



HAL
open science

Etude de la protection œstrogénique dans l'hypertension artérielle et le vieillissement chez la souris femelle

Emmanuel Guivarc'H

► **To cite this version:**

Emmanuel Guivarc'H. Etude de la protection œstrogénique dans l'hypertension artérielle et le vieillissement chez la souris femelle. Médecine humaine et pathologie. Université d'Angers, 2017. Français. NNT : 2017ANGE0064 . tel-03765298

HAL Id: tel-03765298

<https://theses.hal.science/tel-03765298v1>

Submitted on 31 Aug 2022

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.

Thèse de Doctorat

Emmanuel Guivarc'h

*Mémoire présenté en vue de l'obtention du
Grade de Docteur de l'Université Nantes Angers Le Mans
sous le sceau de l'Université Bretagne Loire*

Etude de la protection œstrogénique dans l'hypertension artérielle et le vieillissement chez la souris femelle

JURY

Rapporteurs :	Dr. Chantal Boulanger , DR, UMR INSERM 970, Paris Pr. Valérie Nivet-Antoine , PU-PH, UMR INSERM 1140, Paris
Examineur :	Pr. Vincent Procaccio , PU-PH, UMR INSERM 1083 – UMR CNRS 6015, Angers
Directeur de Thèse :	Dr. Daniel Henrion , DR, UMR INSERM 1083 – UMR CNRS 6015, Angers

Ecole doctorale	Ecole Doctorale Biologie Santé Nantes Angers
Discipline	Physiologie (section CNU 66)
Spécialité	Physiopathologie Cardiovasculaire
Unité de Recherche	Institut MitoVasc, UMR INSERM 1083 - CNRS 6015, Equipe CARME, Angers
Soutenu le	08 septembre 2017
Thèse N°	118789

REMERCIEMENTS

CITATION

RESUME/ABSTRACT

TABLEAUX ET FIGURES

TABLEAUX

FIGURES

Liste des abréviations

INTRODUCTION GENERALE

INTRODUCTION	1
1. Le système cardiovasculaire	1
1.1. Généralités	1
1.2. Artères	3
1.2.1. Structure des artères.....	3
1.2.1.1. Intima.....	3
1.2.1.2. Média	3
1.2.1.3. Adventice	4
1.2.2. Rôle physiologique des artères	4
1.2.2.1. Artères de gros calibre.....	4
1.2.2.2. Artères de petit calibre	5
1.2.2.3. Artérioles	5
1.2.2.4. Capillaires.....	7
1.3. Veines.....	7
1.3.1. Veines.....	7
1.3.2. Veinules	8
1.4. Rôles de l'endothélium vasculaire	9
1.5. Monoxyde d'azote	11
1.5.1. Production du NO.....	11
1.5.2. Enzymes NO synthases.....	12

1.5.2.1.	Activation de la eNOS dépendante du calcium	12
1.5.2.2.	Activation de la eNOS indépendante du calcium	14
1.5.3.	Voie des Prostacyclines	14
1.5.4.	Voie de l'EDHF	15
2.	Les maladies cardiovasculaires.....	16
2.1.	Définition générale	16
2.2.	Facteurs de risque.....	17
2.2.1.	Facteurs de risque non-modifiables.....	17
2.2.1.1.	Âge.....	17
2.2.1.2.	Sexe masculin	18
2.2.1.3.	Antécédents familiaux	18
2.2.2.	Facteurs de risque modifiables	20
2.2.2.1.	Hypertension artérielle.....	20
2.2.2.2.	Tabagisme.....	20
2.2.2.3.	Diabète	20
2.2.2.4.	Dyslipidémies.....	21
2.2.2.5.	Autres facteurs de risque.....	21
2.2.2.5.1.	Sédentarité	22
2.2.2.5.2.	Obésité	22
2.2.2.5.3.	Syndrome métabolique	22
3.	Hypertension artérielle	23
3.1.	Régulation de la pression artérielle	23
3.1.1.	Pression artérielle	23
3.1.2.	Mécanismes de régulation de la pression artérielle	24
3.2.	Définition de l'hypertension artérielle.....	26
3.3.	Principaux facteurs de risque de l'hypertension artérielle	27
3.4.	Traitements de l'hypertension artérielle	28
3.4.1.	Traitements non-médicamenteux de l'hypertension artérielle	28
3.4.2.	Traitements médicamenteux de l'hypertension artérielle	28
3.5.	Rôle du système rénine-angiotensine-aldostérone	29
3.5.1.	Rôle de la rénine.....	29
3.5.1.1.	Production de la rénine	29
3.5.1.2.	Action de la rénine.....	30
3.5.2.	Rôle de l'angiotensine II	31
3.5.2.1.	Nature de l'Ang II.....	31
3.5.2.2.	Production de l'Ang II	31
3.5.2.3.	Action de l'Ang II.....	32

3.6.	Conséquences vasculaires de l'Ang II dans l'hypertension artérielle	32
3.6.1.	Remodelage artériel induit par l'Ang II	33
3.6.1.1.	Action de l'Ang II sur le stress oxydatif et l'inflammation vasculaire	34
3.6.1.2.	Action de l'Ang II sur l'activité des métalloprotéinases.....	35
3.6.1.3.	Action de l'Ang II sur le remodelage vasculaire	36
3.6.1.4.	Endothéline-1	37
3.6.2.	Hypercontraction vasculaire dans l'HTA	37
3.6.3.	Dysfonction endothéliale	39
3.6.3.1.	Analyse de la fonction endothéliale	40
3.6.3.2.	Relation entre hypertension artérielle et dysfonction endothéliale	40
3.6.4.	Stress oxydatif	41
3.6.4.1.	Nature moléculaire du stress oxydatif.....	41
3.6.4.2.	NADPH oxydases.....	44
3.6.4.3.	Superoxyde Dismutases.....	45
3.6.4.4.	Implication dans l'hypertension artérielle.....	46
3.6.4.4.1.	Modifications des protéines	46
3.6.4.4.2.	Effets vasculaires du stress oxydatif dans l'HTA	46
3.6.4.4.3.	Essais cliniques utilisant des antioxydants	48
4.	Œstrogènes et protection vasculaire	49
4.1.	Sexe, ménopause et risque cardiovasculaire	49
4.2.	Nature moléculaire des œstrogènes.....	49
4.3.	Cycle hormonal et production des œstrogènes.....	51
4.4.	Etudes cliniques de remplacement hormonal	53
4.4.1.	Design de la Women Health Initiative	53
4.4.2.	Résultats de l'étude.....	53
4.4.3.	Critiques de l'étude	54
4.5.	Récepteurs aux œstrogènes.....	55
4.5.1.	Structure des récepteurs aux œstrogènes	55
4.5.2.	Différence d'action entre les récepteurs aux œstrogènes.....	57
4.5.2.1.	Différence d'actions génomiques entre ER α et ER β	57
4.5.2.2.	Rôle vasculaire de GPER	58
4.5.3.	Mécanismes d'action d'ER α	60
4.5.3.1.	Action génomique d'ER α	60
4.5.3.1.1.	Mécanisme d'action génomique d'ER α	60
4.5.3.1.2.	Rôle vasculaire de la fonction AF-1.....	62
4.5.3.1.3.	Rôle vasculaire de la fonction AF-2.....	62
4.5.3.1.3.1.	Rôle protecteur d'AF-2 dans l'athérosclérose	62

4.5.3.1.3.2.	Absence de rôle d'AF-2 dans l'endothélium	63
4.5.3.2.	Action non-génomique d'ER α	63
4.5.3.2.1.	Mécanisme moléculaire de la fonction MISS d'ER α	63
4.5.3.2.2.	Rôle de MISS dans l'arbre vasculaire	66
4.5.3.2.2.1.	Souris C451A déficientes pour MISS	66
4.5.3.2.2.2.	MISS et vasodilatation E2-dépendante.....	67
4.5.3.2.2.3.	MISS et réparation endothéliale	67
4.5.3.2.2.4.	Complexité de l'interaction entre fonction génomique et non-génomique.....	67
4.5.3.2.2.5.	Conclusion sur les récepteurs aux œstrogènes	68
4.6.	Œstrogènes et Hypertension artérielle.....	69
4.6.1.	Impact de l'E2 sur la sensibilité au sel	69
4.6.2.	Impact de l'E2 sur l'activité du SRAA au niveau rénal	69
4.6.3.	Effet central de l'E2 contre l'hypertension artérielle	69
5.	Etude n°1	70
5.1.	Problématique de l'étude n°1.....	70
5.2.	Objectifs de l'étude n°1.....	71
MATERIEL ET METHODES.....		73
1.	Modèle animal.....	73
1.1.	Souris sauvages	73
1.2.	Souris ovariectomisées et ER β ^{-/-}	74
1.3.	Souris ER α ^{-/-}	75
1.4.	Souris C451A	75
1.5.	Souris AF-2°	76
1.6.	Caractéristiques phénotypiques des animaux	77
2.	Modèle d'hypertension artérielle	77
2.1.	Choix du modèle	77
2.2.	Choix de la dose d'Ang II	78
2.3.	Protocole d'HTA	79
2.4.	Mesure de la pression artérielle de base	79
2.4.1.	Principe de la photopléthysmographie	79
2.4.2.	Protocole de mesure	80
2.4.3.	Justification de la méthode de mesure	81
2.5.	Pompes osmotiques.....	82
2.5.1.	Principe de fonctionnement des pompes osmotiques Alzet.....	82
2.5.2.	Préparation des pompes osmotiques et justification de la dose d'Ang II utilisée	82

2.6.	Chirurgie d'implantation des pompes osmotiques délivrant l'Ang II.....	83
3.	Sacrifice et prélèvements.....	83
4.	Evaluation de la fonction vasculaire par myographie.....	84
4.1.	Préparation du vaisseau.....	84
4.2.	Analyse de la réactivité aortique.....	85
4.3.	Courbe concentration-réponse.....	86
5.	Histomorphométrie.....	87
5.1.	Coupes des artères.....	87
5.2.	Coloration des lames élastiques.....	88
5.3.	Analyse des images.....	88
6.	Western Blot.....	89
6.1.	Extraction et dosage des protéines.....	89
6.2.	Migration et transfert des protéines.....	89
6.3.	Révélation et quantification.....	90
7.	Dosages plasmatiques.....	91
8.	Analyses statistiques.....	91
	RESULTATS DE L'ETUDE 1.....	94
1.	Les œstrogènes réduisent l'hypertension artérielle induite par l'Ang II et ses conséquences cardiovasculaires.....	94
1.1.	Hypertension artérielle et hypertrophie cardiaque.....	94
1.2.	Remodelage artériel.....	96
1.3.	Réactivité vasculaire.....	98
2.	Le récepteur ERβ ne participe pas à la protection œstrogénique contre l'hypertension artérielle induite par l'Ang II.....	100
3.	Le récepteur ERα est nécessaire aux effets protecteurs des œstrogènes contre l'hypertension artérielle et ses conséquences cardiovasculaires.....	101
3.1.	Hypertension artérielle et hypertrophie cardiaque.....	101
3.2.	Remodelage artériel.....	103
3.3.	Réactivité vasculaire.....	105
4.	La voie MISS d'ERα n'est pas nécessaire à son effet protecteur dans l'hypertension artérielle.....	107

4.1.	Hypertension artérielle et hypertrophie cardiaque	107
4.2.	Remodelage artériel.....	109
4.3.	Réactivité vasculaire	111
5.	La fonction nucléaire AF-2 est nécessaire à la protection d'ERα contre l'hypertension artérielle et ses conséquences cardiovasculaires.....	113
5.1.	Hypertension artérielle et remodelage hypertrophique	113
5.2.	Remodelage artériel.....	115
5.3.	Réactivité vasculaire	117
5.4.	Expression protéique dans l'aorte	119
6.	La stimulation des fonctions génomiques d'ERα prévient l'hypertension induite par l'Ang II.....	121
	DISCUSSION.....	123
1.	Rôle protecteur des œstrogènes dans l'hypertension	124
2.	Rôle des récepteurs ERα et ERβ dans l'hypertension.....	124
2.1.	Absence de rôle protecteur d'ER β	124
2.2.	Rôle protecteur d'ER α	126
3.	Absence de rôle protecteur de la voie MISS	127
4.	Rôle protecteur d'AF-2 contre l'hypertension	128
4.1.	Impact sur la réponse à l'Ang II.....	128
4.2.	Impact sur la fonction vasculaire et les défenses anti-oxydantes	129
4.2.1.	Impact sur la vasodilatation	129
4.2.2.	Impact sur l'expression de l'EC-SOD	130
5.	L'estérol prévient l'hypertension induite par l'Ang II	131
	CONCLUSION DE L'ETUDE 1.....	133
	INTRODUCTION DE L'ETUDE 2.....	136
1.	Le vieillissement.....	136
1.1.	Généralités sur le vieillissement	136
1.2.	Causes du vieillissement	137
1.2.1.	Rôle du stress oxydatif	137
1.2.2.	Diminution des capacités réparatrices de l'ADN.....	138

1.2.3.	Raccourcissement des télomères.....	139
1.2.4.	Vieillessement mitochondrial.....	140
1.2.5.	Rôle de p66 ^{shc} dans le vieillissement et la mitochondrie	142
1.2.6.	Fusion et fission mitochondriales.....	144
1.2.6.1.	Rôle d'OPA-1.....	145
1.2.6.2.	Rôle de DRP1	146
2.	Vieillessement du système cardiovasculaire et rénal	147
2.1.	Vieillessement du cœur	147
2.2.	Vieillessement de l'arbre vasculaire.....	147
2.3.	Vieillessement du rein.....	149
2.3.1.	Modifications du rein au cours du vieillissement.....	149
2.3.1.1.	Modifications fonctionnelles	149
2.3.1.2.	Modifications structurelles	150
2.3.2.	Implication du SRAA dans le vieillissement rénal.....	150
3.	Rôle des œstrogènes dans le vieillissement et la mitochondrie.....	152
3.1.	Les œstrogènes protègent le rein au cours du vieillissement.....	152
3.2.	Hormones œstrogéniques et mitochondrie	153
3.2.1.	Implication des récepteurs aux œstrogènes ER α et ER β dans la régulation de la fonction mitochondriale	153
3.2.1.1.	Rôle des œstrogènes dans la mitochondrie	153
3.2.1.2.	Implication des récepteurs aux œstrogènes dans la biogénèse mitochondriale	154
3.2.2.	Relation entre les pathologies cardiovasculaires, rénales et effets œstrogéniques au niveau mitochondrial	155
3.2.2.1.	Modèle de trauma hémorragique	155
3.2.2.2.	Isoflavones et biogénèse mitochondriale.....	155
3.2.2.1.	Ischémie-reperfusion.....	156
4.	Etude 2.....	157
4.1.	Hypothèse	157
4.2.	Design et objectif de l'étude 2	157
	MATERIEL ET METHODES.....	160
1.	Modèle animal.....	160
2.	Caractéristiques phénotypiques des animaux	161
3.	Sacrifice et prélèvements.....	161

4.	Evaluation de la fonction vasculaire	162
5.	Evaluation de la structure vasculaire.....	162
6.	Immunomarquages rénaux	162
7.	Dosages plasmatiques.....	163
8.	Etude de l'expression génique par RT-qPCR	163
8.1.	Extraction d'ARN	163
8.2.	RT-qPCR.....	164
9.	Analyse de l'ADN mitochondrial.....	165
9.1.	Quantification de l'ADNmt par Q-PCR	165
9.1.1.	Extraction d'ADN	165
9.1.2.	Quantification de l'ADNmt	165
9.2.	Evaluation de la qualité de l'ADNmt par PCR long range.....	166
9.2.1.	Préparation du mix de PCR.....	166
9.2.2.	Electrophorèse	167
9.2.3.	Révélation	167
10.	Analyses statistiques.....	167
RESULTATS DE L'ETUDE 2		170
1.	Impact du vieillissement sur le système cardiovasculaire et rénal.....	170
1.1.	Evolution de la pression artérielle, de l'hypertrophie cardiaque et de la structure vasculaire	170
1.2.	Evolution de la fonction vasculaire	172
1.3.	Evolution des paramètres rénaux et métaboliques.....	174
1.4.	Evolution de l'expression des gènes liés à fibrose, l'inflammation et le stress oxydatif	176
1.1.	Evolution de l'inflammation rénale.....	178
2.	Impact du récepteur ERα sur le vieillissement cardiovasculaire et rénal	179
2.1.	Rôle d'ER α dans la pression artérielle, l'hypertrophie cardiaque et la structure vasculaire	179
2.2.	Rôle d'ER α sur le vieillissement de la fonction vasculaire	181
2.3.	Rôle d'ER α dans l'évolution des paramètres rénaux et métaboliques au cours du vieillissement..	183
2.4.	Rôle d'ER α dans l'évolution de l'expression des gènes liés à la fibrose, à l'inflammation et au stress oxydatif	185
2.1.	Rôle d'ER α dans l'évolution de l'inflammation rénale.....	187
3.	Impact du vieillissement et d'ERα sur la mitochondrie.....	188

3.1.	Impact du vieillissement et d'ER α sur l'expression de gènes de régulation mitochondriale.....	188
3.2.	Impact du vieillissement et d'ER α sur la quantité d'ADN mitochondrial.....	191
3.3.	Impact du vieillissement et d'ER α sur la qualité de l'ADN mitochondrial	192
DISCUSSION.....		194
1.	Les souris femelles âgées ne présentent pas d'altérations notables du système cardiovasculaire	195
1.1.	Evolution des paramètres cardiovasculaires.....	195
1.2.	Evolution des paramètres lipidiques circulants	196
2.	Le vieillissement augmente l'inflammation du rein sans altérer sa fonction	197
2.1.	Fonction rénale	197
2.2.	Inflammation et fibrose rénales.....	198
3.	Rôle d'ERα dans le vieillissement cardiovasculaire et rénal.....	199
3.1.	Paramètres cardiovasculaires, rénaux et lipidiques.....	199
3.2.	Le récepteur ER α modifie la biogénèse mitochondriale.....	201
3.2.1.	Le vieillissement ne modifie pas la quantité d'ADNmt	201
3.2.2.	L'absence d'ER α modifie la quantité d'ADNmt	201
3.2.3.	L'absence des œstrogènes, d'ER α et d'ER β , modifie la quantité d'ADNmt	203
4.	Le vieillissement et l'absence d'ERα n'altèrent pas la qualité de l'ADN mitochondrial	204
5.	Hypothèses et perspectives	206
CONCLUSION SUR L'ETUDE 2		207
CONCLUSION FINALE		209
BIBLIOGRAPHIE		211

Remerciements

Ce travail n'aurait pas été possible sans l'aide de nombreuses personnes que je tiens à remercier ici.

