ahmed I, Pérez-Bosque A, Amat C, Naftalin RJ, Moret  M. Pericryptal myofibroblast growth in rat descending colon induced by low-sodium diets is mediated by aldosterone and not by angiotensin II. *J Membr Biol*. 2005; 206:53-59.

<<https://doi.org/10.1007/s00232-005-0773-4>>.

336. Miró L, Pérez-Bosque A, Maijó M, Amat C, Naftalin RJ, Moretó M. Aldosterone induces myofibroblast EGF secretion to regulate epithelial colonic permeability. *Am J Physiol, Cell Physiol*. 2013; 304:C918-926. <<https://doi.org/10.1152/ajpcell.00292.2012>>.
337. Yang T, Richards EM, Pepine CJ, Raizada MK. The gut microbiota and the brain-gut-kidney axis in hypertension and chronic kidney disease. *Nat Rev Nephrol*. 2018; 14:442-456. <<https://doi.org/10.1038/s41581-018-0018-2>>.
338. Basile DP, Collett JA, Yoder MC. Endothelial colony-forming cells and pro-angiogenic cells: clarifying definitions and their potential role in mitigating acute kidney injury. *Acta Physiol (Oxf)*. 2018; 222. <<https://doi.org/10.1111/apha.12914>>.
339. Basile DP. The endothelial cell in ischemic acute kidney injury: implications for acute and chronic function. *Kidney Int*. 2007; 72:151-156. <<https://doi.org/10.1038/sj.ki.5002312>>.
340. Basile DP, Friedrich JL, Spahic J, Knipe N, Mang H, Leonard EC, Changizi-Ashtiyani S, Bacallao RL, Molitoris BA, Sutton TA. Impaired endothelial proliferation and mesenchymal transition contribute to vascular rarefaction following acute kidney injury. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2011; 300:F721-733. <<https://doi.org/10.1152/ajprenal.00546.2010>>.
341. Huen SC, Huynh L, Marlier A, Lee Y, Moeckel GW, Cantley LG. GM-CSF Promotes Macrophage Alternative Activation after Renal Ischemia/Reperfusion Injury. *J Am Soc Nephrol*. 2015; 26:1334-1345. <<https://doi.org/10.1681/ASN.2014060612>>.
342. Wang Y, Chang J, Yao B, Niu A, Kelly E, Breeggemann MC, Abboud Werner SL, Harris RC, Zhang M-Z. Proximal tubule-derived colony stimulating factor-1 mediates polarization of renal macrophages and dendritic cells, and recovery in acute kidney injury. *Kidney Int*. 2015; 88:1274-1282. <<https://doi.org/10.1038/ki.2015.295>>.
343. Cruz-Solbes AS, Youker K. Epithelial to Mesenchymal Transition (EMT) and Endothelial to Mesenchymal Transition (EndMT): Role and Implications in Kidney Fibrosis. *Results Probl Cell Differ*. 2017; 60:345-372. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-51436-9_13>.
344. Jang Y, Lee JH, Wang Y, Sweeney G. Emerging clinical and experimental evidence for the role of lipocalin-2 in metabolic syndrome. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 2012; 39:194-199. <<https://doi.org/10.1111/j.1440-1681.2011.05557.x>>.
345. Sommer G, Weise S, Kralisch S, Lossner U, Blüher M, Stumvoll M, Fasshauer M. Lipocalin-2 is induced by interleukin-1beta in murine adipocytes in vitro. *J Cell Biochem*. 2009; 106:103-108. <<https://doi.org/10.1002/jcb.21980>>.
346. Zhao P, Elks CM, Stephens JM. The induction of lipocalin-2 protein expression in vivo and in vitro. *J Biol Chem*. 2014; 289:5960-5969. <<https://doi.org/10.1074/jbc.M113.532234>>.
347. Guo H, Jin D, Zhang Y, Wright W, Bazuine M, Brockman DA, Bernlohr DA, Chen X. Lipocalin-2 deficiency impairs thermogenesis and potentiates diet-induced insulin resistance in mice. *Diabetes*. 2010; 59:1376-1385. <<https://doi.org/10.2337/db09-1735>>.
348. Law IKM, Xu A, Lam KSL, Berger T, Mak TW, Vanhoutte PM, Liu JTC, Sweeney G, Zhou M, Yang B, Wang Y. Lipocalin-2 deficiency attenuates insulin resistance associated with aging and obesity. *Diabetes*. 2010; 59:872-882. <<https://doi.org/10.2337/db09-1541>>.

ANNEXES

Publications

- 1- **Bonnard B**, Pieronne-Deperrois M, Djerada Z, Elmoghrabi S, Kolkhof P, Ouvrard-Pascaud A, Mulder P, Jaisser F, Messaoudi S. Mineralocorticoid receptor antagonism improves diastolic dysfunction in chronic kidney disease in mice. *J Mol Cell Cardiol.* 2018 Aug;121:124-133. doi: 10.1016/j.yjmcc.2018.06.008. Epub 2018 Jul 6. PMID: 29981797
- 2- Buonafine M, **Bonnard B**, Jaisser F. Mineralocorticoid Receptor and Cardiovascular Disease. *Am J Hypertens.* 2018 Oct 15;31(11):1165-1174. doi: 10.1093/ajh/hpy120. PMID: 30192914 Review.
- 3- Tarjus A, González-Rivas C, Amador-Martínez I, **Bonnard B**, López-Marure R, Jaisser F, Barrera-Chimal J. The Absence of Endothelial Sodium Channel α (α ENaC) Reduces Renal Ischemia/Reperfusion Injury. *Int J Mol Sci.* 2019 Jun 27;20(13):3132. doi: 10.3390/ijms20133132. PMID: 31252520
- 4- Canonica J, Mehanna C, **Bonnard B**, Jonet L, Gelize E, Jais JP, Jaisser F, Zhao M, Behar-Cohen F. Effect of acute and chronic aldosterone exposure on the retinal pigment epithelium-choroid complex in rodents. *Exp Eye Res.* 2019 Oct;187:107747. doi: 10.1016/j.exer.2019.107747. Epub 2019 Aug 5. PMID: 31394103
- 5- Ibarrola J, Garcia-Peña A, Matilla L, **Bonnard B**, Sádaba R, Arrieta V, Alvarez V, Fernández-Celis A, Gainza A, Navarro A, Alvarez de la Rosa D, Rossignol P, Jaisser F, López-Andrés N. A New Role for the Aldosterone/Mineralocorticoid Receptor Pathway in the Development of Mitral Valve Prolapse. *Circ Res.* 2020 Jul 17;127(3):e80-e93. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.119.316427. Epub 2020 Apr 24. PMID: 32329663
- 6- Ibarrola J, Garaikoetxea M, Garcia-Peña A, Matilla L, Jover E, **Bonnard B**, Cuesta M, Fernández-Celis A, Jaisser F, López-Andrés N. Beneficial Effects of Mineralocorticoid Receptor Antagonism on Myocardial Fibrosis in an Experimental Model of the Myxomatous Degeneration of the Mitral Valve. *Int J Mol Sci.* 2020 Jul 28;21(15):E5372. doi: 10.3390/ijms21155372.
- 7- **Bonnard B**, Martínez-Martínez E, Fernández-Celis A, Do QT, Ramos I, Rossignol P, Faiez Z, Mulder P, Ouvrard-Pascaud A, López-Andrés N, Jaisser F. Antifibrotic effect of novel neutrophil gelatinase-associated lipocalin inhibitors in cardiac and renal disease models. *Soumis*
- 8- **Bonnard B**, Genty M, Ibarrola J, Fernández-Celis A, López-Andrés N, Jaisser F. Neutrophil Gelatinase-Associated Lipocalin has a critical role in aldosterone-induced renal fibrosis via the macrophages-CCL5-IL4 pathways. *Soumission automne 2020*



Mineralocorticoid receptor antagonism improves diastolic dysfunction in chronic kidney disease in mice



Benjamin Bonnard^a, Marie Pieronne-Deperrois^{b,1}, Zoubir Djerada^{b,1}, Soumaya Elmoghrabi^a, Peter Kolkhof^c, Antoine Ouvrard-Pascaud^b, Paul Mulder^b, Frédéric Jaisser^{a,d,*}, Smail Messaoudi^a

^a Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale Inserm U1138, Cordeliers Institute, Paris VI-University, Paris, France

^b Normandie Univ, UNIROUEN, INSERM U1096, FHU-REMOD-VHF, Rouen, France

^c Cardiology Research, Bayer AG, Wuppertal, Germany

^d Inserm, Clinical Investigation Centre 1433, Vandoeuvre-lès-Nancy, France

ARTICLE INFO

Keywords:

Mineralocorticoid receptor
Finerenone
Cardio-renal syndrome
Diastolic dysfunction

ABSTRACT

Managing the cardiovascular complications of renal failure is a major therapeutic challenge in clinical practice. Mineralocorticoid Receptor (MR) blockade is a highly effective strategy for the management of heart failure, but the use of MR antagonists (MRA) is limited by their side effects rendering them contraindicated in patients with renal failure. Finerenone is a new non-steroidal MRA that shows fewer hyperkalaemic events than the traditional steroidal MRAs and could therefore represent an alternative to these molecules in patients with damaged kidney function. The aim of this study is to characterize the effects of Finerenone on the cardiac complications of renal failure in a mouse model of chronic kidney disease (CKD). CKD was induced by subtotal nephrectomy (Nx), and finerenone was administered at a low dose (2.5 mg/kg/d) from week 4 to week 10 post-Nx. Cardiac function was assessed by echocardiography and invasive hemodynamics while cardiac fibrosis was measured by Sirius Red staining. Renal failure induced cardiac systolic and diastolic dysfunctions in the untreated CKD mice, as well as minor changes on cardiac structure. We also observed alterations in the phosphorylation of proteins playing key roles in the calcium handling (Phospholamban, Calmodulin kinase II) in these mice. Finerenone prevented most of these lesions with no effects on neither the renal dysfunction nor kaliemia. The benefits of finerenone suggest that activation of MR is involved in the cardiac complication of renal failure and strengthen previous studies showing beneficial effects of MRA in patients with CKD.

1. Introduction

Cardiovascular diseases (CVD) are the first cause of death worldwide [1]. Although the mortality and morbidity of CVD are in constant decrease, certain populations still exhibit a high rate of CVD mortality such as those associating CVD and non-cardiac comorbidities [2]. This situation is particularly frequent in the elderly population and its prevalence is increasing with the increase in life expectancy [3].

Heart failure (HF) and renal dysfunction frequently coexist (about 30% of patients with HF have chronic kidney disease-CKD), a situation known as the cardio-renal syndrome (CRS) [4]. Renal dysfunction is a major cardiovascular (CV) risk factor and a powerful independent predictor of poor outcomes in CVD. Indeed, in patients with HF, glomerular filtration rate (GFR) is a stronger predictor of mortality than left ventricular ejection fraction or NYHA functional class [5], and both

elevated serum creatinine on admission and worsening creatinine during hospitalization for HF predict prolonged hospitalization, re-hospitalisation, and death [6]. Patients with renal failure are at strikingly higher risk for CV complications and death resulting from cardiac causes compared to individuals with normal GFR [7]. In fact, patients with primary renal disease are more likely to die of CV complications rather than renal failure itself. Despite the progress accomplished, managing the cardiovascular complications of CKD remains a major therapeutic challenge in clinical practice as many of the drugs used to control HF can worsen renal function [8].

Mineralocorticoid Receptor (MR) blockade is a highly effective strategy for the management of HF. Large-scale randomized clinical trials have demonstrated that MR antagonists (MRAs) are particularly efficient in decreasing mortality and morbidity in patients with severe HF [9], post-myocardial infarction [10] and moderate HF [11].

* Corresponding author at: Centre de recherche des Cordeliers, Inserm U1138, 15 rue de l'école de médecine, France.

E-mail address: frederic.jaisser@inserm.fr (F. Jaisser).

¹ Equally contributed.

Experimentally, MR antagonism limits the transition to HF in models of systolic left ventricular dysfunction, myocardial infarction, and diastolic dysfunction [12]. In mice, chronic activation of the MR in the setting of high salt intake causes cardiac oxidative stress, inflammation and fibrosis [12]. These effects are prevented by MRAs in most models. Despite their benefits, the use of MRAs is limited by their side effects such as hyperkalaemia, rendering them contraindicated in patients with renal failure unless a strict management is applied. Finerenone is a new non-steroidal MRA [13] that shows a good tolerability in patients with damaged kidney function and could thus represent an alternative to traditional steroidal MRAs (spironolactone and eplerenone) in these patients [14].

The aim of this study is therefore to characterize the effects of MR blockade (finerenone) on the cardiac complications of renal failure in a mouse model of CKD. We report here that low dose of finerenone prevents CKD-induced cardiac dysfunction (systolic and diastolic) and fibrosis, despite similar renal dysfunction. We also show that finerenone prevented the CKD-induced cardiac changes in the activation of key proteins of calcium handling.

2. Materials and methods

2.1. Animals

All the experiments carried on mice were approved by the institutional animal care and use committee of the Centre de Recherche des Cordeliers (CRC) and according to the ethical guidelines of the Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale for the care and use of laboratory animals. The mice (six-weeks-old wild-type B6D2 male) were purchased from Janvier Labs and were housed in the CRC accredited facility with constant room temperature, a 12-h light/dark cycle, and $50 \pm 5\%$ humidity, as well as standard mouse chow and water ad libitum. Three experimental groups were constituted: Sham mice, nephrectomised mice (CKD) and finerenone-treated nephrectomised (CKD-F) mice. Twenty-eight to thirty mice were included in each group (Fig. 1).

2.2. Subtotal nephrectomy

Chronic kidney disease (CKD) was induced by subtotal nephrectomy (Nx) in eight-weeks-old male mice (25–26 g). All surgeries were performed under ketamine /xylazine anaesthesia. Briefly, the left kidney was exposed, and the upper and lower poles were tied with a poly-

glycolic acid suture line. The peritoneum and skin were then sutured, and the animals were returned to their individual cages. After one week of recovery, the second kidney was removed. Removal of the second kidney represents T0. Sham mice were subjected to the same surgical procedures but neither renal poles nor the right kidney were removed. Mice were monitored for any sign of distress, and those observed to be experiencing severe, unrelievable pain were euthanized. Renal failure was assessed by the measure of plasma creatinine and urea with an automatic analyser (Konelab 20i; Thermo Fisher Scientific, Vernon Hills, IL) at weeks 4 and 10 post-Nx.

2.3. Finerenone administration

Finerenone (provided by BAYER AC) was incorporated in regular chow (A04) at the dose of 1.35 mg finerenone/g of chow to achieve a low dose of 2 mg/kg/d of finerenone administered to the mice (based on a daily consumption of 4 g of chow, measured by metabolic cages on a pilot study). Four weeks after the Nx, CKD mice were divided based on their creatinemia and uremia into two groups of similar renal function: untreated (CKD) and finerenone-treated mice (CKD-F). Finerenone was administered for six weeks from week 4 to week 10.

2.4. Blood Pressure (BP) measurement

Systolic and diastolic BP was measured by tail-cuff plethysmography in trained conscious mice at weeks 8–10 using a BP2000 Visitech model. BP was measured every day in the same room at the same hour for 5 consecutive days. The BP measurements presented are the averages of the last 3 days.

2.5. Metabolic cages

Between weeks 8–10 post-Nx, the mice were kept in metabolic cages for 5 consecutive days. Urine was collected every 24h for the last 3 days, and food and water consumption were measured.

2.6. Echocardiography and cardiac catheterism

Transthoracic echocardiography studies (Doppler and M-mode) were performed, in animal anesthetized with isoflurane (1 to 2%), using a Vivid 7 ultrasound device (GE medical) with a RMV 707 12-MHz transducer at week 8 post-Nx. The heart was analysed in the two-dimensional mode in the parasternal short-axis view. LV fractional

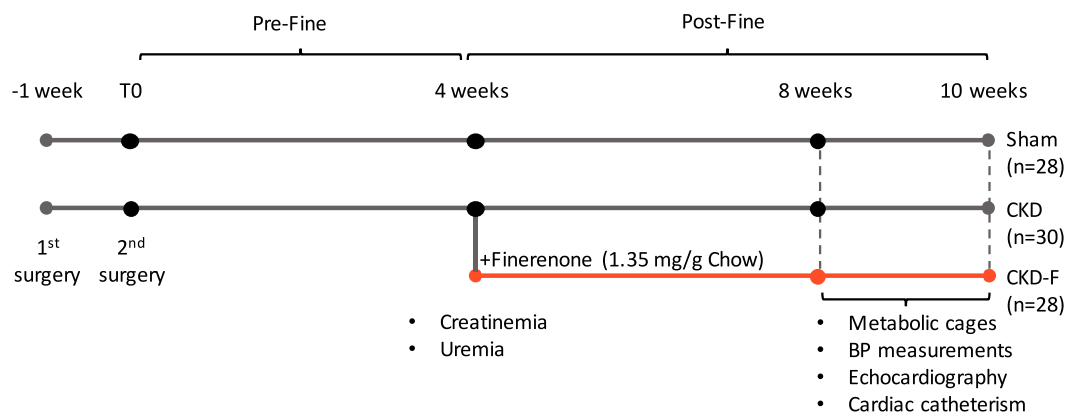


Fig. 1. Experimental timeline. Eight-weeks-old male mice were subjected to a subtotal nephrectomy performed in two distinct steps: the 2/3rd of the left kidney were first removed (1st surgery) and the right kidney was ablated one week later (2nd surgery). The 2nd surgery represents T0. Sham mice were subjected to the same surgical procedures but neither the renal poles nor the right kidney were removed. At week 4, creatinemia and uremia were measured. Measurements made in this interval (0–4 weeks) are referred as Pre-Fine. Based on their creatinemia and uremia, the CKD mice were then divided into 2 sub-groups of similar renal function. The first sub-group remained untreated (CKD), whereas the second sub-group received finerenone incorporated in A04 chow (1.35 mg finerenone/g chow) and is referred to as CKD-F. All functional explorations were performed between weeks 8 and 10. Mice were euthanized at week 10. The number of total animals used in each group is referred as n. This value does not represent the number of animals used for each parameter measured.

Table 1
Primers list and sequences.

Primers	Forward	Reverse
Reference genes		
<i>18S</i>	CgCCgCTAgAggTgAAATTC	TCTTggCAAATgCITTCgC
<i>gapdh</i> (GAPDH)	gTggCAAAGTggAgATTgTCC	gATgATgACCCgTTTggCTCC
<i>Hprt</i> (HPRT)	TCTAACTTTAACTggAAAgAATgTC	TCCTTTTCACCAgCAAAGCT
<i>Ubc</i> (UBC)	CggAgTCgCCgAggTCACA	gggCTCgAACCTCCAggTgAT
Target genes		
<i>Acta2</i> (α SMA)	TgTgCTggACTCTggAgATg	gAAggAATAgCCACgCTCAG
<i>Ccl2</i> (MCP1)	ATCCCAATgAgTAggCTggAgAgC	CAGAAgTgCTTgAggTggTTgTg
<i>Col1a1</i> (COL1)	CCCCgggACTCCTggACTT	gCTCCgACACgCCCTCTCTC
<i>Col3a1</i> (COL3)	CTggAgCCCCTggACTAATAg	gCCCATTTgCACCAggTTCT
<i>Lcn2</i> (LCN2)	ggACCAgggCTgTCgCTACT	ggTggCCACTTgCACATTgT
<i>Nov</i> (NOV)	ACAaggAATCgCCAgTgTgAg	AgggATTCTTgTgCgAgg
<i>Nppa</i> (ANF)	CTCgTCTTggCCTTTTgg	TCggggAgggAgCTAAgT
<i>Nppb</i> (BNP)	AgACCCAggCAGAgTCAGAA	AgCTCTTgAAggACCAAgg
<i>Tgfb1</i> (TGF β)	TgCgCTTgCAGAgATTA AAA	CTgCCgTACAACCTCCAgTgA

18S: 18S ribosomal RNA; *Gapdh*: glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase; *Hprt*: hypoxanthine guanine phosphoribosyl transferase; *Ubc*: Ubiquitin C; *Acta2*: Alpha Smooth Muscle Actin; *Ccl2*: C–C motif Chemokine ligand 2; *Col1a1*: Collagen type 1 alpha 1 chain; *Col3a1*: Collagen type 3 alpha 1 chain; *Lcn2*: Lipocalin 2; *Tgfb1*: transforming growth factor β .

shortening and ejection fraction were calculated using M mode imaging. To obtain heart rate (HR) and velocity time integral (VTI), a pulsed Doppler of the LV outflow was performed, allowing the calculation of stroke volume ($SV = \pi \times LV \text{ outflow radius}^2 \times VTI$) and cardiac output ($CO = SV \times HR$). LV outflow radius was fixed as a constant (1.6 mm), due to the use of an echocardiographic transducer that does not allow confident measurements of the diameter [15,16].