« Est-ce que vous avez deux minutes Daniel ? »

Je souhaite tout d'abord remercier le Dr. Daniel Henrion, qui m'a accueilli dans son laboratoire et m'a accordé la chance de réaliser ma thèse de doctorat sur un sujet particulièrement intéressant. Au cours de ces trois années de collaboration, il a été un important soutien, prodiguant de très nombreux conseils agrémentés d'anecdotes toujours passionnantes. J'ai eu la liberté de travailler à ma façon tout en ayant quelqu'un de confiance à qui me référer en cas de besoin. Il m'a accordé l'opportunité d'encadrer de nombreux stagiaires, d'enseigner en parallèle de ma thèse et enfin, de présenter mon travail en congrès et en séminaires à de nombreuses reprises. Pendant ces années, il n'y a jamais eu aucune critique ou remarque négative de sa part et il a toujours montré un optimisme et une bonne humeur très agréables. Ces trois années ont été une période véritablement enrichissante sur le plan personnel et professionnel et je le remercie pour cela. Pour tout étudiant cherchant un directeur de thèse, je le recommande vivement !

Je remercie également le Pr Vincent Procaccio pour ses conseils, son aide et sa disponibilité dans mon projet de thèse. Je remercie aussi le Pr Jean-François Arnal, Coralie Fontaine, Françoise Lenfant et toute leur équipe pour cette passionnante collaboration scientifique.

« *Quand tout va bien, on peut compter sur les autres, quand tout va mal, on ne peut compter que sur sa famille* ». Proverbe chinois

Pour finir, je tiens à remercier ma famille. En premier lieu, je souhaite tout d'abord remercier mes parents.

« *D'un père vertueux naissent ordinairement des enfants vertueux* ». Proverbe latin, 1757.
Espérons que nous ne soyons pas les exceptions à la règle...

Je remercie mon père Hervé, un homme droit, honnête, intègre, altruiste, modeste et travailleur qui nous a élevés à la sueur de son front. Tout ce que nous avons, nous le lui devons. Si je marche de plus en plus dans ses traces aujourd'hui, c'est sans doute que c'est un modèle et un exemple à suivre. Pour tous les problèmes qu'il a connus dans sa vie personnelle et professionnelle, pour tout le stress et l'anxiété que nous lui avons occasionnés par nos errements de jeunesse, j'espère que nos parcours le rendront fier et récompenseront ses efforts infatigables. Qu'il en soit remercié et que Dieu le protège.

« *Derrière chaque grand homme, il y a une femme* ».
On ne la voit pas toujours parce qu'elle fait l'm55 mais elle est bien là !

Fidèle bras droit du paternel, ma mère Bernadette est une femme avant tout généreuse, qui ne compte pas et donne tout ce qu'elle a (mais l'argent de poche était parfois très limité!). C'est également une femme forte, qui a beaucoup souffert et a tout sacrifié pour sa famille, et nous ne lui avons pas toujours rendu. Elle a été et sera toujours une merveilleuse mère, attentive et aimante. Elle nous a toujours protégés, éduqués et choyés comme une mère ours. De la même manière, elle nous a aussi administré de bonnes fessées quand cela était mérité ! Sans son travail quotidien pour tenir sa famille, nous n'aurions pas eu d'avenir. Qu'elle en soit remerciée et que Dieu la protège.

« *On ne doit aimer qu'une femme dans sa vie, celle qui vous aime, et vivre tous deux de ce mutuel amour* ». Emile Zola, 1868

Je remercie ma femme, Lena, pour l'amour qu'elle me porte, le bonheur qu'elle m'apporte et pour m'avoir donné un merveilleux petit garçon, Gabriel. Nous avons traversé beaucoup d'épreuves dans notre jeune vie de couple mais nous avons toujours fait face ensemble, malgré les difficultés. Je te remercie pour ton soutien, ta gentillesse, ta patience et ta douceur. Et je te remercie également pour tes multiples corrections et relectures de ce mémoire ! Il y aurait encore beaucoup de choses à dire et, comme je suis pudique, je vais m'arrêter là. Que tu en sois remerciée et que Dieu te protège.

« *Les enfants valent mieux que la richesse* ». Proverbe islandais, 1960.

Je remercie mon petit Gabriel pour le bonheur qu'il apporte déjà dans notre vie. Que Dieu le protège et lui donne une longue et belle vie.

« *Un frère est un ami donné par la nature* ». Gabriel-Marie Legouvé.
Occasionnellement, cet ami peut mettre des raclées à son petit frère !

« *Nulle amie ne vaut une sœur* ». Christina Rossetti.
Idem, cette sœur peut aussi mettre des raclées à son frère, à l'âge de 12 mois !

Je remercie mon frère Bertrand et ma sœur Emeline, avec qui nous avons tout partagé, avec qui nous nous sommes disputés, amusés, rigolés, chamaillés, réconciliés, etc. Nous avons surtout vécu des années de bonheur familial et que Dieu nous accorde d'en avoir encore de longues autres. Je les remercie pour leur soutien indéfectible et tout ce qu'ils m'ont apporté. Qu'ils en soient remerciés et que Dieu les protège.

« *Il n'y a point de tableau plus charmant que celui de la famille* ». Jean-Jacques Rousseau, 1762

Je remercie ma tante et marraine Pierrette qui a toujours veillé sur moi et qui est l'une des personnes les plus généreuses que l'on puisse rencontrer. Elle a été un grand soutien pour tous les membres de notre famille, que ce soit pour ses parents, ses frères et sœur, son mari et tous les autres. C'est la maman de notre famille, toujours prête à se mettre en quatre pour régler les problèmes et pourvoir aux besoins de chacun. Elle m'a beaucoup apporté tout au long de ma vie et je tiens à l'en remercier profondément. Qu'elle en soit remerciée et que Dieu la protège.

Je remercie également ma mamie Catherine, qui n'est malheureusement plus parmi nous. Sans elle, cette famille n'aurait pas foulé le sol. Elle a vécu une vie difficile rempli de difficultés auxquelles elle a toujours fait face avec force et dignité. Je pense également à mon grand-père Marcel, qui a permis à ses enfants de construire une vie décente. Je pense également à mon grand-père Joseph et sa femme Jeannette. Qu'ils soient tous remerciés et que Dieu veille sur eux où qu'ils soient maintenant.

Enfin, je remercie toute ma famille pour tout, Patrick, Jacqueline, Lorette, Jean-Jacques, Guy, Nicolas, Nathalie, Landry, Léa, Paul, Cyril, Gaëlle, Michelle, Marie-No, Brice, petit Joseph, grand Joseph, Joséphine et Athanase, et tous les autres... Qu'ils soient tous remerciés et que Dieu les protège.

Je tiens à remercier quelques personnes qui ont rendu mes journées de travail toujours agréables avec parfois de francs moments de rigolade.

« *MD. Ph.D.* »

Je remercie tout d'abord mon ami « le futur double-docteur » Oussama, avec qui nous avons partagé nos galères et nos joies pendant trois, dans et en dehors du labo. On a déprimé ensemble, on a rigolé ensemble et on a quand même passé de bonnes années de doctorat ! Cela a rendu cette expérience encore plus agréable et je l'en remercie. Je lui souhaite une belle réussite personnelle et professionnelle.

« *ALLER, FINIS TES POMPES* »

Je remercie aussi Zénouba, alias Zouzou, qui m'a fait suer sang et eau pour me maintenir en forme. Toujours le cœur sur la main, je la remercie pour sa gentillesse de tous les instants.

« *Quand on est un boss...* »

Je remercie également Tristan Champin, alias le « *pape de l'immunomarquage* ». Quelqu'un de toujours positif, avec la petite blague toujours prête pour faire rire (à noter que la blague est parfois raciste). Nous avons également des goûts communs en matière... de... il comprendra !

« *11h30, l'heure du selfie...* »

Je remercie « Selfie-Man » Joseph, qui non seulement m'a fait beaucoup rire pendant son séjour mais qui m'a également montré un nombre incalculable de selfies, en général vers 11h30. Sa bonne humeur et son sens social a mis une super ambiance dans le labo. Je lui souhaite le meilleur pour la suite.

« *Dr Dib* »

Je remercie Abdallah, avec qui nous avons beaucoup partagé, rigolé et réfléchi aux mécanismes de remodelage (si c'est vrai !)... Je lui souhaite le meilleur pour la suite !

« *GuyGuy* »

Je remercie Guillaume, un autre futur MD. Ph.D., avec qui nous avons beaucoup échangé, notamment des balles de tennis et de squash, mais également des informations scientifiques sur mon projet de thèse et des bons moments de rigolade. Je lui souhaite un excellent avenir personnel et professionnel.

« La force tranquille du Cameroun »

Je remercie Lionel, avec qui cela été un plaisir de danser l'Azonto en artério ! Je lui souhaite un excellent avenir personnel et professionnel.

« Dr Garnier »

Je remercie Anne-So, pour les moments passés à écouter de la musique en artério (Pierre Bachelet et Hugues Aufray ou quelque chose comme ça...). Je lui souhaite le meilleur ainsi que pour sa petite famille.

« le Dr Sushi »

Je remercie Simon pour m'avoir donné l'opportunité d'assister à de véritables chirurgies cardiaques et toutes les rigolades en artério. Je lui souhaite le meilleur ainsi que pour sa petite famille.

Je remercie également Charlotte, Lucille, Céline et Cyrielle avec qui j'ai passé de supers moments et à qui je souhaite le meilleur pour la suite.

« Anne-Laure ? j'ai juste une petite question... »

Je remercie Anne-Laure pour son accueil, ses conseils, sa disponibilité malgré mes nombreux « Anne-Laure ? j'ai juste une petite question... » qui prenaient une demi-heure à chaque fois... Je tiens également à la remercier pour son travail de grande qualité qui m'a permis de démarrer ma thèse dans de très bonnes conditions. Enfin, je la remercie pour sa gentillesse et son aide précieuse.

« Dr & Dr »

Je remercie Julie et Gilles pour leurs 10⁹ conseils et informations qu'ils ont pu me prodiguer au cours de ces 3 ans. Toujours disponibles, toujours de bonne humeur. Ils ont été d'excellents guides scientifiques et je les remercie particulièrement pour cela.

« Les Mamans du labo »

Je remercie également Emilie (la Black Mamba !) ainsi que Linda qui ont été d'une grande aide pendant ces trois années. Toujours accueillantes et souriantes, leurs conseils et leur disponibilité ont été très appréciés. Merci pour leur gentillesse et le temps que nous avons passé à discuter de tout et de rien (enfants, biberons, crédit immobilier...). Je remercie particulièrement Linda pour son aide dans mon projet de recherche. Je remercie également Emmanuelle Maire pour son travail administratif quotidien sans qui le laboratoire ne fonctionnerait plus.

« L'expérience de la paillasse »

Je tiens à remercier Jennifer Deschamps et Agnès Barbelivien pour leur aide précieuse à la paillasse et pour m'avoir formé à certaines manipulations. Je les remercie également pour leur gentillesse et leur bonne humeur.

« L'association DNA »

Je n'oublie pas les membres de l'association DNA avec qui on a galéré pour faire vivre cette association, Guyguy bien sûr mais aussi Marine, Sylvain et le Pr. Legeay pour les bons moments passés ensemble. On a galéré pour le gala, les tables rondes, les affiches, les petits-déjeuners... Mais c'était une excellente expérience et je suis content d'y avoir pris part.

Je remercie également Jamal qui a contribué à ce travail de thèse.

Je remercie les stagiaires que j'ai eu la chance d'encadrer. Aurélien dont le travail et le sérieux ont permis de véritables avancées pour mon deuxième projet de thèse mais également Nada-Joe qui a travaillé dur, Vincent, Loïc, Nadège, Juliette et Solenne.

« L'enseignement »

Je remercie toutes les personnes qui m'ont permis d'enseigner pendant mon doctorat. C'était un rêve d'enfant que j'ai pu réaliser et j'ai particulièrement apprécié cette expérience. Je remercie donc Christian Legros, Eric Lelièvre, Dominique Couez, Caroline de l'IUT et Thibault de la fac de Science.

Je remercie Céline, Laurent, César, Marie, Mathilde, Claire, Louis et Cyril pour leurs conseils et leur disponibilité. Je remercie aussi les stagiaires du labo pour la bonne ambiance qu'ils ont mise, malgré le stress de leur formation.

« Passeport-recherche »

Je remercie également les enseignants et les élèves de la classe de 1^{ère} STL 2015-2016 du lycée Bourg-Chevreau de Segré. Cette expérience a été particulièrement enrichissante et je leur souhaite un très bel avenir et une bonne continuation.

« Le début dans la recherche »

Je tiens à remercier les personnes qui m'ont aidé à mettre un pied dans la recherche, notamment le Pr. Vehary Sakanyan et son assistante Michelle Lecoq. C'est un modèle de travailleur, intègre et brillant, qui donne sa chance à tous. Je le remercie pour son aide.

Je remercie le Pr. N'Guessan et le Pr. Dosso pour mon stage à l'Institut Pasteur de Côte d'Ivoire. Je remercie le Dr. Angela Tesse, le Dr. Sophie Talon, le Dr. Gilles Toumaniantz, le Dr. Christelle Cario-Toumaniantz ainsi que le Dr. Vincent Sauzeau pour leur aide et leur soutien au cours de mon cursus.

« Les amis »

Je remercie les amis avec qui j'ai traversé pas mal de bons moments. Lyssia pour toutes les fois où elle m'a grondé parce que j'arrivais en retard en cours et où elle a fait du shopping pour que je m'habille mieux. Pierre-Samuel pour tous les gâteaux qu'il m'a fait manger (si j'ai du diabète, ce sera de sa faute). Antoine (aka Guérié) pour tous les Quicks du vendredi (pareil si j'ai du cholestérol), Hamady N'Gom Coulibaly (le business man), Dr Dévo (ma future ophtalmo) et d'autres que j'oublie sans doute.

Citation

“Life is 10% what happens to us and 90% how we react to it”

-Dr Dennis P. Kimbro

Résumé/Abstract

Context

Estrogenic hormones have numerous beneficial effects in the cardiovascular and renal systems but the underlying mechanisms are extensively complex. Estrogen receptor ER α is described as the main effector of the positive actions of estrogens. This receptor acts in the cell using two different pathways. In the nucleus, ER α acts as a transcription factor with genomic effects, through its activating functions AF. At the membrane, it exerts non-genomic effects, called MISS.

First Study

In a first study, we have explored the protective mechanism of ER α in hypertension, a main risk factor in cardiovascular diseases. Using genetically modified mice, we have been able to highlight the involvement of AF-2 genomic actions against angiotensin II-induced hypertension. On the other hand, ER α -dependant MISS was not involved in ER α protection. Confirming our hypothesis, we found that AF-2 stimulation with estretol was sufficient to completely prevent hypertension, thus providing a possible therapeutic perspective.

Second Study

In a second project, we have investigated the protective actions of ER α against aging-related cardiovascular and renal alterations. This work is still ongoing but we found that 16 months-old female mice presented no obvious vascular or renal dysfunctions. Those results are surprising considering past published data on the subject. Aging mice lacking ER $\alpha^{-/-}$ did not exhibit any particular alterations either. However, we were able to find that estrogens and ERs were involved in the mitochondria biogenesis in a surprising manner. These results will be further investigated in the future.

Conclusion

To conclude, this work has allowed a better understanding of the estrogens receptors actions in the cardiovascular and renal systems.

Contexte

Les hormones œstrogéniques ont de nombreux effets protecteurs au niveau cardiovasculaire et rénal mais leurs mécanismes sont très complexes. Le récepteur aux œstrogènes ER α est le principal effecteur des effets bénéfiques de ces hormones. Il possède deux voies d'action. Dans le noyau, il a des effets génomiques via ses fonctions d'activation AF. A la membrane, il a des effets non-génomiques via une signalisation membranaire MISS.

Première étude

Dans une première étude, nous avons exploré le mécanisme protecteur d'ER α dans l'hypertension artérielle, un facteur de risque majeur de maladies cardiovasculaires. Nous avons mis en évidence le rôle protecteur des effets génomiques d'ER α via sa fonction AF-2 contre l'hypertension. Nous avons également observé que la stimulation de cette fonction par l'Estétrol suffisait à reproduire les effets protecteurs des œstrogènes, ce qui ouvre une perspective thérapeutique potentielle.

Deuxième étude

Dans une deuxième partie, nous avons étudié un potentiel effet protecteur d'ER α dans le vieillissement cardiovasculaire et rénal. Cette étude, toujours en cours, a pu mettre en évidence que la souris femelle ne présentait pas d'altération majeure de la fonction vasculaire et rénale. Les résultats obtenus étaient globalement inverses à ce qui est suggéré dans la littérature concernant le vieillissement et la protection œstrogénique. Cette étude a toutefois permis de mettre en évidence que les œstrogènes agissaient sur la biogénèse mitochondriale, d'une manière inattendue. Ces résultats seront approfondis dans de prochaines expériences.

Conclusion

En conclusion, ce travail de thèse a permis de mieux cerner l'implication des hormones œstrogéniques et de leur récepteur ER α dans le système cardiovasculaire.

Tableaux et Figures

Aucune figure ou tableau de ce mémoire n'a été copiée-collée à partir d'une autre source. Les figures ont été réalisées en anglais. Lorsque la figure (ou le tableau) a été inspirée ou modifiée à partir d'une source, celle-ci a été systématiquement citée dans le titre adjacent.

Tableaux

Tableau 1 : Classification de l'HTA.	26
Tableau 2 : Classification du risque de MCV en fonction du niveau d'HTA.....	27
Tableau 3 : Principaux facteurs de risque de l'hypertension artérielle.	27
Tableau 4 : Liste des principales catégories de traitements médicamenteux de l'hypertension artérielle.....	29
Tableau 5 : Critiques de l'étude de remplacement hormonal de la Women Health Initiative .	54
Tableau 6: Liste non-exhaustive des actions génomiques d'ER α et ER β dans le cœur et les vaisseaux (données issues de ^{165;166;167}).	58
Tableau 7 : Poids du corps et ratio poids utérus/corps.	77
Tableau 8: Liste des prélèvements effectués chez les souris.	83
Tableau 9 : Composition du milieu physiologique utilisé en myographie.....	84
Tableau 10 : Concentrations de phényléphrine et d'acétylcholine utilisées.	86
Tableau 11 : Bains successifs pour la coloration Orcéine.....	88
Tableau 12 : Composition du tampon d'extraction protéique SDS.	89
Tableau 13 : Liste des anticorps primaires utilisés.	90
Tableau 14 : Liste non-exhaustive des causes biologiques, biophysiques et biochimiques associées aux mutations génétiques chez l'Homme (source ²⁶⁸).	139
Tableau 15 : Facteurs de risque accélérant la diminution de la fonction rénale au cours du vieillissement.....	149
Tableau 16 : Poids du corps et de l'utérus des souris femelles WT et ER α ^{-/-} de 17 mois.....	161
Tableau 17: Liste des prélèvements effectués chez les souris.....	161
Tableau 18 : Séquences des oligonucléotides utilisés.	164
Tableau 19 : Séquences des amorces utilisés pour la quantification de l'ADNmt.	165
Tableau 20 : Préparation du mix de PCR longue.	166
Tableau 21 : Séquences des amorces utilisés pour la PCR longue.	167

Figures

Figure 1 : Schéma du système cardiovasculaire et des deux circulations sanguines.	2
Figure 2 : Structure de la paroi artérielle.....	4
Figure 3 : Caractéristiques des principaux types d'artères (valeurs retrouvées chez l'Homme) (inspirée à partir de biobeug.com/master-1).	6
Figure 4 : Schéma de la structure et des caractéristiques des veines (valeurs retrouvées chez l'Homme).	8
Figure 5 : Schéma des différentes voies de vasodilatation de l'endothélium vasculaire.....	10
Figure 6 : Synthèse enzymatique du monoxyde d'azote.	11
Figure 7 : Schéma de la régulation de l'activité de la eNOS dépendante du calcium.....	13
Figure 8 : Synthèse enzymatique de la PGI ₂	15
Figure 9 : Facteurs de risques cardiovasculaires.	19
Figure 10 : Mécanismes augmentant la pression artérielle (inspiré de ⁵⁹).	25
Figure 11 : Schéma de la voie de synthèse de l'angiotensine II et de ses effets sur la pression artérielle (modifié à partir de cours hypertension artérielle CHU Vaudois, Département de médecine, Service d'Urologie).	30
Figure 12: Schéma des mécanismes de modification de structure vasculaire dans l'hypertension par l'angiotensine II (modifié à partir de ²).	34
Figure 13 : Schéma des différents types de remodelage artériel dans les pathologies cardiovasculaires (adapté de ⁸⁵).	36
Figure 14 : Schéma des mécanismes de modification de fonction vasculaire dans l'hypertension par l'angiotensine II (modifié à partir de ²).	39
Figure 15 : Réduction de l'oxygène par les électrons de la chaîne respiratoire.	42
Figure 16 : Réactions de productions des espèces réactives d'oxygène (adapté à partir de ¹¹²).	43
Figure 17 : Schéma de la structure de la NADPH (adapté à partir de ¹¹⁵).	44
Figure 18 : Mécanismes moléculaires de l'action des ROS dans l'endothélium et les cellules musculaires lisses vasculaires (adapté à partir de ¹¹²).	47
Figure 19 : Synthèse des hormones œstrogéniques à partir du cholestérol.....	50
Figure 20 : Schéma du cycle menstruel (adapté à partir de santé-médecine, le journal des femmes).	52
Figure 21 : Structure des récepteurs ER α et ER β et les pourcentages d'homologie entre leurs domaines (inspirés de ¹⁵⁵).	56

Figure 22 : Action génomique du récepteur ER α	61
Figure 23 : Action non-génomique du récepteur ER α dans l'endothélium vasculaire (adapté à partir de ¹⁹⁸).....	65
Figure 24 : Schéma de la structure du gène ESR1, de l'ARNm et de la protéine ER α chez une souris WT.....	73
Figure 25: Schéma du groupe ovariectomisé WT-OVX et du groupe ER $\beta^{-/-}$	74
Figure 26 : Schéma de la structure du gène ESR1 chez une souris ER $\alpha^{-/-}$	75
Figure 27 : Schéma de la structure du gène ESR1, de l'ARNm et de la protéine ER α chez une souris C451A.....	75
Figure 28 : Schéma de la structure du gène ESR1, de l'ARNm et de la protéine ER α chez une souris AF2°.....	76
Figure 29 : Schéma du protocole d'infusion de l'Ang II.....	79
Figure 30 : Dispositif de mesure de pression par photopléthysmographie.....	81
Figure 31: Schéma du dispositif de myographie (modifié à partir du site DMT).....	85
Figure 32 : Illustration d'une courbe de contraction au KCl et du test PHE/ACh.....	86
Figure 33 : Exemple de courbe concentration-réponse à la PHE.....	87
Figure 34 : Dispositif de coupes d'artères par Cryostat.....	87
Figure 35 : Effet de l'absence d'hormones œstrogéniques sur l'hypertension artérielle induite par l'Ang II et sur l'hypertrophie cardiaque.....	94
Figure 36 : Effet de l'absence d'hormones œstrogéniques sur le remodelage structurel de l'aorte et de l'artère mésentérique après traitement par l'Ang II.....	96
Figure 37 : Effet de l'absence d'hormones œstrogéniques sur la fonction vasculaire de l'aorte.....	98
Figure 38 : Effet de la délétion d'ER β dans l'hypertension artérielle induite par l'Ang II.....	100
Figure 39 : Effet de l'absence du récepteur ER α sur l'hypertension artérielle induite par l'Ang II et sur l'hypertrophie cardiaque.....	101
Figure 40 : Effet de l'absence du récepteur ER α sur le remodelage structurel de l'aortique et de l'artère mésentérique après traitement par l'Ang II.....	103
Figure 41 : Effet de l'absence du récepteur ER α sur la réactivité vasculaire de l'aorte.....	105
Figure 42 : Effet de l'absence de la forme membranaire d'ER α sur l'hypertension artérielle induite par l'Ang II et sur l'hypertrophie cardiaque.....	107
Figure 43 : Effet de l'absence de la forme membranaire d'ER α sur le remodelage structurel de l'aortique et de l'artère mésentérique après traitement par l'Ang II.....	109

Figure 44 : Effet de l'absence de la fonction membranaire du récepteur ER α sur la réactivité vasculaire de l'aorte.	111
Figure 45 : Effet de l'absence de la fonction de transactivation AF-2 d'ER α sur l'hypertension artérielle induite par l'Ang II et sur l'hypertrophie cardiaque.	113
Figure 46 : Effet de l'absence de la fonction de transactivation AF-2 sur le remodelage structurel de l'aortique et de l'artère mésentérique après traitement par l'Ang II.	115
Figure 47 : Effet de l'absence de la fonction de transactivation AF-2 d'ER α sur la réactivité vasculaire de l'aorte.	117
Figure 48 : Effet de l'absence de la fonction de transactivation AF-2 d'ER α sur l'expression des protéines eNOS, EC-SOD, ERK et sur la phosphorylation de ERK par rapport à la β -actine.	120
Figure 49 : Effet de la stimulation de la fonction nucléaire d'ER α sur l'hypertension artérielle induite par l'Ang II et sur l'hypertrophie cardiaque.	121
Figure 50 : Relaxation endothélium-indépendante de l'aorte chez les souris AF2 $^{\circ}$ en réponse au SNP.	129
Figure 51 : Résumé des différentes actions connues des fonctions AF et MISS du récepteur ER α dans le système cardiovasculaire.	133
Figure 52 : Relation entre vieillissement et dysfonction mitochondriale.	141
Figure 53 : p66 ^{shc} joue un rôle clé dans la régulation du stress oxydatif et l'apoptose (modifié à partir de ²⁸⁴).	143
Figure 54 : Fusion et fission mitochondriales (modifiée à partir de ²⁹⁷).	145
Figure 55 : Effets du vieillissement sur le système cardiovasculaire et rénal au cours du vieillissement.	148
Figure 56 : Changements macroscopiques, microscopiques et facteurs de risques dans le vieillissement rénal (modifié à partir de ³⁴⁸).	151
Figure 57 : Schéma des effets génomiques et non-génomiques des ERs dans la mitochondrie et le noyau (modifié à partir de ²⁴⁶).	156
Figure 58 : Modèles de souris utilisées dans cette étude.	160
Figure 59 : Analyse de la pression artérielle systolique, du remodelage du ventricule gauche et de la structure de l'aorte chez les souris WT jeunes et âgées.	170
Figure 60 : Impact du vieillissement sur la capacité contractile et dilatatrice de l'aorte thoracique chez les souris WT jeunes et âgées.	172
Figure 61 : Impact du vieillissement sur le taux d'urée, de créatinine et les paramètres métaboliques plasmatiques chez les souris WT jeunes et âgées.	174

Figure 62 : Expression des gènes liés à la fibrose, à l'apoptose et au stress oxydatif chez les souris WT jeunes et âgées.	176
Figure 63 : Analyse de l'infiltration de cellules inflammatoires au niveau rénal chez les souris WT jeunes et âgées.....	178
Figure 64 : Analyse de la pression artérielle systolique, du remodelage du ventricule gauche et de la structure de l'aorte chez les souris ER $\alpha^{-/-}$ et WT jeunes et âgées.....	179
Figure 65 : Evaluation de la fonction vasculaire de l'aorte et de l'artère mésentérique chez les souris ER $\alpha^{-/-}$ et WT jeunes et âgées.....	181
Figure 66 : Analyses des taux d'urée, de créatinine et des paramètres métaboliques plasmatiques chez les souris ER $\alpha^{-/-}$ et WT jeunes et âgées.....	183
Figure 67 : Expression des gènes liés au remodelage, à l'inflammation et au stress oxydatif chez les souris ER $\alpha^{-/-}$ et WT jeunes et âgées.....	185
Figure 68 : Analyse de l'infiltration de cellules inflammatoires au niveau rénal chez les souris ER $\alpha^{-/-}$ et WT jeunes et âgées.....	187
Figure 69 : Expression des gènes régulant la biogénèse, la fusion et la fission mitochondriale chez les souris ER $\alpha^{-/-}$ et WT jeunes et âgées.....	188
Figure 70 : Quantification de l'ADNmt par rapport à l'ADN génomique chez les souris ER $\alpha^{-/-}$ et WT jeunes et âgés.....	191
Figure 71 : Evaluation de la qualité de l'ADNmt chez les souris ER $\alpha^{-/-}$ et WT jeunes et âgées.	192
Figure 72 : Analyse de la quantité d'ADNmt chez les souris WT, OVX, ER $\alpha^{-/-}$ et ER $\beta^{-/-}$	203
Figure 73 : Evaluation de la qualité de l'ADNmt par PCR longue chez des souris Pol G et Twinkle.....	205
Figure 74 : Niveaux de complexité de l'étude des mécanismes d'action œstrogénique.	209

Liste des Abréviations

ACh	Acétylcholine	IP₃	Inositol triphosphate
ADNmt	ADN mitochondrial	JNK	c-Jun N-terminal kinases
AF-1/2	Fonction d'activation ½	LDL-c	Low Density Lipoprotein-cholesterol
Ang I/II	Angiotensine I/II	LH	Hormone lutéinisante
AP-1	Activator protein-1	L-NAME	L-NG-Nitroarginine methyl ester
ARA2	Antagoniste des récepteurs à l'aldostérone	LPS	Lipopolysaccharides
ARNm	Acide ribonucléique messager	MAPK	Mitogen-activated protein kinases
ARNt	Acide ribonucléique de transfert	MCP-1	Monocyte chemotactic protein 1
AT1/2R	Récepteur à l'Angiotensine de type ½	MEC	Matrice extracellulaire
ATP	Adénosine Triphosphate	MISS	Membrane Initiated Steroid Signaling
AVC	Accident vasculaire cérébral	Mfn1/2	Mitofusine 1 et 2
BSA	Albumine de sérum bovin	MLCK	Kinase de la chaîne légère de myosine
Ca²⁺	Calcium	MMPs	Métalloprotéinases
CO₂	Dioxyde de carbone	MOER	Récepteur aux œstrogènes uniquement à la membrane
COX	Cyclooxygénase	MTPT	Pore de transition mitochondriale
c-Src	Proto-oncogene tyrosine-protein kinase Src	NADPHox	Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate oxydase
DFD	Dilatation Flux-dépendante	NF-κB	Nuclear factor kappa B
DFG	Débit de filtration glomérulaire	NO	Monoxyde d'azote
DPN	Diarylpropionitrile	NOX	NADHP oxydases
DRP1	Protéine reliée à la Dynamine 1	NRF-1/2	Facteur de respiration nucléaire 1
E1	Estrone	O₂	Dioxygène
E2	Estradiol	OD	Oreillette droite
E3	Estriol	OG	Oreillette gauche
E4	Estérol	OPA1	Atrophie optique type 1
ECA	Enzyme de conversion de l'angiotensine II	PA	Pression artérielle
EDC	Dendrimère conjugué aux œstrogènes	PAD	Pression artérielle diastolique
EDHF	Facteur hyperpolarisant dérivé de l'endothélium	PAF	Facteur d'activation des plaquettes
EDRF	Facteur relaxant dérivé de l'endothélium	PAM	Pression artérielle moyenne
EET	Acides époxyéicosatriénoïques	PAS	Pression artérielle systolique
EGF	Facteur de croissance épithélial	PDGFR	Récepteur au facteur de croissance dérive des plaquettes
EGFR	Récepteur de l'EGF	PFA	Paraformaldéhyde
ER	Récepteur aux œstrogènes	PGC-1α	Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1-alpha
ERE	Élément de réponse aux œstrogènes	PHE	Phényléphrine
ERK	Kinases régulées par signaux extracellulaires	PHOX	gp91-phagocytic oxidase
ET-1	Endothéline 1	PKC	Protéine kinase C
ETA/B	Récepteur de l'endothéline A/B	PLA2	Phospholipase A2
FC	Fréquence cardiaque	PLCβ	Phospholipase C β
FdR	Facteur de risque	RCPG	Récepteur à sept domaines transmembranaires couplé aux protéines G
FGF-2	Facteur de croissance des fibroblastes-2	RNS	Espèces réactives nitrogénées
Fis1	Protéine de fission mitochondriale 1	ROS	Espèces réactives oxygénées
FSH	Hormone stimulant le follicule	sEH	Epoxyde hydrolase soluble
GnRH	Hormone de libération des gonadotrophines hypophysaires	SEM	Erreur standard à la moyenne
GPER	Récepteur aux œstrogènes couplé aux protéines G	SNC	Système nerveux central
GTPase	Guanosine Triphosphatase	SNP	Sodium Nitroprusside
HDL-c	High Density Lipoprotein-cholesterol	SOD	Super oxyde dismutase
HIF-1	Facteur induit par l'hypoxie-1	SRAA	Système Rénine Angiotensine Aldostérone
HSP	Heat Shock Protein	Tfam	Mitochondrial transcription factor A
HTA	Hypertension artérielle	TG	Triglycérides
ICAM	Molécule d'adhésion intercellulaire	TGF-β1	Facteur de croissance tumorale β
IEC	Inhibiteur de l'enzyme de conversion	TNF-α	Facteur de nécrose tumorale-α
IGF-1R	Récepteur au facteur de croissance de l'insuline-1	VCAM-1	Protéine d'adhésion des cellules vasculaires 1
IL-1β	Interleukine-1β	VDAC	Canal ionique voltage dépendant
IL-6	Interleukine-6	VES	Volume d'éjection systolique
IMC	Indice de masse corporelle	VG	Ventricule gauche

Introduction générale

Les maladies cardiovasculaires sont encore aujourd'hui la première cause de mortalité au monde, malgré des traitements de plus en plus efficaces (OMS, 2017). Il existe cependant des différences dans leur prévalence entre les hommes et les femmes, ces dernières étant moins touchées que les hommes. Toutefois, cette différence disparaît rapidement après la ménopause, soulignant le rôle protecteur des hormones œstrogéniques, principales hormones reproductrices féminines. En utilisant des stratégies de thérapie hormonale à base d'œstrogènes chez des femmes ménopausées, les cliniciens ont tenté de prolonger leurs effets bénéfiques, sans succès au niveau cardiovasculaire. Il est apparu de manière claire que leurs actions étaient particulièrement complexes et une connaissance plus précise de leurs mécanismes est nécessaire. C'est dans cette perspective que ce travail de thèse se situe.