Doppler measurements were made at the tip of the mitral leaflets for diastolic filling profiles in the apical four-chamber view to determine peak early (E) and late (A) mitral inflow velocities, and calculation of the E/A ratio.

LV hemodynamics was assessed as described previously. Mice were anesthetized (Inactin 60 mg/kg, IP) and the carotid artery cannulated with a pressure-volume catheter (SPR839, Millar-Instruments, USA) to record arterial pressure and heart rate, after which the catheter was advanced into the LV. Pressure-volume loops were obtained at baseline and during loading by gently occluding the abdominal aorta. LV end-systolic and end-diastolic pressures were measured, and LV end-systolic and end-diastolic pressure-volume relations were calculated with IOX™ software (EMKA, France).

2.7. Tissue and blood sampling

Hearts and kidneys were harvested at sacrifice (week 10) and rinsed in ice-cold PBS. The hearts were weighed and cut into two parts (transversal cut). The base was fixed in 4% formaldehyde for histological studies. The apex was kept for mRNA and protein studies. Kidneys were weighed and cut transversally into two parts, one for mRNA or protein extraction and the second part for histology (fixed in 4% formaldehyde). All non-fixed samples were frozen in liquid nitrogen, and kept at -80°C .

At sacrifice, blood was collected in heparinized tubes and plasma was isolated by centrifugation (1000 g, 15 min). Plasma was stored at -80°C . Potassium was measured using an ABL80 FLEX blood-gas analyser (Radiometer, France).

2.8. Histology and immunofluorescence

For histology, hearts and kidneys, fixed in 4% paraformaldehyde, were embedded in paraffin and sectioned at 8- μm interval. Masson's trichrome and Sirius red stainings were then performed to assess renal and cardiac fibrosis respectively.

For immunofluorescence, transverse cardiac 8- μm sections were stained using a primary antibody against vinculin (Sigma, V9131, dilution: 1/100). Sections were blocked with 5% BSA for 30 min and

incubated with the primary antibody overnight at room temperature. After rinsing with PBS, the sections were incubated for 1 h with the appropriate secondary antibody (Goat anti-mouse IGG1 secondary antibody, Alexa Fluor 488 conjugate—Life technologies, ref. A-21121, dilution: 1/250).

Images were acquired blindly with a Leica DM4000B Microscope mounted with Leica DFC420 camera. A minimum of five fields per section was recorded at $\times 10$ for fibrosis and $\times 20$ for vinculin. Fibrosis and cardiomyocytes areas were determined using imageJ (1.43) software.

2.9. qPCR

Frozen tissues (kidneys, heart) were homogenized in TRIzol (Life Technologies, 15,596,018) using FastPrep beads (MP-Bio, 6913-100). cDNAs were generated using the Superscript II reverse transcriptase kit (Invitrogen, 18,064,022), and qPCR was performed as previously described. Briefly, transcript levels were analysed in a CFX396 apparatus (Biorad). The reactions were performed in duplicate for each sample using the IQ SYBR Green supermix Kit (Biorad, 170–8882). To normalize gene expression, we used the geometric mean of multiple internal reference genes (*RS16*, *Ubc*, *Hprt* and *Gapdh* for mice experiments) as described by Vandesompele et al. [17]. Values in control conditions were set as 1 for each gene. The sequences of the specific primers are detailed in Table 1.

2.10. Western blot

Cardiac proteins were extracted in SDS 1% buffer containing PhosSTOP phosphatases inhibitor (Roche, 04906845001) and cOmplete protease inhibitor (Roche, 04693116001) reagents. Protein concentration was estimated according to the Pierce method. Membranes were incubated overnight (4°C) with the respective antibodies: Ryanodine2 (Alomone, ref. ARR-002, dilution: 1/1000), phospholamban (ThermoFisher Scientific, MA3-922, dilution: 1/1000), phospho-phospholamban-ser16/thr17 (Cell Signalling, ref. 8496, dilution: 1/500), phospho-CamKII-Thr286 (Cell Signalling, ref. 12,716, dilution: 1/1000), CamKII (Cell Signalling, ref. 3362, dilution: 1/1000), Serca2a (Cell Signalling, ref. 9580, dilution: 1/1000), phospho-PKAc-thr197 (Cell Signalling, ref. 5661, dilution: 1/1000), PKAc (Cell Signalling, ref. 5842, dilution: 1/1000). Chemiluminescent signal was produced using ECL+ solution and detected with a LAS-4000 luminescent image analyser (General Electric). Relative densitometry was determined using the computer software ImageQuant TL (General Electric). Actin (Millipore, ref. MAB1501R) was used as a protein-loading control.

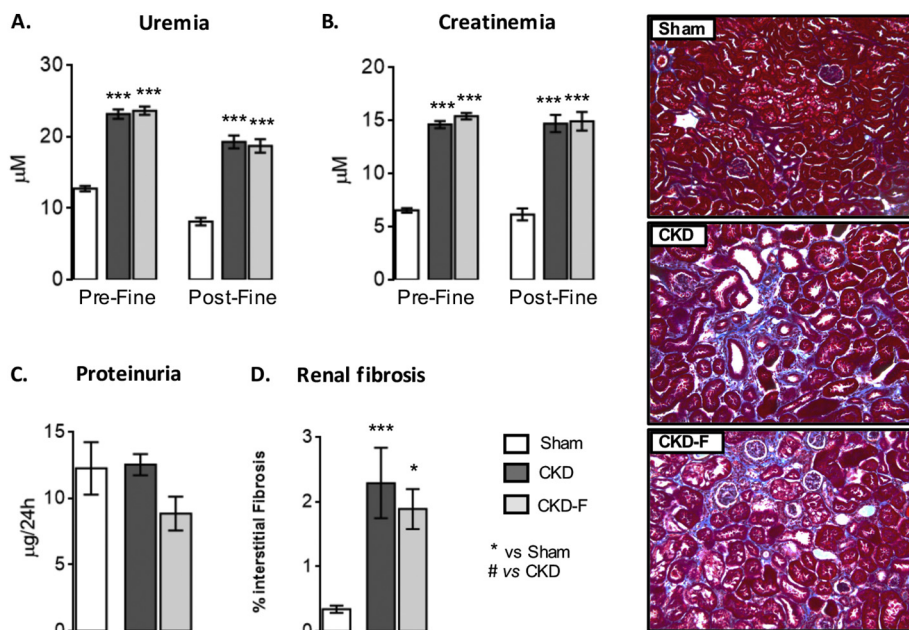


Fig. 2. Effects of finerenone on CKD-associated renal damages. (A–B) Renal failure induced a significant rise in creatinemia and uremia at 4 (pre-Fine) and 10 (Post-Fine) weeks post-Nx. Finerenone did not correct any of these parameters. (pre-fine: $n = 15–19$ per group, post-fine: $n = 28–30$ per group). The results are reported as mean \pm s.e.m. *** $P < .005$ versus Sham (Anova test). (C) Urine collection by metabolic cages showed that no group developed proteinuria (quantity of proteins excreted in urine per 24 h). ($n = 9–10$ per group). The results are reported as mean \pm s.e.m. *** $P < .005$ versus Sham, ### $P < .005$ versus CKD (Anova test). (D) CKD induced a significant increase in renal fibrosis (assessed by Masson's trichrome staining). Finerenone did not prevent nor limit this increase (Fibrosis $n = 8–9$ per group). The results are reported as mean \pm s.e.m. * $P < .05$ and *** $P < .005$ versus Sham (Anova test). The results are reported as mean \pm s.e.m. * $P < .01$ versus Sham (Anova test).

2.11. Statistics

The results are reported as mean \pm s.e.m. Statistical analysis was performed using Graphpad V5 software. The experiments and data analysis were performed blind, when possible, to the experimental conditions. Sample size was determined empirically based on pilot analyses. The d' Agostino–Pearson test was used to analyse normality. ANOVA was used for multivariate comparisons followed by Tukey's correction for multiple comparisons. Differences with $P < .05$ are considered significant.

3. Results

3.1. General characteristics, kidney function and structure, blood pressure

Four weeks after the subtotal Nx, the creatinemia, uremia and body weight were measured. Subtotal Nx induced a substantial increase in both creatinemia and uremia (x1.8 and x2.2 respectively vs Sham, $p < .001$) reflecting a decrease in renal function (Fig. 2A–B). Similarly, the body weight, an indicator of the general health's status, was altered in the nephrectomised mice (-9% vs Sham, $p < .001$) (Table 2). Altogether, these data indicate that the subtotal Nx led successfully to renal failure. The nephrectomised mice were then separated into 2 groups of similar renal function (i.e. same uremia and creatinemia, Fig. 2A–B). The first group received finerenone at the dose of 2 mg/kg/d for the next 6 weeks (CKD-F mice) whereas the second group remained untreated (CKD mice).

At sacrifice, the body weight of the CKD mice remained significantly lower than that of their sham counterparts (-9% , $p < .01$) (Table 2), and their creatinemia and uremia were still increased (x2.4 and x2.4 respectively, $p < .001$) (Fig. 2A–B). Proteinuria, however, was not increased (Fig. 2C). Finerenone treatment had no effects on neither the body weight loss (Table 2) nor the degree or progression of renal dysfunction as shown by the similar creatinemia and uremia of both CKD and CKD-F mice (Fig. 2A–B). Plasma potassium concentrations were not modified by CKD nor Finerenone treatment (Sham: 4.9 ± 0.1 mM; CKD: 4.7 ± 0.1 mM; CKD-F: 4.7 ± 0.1 mM; $n = 9–13$). Kidney structure and fibrosis, assessed by Masson's trichrome, were significantly altered in CKD mice when compared to Sham mice (x6.8 $p < .01$) (Fig. 2D). Finerenone did not prevent nor limit the increase in CKD-induced renal fibrosis. Finally, systolic blood pressure measured by tail-

cuff method (SBP) was similarly increased in both CKD and finerenone-treated CKD mice whereas diastolic blood pressure was increased only in CKD mice (Table 2).

3.2. Cardiac function, hemodynamic and structure

To analyse the consequences of renal failure and the effect of finerenone on cardiac function we performed cardiac echocardiography and invasive hemodynamics on the Sham, CKD and CKD-F mice. Renal failure induced a moderate decrease in left ventricular fractional shortening and ejection fraction in the CKD mice (-12% and -9% respectively vs Sham, $p < .05$) (Fig. 3A and Table 2). These alterations were fully prevented by finerenone. Stroke volume and cardiac output were both decreased by renal failure (-18% , $p < .05$) but were not prevented by finerenone (Fig. 3B) (heart rate was similar in all groups). Remarkably, the trans-mitral pulse Doppler E/A wave ratio was substantially decreased in the CKD mice (-33% vs sham, $p < .005$) suggesting that renal failure induced a significant diastolic dysfunction (Fig. 3C). This decrease in E/A ratio was partly corrected by finerenone (-19% vs Sham, $p < .005$).

Invasive hemodynamic measurements showed a significant increase in the LV end-systolic pressure-LVESP in the CKD mice ($+30\%$ vs sham, $p < .05$) (Fig. 3D). The same trend was observed in the CKD-F mice (Fig. 3D). Noteworthy, finerenone improved LV contractility as indicated by the increase of LV end-Systolic pressure-volume relationship-LVESPVR in the CKD-F mice ($+43\%$ vs Sham, $p < .05$) (Fig. 3E). Invasive measurement clearly confirmed the diastolic dysfunction in the CKD mice as evidenced by the increase in the LV end-diastolic pressure-volume relationship-LVEDPR (x3 vs Sham, $p < .0001$) which indicates a decrease in the load-independent LV passive compliance (Fig. 3G). Moreover, the LV end-diastolic pressure (LVEDP), which reflects the LV filling pressure, exhibited a strong trend toward an increase in the CKD mice (x1.7 vs Sham, $p < .076$) (Fig. 3F). Finerenone partially corrected these parameters indicating an improvement in the diastolic function (LVEDPR: x1.9 vs Sham, $p < 0.001$) (Fig. 3G).

Abnormalities in cardiac structure such as hypertrophy and fibrosis play a crucial role in diastolic dysfunction. Compared to Sham, and although cardiomyocytes cross-sectional area was not different between the two groups (Fig. 4A), CKD mice exhibited increased heart weight to tibia length ratio (moderate, $+10\%$ vs Sham, $p < .05$) (Table 2) and BNP cardiac gene expression ($+68\%$ vs sham, $p < .05$). These changes

Table 2
Cardiac echocardiographic and hemodynamic measurements.

	Sham	CKD	CKD-F
General characteristics			
Body weight (g) (4 Wks post Nx)	29.5 ± 0.5	27.2 ± 0.3**	27.7 ± 0.2**
Body weight (g) (10 Wks post Nx)	35.3 ± 0.6	31.7 ± 0.4**	31.2 ± 0.4**
Kidney Weight (mg)	479.7 ± 5.8	176.6 ± 2.7**	164.2 ± 4.8**
Kidney weight/Tibia Length (mg/mm)	25.7 ± 0.3	9.5 ± 0.1**	8.8 ± 0.3**
Heart Weight (mg)	168.0 ± 2.7	179.5 ± 5.3	167.4 ± 6.2
Heart Weight/Tibia length (mg/mm)	8.7 ± 0.4	9.6 ± 0.3*	9.0 ± 0.3 #
Systolic Blood Pressure (mmHg)	119.4 ± 2.0	137.6 ± 2.7**	130.4 ± 2.9*
Diastolic Blood Pressure (mmHg)	53.2 ± 2.9	64.6 ± 3.4**	52.0 ± 1.5#
Echocardiography			
Heart rate (bpm)	400.3 ± 10.0	394.9 ± 13.6	413.7 ± 18.9
LVAWs (mm)	1.34 ± 0.06	1.23 ± 0.07	1.30 ± 0.04
LVAWd (mm)	0.86 ± 0.05	0.76 ± 0.03	0.85 ± 0.02
LVPWs (mm)	1.06 ± 0.08	1.06 ± 0.06	1.08 ± 0.06
LVPWd (mm)	0.98 ± 0.06	0.90 ± 0.05	0.90 ± 0.07
LVIDs (mm)	2.79 ± 0.11	2.88 ± 0.07	2.78 ± 0.05
LVIDd (mm)	3.88 ± 0.14	4.00 ± 0.09	4.15 ± 0.14
Ejection fraction (%)	65.1 ± 1.7	59.1 ± 1.0*	63.2 ± 1.5
Fraction of shortening (%)	29.9 ± 0.7	26.5 ± 0.6*	29.5 ± 0.9
Stroke volume (μl)	87 ± 3	73 ± 4*	74 ± 3*
Cardiac output (ml/mn)	35 ± 1.9	28.7 ± 1.1*	30.9 ± 2.8
Pulm VTI	4.34 ± 0.16	3.65 ± 0.19*	3.68 ± 0.17*
Vmax	805 ± 38	655 ± 40*	687 ± 48
E/A ratio	1.51 ± 0.07	1.03 ± 0.03*	1.23 ± 0.04*#
Hemodynamic			
Systolic Blood Pressure (mm Hg)	98.3 ± 2.2	121.0 ± 6.4*	117.3 ± 4.6*
Diastolic Blood Pressure (mm Hg)	56.8 ± 1.9	76.5 ± 6.5*	72.6 ± 4.4*
Heart rate (bpm)	290.1 ± 14.6	298.8 ± 22.1	236.2 ± 11.7
dP/dtmax	7073 ± 920	8505 ± 390	7883 ± 741
dP/dtmin	5877 ± 604	6554 ± 676	5904 ± 594
tau e	6.0 ± 0.4	7.0 ± 0.6	7.2 ± 0.5
tau 1/2	4.4 ± 0.3	5.0 ± 0.4	5.2 ± 0.4

LVAWs and LVAWd: Left ventricular anterior wall thickness in systole and diastole; LVPWs and LVPWd: Left ventricular posterior wall thickness in systole and diastole, LVIDs and LVIDd: Left ventricular internal diameter in systole and diastole, VTI: Velocity time integral; LVEDP: Left ventricular end diastolic pressure; LVESP: Left ventricular end systolic pressure; LVESV: Left ventricular end-systolic pressure volume relationship; LVEDPVR: Left ventricular end-systolic pressure volume relationship. ($n = 5-8$ per group). The results are reported as mean ± s.e.m. * $P < .05$ versus Sham, # $P < .05$ versus CKD (Anova test).

were prevented by finerenone. In non-treated mice, CKD induced an increased interstitial myocardial collagen deposition although it did not reach statistical significance ($\times 1.5$ vs Sham, $p = .058$) (Fig. 4A-B). The cardiac mRNA expression of Collagen I and III was unaltered in the CKD mice as was the expression of the pro-fibrotic cytokine TGF β . However, the expression of α SMA, a marker of fibroblast activation, was increased in CKD mice ($+65\%$ vs Sham, $p < .05$) (Fig. 4C). Finerenone prevented the increase in α SMA expression, and induced an increase in the expression of NOV (Nephroblastoma Overexpressed, $+37\%$ vs sham, $p < .05$), an anti-fibrotic cytokine belonging to the CCN family. No changes were observed in the expression of LTBP4 (latent TGF-beta binding protein 4), a protein that modulates TGF β bioavailability and which activity is modified in the B6D2 strain [18].

Functional cellular abnormalities of myocyte relaxation are another important component of diastolic dysfunction. In CKD mice, the expression of the calcium channel ryanodine receptor 2 (RYR2) and of the sarco/endoplasmic reticulum Calcium ATPase SERCA2a was unaltered (Fig. 5A). The expression of phospholamban (PLN), a key negative regulator of Serca2a, was unchanged in CKD and CKD-F mice (Fig. 5B).

The activity of PLN is regulated by phosphorylation at multiple sites and depends on several kinases such as the Protein Kinase A and Calmodulin Kinase II. In the hearts of CKD mice, phosphorylation of PLN at ser16/Thr17 (relieving inhibition of Serca2a by PLN) was significantly decreased (-55% vs Sham, $p < .05$) suggesting an alteration in Ca⁺ reuptake by Serca2a (Fig. 5B). The expression and the phosphorylation of PKA (threonine 197) was unchanged in CKD mice (Fig. 5C) suggesting that cardiac inhibition of PLN in renal failure is independent of PKA. In contrast, the phosphorylation of CamKII at threonine 286 was severely decreased in the hearts of CKD mice (-55% vs Sham, $p < .05$) indicating that cardiac inactivation of PLN in renal failure could rely on deregulated CamKII signalling (Fig. 5D). Finerenone treatment fully prevented the decreased phosphorylation of both in PLN and CamKII.

4. Discussion

Cardiac complications are very frequent in patients with CKD and are the first cause of death in this population [7]. Steroidal MR antagonists (spironolactone and eplerenone) are highly efficient in managing heart failure [12]. Their use is however contraindicated in patient with decreased renal function because of the increased risk of hyperkalaemia. Finerenone, is a new non-steroidal MRA that could represent an alternative to these molecules. Clinical studies show a good tolerability of finerenone in populations traditionally at risk. In patients with diabetes and/or CKD hospitalized for a worsening of HF, finerenone was well tolerated and induced a 30% or greater decrease in NT-proBNP levels in a similar proportion of patients to eplerenone [19]. The results presented herein shows that finerenone prevented the diastolic dysfunction induced by CKD, and the alterations in the expression and phosphorylation in key calcium handling proteins.