Le principal récepteur des hormones œstrogéniques est le récepteur ER α . Ses actions sont diverses, touchant à la fois la reproduction sexuelle, le métabolisme, le système nerveux central, le système cardiovasculaire ou encore la fonction rénale. Dans la cellule, ce récepteur est exprimé dans deux compartiments distincts. Dans le noyau, il agit comme un facteur de transcription, via ses fonctions d'activation AF-1 et AF-2 qui régulent l'expression de gènes cibles. Cette action est qualifiée de « génomique » ou « nucléaire ». En parallèle, ER α est exprimé à la membrane plasmique d'où il active des voies de signalisation aux effets rapides, regroupées sous le terme de « Membrane Initiated Steroid Signaling » (MISS).

Ces deux mécanismes ont des rôles protecteurs différents dans le système vasculaire, en particulier dans des contextes d'athérosclérose ou de dysfonction endothéliale. Toutefois, leurs implications respectives n'ont jamais été étudiées dans le cadre de l'hypertension artérielle ou de la dysfonction rénale, deux facteurs de risques cardiovasculaires majeurs. En partenariat avec l'équipe du Pr. Jean-François Arnal à Toulouse, nous avons tenté d'explorer l'implication de ces deux voies d'ER α dans les effets bénéfiques des œstrogènes.

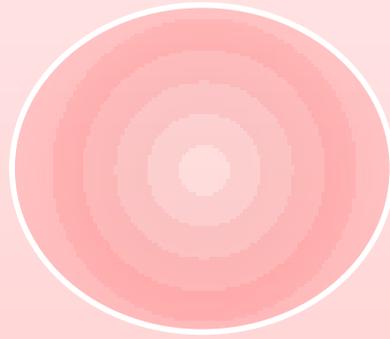
L'objectif de la première étude a été de mieux comprendre le rôle d'ER α dans l'hypertension artérielle. Nous avons utilisé des souris femelles génétiquement modifiées déficientes pour ER α ou ses composantes membranaire et nucléaire. Notre modèle d'hypertension a consisté en une infusion chronique d'angiotensine II pendant 28 jours. Nous avons pu mettre en évidence (1) que le récepteur ER α était nécessaire à la protection contre l'hypertension et ses conséquences cardiovasculaires, (2) que la voie MISS n'était pas impliquée dans cette protection, (3) que la fonction génomique d'ER α était nécessaire à cette protection, via sa fonction d'activation AF-2, (4) que la stimulation de cette fonction était nécessaire et suffisante pour prévenir l'apparition de l'hypertension en réponse à l'angiotensine II.

Dans la deuxième partie de ce travail, nous avons tenté d'étudier d'éventuels effets protecteurs d'ER α dans les dysfonctions cardiovasculaires et rénales au cours du vieillissement. Le vieillissement est un processus complexe touchant tous les organes, par des mécanismes cellulaires encore mal connus. La mitochondrie est considérée comme l'organite clé du vieillissement cellulaire et, de manière intéressante, les œstrogènes exercent des effets protecteurs dans les altérations rénales et cardiovasculaires dues au vieillissement ainsi que dans la mitochondrie. Nous avons donc émis l'hypothèse que les effets protecteurs de ces hormones au cours du vieillissement seraient induits par ER α , via une protection des mitochondries de ces organes.

Cette étude, toujours en cours, a déjà pu mettre en évidence que le vieillissement : (1) n'entraîne pas d'altération notable des fonctions cardiovasculaires et rénales chez la souris femelle, (2) augmente le niveau d'inflammation et l'expression de facteurs pro-apoptotiques, inflammatoires et oxydatifs, (3) que l'absence d'ER α n'altère pas les paramètres cardiovasculaires et rénaux que nous avons mesurés et (4) que les œstrogènes régulent la quantité d'ADNmt d'une manière encore jamais décrite.

ETUDE 1

Œstrogènes



Hypertension

**La fonction d'activation AF-2 est nécessaire
au rôle protecteur du récepteur aux
œstrogènes ER α contre l'hypertension
artérielle induite par l'angiotensine II**

Emmanuel Guivarc'h; Anne-Laure Guihot; Julie Favre; Emilie Vessières; Linda Grimaud; Nada-Joe Melhem; Jamal Wakim; Aurélien Flatres; Gilles Kauffenstein; Vincent Le Corre; Françoise Lenfant; Jean-François Arnal; Laurent Loufrani; Daniel Henrion; Coralie Fontaine

INTRODUCTION

Angiotensine II

Hypertension

Œstrogènes

Maladies Cardiovasculaires

ER α

INTRODUCTION

Cette introduction a été réalisée grâce à l'aide de revues et d'articles de référence sur les sujets abordés, en particulier^{1;2;3;4;5;6;7;8;9}. Les figures illustratives ont été réalisées grâce aux éléments de la banque d'images Servier. Une partie des résultats présentés dans cette première étude a été obtenue grâce à l'aide d'Anne-Laure Guihot et Jamal Wakim qui ont démarré ce projet.

1. Le système cardiovasculaire

1.1. Généralités

L'appareil cardiovasculaire, aussi appelé système circulatoire, est composé du cœur et des vaisseaux tels que les artères, les veines et les capillaires. Son rôle est d'apporter de l'oxygène (O_2) et les nutriments aux organes périphériques et de ramener le sang au cœur et aux poumons (Figure 1).

La « petite circulation » ou circulation pulmonaire, commence dans le ventricule droit (VD) d'où naissent les artères pulmonaires qui transportent le sang aux poumons. Au contact des alvéoles, les échanges gazeux permettent au sang de s'enrichir en O_2 et de réduire le niveau de dioxyde de carbone (CO_2). Le sang oxygéné est ramené au niveau de l'oreillette gauche (OG) par les veines pulmonaires.

La « grande circulation » ou circulation systémique, commence dans le ventricule gauche (VG) d'où naît l'aorte qui permet l'apport du sang aux organes périphériques via les artères de conductance, puis de résistance. Au niveau des capillaires, les tissus acquièrent l' O_2 et les nutriments et rejettent le CO_2 ainsi que les déchets métaboliques. Le sang est ensuite ramené au niveau de l'oreillette droite (OD) par le système veineux pour un nouveau cycle (Figure 1).

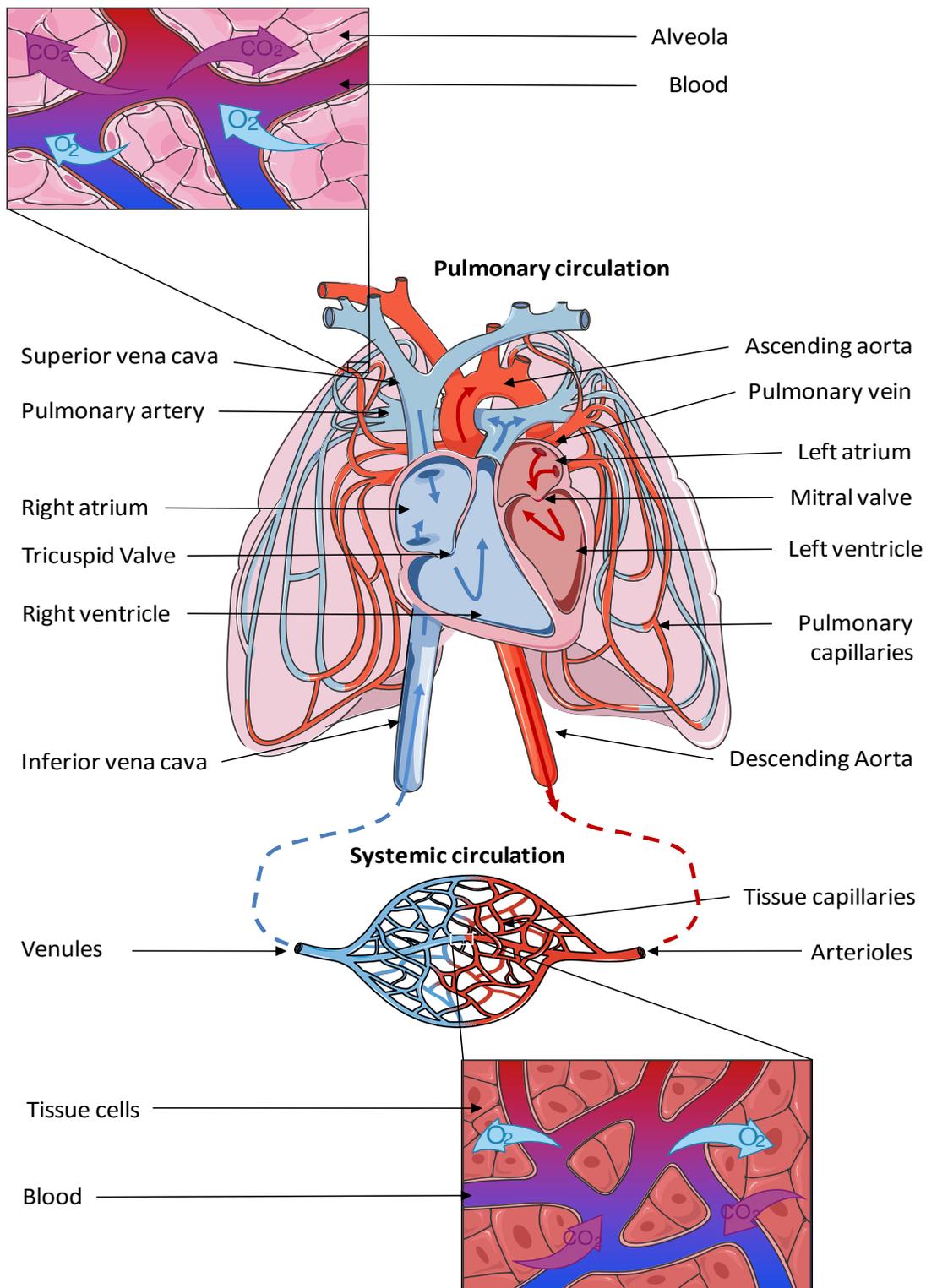


Figure 1 : Schéma du système cardiovasculaire et des deux circulations sanguines.

Le système circulatoire se compose de deux principales circulations, la petite circulation ou circulation pulmonaire et la grande circulation ou circulation systémique. Les échanges gazeux sont effectués au niveau des poumons pour enrichir le sang en oxygène et éliminer le dioxyde de carbone. L'oxygène est délivré au niveau des organes par les capillaires.

1.2. Artères

1.2.1. Structure des artères

Les artères sont les vaisseaux permettant l'acheminement du sang du cœur vers les organes. Elles sont composées de 3 tuniques appelées, de l'intérieur vers l'extérieur, intima, média et adventice (Figure 2).

1.2.1.1. Intima

L'intima, aussi appelée endothélium, est une couche composée de cellules endothéliales. Ces cellules sont de forme plate et constituent la barrière de communication entre le sang et les tissus. Leurs fonctions principales sont l'assurance de l'homéostasie du vaisseau, de son étanchéité, la régulation du tonus vasculaire, l'adhésion des cellules immunitaires et ont un rôle clé dans les processus de coagulation et de thrombose¹⁰. Ces cellules sont recouvertes d'une couche protectrice constituée de polysaccharides, de lipides et de protéines constituant le glycocalyx. L'endothélium est soutenu par une lame basale et une couche de tissu conjonctif qui permettent son maintien et son étanchéité. Une description plus approfondie de l'endothélium vasculaire sera faite plus avant dans cette introduction.

1.2.1.2. Média

Située sous l'endothélium, la couche intermédiaire est appelée média. Il s'agit généralement de la plus épaisse des 3 couches. Elle contient des fibres d'élastine organisées en lames élastiques, des cellules musculaires lisses et une couche de fibres de collagène. C'est la composition de cette couche qui varie le plus entre les différents types d'artères.

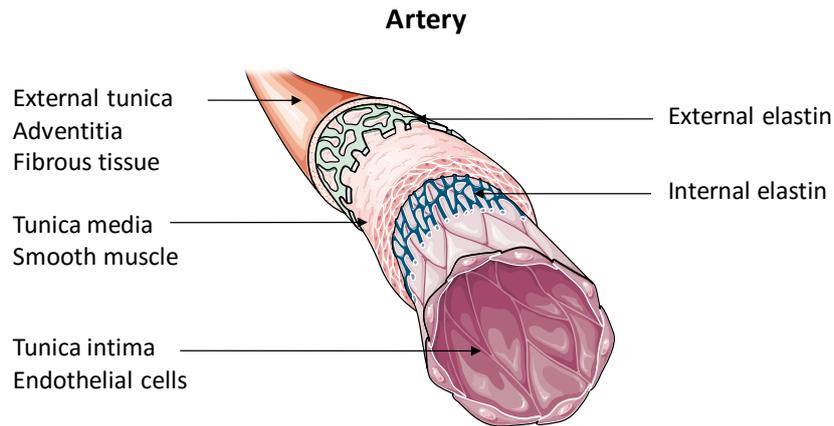


Figure 2 : Structure de la paroi artérielle.

Les artères amènent le sang du cœur vers la périphérie. La paroi artérielle se compose de trois couches (de l'intérieur vers l'extérieur) : l'endothélium, la média et l'adventice.

1.2.1.3. Adventice

Enfin, la troisième couche appelée adventice est la couche la plus externe. Elle se compose d'une couche de tissu conjonctif qui délimite le vaisseau. Elle contient des fibres de collagène et des cellules fibroblastiques et assure une protection physique du vaisseau.

1.2.2. Rôle physiologique des artères

A la sortie du VG, la pression du sang exercée par la contraction cardiaque (systole) est importante, de l'ordre de 120 mmHg chez l'Homme. Si cette pression était maintenue jusqu'aux organes, elle détruirait les capillaires et les tissus ne seraient plus perfusés. Le rôle des artères est donc d'amener le sang à la périphérie tout en contrôlant son débit et sa pression pour une délivrance optimale (Figure 3).

1.2.2.1. Artères de gros calibre

Les premières artères à la sortie du cœur sont donc des artères de gros calibre, appelées artères de conductance. Il s'agit principalement de l'aorte thoracique, abdominale et

des artères carotides. La composante élastique est majoritaire par rapport à la composante musculaire dans la média (Figure 3). Cela s'explique par le rôle physiologique de ces vaisseaux qui doivent supporter de fortes contraintes mécaniques. Lors de la systole, la pression augmente fortement dans l'aorte. La composante élastique permet de supporter cette pression en permettant une distension de la paroi. Lors de la diastole, le cœur se relâche et n'exerce plus de pression. L'énergie emmagasinée par la paroi de l'aorte est alors restituée, permettant un maintien de la pression artérielle. La pulsatilité est ainsi amortie au fil de l'aorte, diminuant en s'éloignant du cœur. Au niveau de ces artères, la pression se situe aux alentours de 100 mmHg (Figure 3).

1.2.2.2. Artères de petit calibre

A l'inverse, les artères de plus petit calibre, appelées artères de résistance, possèdent une forte composante musculaire. Leur rôle est de réguler le débit sanguin au niveau périphérique. Au cours d'un exercice physique intense, les besoins en oxygène et nutriments augmentent. Pour y répondre, l'artère afférente se dilate pour diminuer sa résistance à l'écoulement et augmenter l'arrivée de sang. A l'inverse, dans le cas d'un apport de sang trop important et d'une pression trop forte, l'artère pourra se contracter pour limiter l'apport en sang et protéger l'organe en amont d'une pression excessive. Tout au long de l'arbre artériel, la pression pulsée se réduit de sorte que le flux sanguin initialement turbulent devient laminaire. Au niveau des artères, la pression sanguine se situe entre 40 et 100 mmHg (Figure 3).

1.2.2.3. Artérioles

Au niveau des plus petites artères appelées artérioles, la pression sanguine se situe entre 30 et 40 mmHg. Tout comme les artères de résistance, elles sont dotées d'une capacité particulière, le tonus myogénique. Cette particularité leur permet de se contracter en réponse à une augmentation de pression. Cela permet d'absorber le surplus de pression sanguine et de

protéger les vaisseaux en aval. Ce faisant, la pression sanguine dans les capillaires situés après l'artère reste inférieure à 30 mmHg, permettant l'échange de nutriments et de gaz entre le sang et les tissus (Figure 3).

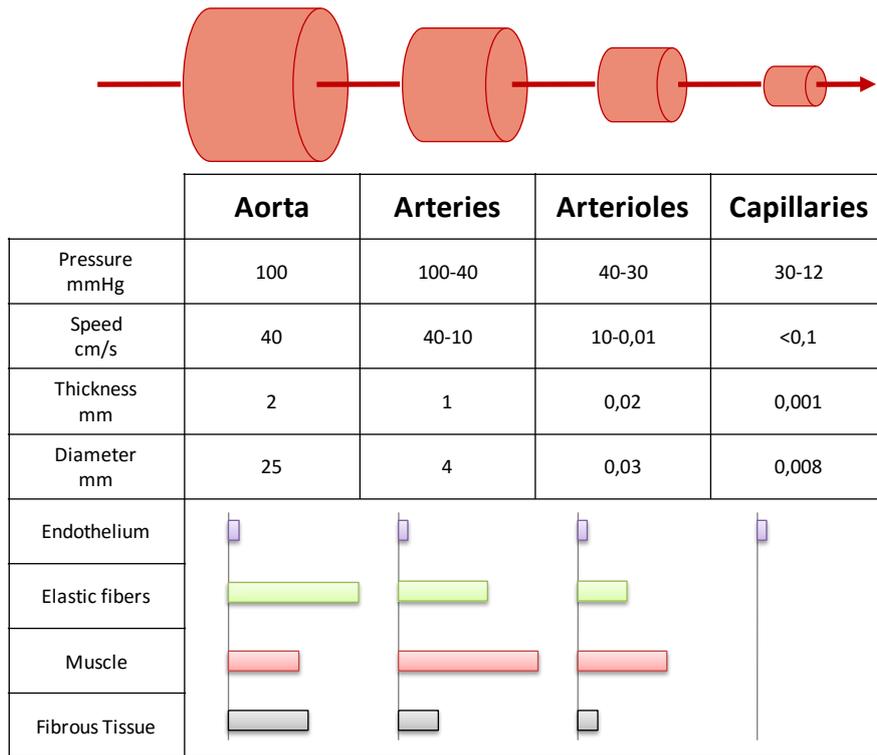


Figure 3 : Caractéristiques des principaux types d'artères (valeurs retrouvées chez l'Homme) (inspirée à partir de biobeug.com/master-1).

Les artères sont séparées en 3 catégories : les artères de conductance comme l'aorte, les artères de résistance comme l'artère mésentérique et les artérioles. Chacune possède des caractéristiques structurelles propres.

L'ensemble des constituants de cet arbre artériel est adapté aux contraintes mécaniques nécessaires à l'acheminement du sang vers la périphérie. La structure de chaque type d'artère dépend de sa nature et de son rôle (Figure 3).

1.2.2.4. Capillaires

Les capillaires sont les plus petits et les plus nombreux vaisseaux du corps. Leur diamètre est de l'ordre de 8 μm , équivalent à celui des érythrocytes. Ces vaisseaux sont constitués d'un endothélium perméable, d'une lame basale et de péricytes assurant une capacité contractile. La pression sanguine y est comprise entre 30 et 12 mmHg (Figure 3). Ils assurent les échanges entre les cellules et le sang (eau, nutriments, composés inorganiques, urée, acides aminés ou encore l'acide lactique). Ces transferts liquidiens sont le résultat des différences de pressions hydrostatiques et osmotiques des liquides entre l'intérieur et l'extérieur des capillaires. Certaines cellules comme les cellules immunitaires peuvent également traverser la paroi des capillaires pour pénétrer ou sortir des tissus. La distance moyenne entre les cellules et le plus proche capillaire doit être inférieure à 50 μm pour assurer une bonne oxygénation.

1.3. Veines

1.3.1. Veines

Les veines ont un diamètre plus important de l'ordre de 5 mm. Les veines les plus importantes comme les veines caves ont un diamètre important atteignant 3 cm. La structure des veines est proche de celle des artères mais les proportions de constituants sont différentes. Les veines ne possèdent pas de lame élastique externe, sont plus riches en tissu conjonctif et possèdent peu de cellules musculaires lisses. Dans l'ordre de circulation du sang, le réseau veineux succède aux capillaires. Sa fonction est inverse à celle des artères, elle consiste à ramener le sang des tissus périphériques vers le cœur, en collectant les déchets métaboliques et le CO_2 pour qu'ils soient filtrés. Les veines s'organisent en un réseau profond et un réseau superficiel. Une particularité des veines est la présence de valves, qui empêchent le reflux du sang dans le sens contraire à la circulation sanguine.

1.3.2. Veinules

Les veinules sont les plus petites veines et ont un diamètre de 20 μm (Figure 4). Dans ce réseau veineux la pression sanguine est extrêmement faible, la grande majorité de la pression ayant été absorbée par les artères et les capillaires. Les veines jouent aussi un rôle de « réservoir » de sang, puisqu'elles contiennent environ 60% du volume total du sang de l'organisme.

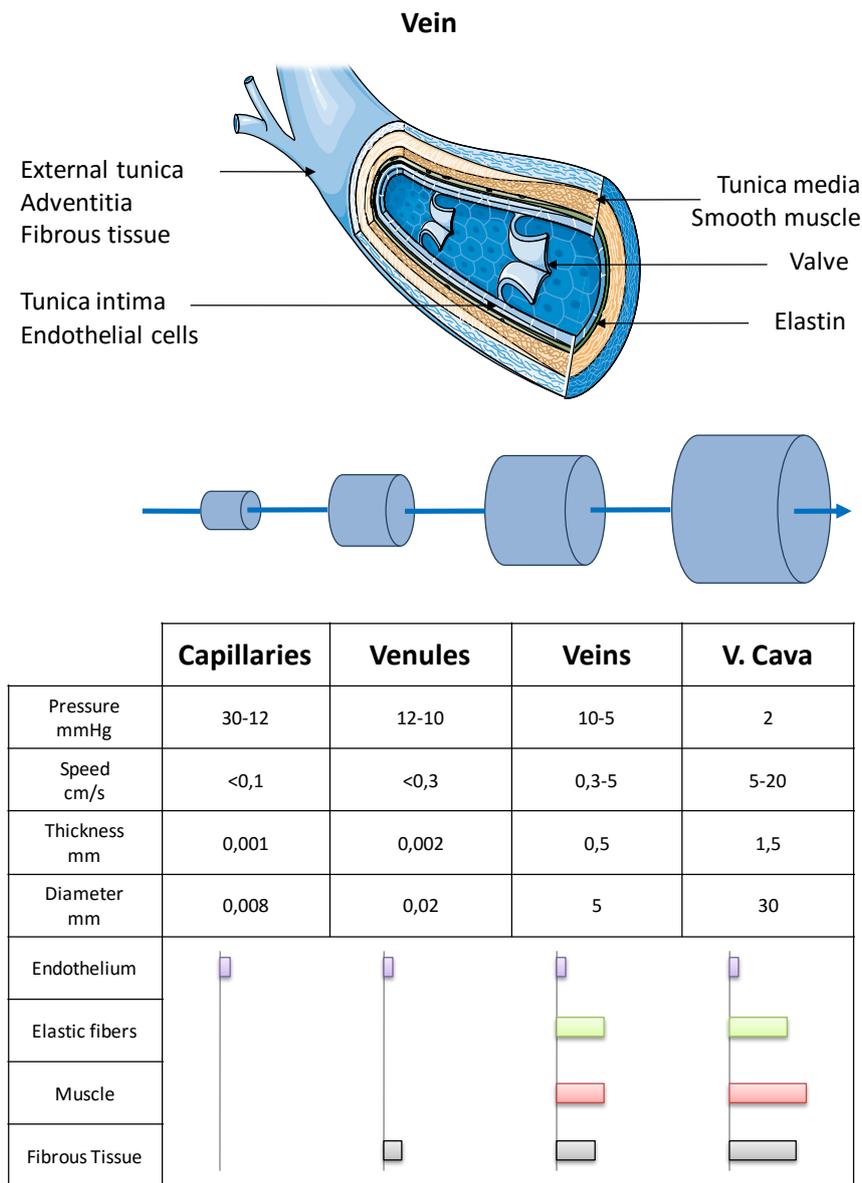


Figure 4 : Schéma de la structure et des caractéristiques des veines (valeurs retrouvées chez l'Homme).

Les veines sont séparées en 3 catégories : les veines caves qui sont les plus larges, les veines et les veinules. Chacune possède des caractéristiques structurelles propres.

1.4. Rôles de l'endothélium vasculaire

Artères, veines et vaisseaux lymphatiques possèdent tous un endothélium vasculaire. Comme évoqué précédemment, les cellules endothéliales jouent un rôle primordial dans la physiologie vasculaire. Leur surface totale est extrêmement importante, estimée entre 280 et 350 m² ¹¹. La structure de l'endothélium varie en fonction de sa localisation. Dans les capillaires, son épaisseur est d'environ 0,1 µm contre 1 µm dans l'aorte thoracique et abdominale. Depuis les années 1980, l'endothélium n'est plus considéré comme une barrière inerte entre le sang et les tissus. Ses fonctions sont multiples, passant notamment par le contrôle de la perméabilité du vaisseau, l'agrégation plaquettaire, l'adhésion des cellules immunitaires, le contrôle et la prolifération des cellules musculaires lisses et le contrôle de la vasomotricité ^{12;13;14;15;16}. Ces fonctions sont réalisées grâce à la libération de différentes molécules en réponse à des agonistes ou des stimuli. Parmi les différentes classes d'agonistes, on peut distinguer :

- Les hormones circulantes comme l'angiotensine II (Ang II), l'insuline, les catécholamines et les hormones stéroïdes comme les œstrogènes,
- Les neurotransmetteurs comme l'acétylcholine et la noradrénaline,
- Les nucléotides extracellulaires comme l'adénosine tri-phosphate et l'adénosine di-phosphate,
- Les autacoïdes comme la bradykinine, les prostaglandines et l'endothéline,
- Les produits issus des plaquettes comme la thrombine et la sérotonine.

Ces molécules se fixent à la surface de l'endothélium via leurs récepteurs spécifiques, majoritairement des récepteurs couplés aux protéines G (RCPG). Cette activation entraîne une augmentation de calcium (Ca²⁺) intracellulaire, à l'origine d'effets biologiques variés, produits par des enzymes.

Une fonction importante de l'endothélium, qui importe particulièrement dans le contexte de pathologies cardiovasculaires, est la régulation du tonus des artères.

L'endothélium est capable de produire des agents vasodilatateurs, que sont le monoxyde d'azote (NO pour oxyde nitrique), les prostacyclines comme PGI₂ et les facteurs hyperpolarisants dérivés de l'endothélium (EDHF) (Figure 5). Il est également capable de produire des facteurs vasoconstricteurs comme le thromboxane A₂, les anions superoxydes, l'endothéline-1 (ET-1), la prostaglandine H₂ et l'angiotensine II².

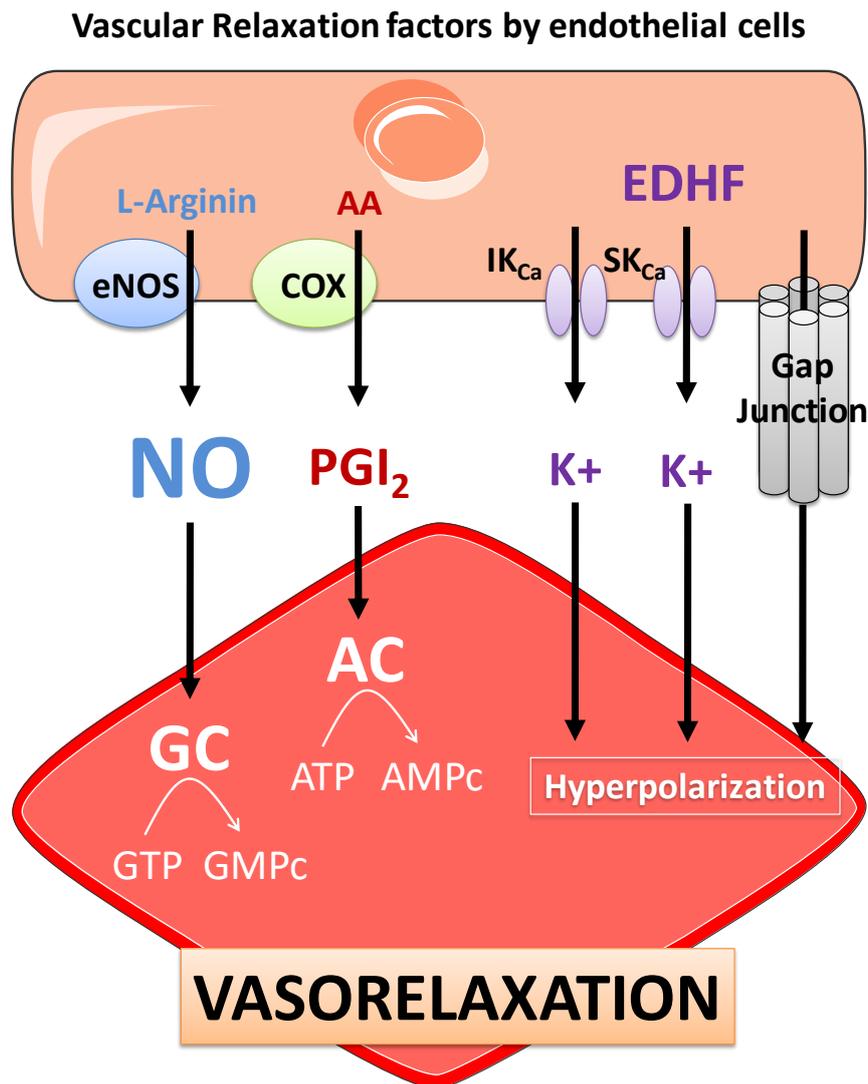


Figure 5 : Schéma des différentes voies de vasodilatation de l'endothélium vasculaire.

Les cellules endothéliales sont capables d'induire une vasodilatation via 3 principales voies : la voie du NO, la voie de la PGI₂ et la voie de l'EDHF.

1.5. Monoxyde d'azote

1.5.1. Production du NO

Découvert en 1980 par Furchgott et Zawadzki, le monoxyde d'azote ou NO fait partie des facteurs relaxants dérivés de l'endothélium (EDRF) ¹⁷. En préparant des anneaux d'aorte de lapin afin d'étudier l'action de l'acétylcholine (ACh) sur la vasomotricité, les auteurs se sont aperçus d'une action vasorelaxatrice produite par une couche de cellules au niveau de la lumière du vaisseau. Lorsqu'elle était abimée lors du montage, cette couche n'avait plus d'effet vasorelaxant et l'ACh induisait une contraction à des doses élevées. Si un soin particulier était apporté à la préparation du vaisseau, l'ACh était capable d'induire une vasorelaxation prononcée à faible dose. A l'époque, les auteurs avaient attribué ces effets à des « substances » produites par les cellules endothéliales ¹⁷. Quelques années après, la substance a été identifiée comme étant le monoxyde d'azote (Figure 6). Cette découverte a valu en 1998 un prix Nobel aux découvreurs de l'action du NO, que sont Furchgott, Ignarro et Murad.

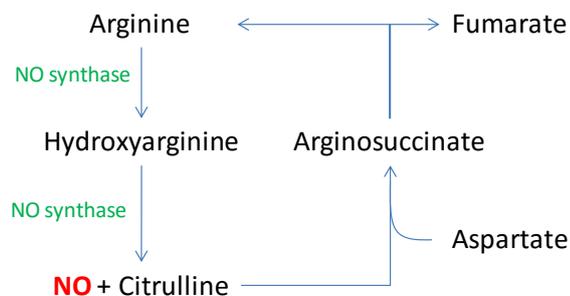


Figure 6 : Synthèse enzymatique du monoxyde d'azote.

Le NO est produit à partir de la conversion de l'arginine par le NO synthase. Cette molécule gazeuse agit sur les cellules musculaires lisses pour réduire leur contraction.

Le NO est un gaz ayant une demi-vie très courte de quelques secondes et passant facilement les membranes cellulaires. Il agit à la surface de l'endothélium en inhibant l'adhésion leucocytaire mais également au niveau des cellules musculaires lisses dont il diminue la contraction et la prolifération ^{18;19;20}.

1.5.2. Enzymes NO synthases

Le NO est produit par les enzymes NO synthases que sont l'eNOS (NOS endothéliale, de type III), la nNOS (NOS neuronale, de type I) et l'iNOS (la NOS inducible par le système immunitaire, de type II). Ces trois isoformes sont codées par trois gènes différents ²¹. L'activité de la eNOS et la nNOS dépend de stimuli activateurs. Leur action est de courte durée et se met en place rapidement. La production de NO par ces deux types d'enzymes est très faible, de l'ordre du nM. L'expression de la iNOS est augmentée par des stimuli immunogènes comme les lipopolysaccharides bactériens (LPS). Contrairement à la eNOS et la nNOS, la iNOS produit des quantités beaucoup plus fortes de NO, de l'ordre du M, entraînant une vasodilatation importante voire excessive. Ce mécanisme participe aux graves hypotensions qui accompagnent par exemple les chocs septiques ²².

Dans les vaisseaux, l'activité et l'expression de la eNOS dépendent de différents facteurs comme les forces de cisaillement (*shear stress*) exercées par le sang sur la paroi artérielle, les médiateurs circulants comme les hormones œstrogéniques et d'agonistes comme la sérotonine, la bradykinine ou l'histamine ^{23;24;25}. Les hormones œstrogéniques font partie des principaux acteurs de la régulation positive de l'expression de la eNOS ²⁶. Deux grands modes d'activation de la eNOS sont classiquement décrits, l'activation dépendante du calcium et l'activation indépendante du calcium.

1.5.2.1. Activation de la eNOS dépendante du calcium

Dans des conditions où la concentration intracellulaire de calcium est basse, la eNOS est localisée au niveau de la membrane plasmique, liée à la protéine cavéoline-1 qui l'inhibe (Figure 7). Cette protéine est constitutive de la structure des cavéoles qui sont des renforcements de la bi-couche lipidique permettant la transduction des signaux cellulaires. Cette configuration empêche l'activation de la eNOS ²⁷. Lorsqu'un agoniste active un récepteur situé dans la cavéole, cela stimule l'activité des kinases qui vont phosphoryler la eNOS pour l'activer ou l'inhiber, en fonction de la cible de l'enzyme. L'activation de la eNOS nécessite d'une part que le complexe Ca²⁺/CaM soit actif, grâce à l'augmentation du

taux de calcium à proximité des cavéoles ²⁸ et d'autre part, l'interaction avec la protéine Hsp90 (Heat Shock Protein 90). Lorsque ces différentes conditions sont réunies, la eNOS migre vers l'appareil de Golgi d'où elle produira du NO ²⁸. L'ensemble de ce processus est très rapide et agit en quelques secondes. La eNOS peut aussi être inhibée, via la phosphorylation de la tyrosine en position 497 ²⁹.