Diastolic dysfunction (DD) is a prominent feature of CKD, with impairment of both passive and active relaxation. In human, DD is highly prevalent in patients with CKD (up to 85%) and is a powerful independent predictor of mortality [20,21]. In experimental models of CKD, diastolic dysfunction is reported in most models. In the subtotal nephrectomy model in rats, several groups have reported alterations in numerous parameters of diastolic function (EDP, time constant of diastolic relaxation, EDPVR, cardiac compliance) [22–24]. In mice, diastolic dysfunction is also observed in models of nephronic reduction [25,26], although this feature is not described in all reports [27,28]. The reason for such discrepancy is not clear, but genetic and phenotypic (i.e. high blood pressure, cardiac fibrosis, increased creatinemia and uremia) variations could account for this difference [29]. In our model, the DD was clear and characterized with 2 different methods. The B6D2 mouse strain may therefore represent a useful tool to further analyse the pathophysiology and progression of DD in the context of CKD.

Despite the impact of DD on mortality of patients with CKD, the optimal management of these patients is not well defined. Our results show that finerenone improves several diastolic parameters affected by CKD (E/A ratio and LVEDP), suggesting that MR antagonists may represent a therapeutic option to limit CKD-induced DD. Several small studies have shown that spironolactone improves predictors of cardiovascular mortality in patients with CKD [30]. More recently, spironolactone has shown trends in reduction of CV death and hospitalization for CV events in haemodialysis patients [31]. The mechanisms of such benefits are unclear, but an effect of MR blockers on DD in addition to their well-known actions on systolic dysfunction cannot be excluded. Indeed, the ALDO-DHF trial has shown that spironolactone has shown trends to improvement of DD in patients with heart failure with preserved ejection fraction (HFpEF), even after adjustment for the reduction in systolic blood pressure [32]. Surprisingly, the TOPCAT trial showed overall no benefits of spironolactone in these patients [33]. However, the interpretation of the results of this trial is difficult because of broad inclusion criteria [34,35]. This heterogeneity in patient population could have therefore masked specific patient subgroups that

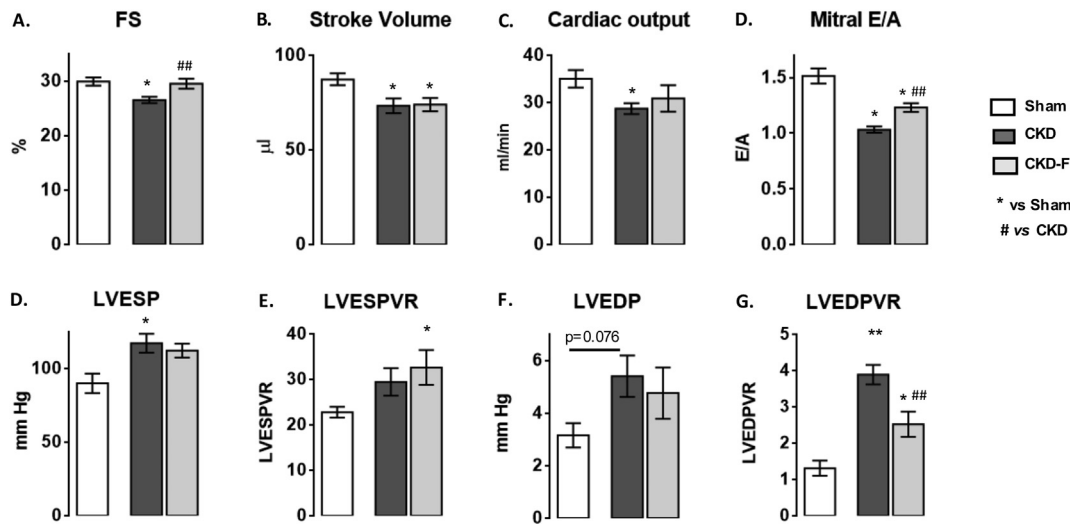


Fig. 3. Effects of finerenone on CKD-associated cardiac functional abnormalities. Cardiac function was assessed by echocardiography (A-D) and invasive hemodynamics (E-G). (A-D): (A) fractional shortening (FS), (B) Stroke volume, (C) Cardiac output, and (D) transmitral pulse Doppler E/A waves ratio. (E-G): (E) Left ventricular end systolic pressure (LVESP), (F) Left ventricular end systolic pressure-volume relation (LVESPVR i.e. LV contractility), (G) Left ventricular end-diastolic pressure (LVEDP), and (H) Left ventricular end diastolic pressure-volume relation (LVEDPVR i.e. LV compliance). ($n = 5-8$ per group). The results are reported as mean \pm s.e.m. * $P < .05$ and ** $P < .01$ versus Sham, # $P < .05$ versus CKD (Anova test).

might preferentially benefit from MR antagonism such as patients with CKD. Therefore, additional studies are needed to evaluate the benefits of MRAs on DD in and outside the context of renal failure.

The mechanisms leading to diastolic dysfunction in CKD are not fully characterized, but structural changes such as LV hypertrophy (LVH) and fibrosis as well as alterations in calcium handling are suspected to contribute significantly to the process. Ventricular stiffness, which is well documented in patients and rat models of CKD, is often seen as a direct consequence of ventricular hypertrophy. However, although most studies in mice also describe LVH, in several strains these changes are absent. In fact, it has recently been reported in a mouse model of CKD that diastolic dysfunction occurs prior to changes in ventricular geometry and hypertrophy [26] as it is documented in other cardiovascular pathologies such as hypertension [36–38]. This suggests that contribution of LVH to DD may not be as prominent as it was previously thought, at least in initiating the process. Our results show a discrete increase in the HW/TL ratio and cardiac BNP expression suggestive of LV hypertrophy early stages as reflected by the absence of changes in the cardiomyocytes cross-sectional area and the ventricular dimensions. These changes were reversed by finerenone. Importantly, these benefits are observed in presence of the same level of systolic blood pressure and renal dysfunction. Although the pathophysiological impact of such minor changes on cardiac diastolic function is difficult to establish, it nevertheless points out myocardial disturbances that could eventually lead or contribute to cardiovascular events: LVH is associated with increased mortality risk and cardiovascular events in patients CKD and ESRD [39], and therapeutics that reverse or limit the progression of LVH in these patients will undoubtedly provide a significant progress in the management of this condition. MRAs reduce cardiac hypertrophy in patients with heart failure and high blood pressure and recent studies have demonstrated that spironolactone is also efficient in reducing cardiac hypertrophy in patients with renal failure [40,41] as well as in uremic rats [42]. Our data support a similar cardiac anti-hypertrophic role of MR blockade in the context of CKD and are in line with these studies.

Excessive accumulation of extracellular matrix plays a crucial role in cardiac compliance and contributes to systolic and diastolic dysfunction by increasing LV stiffness and impairing LV diastolic filling [43]. Myocardial fibrosis is frequently reported in patients with renal failure [44] and is a widely reported feature of experimental CKD. In patients with systolic heart failure, the benefit of MR antagonists

involves reduction of cardiac collagen accumulation [12] [45]. We observed in our model a very strong trend toward an increase in cardiac fibrosis that was completely abolished by finerenone. Our data support therefore a similar cardiac anti-fibrotic role of MR antagonism in the context of CKD-related DD. Noticeably, the expression of NOV, an anti-fibrotic cytokine belonging to the CCN family, was increased in the finerenone-treated group. NOV is known to play an anti-fibrotic role in the kidney *in vivo* in diabetic nephropathy [46] and *ex vivo* in mesangial cells [47]. However, its role in limiting in cardiac fibrosis is unknown. Our results suggest that the benefits of finerenone could be related to the induction (or repression of inhibition) of active anti-fibrotic molecules. The exact underlying mechanisms warrant further investigations.

Impaired calcium handling is an important factor in the development and progression of DD [48]. Although DD is a prominent feature of CKD, the defects on cardiac intracellular calcium (iCa^{2+}) handling in renal failure aroused little attention, perhaps because cardiac hypertrophy and fibrosis are considered as the main mechanisms of DD in CKD. Reuptake of iCa^{2+} into the sarcoplasmic reticulum during diastole occurs mainly via the sarco/endoplasmic reticulum calcium ATPase (SERCA2a). SERCA2a dysfunction resulting in accumulation of iCa^{2+} during diastole and therefore partial myofilament relaxation, has been implicated in the impaired relaxation of cardiomyocytes (CM) isolated from failing hearts in humans and animals [49,50]. Cardiomyocytes isolated from the hearts of Sprague-Dawley rats with subtotal nephrectomy have been reported to display alteration in calcium cycling and contractile function correlating with reduced SERCA2a expression, protein density, and activity [51]. Similarly, SERCA2a expression was decreased in the hearts of CD-1 mice following partial nephrectomy [25]. Noticeably, these alterations are not reported by all groups [24], and we did not find changes in SERCA2a expression in our model. However, we observed in the CKD mice a severe decrease in the phosphorylation of phospholamban (PLN) that was fully prevented by finerenone. Un-phosphorylated PLN is a negative regulator of SERCA2a and is negatively regulated (i.e. PLN-dependent inhibition on SERCA2a is relieved) when PLN is phosphorylated by Protein Kinase A (PKA) and Calmodulin kinase II (CamKII) [52]. We found no changes in the phosphorylation of PKA in the CKD mice. However, the phosphorylation of CamKII was severely decreased. Whether these alterations in PLN and CamKII phosphorylation in CKD is a direct effect of MR activation is unclear. However, a recent study has shown that chronic

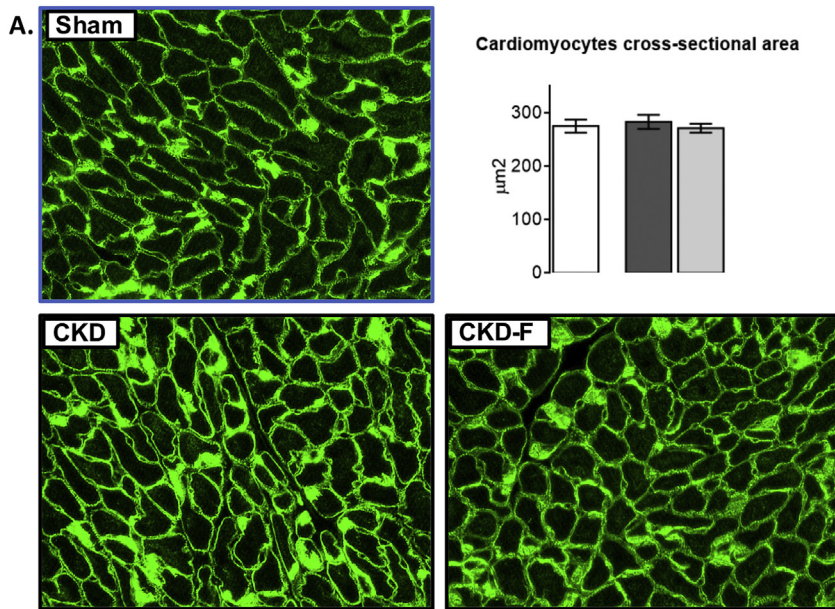
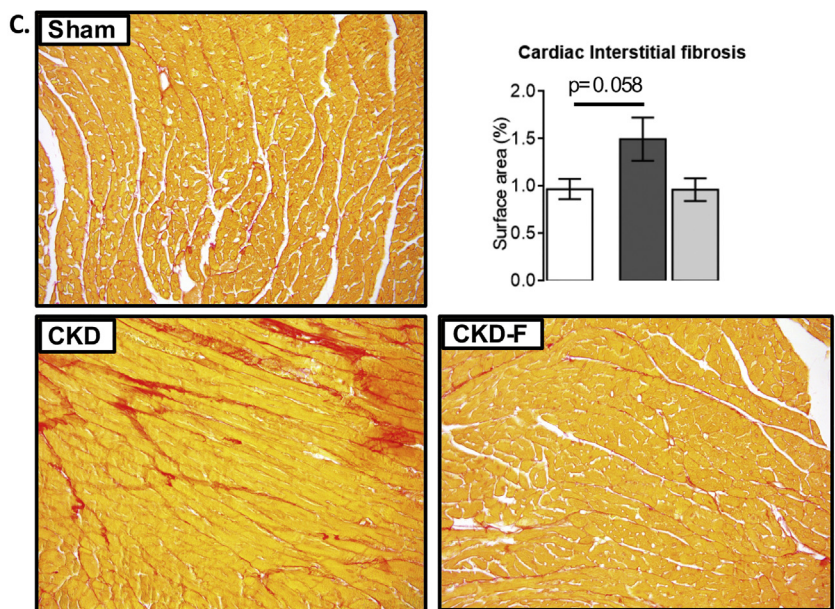
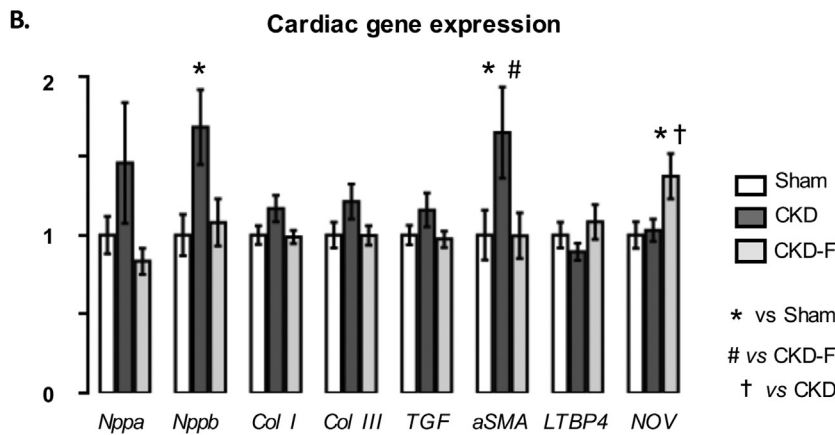


Fig. 4. Effects of finerenone on CKD-associated cardiac remodelling. 10 weeks after subtotal nephrectomy, the cardiomyocytes (delineated by immuno-staining of vinculin in green) cross sectional area was not modified by CKD (A). However, the cardiac gene expression of *nppb* (BNP) was significantly increased (B). CKD induced a strong trend toward cardiac fibrosis (assessed by Sirius red staining, (C). The expression of several pro-fibrotic genes was unchanged, except for *αSMA* which expression was increased in CKD mice (C). No changes were observed in the Finerenone treated CKD mice, except for the cardiac gene expression of *NOV*, an anti-fibrotic cytokine (B). ($n = 7-9$ per group). The results are reported as mean \pm s.e.m. * $P < .05$ versus Sham (Anova test). (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)



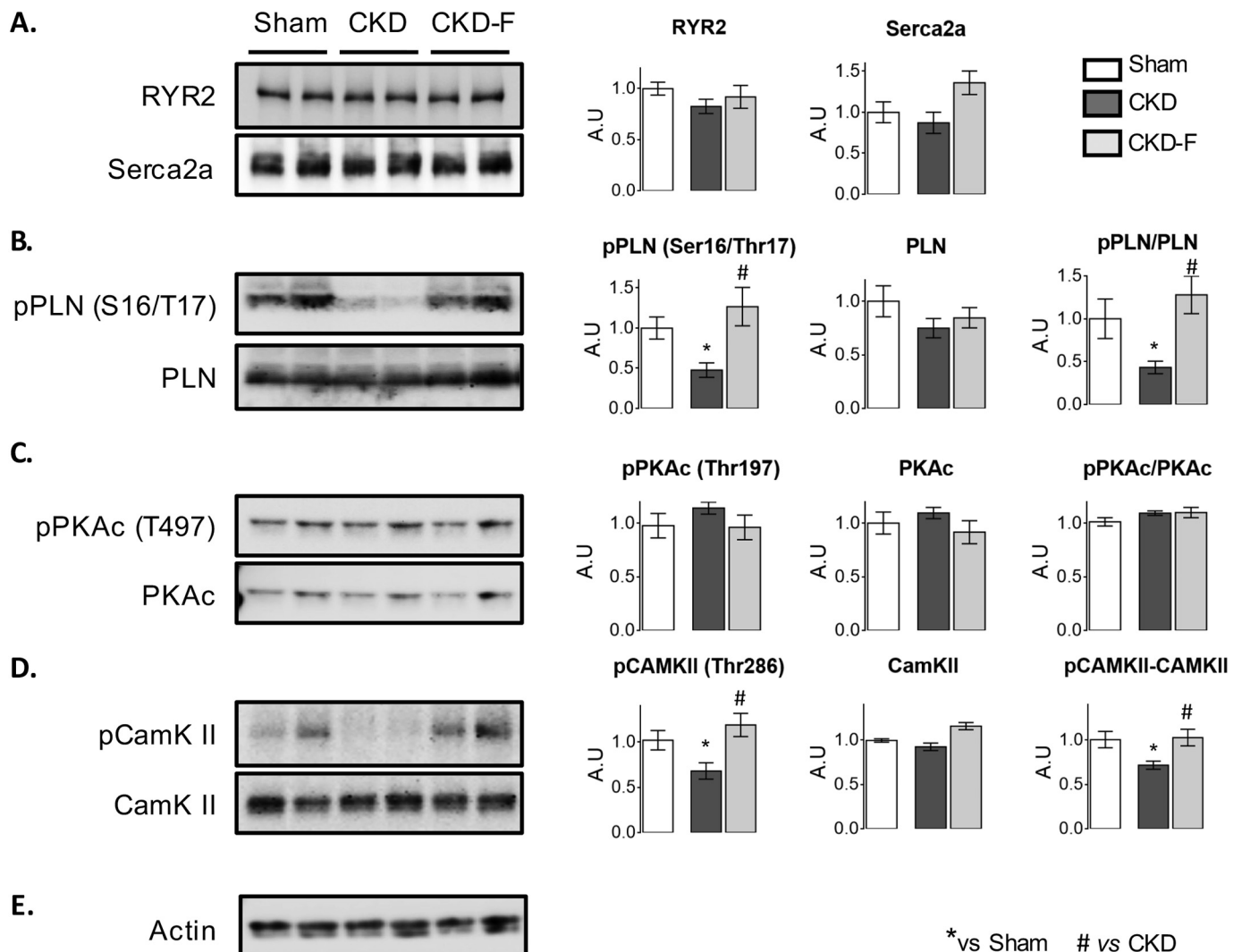


Fig. 5. CKD induces alterations in the phosphorylation of key calcium handling proteins. Phospholamban (PLN) and Calmodulin Kinase II (CamK II) phosphorylations are decreased in CKD mice hearts (B and D). Protein kinase A (PKAc) phosphorylation is unaffected by CKD (C) as is the expression of Serca2a and ryanodine receptor 2 (RYR2) (A). Finerenone prevents all these changes ($n = 8-9$ per group). Phosphorylated proteins are normalized to total proteins. Total proteins are normalized to actin (E). The results are reported as mean \pm s.e.m. * $P < .05$ versus sham, # $P < .05$ vs CKD mice (Anova test).

infusion of aldosterone in mice induces a DD that is associated with a severe decrease in both PLN and CamKII phosphorylation suggesting that MR could be directly involved in the alteration reported herein [53].

Decreased PLN's phosphorylation in our study suggests abnormal intracellular diastolic calcium handling and subsequent DD. We did not measure intracellular Ca^{2+} concentrations. However, evidence indicates that diastolic intracellular calcium handling is mainly regulated by SERCA2a and its modulator PLN. The beneficial effects of finerenone on DD could therefore be directly related to its effect on PLN phosphorylation in addition to other effects on Ca^{2+} homeostasis. Indeed, the MR is known to induce cardiac ion channels remodelling (e.g. increase in L-type Ca^{2+} current activity, impairment in ryanodine receptor activity) with important consequences in the control of calcium homeostasis, modulation of calcium transients and sarcoplasmic reticulum diastolic leaks. It is important to note that diastolic function was not fully recovered in finerenone-treated mice, suggesting that other mechanisms were still dysregulated. Beside Ca^{2+} sarcoplasmic reuptake, additional Ca^{2+} abnormalities that increase overall chamber stiffness have been proposed to occur such as increased myofilament sensitivity to Ca^{2+} due to alterations in sarcomeric proteins and regulatory thin filaments, such as troponin-I [54]. Modifications that affects the elastic

recoil of compressed elements within the myocytes, such as titin, also affects the velocity of relaxation and thus diastole [55]. Whether these pathways are also affected in CKD is unknown and further studies are needed to answer this question.

Cardiac overall performance requires complex integration of intrinsic and extrinsic cardiac regulatory mechanisms across multiple physiological systems. With its effects on renal and vascular homeostasis [12], MR blockade may also affect cardiac function, including diastolic parameters, through mechanisms that go beyond direct cardiac effects. Although we designed our experimental plan to limit confounding extra-cardiac effects, finerenone improved diastolic BP (DBP). The mechanisms by which DBP could affect cardiac function are unclear, but several studies have associated diastolic BP with increased risk of adverse cardiovascular outcomes in the general population and in patients with HFpEF [56,57]. It is therefore possible that the beneficial effect of finerenone reported herein, functional and molecular, are also related to the improvement of DBP. Noteworthy, systolic BP remained high in finerenone-treated mice. The reasons for such uncoupling are unclear and warrant further investigations.

In conclusion, we have demonstrated that a low dose of finerenone improves some parameters of CKD-associated DD. This beneficial effect is associated with reduced cardiac fibrosis, improved calcium

homeostasis and diastolic blood pressure. Importantly, this effect of finerenone is independent of improvement in renal function and systolic BP.

Acknowledgments

This work was funded by grants from the Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, the *Centre de Recherche Industrielle et Technique*, the European Regional Development Fund (ERDF) in Normandy, the FP7-funded COST ADMIRE network (BM1301), ANR MRFOCUS (ANR-15-CE14-0032-02), the Fight-HF Avenir investment program (ANR-15-RHUS-0004) and a research grant from Bayer (12127a10). BB was supported by a PhD grant from Region Ile de France ARDoc. Finally, we would like to thank the team of the CEF of the Cordeliers Research Center for their support with animal care.

Disclosure

Frédéric Jaisser received grants from BAYER AG.

References

- G.A. Roth, et al., Global and regional patterns in cardiovascular mortality from 1990 to 2013, *Circulation* 132 (2015) 1667–1678.
- A.L. Bui, T.B. Horwich, G.C. Fonarow, Epidemiology and risk profile of heart failure, *Nat. Rev. Cardiol.* 8 (2011) 30–41.
- N. Azad, G. Lemay, Management of chronic heart failure in the older population, *J. Geriatr. Cardiol.* JGC 11 (2014) 329–337.
- J.F. Mann, H.C. Gerstein, J. Pogue, J. Bosch, S. Yusuf, Renal insufficiency as a predictor of cardiovascular outcomes and the impact of ramipril: the HOPE randomized trial, *Ann. Intern. Med.* 134 (2001) 629–636.
- H.L. Hillege, et al., Renal function, neurohormonal activation, and survival in patients with chronic heart failure, *Circulation* 102 (2000) 203–210.
- D.E. Forman, et al., Incidence, predictors at admission, and impact of worsening renal function among patients hospitalized with heart failure, *J. Am. Coll. Cardiol.* 43 (2004) 61–67.
- M.J. Sarnak, Cardiovascular complications in chronic kidney disease, *Am. J. Kidney Dis. Off. J. Natl. Kidney Found.* 41 (2003) 11–17.
- A.S. Abdo, A. Basu, S.A. Geraci, Managing chronic heart failure patient in chronic kidney disease, *Am. J. Med.* 124 (2011) 26–28.
- B. Pitt, et al., The effect of spironolactone on morbidity and mortality in patients with severe heart failure. Randomized Aldactone Evaluation Study Investigators, *N. Engl. J. Med.* 341 (1999) 709–717.
- B. Pitt, et al., Eplerenone, a selective aldosterone blocker, in patients with left ventricular dysfunction after myocardial infarction, *N. Engl. J. Med.* 348 (2003) 1309–1321.
- F. Zannad, et al., Eplerenone in patients with systolic heart failure and mild symptoms, *N. Engl. J. Med.* 364 (2011) 11–21.
- F. Jaisser, N. Farman, Emerging roles of the mineralocorticoid receptor in pathology: toward new paradigms in clinical pharmacology, *Pharmacol. Rev.* 68 (2016) 49–75.
- L. Bärfacker, et al., Discovery of BAY 94-8862: a nonsteroidal antagonist of the mineralocorticoid receptor for the treatment of cardiorenal diseases, *ChemMedChem* 7 (2012) 1385–1403.
- B. Pitt, et al., Safety and tolerability of the novel non-steroidal mineralocorticoid receptor antagonist BAY 94-8862 in patients with chronic heart failure and mild or moderate chronic kidney disease: a randomized, double-blind trial, *Eur. Heart J.* 34 (2013) 2453–2463.
- M. Vinhas, A.C. Araújo, S. Ribeiro, L.B. Rosário, J.A. Belo, Transthoracic echocardiography reference values in juvenile and adult 129/Sv mice, *Cardiovasc. Ultrasound* 11 (12) (2013).
- E. Domínguez, et al., Non-invasive in vivo measurement of cardiac output in C57BL/6 mice using high frequency transthoracic ultrasound: evaluation of gender and body weight effects, *Int. J. Card. Imaging* 30 (2014) 1237–1244.
- J. Vandesompele, et al., Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes, *Genome Biol.* 3 (7) (2002) research0034.1–0034.11.
- A. Heydemann, et al., Latent TGF-beta-binding protein 4 modifies muscular dystrophy in mice, *J. Clin. Invest.* 119 (2009) 3703–3712.
- G. Filippatos, et al., A randomized controlled study of finerenone vs. eplerenone in patients with worsening chronic heart failure and diabetes mellitus and/or chronic kidney disease, *Eur. Heart J.* 37 (2016) 2105–2114.
- M. Park, et al., Associations between kidney function and subclinical cardiac abnormalities in CKD, *J. Am. Soc. Nephrol. JASN* 23 (2012) 1725–1734.
- A. Farshid, R. Pathak, B. Shadbolt, L. Arnold, G. Talaulikar, Diastolic function is a strong predictor of mortality in patients with chronic kidney disease, *BMC Nephrol.* 14 (280) (2013).
- J. Elkareh, et al., Marinobufagenin stimulates fibroblast collagen production and causes fibrosis in experimental uremic cardiomyopathy, *Hypertens Dallas Tex* 1979 (49) (2007) 215–224.
- D.J. Kennedy, et al., Central role for the cardiotoxic steroid marinobufagenin in the pathogenesis of experimental uremic cardiomyopathy, *Hypertens Dallas Tex* 1979 (47) (2006) 488–495.
- D.A. Yuen, et al., Culture-modified bone marrow cells attenuate cardiac and renal injury in a chronic kidney disease rat model via a novel Antifibrotic mechanism, *PLoS One* 5 (2010) e9543.
- D.J. Kennedy, et al., Partial nephrectomy as a model for uremic cardiomyopathy in the mouse, *Am. J. Physiol.-Ren. Physiol.* 294 (2008) F450–F454.
- P.D. Winterberg, R. Jiang, J.T. Maxwell, B. Wang, M.B. Wagner, Myocardial dysfunction occurs prior to changes in ventricular geometry in mice with chronic kidney disease (CKD), *Phys. Rep.* 4 (2016).
- A.M. Siedlecki, X. Jin, A.J. Muslin, Uremic cardiac hypertrophy is reversed by rapamycin but not by lowering of blood pressure, *Kidney Int.* 75 (2009) 800–808.
- S. Bro, E. Bollano, A. Brühl, K. Olgaard, L.B. Nielsen, Cardiac structure and function in a mouse model of uraemia without hypertension, *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* 68 (2008) 660–666.
- L.G. Bongartz, et al., Target organ cross talk in cardiorenal syndrome: animal models, *Am. J. Physiol. Ren. Physiol.* 303 (2012) F1253–F1263.
- S. Agrawal, et al., Heart failure and chronic kidney disease: should we use spironolactone? *Am J Med Sci* 350 (2015) 147–151.
- Y. Matsumoto, et al., Spironolactone reduces cardiovascular and cerebrovascular morbidity and mortality in hemodialysis patients, *J. Am. Coll. Cardiol.* 63 (2014) 528–536.
- F. Edelmann, et al., Effect of spironolactone on diastolic function and exercise capacity in patients with heart failure with preserved ejection fraction: the Aldo-DHF randomized controlled trial, *JAMA* 309 (2013) 781–791.
- B. Pitt, et al., Spironolactone for heart failure with preserved ejection fraction, *N. Engl. J. Med.* 370 (2014) 1383–1392.
- M.R. Bristow, et al., Detection and Management of Geographic Disparities in the TOPCAT trial: Lessons Learned and Derivative Recommendations, *JACC Basic Transl. Sci.* 1 (2016) 180–189.
- R.B. Patel, S.J. Shah, G.C. Fonarow, J. Butler, M. Vaduganathan, Designing future clinical trials in heart failure with preserved ejection fraction: lessons from TOPCAT, *Curr. Heart Fail. Rep.* 14 (2017) 217–222.
- B.C. Aeschbacher, et al., Diastolic dysfunction precedes myocardial hypertrophy in the development of hypertension, *Am. J. Hypertens.* 14 (2001) 106–113.
- V. Di Bello, et al., Early left ventricular mechanics abnormalities in prehypertension: a two-dimensional strain echocardiography study, *Am. J. Hypertens.* 23 (2010) 405–412.
- S. Dupont, et al., The onset of left ventricular diastolic dysfunction in SHR rats is not related to hypertrophy or hypertension, *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 302 (2012) H1524–H1532.
- L. Di Lullo, A. Gorini, D. Russo, A. Santoboni, C. Ronco, Left ventricular hypertrophy in chronic kidney disease patients: from pathophysiology to treatment, *Cardiorenal Med.* 5 (2015) 254–266.
- G.M.M. Feniman-De-Stefano, et al., Spironolactone is secure and reduces left ventricular hypertrophy in hemodialysis patients, *Ther. Adv. Cardiovasc. Dis.* 9 (2015) 158–167.
- C. Lin, Q. Zhang, H. Zhang, A. Lin, Long-term effects of low-dose spironolactone on chronic Dialysis patients: a randomized placebo-controlled study, *J. Clin. Hypertens. Greenwich Conn* 18 (2016) 121–128.
- L. Michea, et al., Mineralocorticoid receptor antagonism attenuates cardiac hypertrophy and prevents oxidative stress in uremic rats, *Hypertens Dallas Tex* 1979 (52) (2008) 295–300.
- D.A. Kass, J.G.F. Bronzwaer, W.J. Paulus, What mechanisms underlie diastolic dysfunction in heart failure? *Circ. Res.* 94 (2004) 1533–1542.
- K. Amann, K. Tyralla, Cardiovascular changes in chronic renal failure–pathogenesis and therapy, *Clin. Nephrol.* 58 (Suppl. 1) (2002) S62–S72.
- W. Iraqi, et al., Extracellular cardiac matrix biomarkers in patients with acute myocardial infarction complicated by left ventricular dysfunction and heart failure: insights from the Eplerenone post-acute myocardial infarction heart failure efficacy and survival study (EPHESUS) study, *Circulation* 119 (2009) 2471–2479.
- B.L. Riser, et al., Treatment with the matricellular protein CCN3 blocks and/or reverses fibrosis development in obesity with diabetic nephropathy, *Am. J. Pathol.* 184 (2014) 2908–2921.
- H.-F. Liu, et al., CCN3 suppresses TGF-β1-induced extracellular matrix accumulation in human mesangial cells in vitro, *Acta Pharmacol. Sin.* 39 (2018) 222–229.
- M.L. Asp, J.J. Martindale, F.I. Heinis, W. Wang, J.M. Metzger, Calcium mishandling in diastolic dysfunction: mechanisms and potential therapies, *Biochim. Biophys. Acta BBA - Mol. Cell Res.* 1833 (2013) 895–900.
- R.J. Hajjar, J.X. Kang, J.K. Gwathmey, A. Rosenzweig, Physiological effects of adenoviral gene transfer of sarcoplasmic reticulum calcium ATPase in isolated rat myocytes, *Circulation* 95 (1997) 423–429.
- R.J. Hajjar, U. Schmidt, J.X. Kang, T. Matsui, A. Rosenzweig, Adenoviral gene transfer of phospholamban in isolated rat cardiomyocytes. Rescue effects by concomitant gene transfer of sarcoplasmic reticulum ca(2+)-ATPase, *Circ. Res.* 81 (1997) 145–153.
- D. Kennedy, et al., Effect of chronic renal failure on cardiac contractile function, calcium cycling, and gene expression of proteins important for calcium homeostasis in the rat, *J. Am. Soc. Nephrol. JASN* 14 (2003) 90–97.
- A. Mattiazzi, E.G. Kranias, The role of CaMKII regulation of phospholamban activity in heart disease, *Front. Pharmacol.* 5 (2014).
- K. Tanaka, et al., Effects of adiponectin on calcium-handling proteins in heart failure with preserved ejection fraction, *Circ. Heart Fail.* 7 (2014) 976–985.
- E. Takimoto, et al., Frequency- and afterload-dependent cardiac modulation in vivo

- by troponin I with constitutively active protein kinase a phosphorylation sites, *Circ. Res.* 94 (2004) 496–504.
- [55] B.A. Borlaug, D.A. Kass, Mechanisms of diastolic dysfunction in heart failure, *Trends Cardiovasc. Med.* 16 (2006) 273–279.
- [56] P.A. James, et al., 2014 evidence-based guideline for the management of high blood pressure in adults: report from the panel members appointed to the eighth joint National Committee (JNC 8), *JAMA* 311 (2014) 507–520.
- [57] P.B. Sandesara, et al., Diastolic blood pressure and adverse outcomes in the TOPCAT (treatment of preserved cardiac function heart failure with an aldosterone antagonist) trial, *J. Am. Heart Assoc.* 7 (2018).

Disclaimer: The manuscript and its contents are confidential,
intended for journal review purposes only, and not to be further
disclosed.

URL: <http://hype-submit.aha-journals.org>

Title: ANTIFIBROTIC EFFECT OF NOVEL NEUTROPHIL
GELATINASE-ASSOCIATED LIPOCALIN INHIBITORS IN CARDIAC AND
RENAL
DISEASE MODELS

Manuscript number: HYPE/2020/15828

Author(s): Frédéric Jaisser, INSERM UMRS 1138

BENJAMIN BONNARD, INSERM

Ernesto Martínez-Martínez, Navarrabiomed. Miguel Servet Foundation
Amaya Fernández-Celis, Instituto de Investigación Sanitaria de Navarra

Quoc-Tuan Do, Greenpharma S.A.S.

Isbaal Ramos, INNOPROT

Rossignol Patrick, CHUNANCY

FAIEZ ZANNAD, CHRU de Nancy

Paul Mulder, INSERM U1096, Université de Rouen

Antoine Ouvrard-Pascaud, Unité Inserm U1096

Natalia López-Andrés, Instituto de Investigación Sanitaria de Navarra

For Hypertension Peer Review. Do not distribute.
Destroy after use.

ANTIFIBROTIC EFFECT OF NOVEL NEUTROPHIL GELATINASE-ASSOCIATED LIPOCALIN INHIBITORS IN CARDIAC AND RENAL DISEASE MODELS

Benjamin Bonnard^{1*}, Ernesto Martínez-Martínez^{1*}, Amaya Fernández-Celis², Quoc-Tuan Do³, Isbaal Ramos⁴, Patrick Rossignol⁵, Faiez Zannad⁵, Paul Mulder⁶, Antoine Ouvrard-Pascaud⁶, Natalia López-Andrés^{2, 5#}, Frédéric Jaisser^{1, 5#}

* These authors contributed equally to this work

Both authors contributed equally to this study.

¹INSERM, UMRS 1138, Centre de Recherche des Cordeliers, Sorbonne Université, Université de Paris, Paris, France. ²Cardiovascular Translational Research. Navarrabiomed (Miguel Servet Foundation), Instituto de Investigación Sanitaria de Navarra (IdiSNA), Pamplona. Spain. ³Greenpharma SAS, Orléans, France. ⁴Innovative Technologies in Biological Systems SL (INNOPROT), Bizkaia, Spain. ⁵Université de Lorraine, INSERM Centre d'Investigations Cliniques-Plurithématique 1433, UMR 1116, CHRU de Nancy, French-Clinical Research Infrastructure Network (F-CRIN) INI-CRCT, Nancy, France. ⁶Inserm U1096, UFR Médecine-Pharmacie, Rouen, France.

Short title: NGAL inhibitors in cardiac and renal diseases

Word count: 5107

Word count of abstract: 244

Total numbers of figures and tables: 6

Corresponding author:

Dr. Frédéric Jaisser

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

E-mail: frederic.jaisser@inserm.fr

Dr. Natalia López-Andrés.

Cardiovascular Translational Research. Navarrabiomed (Miguel Servet Foundation). C/Irunlarrea 3, 31008 Pamplona, Spain. Telephone: 34-848422359. Fax: 34-848422300

E-mail: natalia.lopez.andres@navarra.es

Abstract

Neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL) (also Lipocalin2, LCN2) is involved in cardiovascular and renal diseases. Gene inactivation of NGAL blunts the pathophysiological consequences of cardiovascular and renal damage. We aimed to design chemical NGAL inhibitors and investigate the protective effects of pharmacological NGAL blockade in experimental models of myocardial infarction (MI) and chronic kidney disease (CKD).

Potential NGAL inhibitors were selected from *in silico* screening models. Among the 32 compounds tested, GPZ614741 and GPZ058225 were selected, as they fully blocked recombinant human NGAL-induced inflammatory and profibrotic markers in human cardiac fibroblasts (HCF) and primary mouse kidney fibroblasts (MKF). The administration of GPZ614741 (100 mg/kg/day) for three months increased fractional shortening, stroke volume, cardiac output, and the dp/dt_{min} relaxation index in MI mice relative to the non-treated MI group. The improvement in cardiac function was accompanied by reduced myocardial fibrosis and inflammation. These results mimic our previous results in MI using global genetic deletion of *Lcn2*. Administration of GPZ614741 (100 mg/kg/day) after CKD induction for two months did not improve renal function but prevented the increase in blood pressure. In addition, GPZ614741 blunted renal tubulointerstitial fibrosis and profibrotics marker expression.

In conclusion, we have identified new compounds with potent inhibitory activity on NGAL-profibrotic and pro-inflammatory effects. GPZ614741 prevented interstitial fibrosis and dysfunction associated with MI, as well as tubulointerstitial fibrosis in a CKD model. These inhibitors could be used for other diseases that involve NGAL, such as cancer or metabolic diseases, creating new therapeutic options.

Introduction

Neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL) (also known as lipocalin-2, oncogene 24p3, siderocalin, or uterocalin) is a small circulating protein induced in a wide variety of pathological situations. Initially, NGAL was identified in mature neutrophil granules and shown to also be expressed in the kidney, prostate, and various epithelia.¹ Over the last decade, NGAL has been shown to have a broad expression pattern and is expressed by renal, endothelial, and smooth muscle cells and hepatocytes, as well as cardiomyocytes, neurons, and various populations of immune cells, such as macrophages and dendritic cells.

Several studies have highlighted NGAL as a potent early biomarker of renal injury or as an inflammation biomarker.^{2,3} Other studies have shown that NGAL has a role in iron trafficking and chemotactic and bacteriostatic effects, as well as in differentiation, proliferation, and inflammation.⁴⁻⁷ NGAL participates in the epithelial-mesenchymal transition *in vivo*, as shown in a pulmonary adenocarcinoma model,⁸ and *in vitro* in prostate and breast-cancer cells.⁹ In these models, NGAL promotes the motility, invasiveness, and metastatic capacities of cancer cells. More recently, NGAL has also been shown to be involved in cardiovascular, metabolic, and renal diseases.¹⁰ Indeed, gene inactivation in mice blunts the pathophysiological consequences of cardiovascular (myocardial infarction or ischemia),^{11, 12} renal (subtotal nephrectomy)¹³, and metabolic (high-fat diet)¹⁴ challenges.

Overall, these data suggest that NGAL is a potential therapeutic target in several diseases. There is thus a need to find NGAL inhibitors that can be used as therapeutic agents in various disease settings. More precisely, we aimed to design chemical NGAL inhibitors and investigate the protective effects of pharmacological NGAL blockade in cardiac and renal fibrosis. We thus performed *in vitro* studies in human cardiac fibroblasts and primary mouse renal fibroblasts and *in vivo* experiments in myocardial infarction (MI) and chronic kidney disease (CKD) mouse models.

Material and Methods

The data that support the findings of this study are available from the corresponding author on reasonable request.

A detailed description of the methods used is available in the online-only Data Supplement.

Statistical analyses

All data are presented as the mean \pm SEM. $P < 0.05$ was considered significant. Distributions were verified using the Kolmogorov–Smirnov test. Differences in the means between two groups for non-repeated variables were compared by Student's t test. Differences in the means among groups and treatments were compared by one-way ANOVA for multiple comparisons, followed by Tukey's correction for multiple comparisons (GraphPad).