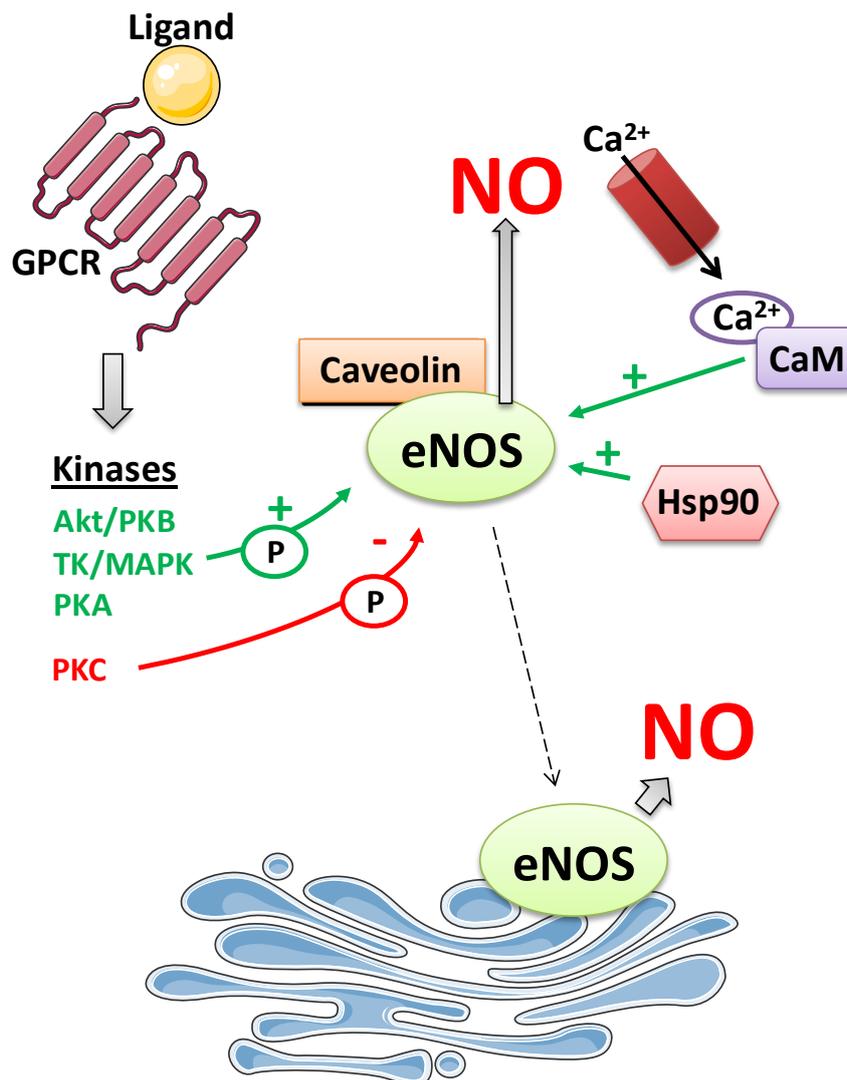


Figure 7 : Schéma de la régulation de l'activité de la eNOS dépendante du calcium.

L'enzyme eNOS est exprimée dans les cellules endothéliales, au niveau des cavéoles de la membrane plasmique. Son activation peut être dépendante ou indépendante du calcium. Elle entraîne la libération de NO qui aboutira à une vasodilatation.

1.5.2.2. Activation de la eNOS indépendante du calcium

Parallèlement à cette activation dépendante du calcium, la eNOS peut aussi être activée par d'autres médiateurs. Un des médiateurs les plus importants entraînant la libération du NO au niveau des vaisseaux est le *shear stress*, les forces de cisaillement. En passant dans la lumière du vaisseau, le sang exerce une force de frottement permanente, due à sa viscosité et à son débit. Cette contrainte mécanique est ressentie par l'endothélium grâce à un ensemble de mécanismes impliquant les protéines de surface et le cytosquelette des cellules endothéliales³⁰. Harris et al. ont décrit en 2000 que le *shear stress* augmentait la phosphorylation de la protéine Hsp90, aboutissant à sa liaison avec eNOS et son activation³¹. Un autre mécanisme décrit est l'activation de la voie PI3K/Akt. En 2003, Jin et al. décrivent une activation de cette voie par l'intermédiaire du récepteur au VEGF, qui aboutit à une augmentation de la phosphorylation et de l'activité de la eNOS³². De manière tout à fait intéressante, cette voie est aussi utilisée par les hormones œstrogéniques pour activer la eNOS et augmenter la vasodilatation³³. Nous reviendrons sur cet aspect plus loin dans le manuscrit.

1.5.3. Voie des Prostacyclines

La prostacycline PGI₂ fait partie de la famille des dérivés de l'acide arachidonique (appelés les eicosanoïdes). Elle est synthétisée par les enzymes cyclooxygénase-1 et 2 (COX-1 et COX-2) (Figure 8). L'acide arachidonique est lui-même produit à partir des phospholipides de la membrane par l'enzyme phospholipase A2 (PLA₂). Les enzymes COX-1 et COX-2 le transforment ensuite en PGG₂ puis en PGH₂ et enfin en PGI₂ ou en thromboxane A2 (TXA₂)³⁴. La production du PGI₂ est réalisée au niveau de l'endothélium par la COX-2 et est activée par différents stimuli comme le *shear stress*, la thrombine, l'histamine ou encore la bradykinine³⁵. Le PGI₂ entraîne une vasodilatation, un effet athéroprotecteur et inhibe l'agrégation plaquettaire³⁶. Ces effets sont tous bénéfiques dans le système cardiovasculaire. D'autres peptides vasoconstricteurs tels que le TXA₂ ont des effets délétères globalement opposés à ceux du PGI₂^{34;36}.

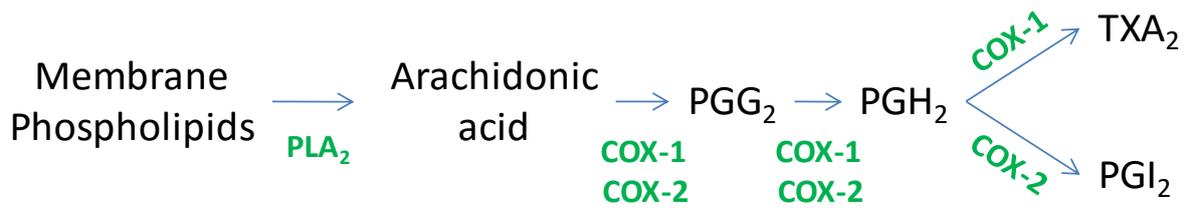


Figure 8 : Synthèse enzymatique de la PGI₂.

Les enzymes COX-1 et COX-2 permettent la production du TXA₂ et du PGI₂ à partir de l'acide arachidonique. Le PGI₂ entraîne une vasodilatation, une inhibition de l'agrégation plaquettaire et une inhibition de l'athérome.

1.5.4. Voie de l'EDHF

La voie de l'EDHF, ou Facteurs Hyperpolarisants Dérivés de l'Endothélium, est encore mal décrite en raison de sa multiplicité d'actions. Toutefois, un nombre croissant de données suggèrent un rôle majeur de cette voie dans divers contextes pathologiques, comme dans le cas de l'hypertension artérielle par exemple ³⁷. Son activation dépend de la présence du calcium intracellulaire et peut être induite soit par les RCPG comme les récepteurs muscariniques, soit par d'autres composés comme l'acide cyclopiazonique ³⁸. En résulte une hyperpolarisation des cellules endothéliales, puis des muscles lisses sous-jacents, aboutissant au blocage des canaux calciques dépendants du potentiel. Ce blocage entraîne une réduction du Ca²⁺ intracellulaire et la relaxation du muscle lisse ³⁹. Cette voie met en jeu les canaux potassiques IKCa et SKCa endothéliaux et est logiquement insensible à l'action des inhibiteurs de la eNOS et COXs.

Les acides époxyéicosatriénoïques (EETs) sont des agents synthétisés dans l'endothélium par le cytochrome endothélial epoxygénase qui contribuent à la vasodilatation endothélium-dépendante, l'inflammation vasculaire, la prolifération cellulaire et l'angiogénèse et le tonus vasculaire ⁴⁰. Ces acides font partie de la voie de l'EDHF. Dans certaines pathologies comme l'hypertension artérielle, une réduction de la biodisponibilité de ces EETs est observée ⁴¹. Cette diminution est due à une augmentation de leur dégradation par l'époxyde hydrolase soluble (sEH). En utilisant des analogues des EETs, Hye Khan et al. ont pu observer une réduction de l'hypertension artérielle et des lésions rénales chez le rat ⁴².

Dans des conditions de baisse de la biodisponibilité du NO, l'activité de la voie EDHF peut augmenter pour compenser la baisse de dilatation ⁴³.

En conclusion, l'endothélium joue un rôle prédominant dans le maintien de l'homéostasie vasculaire en agissant notamment sur la contraction et la prolifération des cellules musculaires lisses. Sa détérioration, appelée dysfonction endothéliale, est associée à de nombreux désordres physiopathologiques dans les vaisseaux.

2. Les maladies cardiovasculaires

2.1. Définition générale

Selon la définition donnée par l'Organisation Mondiale de la Santé, les maladies cardiovasculaires (MCV) constituent un ensemble de troubles affectant le cœur et les vaisseaux sanguins. Cela comprend :

- les cardiopathies coronariennes comme l'infarctus du myocarde, touchant les vaisseaux sanguins alimentant le cœur,
- les maladies cérébro-vasculaires comme l'accident vasculaire cérébral (AVC) touchant les vaisseaux sanguins alimentant le cerveau,
- les artériopathies périphériques touchant les vaisseaux sanguins alimentant les membres,
- les cardiopathies rhumatismales touchant le muscle et les valves cardiaques à la suite d'un rhumatisme articulaire aigu causé par une bactérie streptocoque,
- les malformations cardiaques congénitales, malformations de la structure du cœur présentes dès la naissance,

- les thromboses veineuses profondes et les embolies pulmonaires consécutives à la formation d'un caillot sanguin dans les veines des jambes qui se déplace et obstrue les artères du cœur ou des poumons.

En 2015, les MCV constituaient toujours la première cause de mortalité dans le monde avec environ 17,5 millions de décès par an. Contrairement à ce qui est parfois décrit, la plupart de ces décès n'a pas lieu dans les pays riches mais aux trois quarts dans les pays à revenus faibles ou intermédiaires (OMS, 2012). En France, l'INSERM estimait à 149 000 le nombre de décès dus aux MCV en France en 2008.

2.2. Facteurs de risque

La prévalence des MCV a augmenté de manière importante depuis plusieurs décennies dans le monde. Cette augmentation résulte d'une évolution des modes de vie, de consommation accélérée, d'urbanisation et du vieillissement de la population. La pauvreté, le stress et l'hérédité participent également à cette augmentation. Ces maladies ont de nombreux facteurs de risques (FdR), communément séparés en deux types, les FdR non-modifiables et modifiables (Figure 9).

Un FdR est défini comme étant un élément clinique ou biologique dont la présence ou l'augmentation majorent statistiquement la morbi-mortalité (Collège des Enseignants de Cardiologie et Maladies Vasculaires). Diminuer ou supprimer ces facteurs entraîne une diminution du risque de survenue de la maladie. Les cliniciens estiment le risque cardiovasculaire global d'un patient selon des recommandations cliniques précises.

2.2.1. Facteurs de risque non-modifiables

2.2.1.1. Âge

Il est reconnu que l'augmentation de l'âge accompagne l'augmentation du risque de nombreuses pathologies comme l'AVC, l'insuffisance cardiaque, l'insuffisance rénale, etc ⁴⁴.

Ce facteur n'est toutefois pas significatif avant 50 ans chez les hommes et 60 ans chez les femmes. L'impact du vieillissement sur le système cardiovasculaire est développé dans la deuxième étude.

2.2.1.2. Sexe masculin

Les pathologies coronariennes touchent les hommes en moyenne 10 ans plus tôt que les femmes ⁴⁵. Toutefois, cette différence s'estompe peu à peu après la ménopause, en raison de la baisse d'un facteur protecteur dans les MCV sur lequel nous reviendrons plus en détail : les hormones œstrogéniques ⁴⁶.

Certaines hypothèses du début des années 2000 suggéraient que la testostérone pouvait jouer un rôle délétère dans les MCV. Cependant, les études ont montré que le taux de testostérone plasmatique était négativement corrélé avec le risque d'athérome (dépôts de graisse dans une artère) et d'insulino-résistance chez l'homme ⁴⁷.

2.2.1.3. Antécédents familiaux

La survenue de MCV chez les parents d'un individu constitue un FdR si l'évènement est intervenu avant les 55 ans du père ou 65 ans de la mère. Plus l'âge de l'évènement est précoce, plus le risque pour la descendance augmente ⁴⁸. Les mécanismes sont encore mal élucidés mais les antécédents familiaux regroupent différentes mutations génétiques, modifications épigénétiques, facteurs environnementaux ou socio-économiques.

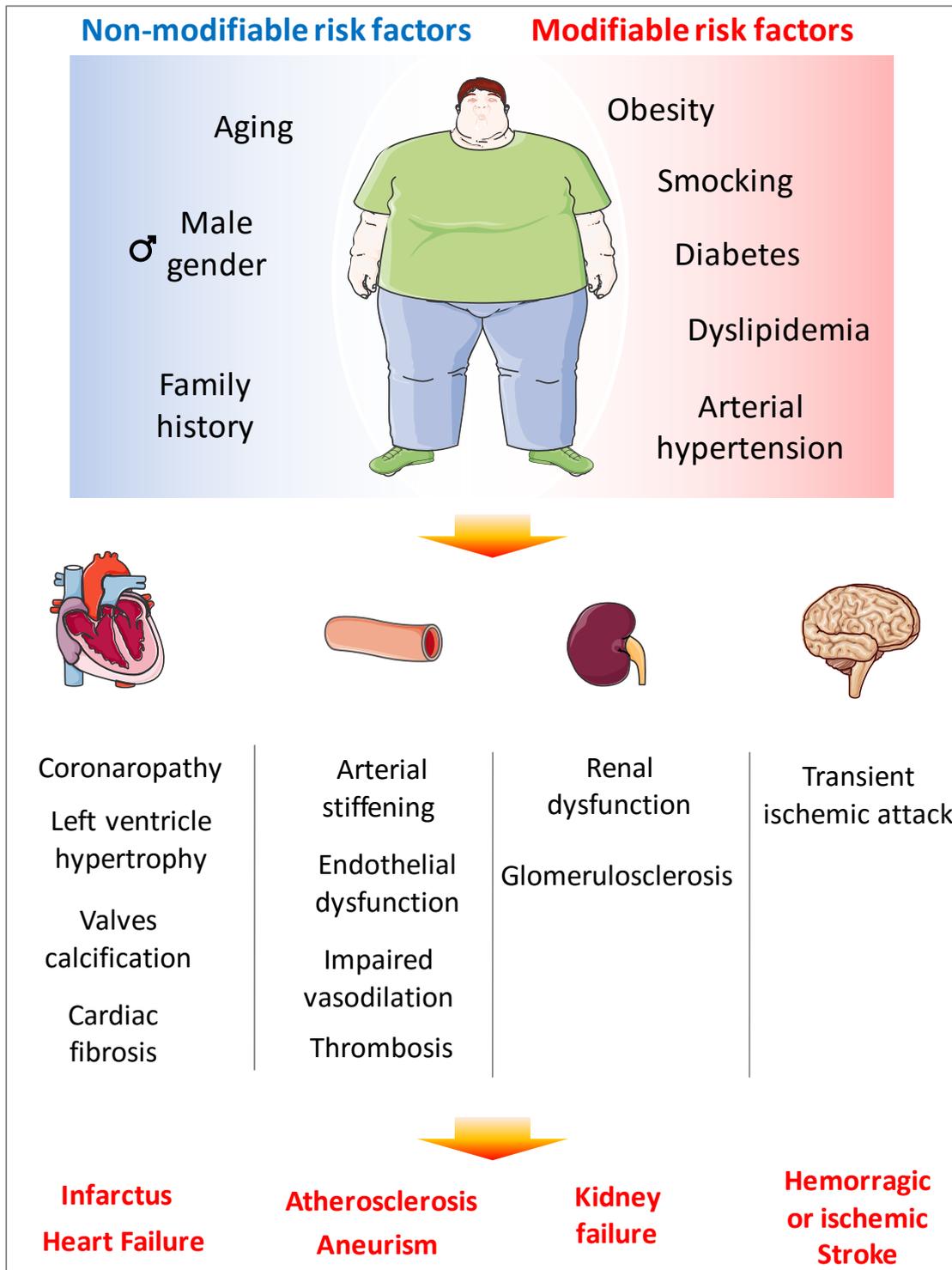


Figure 9 : Facteurs de risques cardiovasculaires.

Les maladies cardiovasculaires sont déclenchées ou aggravées par des facteurs de risques modifiables et non-modifiables. Ces facteurs sont indépendants ou interconnectés et peuvent aboutir à des pathologies graves comme l'infarctus du myocarde, l'insuffisance rénale ou l'AVC.

2.2.2. Facteurs de risque modifiables

2.2.2.1. Hypertension artérielle

L'hypertension artérielle (HTA) est définie comme une pression artérielle systolique supérieure à 140 mmHg et/ou une pression artérielle diastolique supérieure à 90 mmHg. Selon les principales recommandations cliniques, ces chiffres s'appliquent aux adultes dont l'âge se situe entre 18 et 80 ans et les mesures doivent être répétées à plusieurs semaines d'intervalle pour que le diagnostic soit établi ^{49;50}. Elle est considérée comme le principal FdR de MCV ⁵¹. Sa sévérité est corrélée à d'autres facteurs physiopathologiques comme l'athérome, raison pour laquelle elle est dépistée et traitée le plus tôt possible ⁵⁰.

2.2.2.2. Tabagisme

Le tabac contient un grand nombre de composés chimiques extrêmement nocifs pour les poumons mais également pour d'autres organes, dont les vaisseaux et le cœur. Pourtant, 34% des français entre 15 et 85 ans sont fumeurs (source : Baromètre santé INPES 2014). Outre son effet cancérigène notable, le nombre de cigarettes fumées, exprimé médicalement en paquets-années, est directement corrélé avec le risque de MCV. Le tabac détériore l'endothélium vasculaire, aboutissant à une augmentation des phénomènes cancéreux, athéromateux, de dysfonction endothéliale et d'agrégation plaquettaire ^{52;53}. Son effet est particulièrement important chez les femmes prenant des contraceptifs oraux ⁵⁴. La suppression de ce facteur aboutit à une baisse sensible du risque de MCV.

2.2.2.3. Diabète

Le diabète de type I, appelé également diabète insulino-dépendant, est une maladie auto-immune qui détruit partiellement ou totalement les cellules bêta du pancréas. Ces dernières ont pour rôle de synthétiser l'insuline, qui est essentielle à l'utilisation du glucose sanguin par l'organisme. Le diabète de type II est une maladie impliquant des causes

génétiques, environnementales et comportementales et est caractérisée par une baisse de la sensibilité de l'organisme à l'insuline, notamment en cas de consommation excessive chronique de sucres ⁵⁵. Le diabète de type I touche les sujets adultes d'un âge inférieur à 40 ans tandis que le type II, qui constitue la grande majorité des cas de diabète, touche les sujets au-delà de 40 ans ⁵⁶. On parle de diabète lorsque la glycémie à jeun excède 1,26 g/L. Le diabète est corrélé très positivement avec les autres FdR modifiables comme l'HTA et les dyslipidémies et accroît fortement le risque de MCV ⁵⁷. Il est important de noter que la prévalence du diabète de type 2 connaît une augmentation rapide dans la plupart des pays et que le nombre de patients est appelé à doubler dans la prochaine décennie ⁵⁵.

2.2.2.4. Dyslipidémies

Les dyslipidémies regroupent les anomalies des taux de lipides dans le sang. Cela concerne principalement le cholestérol et les triglycérides (TG). Le cholestérol se retrouve sous deux formes principales dans le sang, le LDL-Cholestérol, pour Low Density Lipoprotein et le HDL-Cholestérol pour High Density Lipoprotein. Parmi les dyslipidémies, l'élévation du LDL-c au-dessus de 1,60 g/L accompagnée d'une baisse du HDL-c en dessous de 0,40 g/L est le principal FdR de MCV. Une augmentation isolée des TG n'est corrélée positivement au risque de MCV que si elle est liée avec d'autres FdR.

Parmi les traitements courants destinés à réduire la morbi-mortalité CV, les statines, médicaments visant à réduire le LDL-c et augmenter le HDL-c sont parmi les plus efficaces et ont permis une baisse importante de la mortalité (-30% en 20 ans) (source université médicale virtuelle francophone).

2.2.2.5. Autres facteurs de risque

D'autres facteurs sont également positivement corrélés avec le risque de MCV dans une plus faible mesure ou par amplification des facteurs précédemment cités. Notamment, l'insuffisance rénale chronique qui fragilise particulièrement le système vasculaire ⁵⁸.

2.2.2.5.1. Sédentarité

La sédentarité qui est définie comme un manque d'activité physique régulière, est associée à une augmentation du risque de MCV. L'activité physique diminue les risques d'obésité, la consommation de tabac, stimule le renforcement du système cardiovasculaire et améliore l'hygiène de vie ⁵⁹. On parle de sédentarité en dessous de 5 fois 30 minutes par semaine d'activité modérée comme la marche.

2.2.2.5.2. Obésité

L'obésité est définie comme un excès pondéral, dû à une forte quantité de masse grasseuse. Ce statut est évalué grâce au calcul de l'indice de masse corporelle (IMC), qui divise le poids par le carré de la taille. La valeur obtenue est placée dans une échelle de référence. Entre 18 et 25, on considère que le poids est normal. On parle d'obésité modérée entre 30 et 40 et d'obésité morbide au-delà de 40. En fonction des individus, l'excès de masse grasseuse ne sera pas un FdR de MCV équivalent. On estime à environ 30% le nombre de personnes obèses mais métaboliquement saines ⁶⁰. Pour les autres, l'excès de graisse est associé à des dyslipidémies plus ou moins sévères.

2.2.2.5.3. Syndrome métabolique

Le syndrome métabolique est défini comme une constellation de facteurs physiologiques, biochimiques, cliniques et métaboliques interconnectés qui augmentent directement le risque CV ⁶¹. Il se caractérise comme la réunion d'au moins trois facteurs parmi lesquels :

- Une pression artérielle supérieure à 130/85 mmHg,
- Un taux de HDL-c inférieur à 0,40 g/L chez l'homme et 0,50 g/L chez la femme,

- Une glycémie à jeun supérieure à 1,10 g/L,
- Un taux de TG supérieur à 1,5 g/L,
- Un tour de taille supérieur à 102 cm chez l'homme et 88 cm chez la femme.

A ces différents facteurs biologiques, nous pouvons également associer la consommation excessive d'alcool, le stress chronique et aigu et la pollution environnementale.

3. Hypertension artérielle

3.1. Régulation de la pression artérielle

La pression artérielle (PA) est définie comme la force exercée par le sang sur la paroi d'une artère. Cette valeur de pression est exprimée en mmHg. La PA est contrôlée par le cerveau, le cœur, les vaisseaux et les reins. Ces différents organes interagissent ensemble de manière complexe pour assurer l'homéostasie de la PA (Figure 10).

3.1.1. Pression artérielle

Trois types de PA existent :

- La PA systolique (PAS) est la pression s'exerçant dans l'artère au moment où le cœur se contracte (systole). C'est la PA la plus élevée, la systole permettant au sang de sortir du VG et de passer dans l'aorte.
- La PA diastolique (PAD) est la pression s'exerçant lorsque le cœur se relâche (diastole). C'est la PA la plus faible, la diastole étant la phase où le cœur n'exerce plus de force contractile.
- La PA moyenne (PAM), correspond à la formule suivante :

$$PAM = \frac{PAS + 2PAD}{3}$$

La PA résulte du débit cardiaque (Q) et des résistances périphériques (R). Le débit cardiaque dépend du volume d'éjection systolique (VES) et de la fréquence cardiaque (FC) :

$$Q = VES \times FC$$

Ainsi, la formule de la PA peut être résumée comme suit :

$$PA = Q \times R$$

3.1.2. Mécanismes de régulation de la pression artérielle

Le cœur a une activité autonome lui permettant de fonctionner en l'absence de stimuli nerveux. La force de contraction (inotropisme) et la fréquence des contractions (chronotropisme) déterminent toutes les deux le débit cardiaque. L'augmentation de la valeur de ces paramètres aboutit à une augmentation proportionnelle de la PA. Le cerveau est capable de réguler l'activité cardiaque par le biais de nerfs ortho et parasymphatiques (Figure 10). La détection de la PA est faite au niveau des vaisseaux par l'intermédiaire de barorécepteurs, des mécanorécepteurs à activité neuronale, sensibles aux variations de la PA par l'étirement de la paroi. Ils sont principalement localisés au niveau du sinus carotidien, de la crosse aortique et de l'oreillette droite ⁶².

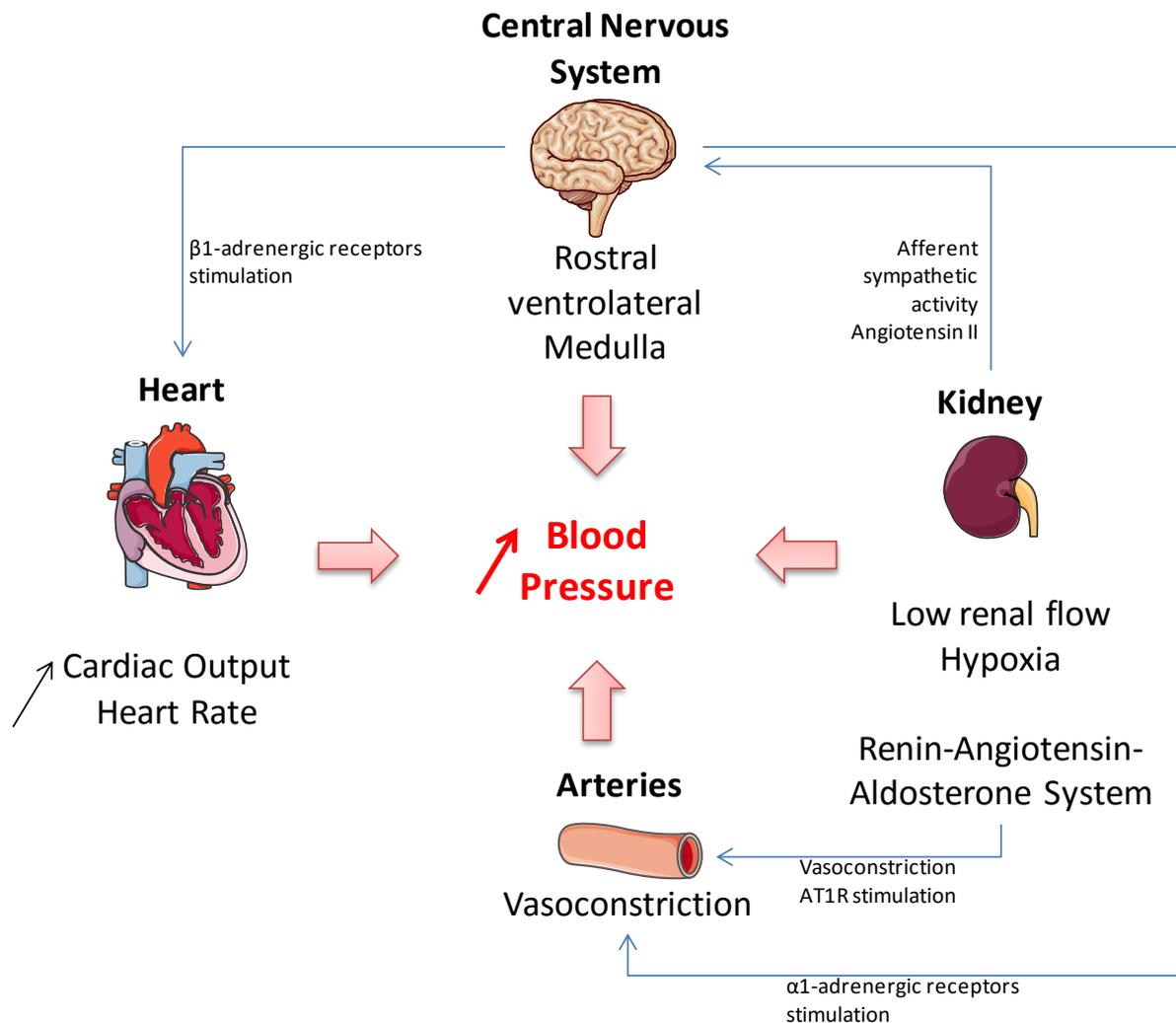


Figure 10 : Mécanismes augmentant la pression artérielle (inspiré de ⁶³).

La régulation de la pression artérielle dépend de l'activité sympathique, du cœur, du rein et des artères. Ces organes interagissent ensemble pour augmenter la pression artérielle. La stimulation orthosympathique augmente l'activité cardiaque et la vasoconstriction. Le rein augmente la synthèse de rénine et la volémie. Ces changements aboutissent à une hausse de la pression artérielle.

En cas de diminution de la PA, les barorécepteurs envoient des signaux afférents au centre vasomoteur situé dans le bulbe rachidien. Celui-ci augmente l'activité de la voie nerveuse orthosympathique qui libère des catécholamines. Elles activent les récepteurs β_1 -adrénergiques cardiaques qui augmentent l'inotropisme et le chronotropisme cardiaques et *in fine* la PA. Ces catécholamines activent également les récepteurs α_1 -adrénergiques situés sur les artères, entraînant leur contraction et l'augmentation de la résistance périphérique.

Les reins jouent également un rôle primordial dans la régulation de la PA. L'artère rénale contrôle le débit de perfusion du rein dont dépend l'excrétion de sodium. Le débit de perfusion agit aussi sur l'activité du système rénine-angiotensine-aldostérone (SRAA), un système crucial dans la régulation de la PA. Ces deux paramètres contrôlent de manière active la volémie, l'état de la résistance périphérique et donc la PA.

3.2. Définition de l'hypertension artérielle

Selon le rapport 2016 de la Heart Foundation qui fournit des consignes de prise en charge de l'HTA, la pression sanguine optimale pour minimiser le risque cardiovasculaire est inférieure à 120-80 mmHg⁶⁴. La pression normale se situe aux alentours de 130-80 mmHg. Au-delà de cette valeur, on parle d'hypertension artérielle. Il existe 3 grades d'HTA (Tableau 1) :

Tableau 1: Classification de l'HTA.

Classification de l'HTA		
	PAS (mmHg)	PAD (mmHg)
Grade 1 : HTA légère	140-159	90-99
Grade 2 : HTA modérée	160-179	100-109
Grade 3 : HTA sévère	≥180	≥110

L'HTA constituant le principal FdR de MCV, les cliniciens ont établi une classification du risque en fonction du niveau de PA et des facteurs de risque (FdR) éventuels (Tableau 2).

Il apparaît clairement que la prévention de la hausse de la PA entraîne une forte réduction de risque CV. Selon les chiffres de l'OMS, plus d'un adulte sur quatre est atteint d'HTA et cette pathologie participe au décès de près de 10 millions de personnes chaque année. Grâce à une approche thérapeutique de plus en plus rigoureuse et précoce, la

prévalence de l'HTA tend à diminuer. Ainsi, dans la région OMS des Amériques, 31% des adultes étaient atteints d'HTA en 1980, contre 18% en 2014 (OMS). Toutefois, il reste encore une forte proportion de personnes hypertendues qui n'est pas diagnostiquée.

Tableau 2 : Classification du risque de MCV en fonction du niveau d'HTA.

		Niveau de la PA (mmHg)		
		Grade 1	Grade 2	Grade 3
FdR ou antécédent	Groupe A : Pas d'autre FdR	Faible	Moyen	Elevé
	Groupe B : 1-2 autres FdR	Moyen	Moyen	Elevé
	Groupe C : 3 FdR ou diabète ou antécédent cardiovasculaire	Elevé	Elevé	Elevé

3.3. Principaux facteurs de risque de l'hypertension artérielle

Les principaux facteurs de risque de l'HTA sont plus ou moins ceux des MCV, rendant l'HTA encore plus prédominante dans le risque CV (Tableau 3).

Tableau 3 : Principaux facteurs de risque de l'hypertension artérielle.

Hypercholestérolémie	LDL-c \geq 1,60 g/L	HDL-c \leq 0,40 g/L
Diabète	Traité ou non	
Tabac	Actif	Depuis moins de 3 ans
Obésité abdominale	Périmètre abdominal > 102 cm chez l'homme	Périmètre abdominal > 88 cm chez la femme
Catégorie socioprofessionnelle défavorisée/sédentarité		
Age	> 50 ans chez l'homme	> 60 ans chez la femme
Sexe masculin		
Antécédents familiaux d'accident CV précoce	Infarctus du myocarde avant 55 ans chez le père ou parent du 1 ^{er} degré masculin Ou AVC < 45 ans	Infarctus du myocarde avant 65 ans chez la mère ou parente du 1 ^{er} degré féminine Ou AVC < 45 ans

La réduction de ces facteurs participe directement à la diminution du risque d'HTA et de MCV.

3.4. Traitements de l'hypertension artérielle

En raison de l'absence de signes cliniques visibles ou douloureux, la gravité de l'HTA est parfois sous-estimée par les patients. Pourtant, cette pathologie est considérée comme « un tueur silencieux » qui doit être traité le plus rapidement et efficacement possible.

3.4.1. Traitements non-médicamenteux de l'hypertension artérielle

Avant la prescription de tout traitement médicamenteux, il est important de mettre en œuvre des mesures hygiéno-diététiques adaptées à chaque patient. Ces règles ont été testées et ont permis d'obtenir des résultats positifs, quoique limités :

- Réduction du poids chez les patients en surpoids => -5,2 mmHg
- Réduction de la consommation d'alcool => -3,9 mmHg
- Augmentation de l'exercice physique => -4,9 mmHg
- Réductions des apports en sel (5-6 g/j) => -5,1 mmHg
- Recours à une technique de relaxation pour réduire le stress => -1,0 mmHg.

Ces traitements ont peu d'effets directs sur le niveau de la PA. En revanche, ils permettent d'améliorer l'hygiène de vie et d'alléger les traitements médicamenteux ⁶⁵.

3.4.2. Traitements médicamenteux de l'hypertension artérielle

Il existe différents types de médicaments antihypertenseurs et leur prescription est adaptée pour chaque patient. La plupart des traitements conventionnels de l'HTA sont répartis en 4 catégories (Tableau 4) : Diurétiques, bêta-bloquants, inhibiteurs du SRAA, inhibiteurs calciques.