Results

Selection of potential disruptors of the NGAL-NGAL receptor interaction

We prepared a database of compounds for virtual screening and built *in silico* screening models for NGAL-interacting compounds prior to the virtual screening of compounds on NGAL-modulated pathways.

We used the www.ambinter.com database, containing more than 35 million molecular references. Our aim was to have access to as many molecules as possible for future virtual and real screening. These chemical catalogues are generally found in various formats that are not directly exploitable. We developed a procedure to “normalize” the structures that would go into the database: discard radioactive, metallic, products, or reactive products, pan-assay interfering compounds, separate salts from the main compounds, normalize the informatic representation of the chemical structures (aromatization, ionic states, etc.), and calculate the 3D structure of each compound. Natural compounds can present specific problems, such as fused rings or missing chirality information. In such cases, the most probable configurations were calculated according to their internal energies. Unity molecular fingerprints (which can be considered as bar-codes that identify molecules) were calculated for the molecules for subsequent diversity or similarity searches. Subsets of the database consisting of natural products, drug-like molecules, lead-like molecules, and molecules that interfere with protein-protein interactions were also built. A workflow for the preparation of the molecules was therefore applied for virtual screening.¹⁵

Several crystal structures of NGAL with siderophores are published in the Protein Data Bank (<https://www.rcsb.org/>). Examination of these 3D structures, with or without siderophores, clearly shows that the general 3D structure of the protein does not change. Therefore, targeting the “main” binding site of siderophores may not exert significant effects, although we cannot rule this out. The biological activity of NGAL may be related to its interactions with a receptor. As the NGAL receptor could not be modelled (no crystallographic data and

no reliable homologue with a known 3D structure), our strategy was based on blocking the interaction of NGAL with its receptor by identifying putative protein-protein interaction (PPI) disruptors. Based on the 3D structure of NGAL (PDB accession numbers: 1DFV & 1NGL), we surveyed potential “hot spots” (*i.e.* important residues for PPI) on the protein surface using ANCHOR¹⁶ (<http://structure.pitt.edu/anchor/>), an online software to analyse PPIs. We then identified two peripheral sites that may be druggable PPI zones (see Fig. 1A, red and cyan sites).

We selected potential disruptors of the NGAL-NGAL receptor interaction by virtual screening. This consisted of simulating the binding energy of a small molecule with NGAL binding sites. As there are significant differences between NMR and X-ray 3D structures of NGAL (RMSD = 4.6 Å calculated according to the backbone of 1DFV and 1NGL, see Fig. 1A), it was necessary to use these two structures as templates for modelling NGAL. Surflex-dock 2.7¹⁷, as implemented in Sybyl-X 2.1.1, was used for docking calculations. We identified two peripheral sites that may be druggable PPI zones. The “-pscreen” parameter was selected for virtual screening. We selected a total of 32 potential hits based on their docking score and after visual inspection. As an example, Fig. 1B shows the docking of GPZ614741 (one of the active molecules, see below) on a PPI site of NGAL.

Inhibitory activity of compounds selected after virtual screening

We previously reported that recombinant human NGAL (hNGAL) induced expression of inflammatory (IL6) and profibrotic (Col I, Col III) markers in HCFs.¹¹ Thus, the inhibitory activity of the compounds was initially evaluated on hNGAL (10 ng/ml)-induced IL6 secretion. Among the 32 compounds obtained by virtual screening, two, GPZ614741 and GPZ058225 (Table S1-S2), were selected, as they fully inhibited hNGAL-induced IL6 secretion (Fig 2A). These compounds also inhibited Col I secretion (Fig 2A). Moreover, the two selected compounds blocked hNGAL-induced expression of intracellular profibrotic proteins (Col I, Col III, fibronectin, Gal3) (Fig 2B), as well as cell proliferation (Fig 2C).

The inhibitory activity of 23 second-generation compounds derived from GPZ614741 or GPZ058225 were next evaluated on hNGAL-induced IL6 secretion in HCFs (Table S3). Eleven were as efficient as GPZ614741 and GPZ058225 at inhibiting hNGAL-induced IL6 secretion, whereas the other tested compounds lost their inhibitory activity (Table S3).

Cell toxicity and absorption, distribution, metabolism, and excretion (ADME) tests

An ADME-Tox panel (Table S4) showed *GPZ614741* to be nontoxic for hepatocytes (MTT, up to 0.1 mM) and cardiomyocytes (hERG predictor assay). The PPB was low and fully stable to acidic pH. It was also perfectly soluble in aqueous buffers and partially processed by CYP3A4. The ADME-Tox panel showed *GPZ058225* to have no significant hepatotoxicity (> 0.1mM) or cardiotoxicity (it did not block the hERG channel). *GPZ058225* bound to plasma proteins within an acceptance range. It showed mild solubility problems (only 63% in the solubility test) and the CYP3A4 isoform appeared to be involved in its processing (inhibited the enzyme activity in a competition assay by 32%) (Table S4).

Based on the efficacy and ADME-TOX results, we next tested whether oral administration of GP1 (*GPZ614741*) could efficiently prevent the cardiac and renal impact of MI or subtotal nephrectomy *in vivo*, respectively.

Impact of GP1 (*GPZ614741*) in a myocardial infarction mouse model

We previously reported that *Lcn2* (NGAL) gene inactivation blunts the functional and morphological consequences of MI.¹¹ We therefore tested whether the GP1 compound mimicked the genetic inactivation of *Lcn2*/NGAL in a murine MI model. As shown in Table 1, three months administration of GP1 (100 mg/kg/day in the food) induced a significant increase in fractional shortening (FS) resulting from a slight, statistically non-significant decrease in both the LV end diastolic and systolic diameters (LVDD and LVSD respectively) relative to those of the non-treated MI group. At the same time-point, both stroke volume (SV) and cardiac output (CO) were higher in the GP1-treated group than the non-treated MI group.

Three months of treatment with GP1 (100 mg/kg/day in the food) did not modify the LV end-systolic pressure (LVESP) relative to that of the MI non-treated group and resulted in a trend towards an increase in the LV dP/dt_{max} ($p = 0.07$) (Table 1). Moreover, the LV end-diastolic pressure (LVEDP) tended to be lower in the MI GP1-treated group, whereas the increase in the LV dP/dt_{min} , together with the decrease in the LV relaxation constant Tau, indicated an improvement in diastolic relaxation upon chronic treatment.

Treatment with GP1 (100 mg/kg/day in the food) resulted in a significantly lower LV interstitial collagen deposition than in the non-treated MI group (Fig. 3A). Three months of treatment with GP1 significantly prevented the upregulation of Col I, α SMA and CTGF observed in the non-treated MI group (Fig. 3B-3D). Treatment with GP1 significantly

prevented the upregulation of cardiac protein levels of IL6 and the expression of inflammatory markers, such as CD68 (marker of monocytes lineage), CD80, and CD86 (markers of macrophages) (Fig 3E).

Impact of GP1 (GPZ614741) on renal fibroblasts and the kidney in a CKD mouse model

We next tested whether GP1 blunted recombinant mNGAL-induced expression of profibrotic/proinflammatory markers in mouse primary renal fibroblasts (MKF) and whether *in vivo* administration of GP1 in the 5/6 Nx CKD mouse model had a similar effect as that reported for *Lcn2/NGAL* gene inactivation.¹³

MKF were stimulated with recombinant murine NGAL (mNGAL), with or without GP1. Similar to its effect in human HCF (Fig. 2), GP1 inhibited mNGAL-induced expression of profibrotic (Col I, fibronectin, α SMA) (Fig. 4A) and inflammatory (IL6, MCP1) markers (Fig. 4B).

In vivo administration of GP1 had no impact on functional parameters, such as plasma levels of urea or creatinine (neither one nor two months after CKD induction) (Table 1), indicating that GP1 did not blunt renal dysfunction associated with CKD in the 5/6 nephrectomy model. However, two months of GP1 administration prevented the increase in blood pressure normally observed in this CKD model (Table 1).

We next analyzed whether the anti-fibrotic and anti-inflammatory effects observed in the MI model were also present in the mouse CKD model. Two months of GP1 administration had a strong antifibrotic effect *in vivo* by blunting the renal tubulointerstitial fibrosis associated with CKD (Fig 5A). GP1 administration also blunted the increased expression of profibrotic markers (Col I, fibronectin, α SMA) (Fig. 5B) but not those of inflammatory markers, such as IL6 and MCP1 (Fig 5C), CD 68, CD80, or CD86 (Fig. 5D).

Discussion

We have identified several compounds with potent inhibitory activity on the NGAL-mediated expression of profibrotic and pro-inflammatory markers and cell proliferation in two primary cell cultures of fibroblasts of human cardiac or murine renal origin. One of the compounds, GP1, showed efficient *in vivo* activity to prevent the interstitial fibrosis associated with MI and CKD. The effects of GP1 (GPZ614741) on cardiac function, fibrosis, and inflammation mimics the functional, molecular, and histological impact of global genetic inactivation of

Lcn2 in the same MI model that we previously reported in Martinez-Martinez et al.¹¹ In the CKD model, the effect was only partial relative to global genetic *Lcn2* inactivation. Although the effect of GP1 on renal fibrosis mimicked the effect of global genetic inactivation of *Lcn2*, it did not improve renal function or inflammation. The reason for these differences may be related to heterogenous intrarenal tissue distribution of the compound, which may thus, for example, not have an effect on glomerular function. The absence of an effect on renal inflammatory markers is more puzzling, given the good inhibitory effect of NGAL on inflammatory gene expression in primary kidney fibroblasts, as well as *in vivo* in the MI model. Of note, GP1 blunted the increased blood pressure normally associated with CKD. This may be related to the vascular impact of NGAL, which has indeed been previously reported upon metabolic challenge in mice.¹⁴ Further studies are required to determine the possible mechanisms related to blood pressure control.

NGAL/Lipocalin-2 (LCN-2) is a member of the broader lipocalin family, which includes over 20 soluble proteins, most of which are extracellular.¹ This family is evolutionarily conserved and found in various lineages from bacteria to plants, invertebrates, and vertebrates.¹⁸ Lipocalins have a three-dimensional structure (lipocalin domain) in which eight β -strands form a symmetrical β -barrel fold with a cylindrical shape. The β -barrel structure provides a hydrophobic cavity to bind to a variety of lipophilic ligands, including retinoic acid, progesterone, prostaglandin, fatty acids, steroids, leukotriene B₄, and platelet activating factor.^{1, 18}

NGAL/Lipocalin 2 is produced by a variety of cells of the cardiovascular and renal systems, adipocytes, and inflammatory cells and is also found in brain, bone, gut, liver, etc. Two different cell-surface receptors for NGAL/LCN2 have been described: solute carrier family 22 member 17 (SLC22A17, 24p3R or NGALR2) and low-density lipoprotein-related protein 2 (LPRP2 or megalin). High levels of 24p3R are expressed by specific cells, including macrophages, neutrophils, lung and gut epithelia, kidney epithelial cells, vascular cells and cardiomyocytes, astrocytes, microglia, and neurons. Megalin, a multi-ligand endocytic receptor, is highly expressed by certain types of absorptive epithelial cells, such as thyroid cells, epididymal cells, renal proximal tubule cells, and neuro-epithelium. Sensory organs, including the eye (specifically, retinal ganglion cells) and ear, also express megalin.¹⁸

Such a broad expression pattern of NGAL/LCN2 and its receptors suggests a potential role in a multitude of physiological and/or pathological processes. The use of mouse models with

genetic inactivation of *Lcn2* has allowed exploration of these roles, revealing both detrimental and beneficial effects of NGAL/LCN2. Global *Lcn2* gene inactivation has beneficial effects in the cardiovascular system (recently summarized in Buonafine et al).¹⁹ However, contrasting results have been reported in the kidney, for which the injection of recombinant NGAL in acute kidney injury provides a benefit²⁰ but NGAL/LCN2 has a deleterious role in CKD progression.^{13, 21} As reported here, NGAL/LCN2 plays a major role in end-organ damage and organ fibrosis in both cardiac- and renal-disease models. *Lcn2* knockout mice also revealed the important metabolic effects of NGAL/LCN2, with higher body and adipose tissue weight in *Lcn2* KO than wild type mice, as well as insulin resistance, but a benefit of LCN2 was also been reported in being of adipocytes and increased thermogenesis.²² Detrimental roles of NGAL/LCN2 have been shown in cancer. NGAL/LCN2 induces proliferation and stimulates AKT and HIF1- α activation, thus promoting angiogenesis and invasion. Moreover, NGAL can form a complex with MMP9, increasing ECM degradation and favoring metastasis.²³ Finally, NGAL/LCN2 is a pleiotropic mediator of various inflammatory processes. Lipocalin-2 has been shown to cause M1 macrophage polarization, while suppressing the formation of the M2 macrophage phenotype, to favor inflammation via the recruitment of inflammatory cells, such as neutrophils, and the induction of pro-inflammatory cytokines.

On the other hand, NGAL/LCN2 is required to limit infection. LCN2 was indeed first identified as a neutrophil granule component with a strong binding affinity to bacterial siderophores. As iron is essential for bacterial growth, NGAL/LCN2 has a bactericidal affect against a number of bacterial species by chelating siderophore-bound iron and making it unavailable for bacterial use. NGAL/LCN2 also plays an important role in immune activation during acute infection. However, LCN2 was shown to worsen the outcome in pneumococcal pneumonia infection by deactivating alveolar macrophages in an animal model.²⁴ NGAL/LCN2 also acts as a source of iron to *Mycobacterium tuberculosis* in infected macrophages, facilitating mycobacterial growth *in vivo*.

Overall, NGAL/LCN2 plays a critical role in the differential regulation of inflammation during acute infections and the progression of several chronic diseases. This Janus face/dual role suggests that NGAL/LCN2 could be an important therapeutic target in chronic diseases, but caution must be exercised in the acute setting, especially during infectious diseases in which limiting the action of NGAL/LCN2 may be deleterious.

Several ways could be used to modulate NGAL/LCN2 expression and/or activity. A few studies have used anti-NGAL antibodies, demonstrating neutralizing activity *in vivo* in the mouse. Anti-NGAL antibody treatment attenuated immune-cell recruitment, such as neutrophil and macrophages, in a cardiac ischemia reperfusion (IR) injury model, along with suppressed M1 marker expression and increased M2 marker expression.²⁵ The role of NGAL in neutrophil recruitment has also been assessed in the liver; neutralization of NGAL by antibody injections protected mice from hepatic injury and neutrophil infiltration induced by alcohol challenge.²⁶ Similarly, neutralizing NGAL antibodies reduced Ly6G neutrophil infiltration in two different psoriasis models²⁷, leading to the diminution of proinflammatory gene expression (IL6, IL8, IL17, IL1 β and IL23).⁶ In patients with an abdominal aortic aneurysm (AAA), NGAL levels are elevated in the plasma and AAA tissue.^{28, 29} In a mouse model of AAA, Tarín *et al.* showed that genetic deletion of *Lcn2* or neutralization of NGAL with polyclonal anti-NGAL antibody injections protected against AAA-induced lesions, with lower neutrophil infiltration and the diminution of MMP activity.³⁰ In contrast, Saha *et al.* showed that antibody-mediated neutralization of NGAL exacerbates DSS-induced colitis³¹, highlighting a protective role of NGAL in this model. Anti-NGAL antibodies lower tissue iron concentrations in a dose-dependent manner, which could starve cancer cells, thus reducing metastasis.³² In cancer, NGAL is known to promote EMT through the alteration of E/N-cadherin expression.⁹ Treatment of MCF-7 breast cancer cells (which have a metastatic tumor cell phenotype) with anti-NGAL antibodies prevented changes in E/N-cadherin expression relative to their control³³ and anti-NGAL antibody administration decreased lung metastasis in a mouse model of breast cancer.²³

Another possible therapeutic approach would be to reduce NGAL expression by RNA interference. Guo *et al.* engineered an encapsulating liposome delivery system to target LCN2 siRNA in cells via the intercellular adhesion molecule (ICAM)-1. This approach was used to treat breast-cancer cells, reducing angiogenesis and tumor progression *in vivo* in a xenograph mouse model.³⁴

Our approach was to identify small molecules that interfere with NGAL signaling in human fibroblasts. We identified several candidates and provide a proof of concept study that at least one of them efficiently reduces ECM remodeling *in vivo* in two preclinical models of CV and renal diseases.

Limitations

Our proof of concept study had several limitations. Full characterization of the hits we identified is now required to precisely identify binding modes and *in vivo* pharmacodynamic and pharmacokinetic properties in various disease models. Moreover, additional structure activity relationship studies should be performed to identify derivatives with higher efficacy. As a proof of principle, we tested only one of the NGAL inhibitors *in vivo* at one fixed dose. Several studies should now be performed to test various doses, as well as the other compounds that we have shown to be active *ex vivo* using various readouts.

Perspectives

We demonstrate that targeting NGAL limits ECM remodeling. These inhibitors could be tested in other diseases that involve NGAL, such as metabolic and cardiovascular diseases or cancer, such as breast or prostate cancers, for which genetic *Lcn2* inactivation and NGAL-neutralizing antibodies have proven to be beneficial.

Acknowledgments

We thank the group of the CEF of the Cordeliers Research Center for their support with animal care.

Sources of funding

This work was supported by the Agence Nationale de la Recherche (ANR- 16-CE14-0021-01), the Fight-HF Avenir Investment Program (ANR-15-RHUS-0004), the European Fibro-Target Project (grant agreement No. SP7#602904), Miguel Servet contract CP13/00221 from the “Instituto de Salud Carlos III-FEDER”, Fondo de Investigaciones Sanitarias [PI18/01875] and the FP7-funded COST ADMIRE network (BM1301). BB was supported by a PhD grant from the Region Ile de France ARDoc. EMM was supported by a contract from CAM (Atracción de Talento).

Disclosures

Dr Martínez-Martínez, Dr Mulder, Dr Do, Dr Ouvrard-Pascaud, Dr López-Andrés and Dr Jaisser have filed a patent on the use of NGAL inhibitors.

REFERENCES

1. Li D, Yan Sun W, Fu B, Xu A, Wang Y. Lipocalin-2-The myth of its expression and function. *Basic Clin Pharmacol Toxicol*. 2019.
2. Zhang J, Han J, Liu J, Liang B, Wang X, Wang C. Clinical significance of novel biomarker NGAL in early diagnosis of acute renal injury. *Exp Ther Med*. 2017;14:5017-5021.
3. Tornblom S, Nisula S, Petaja L, Vaara ST, Haapio M, Pesonen E, Pettila V, group Fs. Urine NGAL as a biomarker for septic AKI: a critical appraisal of clinical utility-data from the observational FINNAKI study. *Ann Intensive Care*. 2020;10:51.
4. Bao G, Clifton M, Hoette TM, Mori K, Deng SX, Qiu A, Viltard M, Williams D, Paragas N, Leete T, Kulkarni R, Li X, Lee B, Kalandadze A, Ratner AJ, Pizarro JC, Schmidt-Ott KM, Landry DW, Raymond KN, Strong RK, Barasch J. Iron traffics in circulation bound to a siderocalin (Ngal)-catechol complex. *Nat Chem Biol*. 2010;6:602-609.
5. Schroll A, Eller K, Feistritz C, Nairz M, Sonnweber T, Moser PA, Rosenkranz AR, Theurl I, Weiss G. Lipocalin-2 ameliorates granulocyte functionality. *Eur J Immunol*. 2012;42:3346-3357.
6. Shao S, Cao T, Jin L, Li B, Fang H, Zhang J, Zhang Y, Hu J, Wang G. Increased Lipocalin-2 Contributes to the Pathogenesis of Psoriasis by Modulating Neutrophil Chemotaxis and Cytokine Secretion. *J Invest Dermatol*. 2016;136:1418-1428.
7. Goetz DH, Holmes MA, Borregaard N, Bluhm ME, Raymond KN, Strong RK. The neutrophil lipocalin NGAL is a bacteriostatic agent that interferes with siderophore-mediated iron acquisition. *Mol Cell*. 2002;10:1033-1043.
8. Mongre RK, Sodhi SS, Sharma N, Ghosh M, Kim JH, Kim N, Park YH, Shin YG, Kim SJ, Jiao ZJ, Huynh do L, Jeong DK. Epigenetic induction of epithelial to mesenchymal transition by LCN2 mediates metastasis and tumorigenesis, which is abrogated by NF-kappaB inhibitor BRM270 in a xenograft model of lung adenocarcinoma. *Int J Oncol*. 2016;48:84-98.
9. Yang J, Bielenberg DR, Rodig SJ, Doiron R, Clifton MC, Kung AL, Strong RK, Zurakowski D, Moses MA. Lipocalin 2 promotes breast cancer progression. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009;106:3913-3918.
10. Legrand M, Rossignol P. Cardiovascular Consequences of Acute Kidney Injury. *N Engl J Med*. 2020;382:2238-2247.
11. Martinez-Martinez E, Buonafina M, Boukhalfa I, Ibarrola J, Fernandez-Celis A, Kolkhof P, Rossignol P, Girerd N, Mulder P, Lopez-Andres N, Ouvrard-Pascaud A, Jaisser F.

- Aldosterone Target NGAL (Neutrophil Gelatinase-Associated Lipocalin) Is Involved in Cardiac Remodeling After Myocardial Infarction Through NFkappaB Pathway. *Hypertension*. 2017;70:1148-1156.
12. Sung HK, Chan YK, Han M, Jahng JWS, Song E, Danielson E, Berger T, Mak TW, Sweeney G. Lipocalin-2 (NGAL) Attenuates Autophagy to Exacerbate Cardiac Apoptosis Induced by Myocardial Ischemia. *J Cell Physiol*. 2017;232:2125-2134.
 13. Viau A, El Karoui K, Laouari D, Burtin M, Nguyen C, Mori K, Pillebout E, Berger T, Mak TW, Knebelmann B, Friedlander G, Barasch J, Terzi F. Lipocalin 2 is essential for chronic kidney disease progression in mice and humans. *J Clin Invest*. 2010;120:4065-4076.
 14. Song E, Fan P, Huang B, Deng HB, Cheung BM, Feletou M, Vilaine JP, Villeneuve N, Xu A, Vanhoutte PM, Wang Y. Deamidated lipocalin-2 induces endothelial dysfunction and hypertension in dietary obese mice. *J Am Heart Assoc*. 2014;3:e000837.
 15. Gally JM, Bourg S, Do QT, Aci-Seche S, Bonnet P. VSPrep: A General KNIME Workflow for the Preparation of Molecules for Virtual Screening. *Mol Inform*. 2017;36.
 16. Meireles LM, Domling AS, Camacho CJ. ANCHOR: a web server and database for analysis of protein-protein interaction binding pockets for drug discovery. *Nucleic Acids Res*. 2010;38:W407-411.
 17. Jain AN. Surflex-Dock 2.1: robust performance from ligand energetic modeling, ring flexibility, and knowledge-based search. *J Comput Aided Mol Des*. 2007;21:281-306.
 18. Ghosh S, Stepicheva N, Yazdankhah M, Shang P, Watson AM, Hose S, Liu H, Weiss J, Zigler JS, Jr., Valapala M, Watkins SC, Sinha D. The role of lipocalin-2 in age-related macular degeneration (AMD). *Cell Mol Life Sci*. 2020;77:835-851.
 19. Buonafine M, Martinez-Martinez E, Jaisser F. More than a simple biomarker: the role of NGAL in cardiovascular and renal diseases. *Clin Sci (Lond)*. 2018;132:909-923.
 20. Ma Q, Devarajan SR, Devarajan P. Amelioration of cisplatin-induced acute kidney injury by recombinant neutrophil gelatinase-associated lipocalin. *Ren Fail*. 2016;38:1476-1482.
 21. Nickolas TL, Forster CS, Sise ME, Barasch N, Sola-Del Valle D, Viltard M, Buchen C, Kupferman S, Carnevali ML, Bennett M, Mattei S, Bovino A, Argentiero L, Magnano A, Devarajan P, Mori K, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Allegri L, Barasch J. NGAL (Lcn2) monomer is associated with tubulointerstitial damage in chronic kidney disease. *Kidney Int*. 2012;82:718-722.

22. Deis JA, Guo H, Wu Y, Liu C, Bernlohr DA, Chen X. Adipose Lipocalin 2 overexpression protects against age-related decline in thermogenic function of adipose tissue and metabolic deterioration. *Mol Metab.* 2019;24:18-29.
23. Leng X, Ding T, Lin H, Wang Y, Hu L, Hu J, Feig B, Zhang W, Pusztai L, Symmans WF, Wu Y, Arlinghaus RB. Inhibition of lipocalin 2 impairs breast tumorigenesis and metastasis. *Cancer Res.* 2009;69:8579-8584.
24. Warszawska JM, Gawish R, Sharif O, Sigel S, Doninger B, Lakovits K, Mesteri I, Nairz M, Boon L, Spiel A, Fuhrmann V, Strobl B, Muller M, Schenk P, Weiss G, Knapp S. Lipocalin 2 deactivates macrophages and worsens pneumococcal pneumonia outcomes. *J Clin Invest.* 2013;123:3363-3372.
25. Cheng L, Xing H, Mao X, Li L, Li X, Li Q. Lipocalin-2 promotes m1 macrophages polarization in a mouse cardiac ischaemia-reperfusion injury model. *Scand J Immunol.* 2015;81:31-38.
26. Wieser V, Tymoszuk P, Adolph TE, Grander C, Grabherr F, Enrich B, Pfister A, Lichtmanegger L, Gerner R, Drach M, Moser P, Zoller H, Weiss G, Moschen AR, Theurl I, Tilg H. Lipocalin 2 drives neutrophilic inflammation in alcoholic liver disease. *J Hepatol.* 2016;64:872-880.
27. Shao S, Fang H, Dang E, Xue K, Zhang J, Li B, Qiao H, Cao T, Zhuang Y, Shen S, Zhang T, Qiao P, Li C, Gudjonsson JE, Wang G. Neutrophil Extracellular Traps Promote Inflammatory Responses in Psoriasis via Activating Epidermal TLR4/IL-36R Crosstalk. *Front Immunol.* 2019;10:746.
28. Folkesson M, Kazi M, Zhu C, Silveira A, Hemdahl AL, Hamsten A, Hedin U, Swedenborg J, Eriksson P. Presence of NGAL/MMP-9 complexes in human abdominal aortic aneurysms. *Thromb Haemost.* 2007;98:427-433.
29. Ramos-Mozo P, Madrigal-Matute J, Vega de Ceniga M, Blanco-Colio LM, Meilhac O, Feldman L, Michel JB, Clancy P, Golledge J, Norman PE, Egido J, Martin-Ventura JL. Increased plasma levels of NGAL, a marker of neutrophil activation, in patients with abdominal aortic aneurysm. *Atherosclerosis.* 2012;220:552-556.
30. Tarin C, Fernandez-Garcia CE, Burillo E, Pastor-Vargas C, Llamas-Granda P, Castejon B, Ramos-Mozo P, Torres-Fonseca MM, Berger T, Mak TW, Egido J, Blanco-Colio LM, Martin-Ventura JL. Lipocalin-2 deficiency or blockade protects against aortic abdominal aneurysm development in mice. *Cardiovasc Res.* 2016;111:262-273.

31. Saha P, Singh V, Xiao X, Yeoh BS, Vijay-Kumar M. Data on importance of hematopoietic cell derived Lipocalin 2 against gut inflammation. *Data Brief*. 2016;8:812-816.
32. Duan X, He K, Li J, Cheng M, Song H, Liu J, Liu P. Tumor associated macrophages deliver iron to tumor cells via Lcn2. *Int J Physiol Pathophysiol Pharmacol*. 2018;10:105-114.
33. Oren B, Urosevic J, Mertens C, Mora J, Guiu M, Gomis RR, Weigert A, Schmid T, Grein S, Brune B, Jung M. Tumour stroma-derived lipocalin-2 promotes breast cancer metastasis. *J Pathol*. 2016;239:274-285.
34. Guo P, Yang J, Jia D, Moses MA, Auguste DT. ICAM-1-Targeted, Lcn2 siRNA-Encapsulating Liposomes are Potent Anti-angiogenic Agents for Triple Negative Breast Cancer. *Theranostics*. 2016;6:1-13.

For Hypertension Peer Review. Do not distribute.
Destroy after use.

Novelty and significance

What Is New?

- We have identified new inhibitors of neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL) activity.
- The compound GPZ614741 inhibits NGAL-enhanced proliferation, as well as the expression of profibrotic and proinflammatory markers in human primary cardiac fibroblasts and mouse primary kidney fibroblasts.
- *In vivo* NGAL blockade with GPZ614741 protects against cardiac fibrosis, inflammation, and dysfunction after myocardial infarct in mice.
- *In vivo* NGAL inhibition using GPZ614741 blunts renal fibrosis in CKD without improving renal inflammation or renal function in a CKD mouse model.

What Is Relevant?

- The data demonstrate the beneficial effects of NGAL blockade with the new inhibitor GPZ614741 in two preclinical models of cardiovascular and renal damage.

Summary

This study demonstrates that interfering with NGAL signaling using new small molecules has important therapeutic applications in the context of cardiovascular and renal diseases, mainly by blocking fibrotic processes.

Figure legends

Figure 1. (A) Difference in the 3D structure of NGAL as determined by X-rays (1DVF, magenta) and NMR (1NGL, green). The main site is represented by yellow spheres and the two peripheral sites by red and cyan spheres. (B) Interaction of GPZ614741 with the NGAL PPI site.

Figure 2. Effects of GP1 (GPZ614741) and GP2 (GPZ058225), at 10 μ M, on (A) IL6 and Col I secretion, (B) cellular content of Col I, Col III, fibronectin, and Gal-3, and (C) cell proliferation in hNGAL-treated human cardiac fibroblasts. * $p < 0.05$ vs. Control. † $p < 0.05$ vs. NGAL-treated human cardiac fibroblasts.

Figure 3. Effect of three months of GP1 (GPZ614741) administration. (A) Representative microphotographs and quantification of interstitial fibrosis. (B) Col I, (C) CTGF, (D) α SMA and (E) proinflammatory markers (IL6, CD68, CD80, and CD86) protein levels in Sham, MI, and MI + GP1 (GPZ614741)-treated mice. * $p < 0.05$ vs. Sham. † $p < 0.05$ vs. MI mice.

Figure 4. Effect of GP1 (GPZ614741), at 10 μ M, on mRNA levels of (A) profibrotic markers Col I, fibronectin and α SMA) and (B) proinflammatory markers (IL6 and MCP1) in mNGAL-treated MKF cells. * $p < 0.05$ vs. Control. † $p < 0.05$ vs. NGAL-treated MKF cells.

Figure 5. Effect of two months of GP1 (GPZ614741) administration. (A) Representative microphotographs and quantification of Sirius red staining and (B) mRNA expression of profibrotic markers (Col I, fibronectin and α SMA), (C) proinflammatory markers (IL6 and MCP1), and (D) CD68, CD80, and CD86 in a CKD mouse model. * $p < 0.05$ vs. Sham. † $p < 0.05$ vs. CKD mice.

Table 1: Cardiac parameters in the myocardial infarction animal model and renal parameters in the chronic kidney disease animal model.

Cardiac parameters	Sham	MI	MI + GP1
HW/TL (mg/mm)	8.5±0.4	10.9±0.4*	11.3±0.8*
LVW/TL (mg/mm)	6.2±0.3	8.3±0.3*	8.8±0.6*
LVEDD (mm)	3.33±0.08	6.31±0.12*	5.88±0.39*
LVESD (mm)	2.03±0.05	5.47±0.13*	4.90±0.39*
FS (%)	39±0.93	13.4±1.0*	17.2±1.3*
SV (ml/beat)	0.092±0.003	0.062±0.005*	0.086±0.004†
CO (ml/min)	39.7±2.0	29.4±1.9*	47.1±3.3†
LVEDP (mmHg)	2.73±0.95	5.91±0.49*	4.41±0.57
LVESP (mmHg)	85.05±1.39	78.82±2.76	82.31±4.22
LV dP/dt _{max}	5220±229	3894±259*	4501±320
LV dP/dt _{min}	4874±550	3117±253*	4487±413†
tau e	6.05±0.30	7.97±0.45*	6.08±0.27†
tau 1/2	4.43±0.20	5.82±0.32*	4.33±0.21†
Renal parameters	Sham	CKD	CKD + GP1
KW/TL (mg/mm)	9.40±0.26	11.5±0.42*	11.3±0.23*
SBP (mmHg)	115±0.75	139.3±2.22*	122.1±2.58†
Plasma Creatinine level (mM)	4.14±1.30	21.5±1.45*	20.4±1.54*
Plasma Urea level (mM)	7.11±0.34	15.2±0.36*	16.74±1.86*

HW/TL: Heart weight/Tibia length; LVW/TL: Left ventricle weight/Tibia length; LVEDD: Left ventricular end diastolic diameter; LVESD: Left ventricular end systolic diameter; FS: Fractional shortening; SV: Stroke volume; CO: Cardiac output; LVEDP: Left ventricular end diastolic pressure; LVESP: Left ventricular end systolic pressure; LV dP/dT_{max} and dP/dT_{min}: contractility and relaxation index, respectively; tau-e and tau 1/2: relaxation constants; KW/TL: Kidney weight/Tibia length; SBP: Systolic blood pressure. *p<0.05 vs. Sham. †p<0.05 vs. MI or CKD mice.

Figure 1

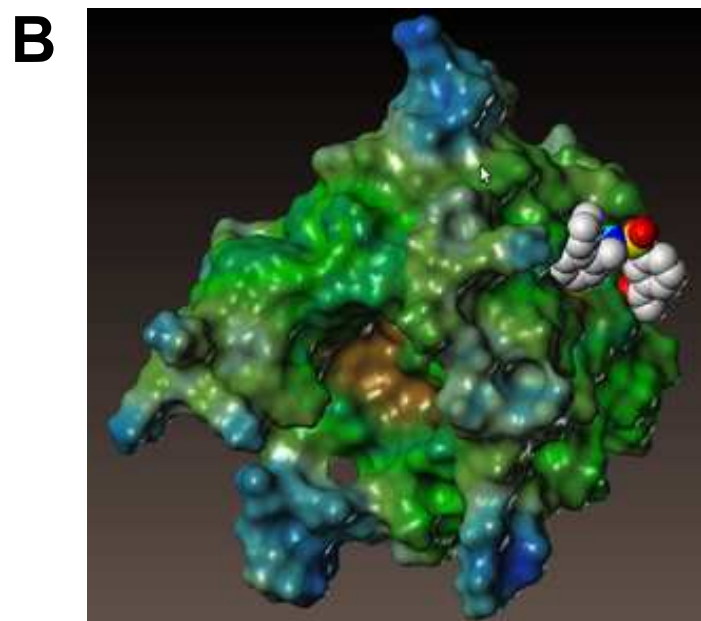
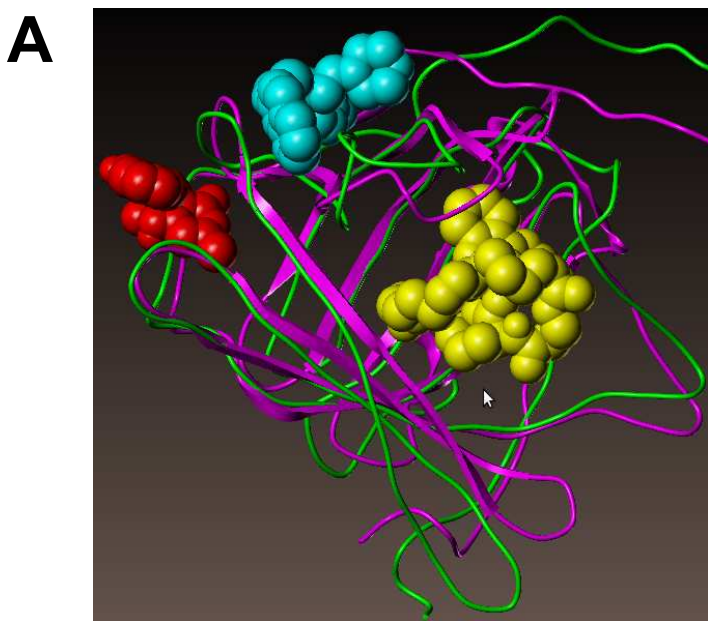
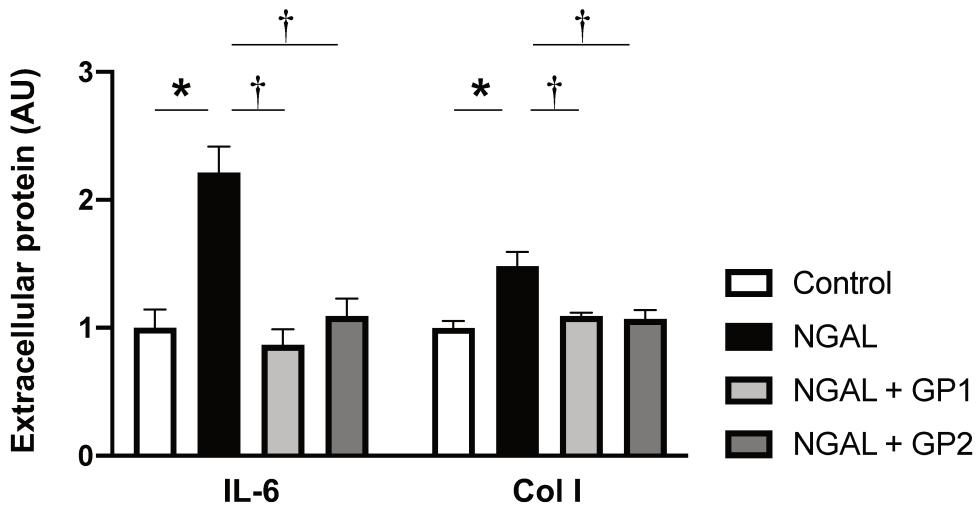
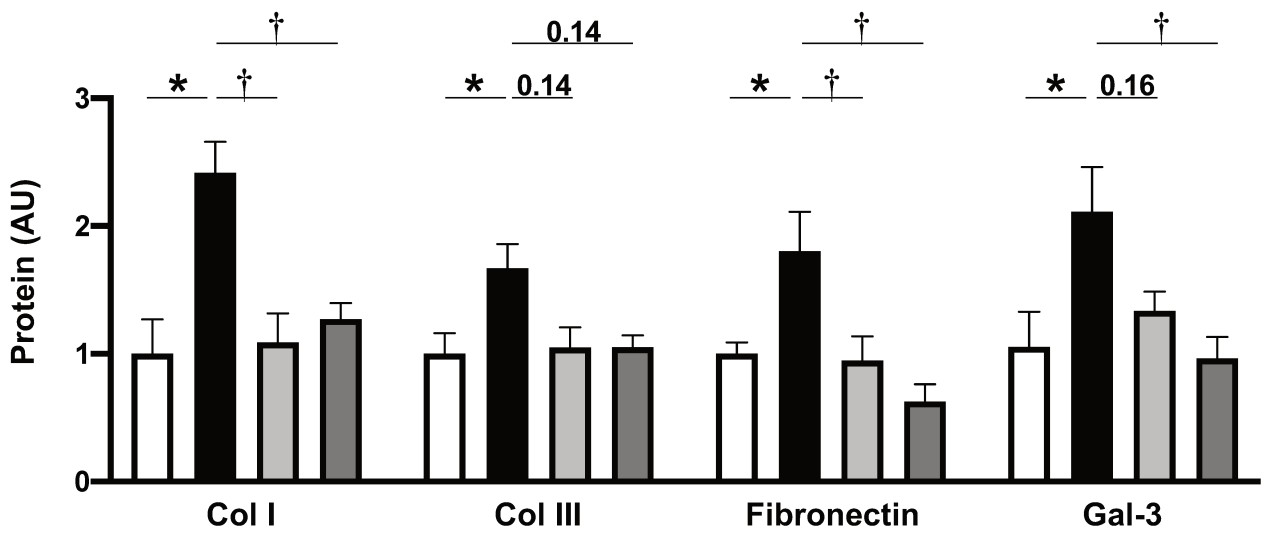


Figure 2

A



B



C

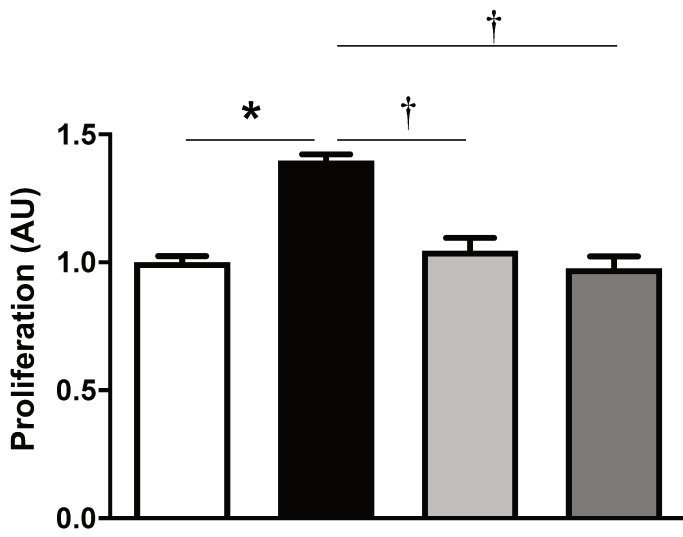
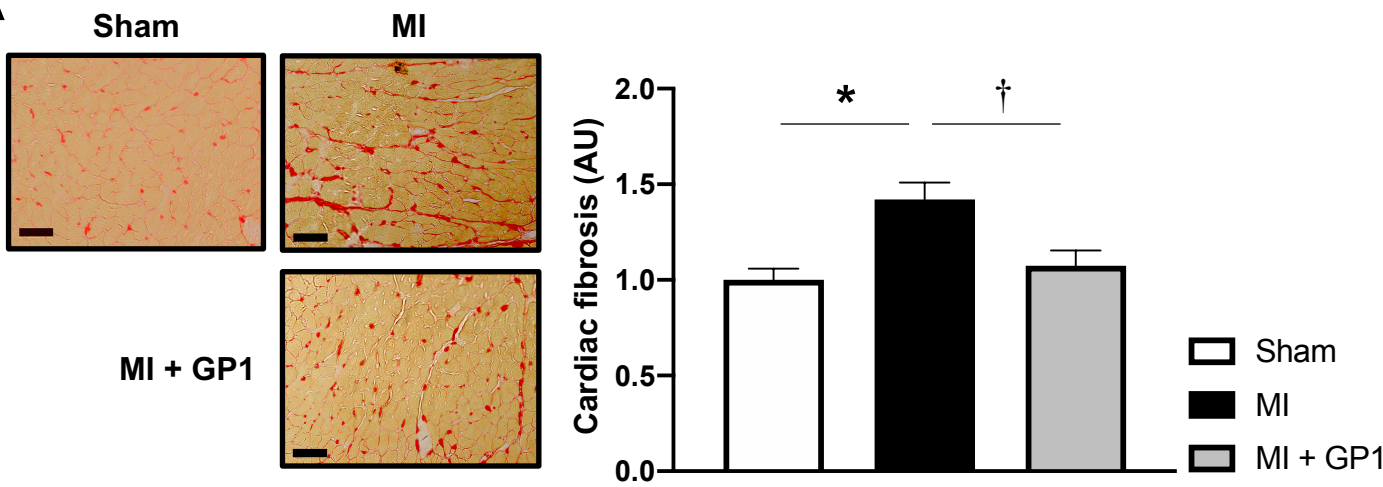
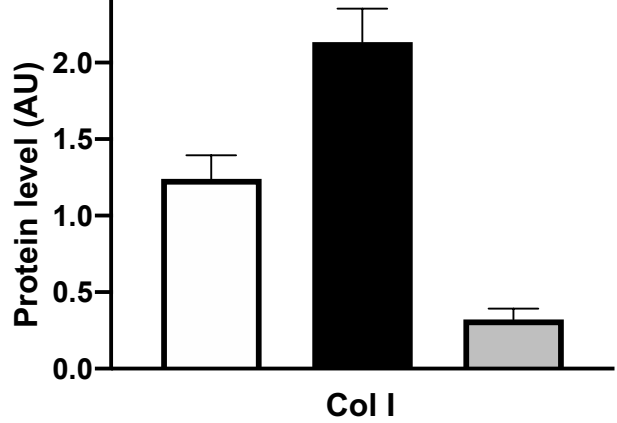


Figure 3

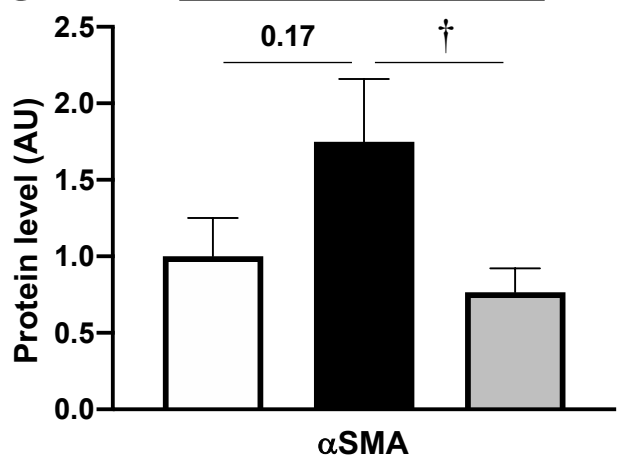
A



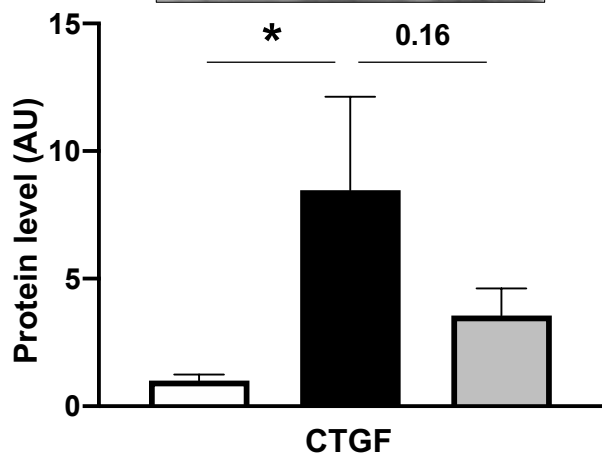
B



C



D



E

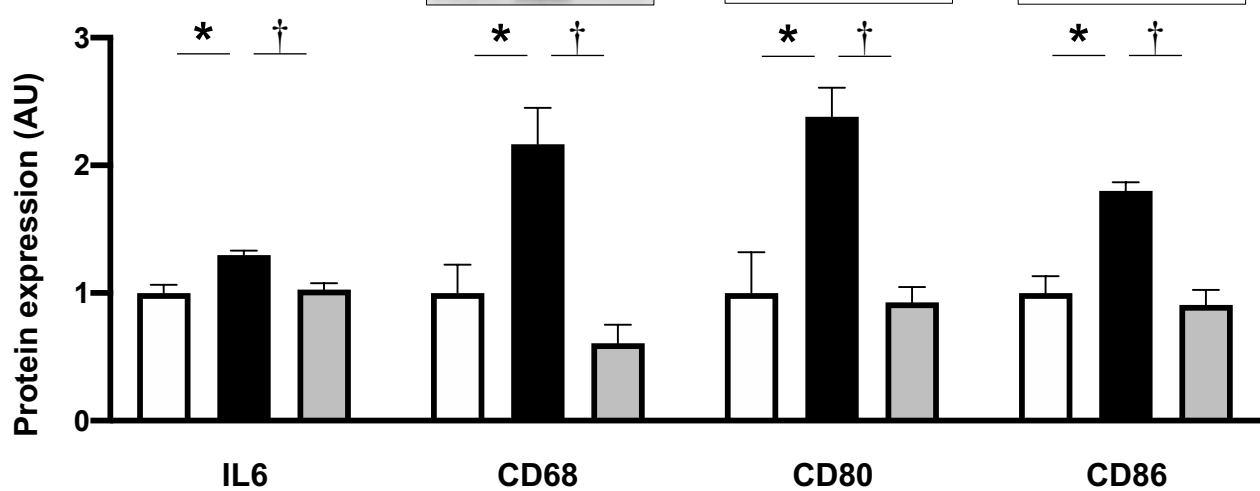
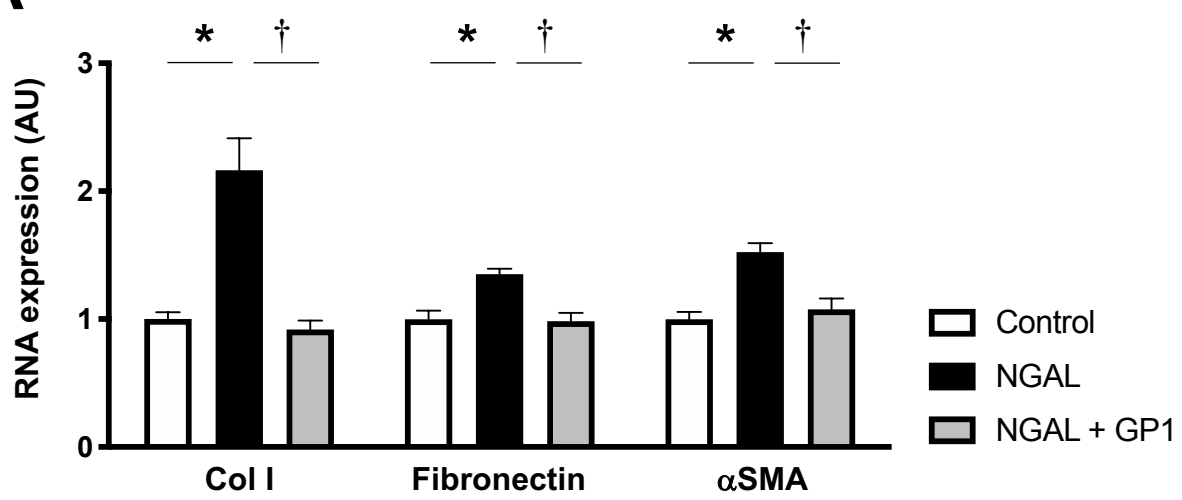


Figure 4

A



B

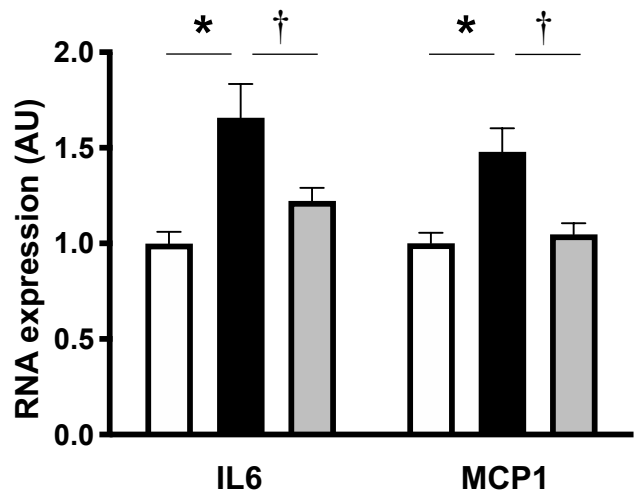
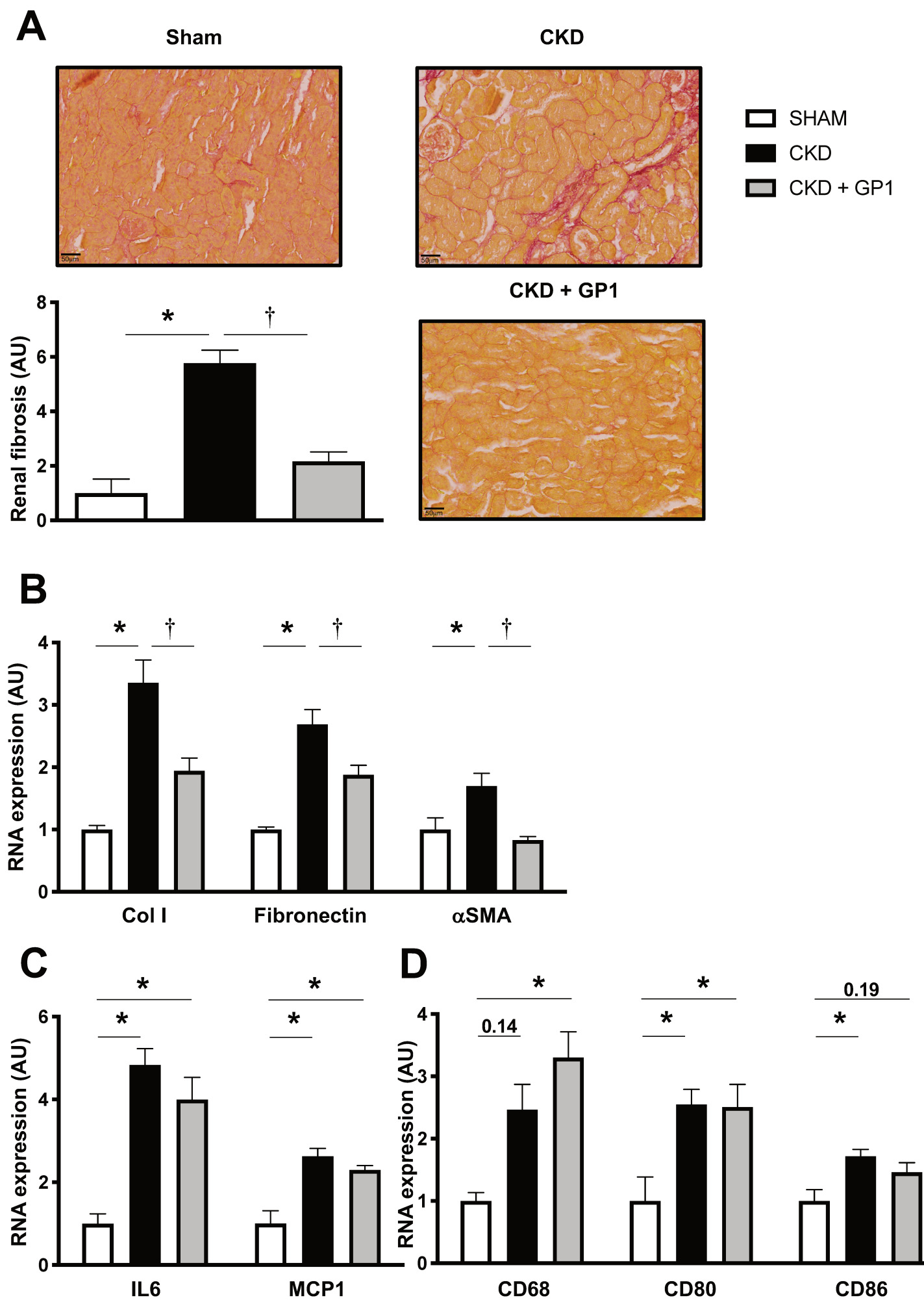


Figure 5



Major Resources Tables

Animals (in vivo studies)

Species	Vendor or Source	Background Strain	Sex
Mice	Charles Rivers	C57Bl6	M
Mice	Charles Rivers	FVB/N	M

Animal breeding

	Species	Vendor or Source	Background Strain	Other Information
Parent - Male				
Parent - Female				

Antibodies

Target antigen	Vendor or Source	Catalog #	Working concentration	Lot # (preferred but not required)
Collagen I	Santa Cruz	sc-59772	1:500	
Collagen type III	Santa Cruz	sc-28888	1:500	
Fibronectin	Millipore	F7387	1:500	
Galectin-3	Thermo	A3A12	1:1000	
α -SMA	Sigma Aldrich	A7607	1:1000	
CTGF	Santa Cruz	sc-25440	1:200	
CD68	Abcam	ab125212	1:500	
CD80	Santa Cruz	sc-376012	1:500	
CD86	Santa Cruz	sc-28347	1:500	

Cultured Cells

Name	Vendor or Source	Sex (F, M, or unknown)
Human Cardiac Fibroblasts	Promocell	Unknown
Mouse Kidney Fibroblasts	Primary cells	M

ONLINE SUPPLEMENT

ANTIFIBROTIC EFFECT OF NOVEL NEUTROPHIL GELATINASE-ASSOCIATED LIPOCALIN INHIBITORS IN CARDIAC AND RENAL DISEASE MODELS

Benjamin Bonnard^{1*}, Ernesto Martínez-Martínez^{1*}, Amaya Fernández-Celis², Quoc-Tuan Do³, Isbaal Ramos⁴, Patrick Rossignol⁵, Faiez Zannad⁵, Paul Mulder⁶, Antoine Ouvrard-Pascaud⁶, Natalia López-Andrés^{2, 5#}, Frédéric Jaisser^{1, 5#}

¹INSERM, UMRS 1138, Centre de Recherche des Cordeliers, Sorbonne Université, Université de Paris, Paris, France. ²Cardiovascular Translational Research. Navarrabiomed (Miguel Servet Foundation), Instituto de Investigación Sanitaria de Navarra (IdiSNA), Pamplona. Spain. ³Greenpharma SAS, Orléans, France. ⁴Innovative Technologies in Biological Systems SL (INNOPROT), Bizkaia, Spain. ⁵Université de Lorraine, INSERM Centre d'Investigations Cliniques-Plurithématique 1433, UMR 1116, CHRU de Nancy, French-Clinical Research Infrastructure Network (F-CRIN) INI-CRCT, Nancy, France. ⁶Inserm U1096, UFR Médecine-Pharmacie, Rouen, France.

* These authors contributed equally to this work

Both authors contributed equally to this study.

Corresponding authors:

Dr. Frédéric Jaisser

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

E-mail: frederic.jaisser@inserm.fr

Dr. Natalia López-Andrés.

Cardiovascular Translational Research. Navarrabiomed (Miguel Servet Foundation). C/Irunlarrea 3, 31008 Pamplona, Spain. Telephone: 34-848422359. Fax: 34-848422300

E-mail: natalia.lopez.andres@navarra.es

This file includes:

1 supplemental method

1 supplemental reference

1 supplemental figure

7 supplemental tables

SUPPLEMENTAL METHODS

Compounds

3-acetyl-N-[2-(1H-pyrazol-1-yl)phenyl]methyl]-benzenesulfonamide (GPZ614741, CAS 1241512-52-6) has been synthesized according to the scheme presented in Fig. S1. To a solution of [2-(1H-pyrazol-1-yl)phenyl]methylamine (3.0 g) in pyridine (20 mL) was slowly added 3-acetylbenzylsulfonyl chloride (4.17 g) at 0 °C, and the mixture was stirred overnight at 115 °C. After cooling down, the reaction solution was concentrated under reduced pressure. The residue was then dissolved in dichloromethane, washed with HCl 2 N, a saturated aqueous solution of NaHCO₃ and saturated brine, then dried over magnesium sulfate, and concentrated under reduced pressure. The residue was finally purified by flash column chromatography (1: 1EtOAc/petroleum ether) to give the title compound as a white solid (5.72 g, 93% yield). ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 8.27 (t, J = 1.6 Hz, 1H), 8.01 (dt, J = 1.6 and 8.0 Hz, 1H), 7.96 (dt, J = 1.6 and 8.0 Hz, 1H), 7.69 (d, J = 1.2 Hz, 1H), 7.63 (d, J = 2.4 Hz, 1H), 7.48 (t, J = 8.0 Hz, 1H), 7.30-7.26 (m, 2H), 7.18-7.14 (m, 2H), 6.45 (t, J = 2.2 Hz, 1H), 4.08 (d, J = 6.4 Hz, 2H), 2.55 (s, 3H).

Other compounds used in the present study are commercialized by Ambinter (see Table S5):

Cell toxicity and absorption, distribution, metabolism, and excretion (ADME) tests

Several parameters have been evaluated to determine ADME-Tox profile of the compounds. Two specific toxicity assays have been performed to assess hepatotoxicity and cardiotoxicity. Hepatotoxicity was evaluated in isolated hepatocytes from swiss mice and determined by the thiazolyl blue tetrazolium bromide colorimetric assay (sigma, St Louis, MO, USA). Cardiotoxicity was evaluated using the commercially available Predictor hERG fluorescence polarization kit (Thermo Fisher Scientific, Illinois, USA). Several absorption, distribution, metabolism, and excretion (ADME) assays have been carried out. The following experiments were undertaken: Stability in human microsomes, binding to human plasma protein, and CYP3A4 inhibition assay (Vivid CYP3A4 assay, Thermo Fisher Scientific, Illinois, USA). Physico-chemical properties were also assessed such as aqueous solubility and chemical stability.

Cell culture

Primary human cardiac fibroblasts (HCF) were obtained from Promocell (Heidelberg, Germany) and maintained in Fibroblast Media 3 following manufacturer's instructions (Promocell). Cells were used between passages 5 and 7. Cells were stimulated with recombinant hNGAL (500 ng/mL, R&D Systems) for 24 h for protein analysis. Primary Mouse Kidney Fibroblasts (MKF) were isolated from Wild Type (WT) mice. Briefly, 8 weeks old mice were sacrificed by cervical dislocation and kidneys were cleaned and rinsed in cold DPBS (Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline). The renal cortex was minced and incubated in Dulbecco's modified eagle medium/Nutrient mixture F-12 (DMEM/F12, Sigma) containing 1mg/mL collagenase A (Roche) during 25 minutes at 37°C. The digestion was inactivated by adding culture medium (DMEM/F12 + 10% FBS) then the cell suspension was passed through a 100-µm cell strainer. After centrifugation, the pellet (containing MKF) was diluted with culture medium then plated in 75cm² culture flask. After 24 hours MKF were washed with DPBS before replacement of fresh culture

medium. Thereafter, culture medium was changed every 48 hours. Once 70-80% confluent, MKF were trypsinized and plated in 12 or 6-well plates. For experimental use, MKF were starved with culture medium containing only 3% FBS. MKF were treated with mNGAL (500 ng/mL, R&D Systems) for 6h for gene expression analysis.

Animal experiments

Animals were housed in a climate-controlled facility with a 12-hours/12-hours light/dark cycle and provided free access to food and water. Experiments were approved by the Darwin ethics committee of Sorbonne University, and conducted according to the INSERM animal care and use committee guidelines. The NGAL inhibitor GP1 was incorporated in regular chow (A04, Safe, Augy, France) at the dose of 625 mg GP1/kg of chow to achieve a low dose of 100 mg/kg/d of GP1 administered to the mice (based on a daily consumption of 4 g of chow).

Myocardial infarction (MI) was induced as previously described.¹ Briefly, 8-12 weeks old C57Bl6 mice were used. Left ventricle diastolic and systolic diameters were measured in anesthetized (isoflurane 1.5%) mice, according to the American Society of Echocardiography's leading-edge method (using Vivid 7 echograph a 14 Mhz probe). In addition, LV outflow velocity was measured by pulsed waves, and CO was calculated as follows: $CO = \text{aortic VTI} \times [\pi \times (\text{LV outflow diameter}/2)^2] \times \text{heart rate}$, where VTI is velocity-time integral.

LV hemodynamic was assessed as described previously.¹ Briefly, mice were anesthetized (chloral 320mg.kg⁻¹, IP) and the carotid artery cannulated with a pressure-volume catheter (SPR839, Millar-Instruments, USA) and the catheter was advanced into the LV. Pressure-volume loops were obtained at baseline and during loading by gently occluding the abdominal aorta. LV end-systolic and end-diastolic pressures, $dP/dt_{\text{max/min}}$, LV relaxation constant tau and were measured/calculated with IOX software (EMKA, France). Systolic BP was measured by tail-cuff plethysmography in trained conscious mice at weeks 8-10 using a BP2000 Visitech model. BP was measured every day in the same room at the same hour for 5 consecutive days. The BP measurements (expressed as mmHg) presented are the averages of the last 3 days.

Chronic kidney disease (CKD) was induced by subtotal nephrectomy in eight-weeks-old male mice (25-26g). All surgeries were performed under ketamine /xylazine anaesthesia. Briefly, the left kidney was exposed, and the upper and lower poles were tied with a polyglycolic acid suture line. The peritoneum and skin were then sutured, and the animals were returned to their individual cages. After one week of recovery, the second kidney was removed. Removal of the second kidney represents T0. Sham mice were subjected to the same surgical procedures but neither renal poles nor the right kidney were removed. Mice were monitored for any sign of distress, and those observed to be experiencing severe, unrelievable pain were euthanized. Renal failure was assessed by the measure of plasma creatinine and urea with an automatic analyser (Konelab 20i; Thermo Fisher Scientific, Vernon Hills, IL) at weeks 4 and 8 post-Nx.

Histology and molecular biology

In the MI model, heart was harvested after hemodynamics and the atria and the ventricles were separated and weighed individually. A section of the left ventricle was immersed in Bouin fixative solution. In the CKD model, kidneys were harvested and a section was immersed in paraformaldehyde fixative solution. After fixation, the sections were dehydrated and embedded in paraffin. From these sections, 5- μ m thick histologic slices were obtained and were stained with Sirius Red. For the measurement of cardiac or renal collagen density, slides were examined and photographed under a light microscope (Zeiss) at 40x magnification. Collagen content was calculated as percentage of collagen area to total area of the image. Perivascular collagen was excluded from the analysis.

Molecular Biology

1) Western-blot analysis

Total protein aliquots of 20 μ g were prepared from cardiac homogenates and HCF and electrophoresed on SDS polyacrylamide gels and transferred to Hybond-c Extra nitrocellulose membranes (Amersham Biosciences). Membranes were incubated with primary antibodies for: Collagen I (Santa Cruz; dilution 1:500), Collagen type III (Santa Cruz; dilution 1:500), fibronectin (Millipore, 1:500), Galectin-3 (Thermo, 1:1000), α -SMA (Sigma, 1:1000), CTGF (Santa Cruz, 1:200), CD68 (Abcam, 1:500), CD80 (Santa Cruz, 1:500), CD86 (Santa Cruz, 1:500). Stain free detection was used for loading control (Bi-Rad Laboratories, CA, USA) After washing, the blots were incubated with peroxidase-conjugated secondary antibody, and binding revealed by ECL chemiluminescence (Amersham). After densitometric analyses, optical density values were expressed as arbitrary units. Results are expressed as an n-fold increase over the values of the control group in densitometric arbitrary units. *ELISA*

NGAL, IL6 and collagen type I concentrations were measured in cardiac tissue and cell supernatants by ELISA according to the manufacturer's instructions (R&D Systems).

2) ELISA

IL6 and collagen type I concentrations were measured in cardiac tissue and cell supernatants by ELISA according to the manufacturer's instructions (R&D Systems).

3) Proliferation

Cell proliferation was assessed using the MTT Proliferation Assay (Sigma).

4) Gene expression analysis

Frozen tissues (kidneys, heart) were homogenized in TRIzol (Life Technologies, Illinois, USA) using FastPrep beads (MP-Bio, CA, USA). cDNAs were generated using the Superscript II reverse transcriptase kit (Invitrogen, NY, USA), and qPCR was performed as previously described. Briefly, transcript levels were analysed in a CFX396 apparatus (Biorad). The reactions were performed in duplicate for each sample using the IQ SYBR Green supermix Kit (Biorad, CA, USA). To normalize gene expression, the geometric mean of multiple internal reference genes were used (*RS16*, *Ubc*, *Hprt* and *Gapdh* for mice experiments). Values in control conditions were set as 1 for each gene. The sequences of the specific primers are detailed in Table S7.

SUPPLEMENTAL REFERENCES

1. Martinez-Martinez E, Buonafine M, Boukhalifa I, Ibarrola J, Fernandez-Celis A, Kolkhof P, Rossignol P, Girerd N, Mulder P, Lopez-Andres N, Ouvrard-Pascaud A, Jaisser F. Aldosterone Target NGAL (Neutrophil Gelatinase-Associated Lipocalin) Is Involved in Cardiac Remodeling After Myocardial Infarction Through NFkappaB Pathway. *Hypertension*. 2017;70:1148-1156.

SUPPLEMENTAL FIGURES

Synthesis of GPZ614741

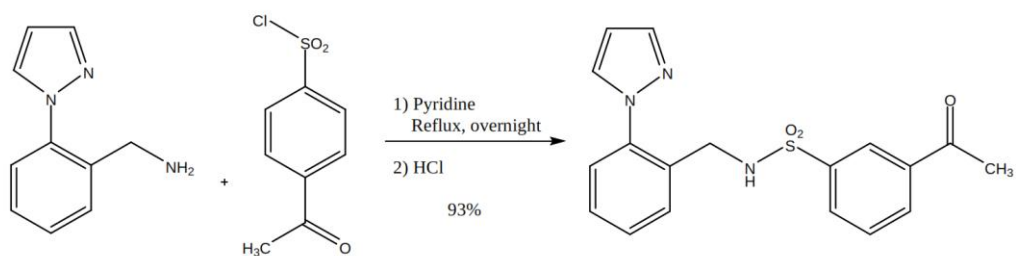


Figure S1: GPZ614741 synthesis scheme.

SUPPLEMENTAL TABLES

Table S1. Percentage of inhibition versus hNGAL on IL-6 secretion in human cardiac fibroblasts.

Compound	IL-6 secretion	% inhibition
Control	1.0 ± 0.1	
NGAL	2.21 ± 0.2 ***	
GPZ614741	0.86 ± 0.2 †††	61.1
GPZ058225	0.99 ± 0.3 ††	55.2
GPZ425915	1.12 ± 0.04 †	49.3
GPZ503502	1.32 ± 0.1 †	40.2
GPZ413473	1.35 ± 0.01 †	38.9
GPZ672150	1.55 ± 0.2	29.9
GPZ880710	1.57 ± 0.2	28.9
GPZ097126	1.58 ± 0.02	28.5
GPZ011720	1.60 ± 1.2	27.6
GPZ597101	1.61 ± 0.1	27.1
GPZ763971	1.69 ± 0.4	23.5
GPZ438190	1.75 ± 0.2	20.8
GPZ902633	1.81 ± 0.9	18.1
GPZ073952	1.82 ± 0.3 *	17.6
GPZ472686	1.98 ± 0.1 **	10.4
GPZ129400	1.99 ± 0.1 **	10.0
GPZ293019	2.01 ± 0.5 **	9.0
GPZ972604	2.02 ± 0.1 **	8.6
GPZ442790	2.04 ± 0.4 **	7.7
GPZ384799	2.05 ± 0.3 **	7.2
GPZ09424	2.16 ± 0.2 ***	2.3
GPZ062639	2.26 ± 0.3 ***	-2.3
GPZ982826	2.83 ± 0.2 ***	-28.0
GPZ469183	2.87 ± 0.2 ***	-29.9
GPZ069322	2.97 ± 0.5 ***	-34.4
GPZ192583	3.19 ± 0.3 ***†	-44.3
GPZ128506	5.72 ± 3.5***†††	-158.8
GPZ574458	6.28 ± 1.6***†††	-184.2
GPZ422811	8.87 ± 0.4***†††	-301.3
GPZ291090	Poor solubility	
GPZ347499	Toxic	
GPZ048130	Toxic	

Values are mean ± SEM. *p<0.05; **p<0.01; ***p<0.001 vs. Control. †p<0.05; ††p<0.01; †††p<0.001 vs. NGAL-treated human cardiac fibroblasts.

Table S2. Chemical formula of GPZ614741 (CAS: 1241512-52-6) **GP1** and GPZ058225 (CAS: 519050-14-7) **GP2**.

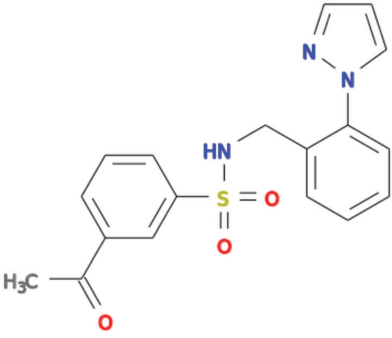
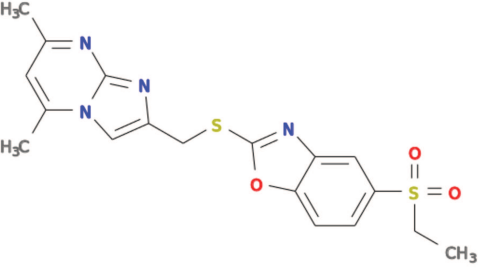
Compound name	Corresponding chemical formula
GPZ614741 (CAS: 1241512-52-6) GP1	
GPZ058225 (CAS: 519050-14-7) GP2	

Table S3. Second generation compounds derived from GP1 and GP2. Percentage of inhibition versus hNGAL on IL-6 secretion in human cardiac fibroblasts.

Original compound	Compound	IL-6 secretion	% inhibition
	Control	1.00 ± 0.03	
	NGAL	1.45 ± 0.1**	
GPZ614741		0.59 ± 0.02††	59.5
GPZ614741	GPZ642292	0.64 ± 0.02††	55.9
GPZ614741	GPZ478519	0.69 ± 0.02††	52.4
GPZ614741	GPZ505884	0.83 ± 0.02††	42.8
GPZ614741	GPZ778195	0.88 ± 0.04††	39.3
GPZ614741	GPZ595600	0.92 ± 0.04††	36.6
GPZ614741	GPZ863205	0.93 ± 0.03††	35.9
GPZ614741	GPZ913629	0.93 ± 0.02††	35.9
GPZ614741	GPZ200962	1.18 ± 0.2†	18.6
GPZ614741	GPZ385963	1.31 ± 0.1	9.7
GPZ614741	GPZ372533	1.40 ± 0.2*	3.4
GPZ614741	GPZ524806	1.46 ± 0.4	-0.7
GPZ058225		0.72 ± 0.02††	50.4
GPZ058225	GPZ564849	0.85 ± 0.1††	41.4
GPZ058225	GPZ278618	0.86 ± 0.02††	40.1
GPZ058225	GPZ743042	0.94 ± 0.03††	35.2
GPZ058225	GPZ519431	1.02 ± 0.1††	29.7
GPZ058225	GPZ469120	1.20 ± 0.1†	17.2
GPZ058225	GPZ406487	1.21 ± 0.1†	16.5
GPZ058225	GPZ827496	1.22 ± 0.02†	15.9
GPZ058225	GPZ380975	1.53 ± 0.3*	-5.5
GPZ058225	GPZ925853	1.63 ± 0.4*	-12.4
GPZ058225	GPZ998905	1.67 ± 0.1**	-15.2
GPZ058225	GPZ228729	1.68 ± 0.3**	-15.9
GPZ058225	GPZ241243	Toxic	

Values are mean ± SEM. *p<0.05; **p<0.01; ***p<0.001 vs. Control. †p<0.05; ††p<0.01; †††p<0.001 vs. NGAL-treated human cardiac fibroblasts.

Table S4. Cell toxicity and ADME. 1) Hepato- and cardio- toxicity determination; 2) ADME drug incompatibility test (CYP3A4 inhibition potential); 3) ADME parameters determination.

Compounds	TOXICITY		ADME			
	Hepatotoxicity μM	Cardiotoxicity % (100= no toxicity)	Aqueous solubility %	Chemical Stability %	hPPB%	CyP 3A4 Inhibition % (100= no inhibition)
GP7058225	No tox up 100 μM	101.73 \pm 4.1	63.46	92.2	89.11	68.07 \pm 1.52
GPZ614741	No tox up 100 μM	101.76 \pm 2.48	100	103	71.16	72.21 \pm 1.94

Table S5: Ambinter code for first generation compounds.

Compound	Ambinter Code
GPZ614741	Amb11184725
GPZ058225	Amb2248638
GPZ425915	Amb3442133
GPZ503502	Amb11202635
GPZ413473	Amb3489508
GPZ672150	Amb4231111
GPZ880710	Amb2050586
GPZ097126	Amb278968
GPZ011720	Amb10845008
GPZ597101	Amb8628398
GPZ763971	Amb10758566
GPZ438190	Amb535844
GPZ902633	Amb28974544
GPZ073952	Amb2412316
GPZ472686	Amb10877513
GPZ129400	Amb13907749
GPZ293019	Amb20418710
GPZ972604	Amb7039537
GPZ442790	Amb10663816
GPZ384799	Amb24107065
GPZ09424	Amb10841302
GPZ062639	Amb10200435
GPZ982826	Amb9982824
GPZ469183	Amb6889815
GPZ069322	Amb1043689
GPZ192583	Amb21856038
GPZ128506	Amb10810342
GPZ574458	Amb18511830
GPZ422811	Amb28974546
GPZ291090	Amb7809477
GPZ347499	Amb9154868
GPZ048130	Amb21856064

Table S6: Ambinter code for second generation compounds.

Compound	Ambinter Code
GPZ478519	Amb9191218
GPZ505884	Amb8210069
GPZ595600	Amb14471392
GPZ642292	Amb8245375
GPZ778195	Amb19510760
GPZ863205	Amb22723246
GPZ913629	Amb14013470
GPZ278618	Amb20642011
GPZ519431	Amb1347727
GPZ564849	Amb2602481
GPZ743042	Amb1262669
GPZ200962	Amb11195808
GPZ469120	Amb2250238
GPZ406487	Amb1346372
GPZ827496	Amb2250270
GPZ385963	Amb11950437
GPZ372533	Amb10618628
GPZ524806	Amb14019491
GPZ380975	Amb2250231
GPZ925853	Amb13134
GPZ998905	Amb1148393
GPZ228729	Amb1145445
GPZ241243	Amb1148474

Table S7: Primers used in mice in real time PCR analysis

	PRIMER	FOWARD	REVERSE
Housekeeping genes	<i>HPRT</i>	TCTAACTTTAACTGGAAAGAATGTC	TCCTTTTCACCAGCAAGCT
	<i>UBC</i>	CGGAGTCGCCCCGAGGTCACA	GGGCTCGACCTCCAGGGTGAT
Target genes	<i>αSMA</i>	TGTGCTGGACTCTGGAGATG	GAAGGAATAGCCACGCTCAG
	<i>CD68</i>	ACAAGGGACACTTCGGGCCA	GTCGTCTGCGGGTGATGCAG
	<i>CD80</i>	TTCACCTGGGAAAACCCCCAGAA	ACGACGACTGTTATTACTGCGCC
	<i>CD86</i>	AGCAGACGCGTAAGAGTGGCT	CATGGTGCATCTGGGGTCCATC
	<i>Collagen I</i>	CCCCGGGACTCCTGGACTT	GCTCCGACACGCCCTCTCTC
	<i>Fibronectin</i>	CCT ACG GCC ACT GTG TCA CC	AGT CTG GGT CAC GGC TGT CT
	<i>IL6</i>	CTCTGGGAAATCGTGGAAATG	AAGTGCATCATCGTTGTTTCATACA
	<i>MCP1</i>	GGCTGGAGAGCTACAAGAGG	TCTTGAGCTTGGTGACAAAAAC
	<i>TNFα</i>	GCCTCTTCTCATTCTGCTTG	CTGATGAGAGGGAGGCCATT

Rôle du récepteur minéralocorticoïde et de la Neutrophil Gelatinase-Associated Lipocalin dans les lésions cardio-rénales de l'insuffisance rénale chronique

Résumé

Le récepteur minéralocorticoïde (RM) connu pour son rôle physiologique dans la régulation de la pression artérielle mais participe également au développement de certaines pathologies telles que l'insuffisance rénale, maladies cardiovasculaires et l'hypertension. Notre équipe a identifié la Neutrophil Gelatinase-Associated Lipocalin (NGAL) comme étant une nouvelle cible régulée directement par le RM dans les pathologies cardiovasculaires. Afin de déterminer le rôle du RM et de NGAL dans le développement des lésions cardio-rénales induites par l'insuffisance rénale chronique (IRC), nous avons utilisé différents modèles de blocage du RM et de NGAL : du blocage pharmacologique à la délétion génétique. Nos résultats montrent dans un premier temps que le RM participe au remodelage cardiaque et à la dysfonction diastolique induites par l'IRC. Nous avons également montré que le NGAL produit par les macrophages a un rôle clef dans l'expression de la chemokine CCL5, qui recruterait des lymphocytes T CD4⁺ potentiellement impliquées dans le remodelage rénal en sécrétant de l'IL4. Enfin, nous avons mis en évidence une nouvelle molécule inhibitrice des effets délétères de NGAL dans le remodelage cardiaque et rénal dans deux modèles pathologiques (infarctus du myocarde et IRC). Pris ensemble, ces résultats démontrent l'implication du RM et de NGAL dans le développement des lésions cardio-rénales induites par l'insuffisance rénale chronique.

Mots clés : récepteur minéralocorticoïde ; NGAL, insuffisance rénale chronique, lésions cardio-rénales, fibrose, inflammation