Tableau 4 : Liste des principales catégories de traitements médicamenteux de l'hypertension artérielle

	Mode d'action	Exemples
Diurétiques thiazidiques	Excrétion du NaCl et de l'eau => Réduction de la volémie	Hydrochlorothiazide, Indapamide
Béta-bloquants	Inhibition des récepteurs β -adrénergiques cardiaques => Diminution du débit cardiaque	Métoprolol, propranolol
Inhibiteurs du système rénine-angiotensine-aldostérone	Inhibition de la production ou de l'action de la rénine, de l'angiotensine II ou de l'aldostérone => vasodilatation périphérique	IEC : Captopril ARA II : Losartan
Bloqueurs des canaux calciques	Réduction de la concentration de calcium intracellulaire => Vasorelaxation	Nifedipine, verapamil

3.5. Rôle du système rénine-angiotensine-aldostérone

Le système rénine-angiotensine-aldostérone (SRAA) est un acteur clé de l'homéostasie de la PA, de l'équilibre hydrosodé et du système cardiovasculaire. Ce système agit principalement sur le cœur, le cerveau, les reins et les vaisseaux (Figure 11).

3.5.1. Rôle de la rénine

3.5.1.1. Production de la rénine

Découverte il y a plus d'un siècle dans le rein de lapin par Tigerstedt et Bergmann, la rénine est un peptide impliqué dans la régulation de la PA. En 1934, Goldblatt et al. ont démontré qu'un clampage de l'artère rénale entraînait une augmentation la PA chez le chien⁶⁶. La rénine, aussi appelée angiotensinogénase, est sécrétée par les cellules juxtaglomérulaires situées dans les artères rénales. Son rôle est de maintenir une perfusion rénale optimale afin d'assurer une fonction d'épuration efficace. Sa sécrétion peut être déclenchée par une baisse de la PA, une baisse du taux sanguin de sodium ou une stimulation du système nerveux sympathique.

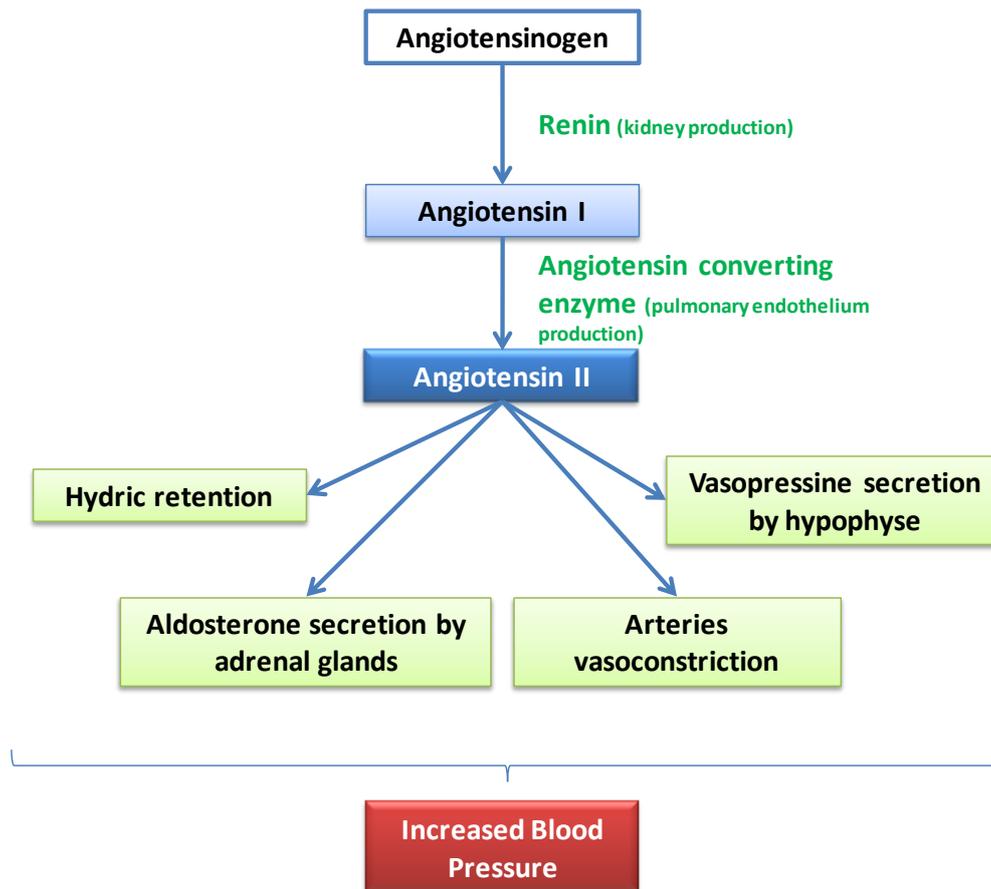


Figure 11 : Schéma de la voie de synthèse de l'angiotensine II et de ses effets sur la pression artérielle (modifié à partir de cours hypertension artérielle CHU Vaudois, Département de médecine, Service d'Urologie).

L'angiotensine I est issue de la coupure enzymatique de l'angiotensinogène par la rénine, enzyme libérée par le rein. L'angiotensine I est convertie en angiotensine II par l'enzyme de conversion de l'angiotensine II. Cette dernière est le peptide actif qui augmente la pression artérielle par plusieurs mécanismes, dont la rétention hydrosodée, la sécrétion de vasopressine, d'aldostérone et la vasoconstriction.

3.5.1.2. Action de la rénine

Une fois libérée dans le sang, la rénine exerce une activité enzymatique vis-à-vis d'un peptide libéré par le foie, l'angiotensinogène (Figure 11). Cette activité aboutit à la coupure du peptide et à la formation d'un second produit, l'angiotensine I (Ang I), inactive sous cette forme. L'enzyme de conversion de l'Ang I (ECA) est une enzyme produite et attachée à l'endothélium pulmonaire, rénal et artériel. Cette enzyme clive l'Ang I en angiotensine II (Ang II), le peptide final actif. Celui-ci aura différentes actions sur les système cardiovasculaires et rénal, toutes aboutissant à une hausse de la PA (Figure 11).

3.5.2. Rôle de l'angiotensine II

3.5.2.1. Nature de l'Ang II

L'Ang II est un petit peptide de 10 acides aminés. Elle agit sur les cellules via deux types de récepteurs. Le premier est AT₁R, le récepteur le plus exprimé. Son expression est abondante dans les vaisseaux, le cœur, les reins, les glandes surrénales et le foie. Il est classiquement décrit comme le récepteur le plus délétère dans l'HTA et est une cible des traitements thérapeutiques comme les antagonistes du récepteur à l'angiotensine II (ARA2). L'action d'AT₁R est associée à la croissance cellulaire, l'inflammation et la vasoconstriction, effets délétère de l'Ang II dans l'HTA ⁶⁷.

Le deuxième est le récepteur AT₂R, moins exprimé que AT₁R. Il est surtout exprimé chez le fœtus et son expression baisse rapidement après la naissance ⁶⁸. Son action est décrite comme antagoniste à celle de AT₁R et ses effets sont bénéfiques dans l'HTA et ses conséquences vasculaires ^{69;70}. Ainsi, son expression est augmentée dans des contextes pathologiques de remodelage ou d'inflammation cardiaque et vasculaire ⁷¹. Son action est associée à la réduction de l'apoptose et une augmentation de la vasodilatation ^{69;72}.

3.5.2.2. Production de l'Ang II

L'Ang II est principalement produite sous forme circulante via l'action de la rénine. La production peut également être faite au niveau tissulaire, comme c'est le cas notamment dans l'organe subfornical, un organe circumventriculaire situé dans le cerveau et directement en contact avec le sang. Il a été montré que les cellules neuronales situées dans cet organe étaient capables de synthétiser localement de l'Ang II en exprimant un enzyme de conversion spécifique ⁷³. Cette production locale aurait des conséquences directes sur l'activité du système nerveux sympathique et le niveau de PA.

3.5.2.3. Action de l'Ang II

Via son récepteur AT₁R, l'Ang II stimule la sécrétion d'aldostérone et de catécholamines⁶⁷. L'aldostérone est sécrétée au niveau du cortex des glandes surrénales et les catécholamines au niveau de la médullosurrénale^{74;75}. Il s'agit du seul organe où l'expression du récepteur AT₂R est 10 fois supérieure à celle de AT₁R⁷⁶. L'aldostérone est le principal minéralocorticoïde sécrété grâce à l'enzyme aldostérone synthase. L'aldostérone ainsi libérée active des récepteurs nucléaires dans les cellules cibles pour augmenter l'expression de certains gènes, notamment celui de la pompe Na/K ATPase⁷⁷. En résulte une augmentation de la réabsorption des ions sodium et une expulsion des ions potassium au niveau du tubule contourné distal et du tube collecteur du rein. Ce phénomène entraîne une réabsorption d'eau par phénomène d'osmose et en conséquence une augmentation de la PA. Cet effet est renforcé par l'action de la vasopressine, une hormone antidiurétique dont la production est stimulée au niveau de l'hypophyse par l'Ang II⁷⁸.

Favoriser l'excrétion des sels au niveau rénal est donc une stratégie thérapeutique très performante dans le traitement de l'HTA, grâce notamment à l'utilisation de diurétiques ou d'antagonistes de l'action de l'aldostérone.

3.6. Conséquences vasculaires de l'Ang II dans l'hypertension artérielle

Les artères représentent une des cibles privilégiées de l'action de l'Ang II en situation d'HTA. L'Ang II a un rôle à la fois de vasoconstricteur direct en agissant sur les cellules musculaire lisses vasculaires (CMLVs) mais également comme un stimulateur du remodelage de la paroi artérielle.

Les CMLVs sont des cellules particulièrement dynamiques dans leur activité contractile mais également dans leur structure et leur organisation. L'Ang II stimule des processus clés comme l'hyperplasie et l'hypertrophie. L'hyperplasie est définie comme une augmentation du nombre de cellules. L'Ang II agit en stimulant la synthèse d'ADN de ces

cellules ⁷⁹. L'hypertrophie se réfère à l'augmentation de la taille cellulaire grâce à une synthèse accrue de protéines et un enrichissement du contenu cellulaire en eau. L'Ang II stimule la synthèse de protéines et les transports ioniques pour augmenter le volume cellulaire des CMLVs ². Ces modifications participent au phénomène appelé « remodelage artériel ». Ce dernier regroupe tous les changements de structure de la paroi artérielle et englobe également les changements de taille de l'artère ⁸⁰.

3.6.1. Remodelage artériel induit par l'Ang II

En activant le récepteur AT₁R à la surface des CMLVs, l'Ang II active d'autres récepteurs situés dans la membrane plasmique comme l'Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR), le Platelet-Derived Growth Factor Receptor (PDGFR) ou encore l'Insulin-like Growth Factor-1 Receptor (IGF-1R). Comme leurs noms l'indiquent, ces récepteurs à activité tyrosine-kinase ont un effet majeur dans la croissance cellulaire et leur activation participe au remodelage cellulaire des CMLVs (Figure 12). AT₁R active également d'autres types de protéines comme le Proto-oncogene tyrosine-protein kinase Src (c-Src). Ce dernier est impliqué directement dans la détérioration de la fonction vasculaire et l'accentuation du stress oxydatif liées à l'action de l'Ang II. Son inhibition réduit partiellement ces phénomènes ⁸¹. AT₁R active également l'enzyme Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate-Oxidase (NADPH oxydase), impliquée dans la production d'espèces réactives oxygénées (ROS).

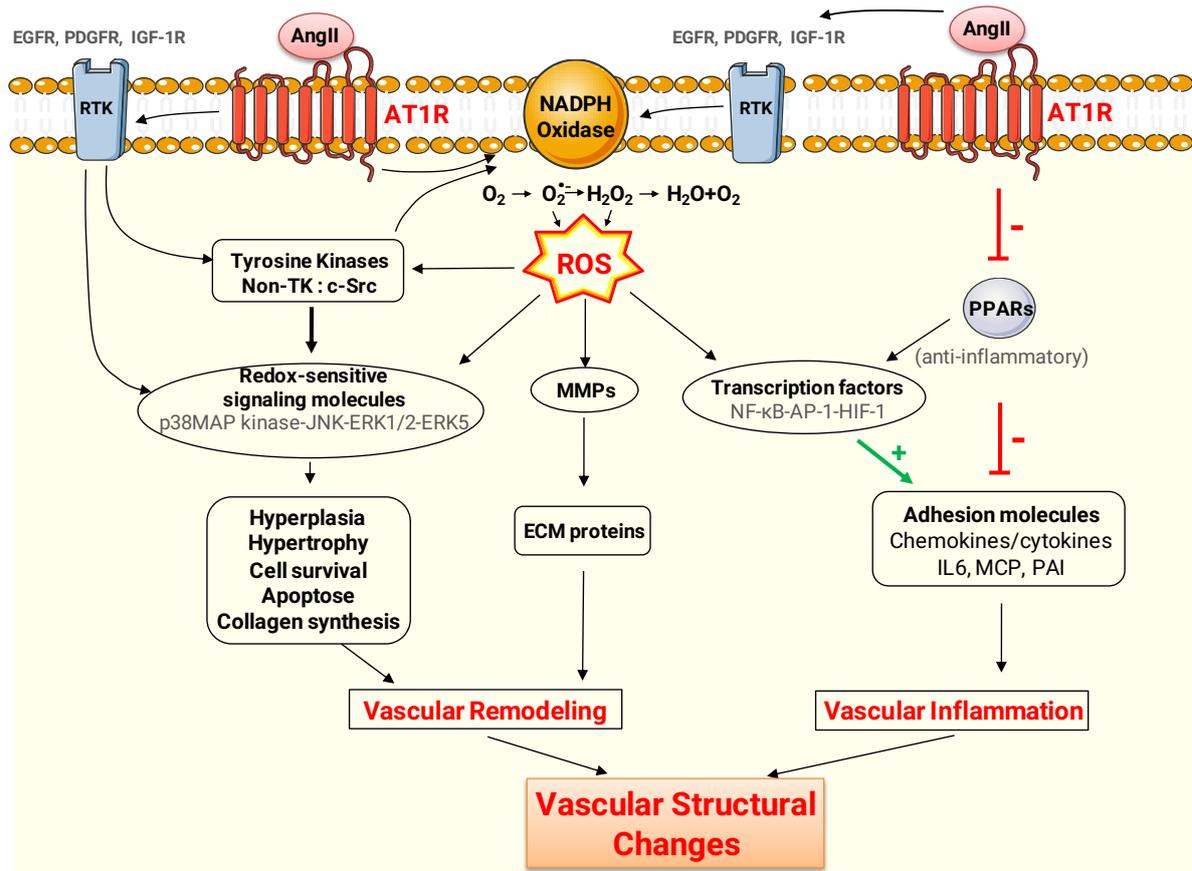


Figure 12: Schéma des mécanismes de modification de structure vasculaire dans l'hypertension par l'angiotensine II (modifié à partir de ²).

Le récepteur à l'angiotensine II AT₁R active différents mécanismes délétères au niveau vasculaire, notamment l'augmentation de la production de ROS par la NADPH, l'inflammation et la synthèse de collagène. Ces modifications aboutissent à des changements structuraux, appelés remodelage vasculaire.

3.6.1.1. Action de l'Ang II sur le stress oxydatif et l'inflammation vasculaire

Ces ROS activent à leur tour des protéines à activité kinase telles que p38MAP kinase, JNK, ERK1/2 et ERK5 qui font partie de la famille des Mitogen-Activated Protein kinases (MAPK). Ces protéines jouent un rôle primordial dans la mitose des cellules eucaryotes. De très nombreuses études ont également prouvé leur implication dans l'apoptose, la différenciation et la survie cellulaire ^{82;83}. Les ROS activent aussi des facteurs de transcription comme le Nuclear Factor κ B (NF- κ B), l'Activator Protein-1 (AP-1) et l'Hypoxic Inducible Factor-1 (HIF-1). Ces changements aboutissent à une augmentation de l'expression de

molécules d'adhésion et de cytokines pro-inflammatoires telles que l'Interleukine-6 (IL-6) et le Monocyte Chemoattractant Protein-1 (MCP-1). Ces phénomènes participent directement à l'inflammation dans le vaisseau. L'Ang II réduit notamment l'expression cellulaire du Peroxisome Proliferator-Activated Receptors (PPARs), une protéine anti-inflammatoire.

L'inflammation vasculaire se caractérise également par un recrutement local de monocytes et de lymphocytes dans la paroi artérielle. Ce recrutement est favorisé par l'expression de molécules d'adhésion comme VCAM-1, ICAM et l'expression de la E-selectin, toutes augmentées par l'Ang II ^{84;85}. En association avec une présence accrue de lipides oxydés, cette inflammation est pro-athérogène. Les traitements visant le SRAA comme les bloqueurs d'AT₁R réduisent sensiblement les niveaux sanguins de VCAM-1, du Tumor Necrosis Factor- α (TNF- α) chez les patients hypertendus ⁸⁶.

3.6.1.2. Action de l'Ang II sur l'activité des métalloprotéinases

AT₁R active également les enzymes métalloprotéinases (MMPs), impliquées dans la dégradation de la matrice extracellulaire (MEC). Ces enzymes ont été découvertes par leur rôle dans la métamorphose amphibienne en 1962 par Gross et Lapierre. La MMP1, aussi appelée collagénase, a été mise en évidence comme étant capable de dégrader les fibres de collagène, composé essentiel de la MEC ⁸⁷. Une augmentation de l'activité de ces enzymes participe à la modification de la MEC qui entoure les CMLVs et de la structure la paroi artérielle, entraînant son remodelage. Parallèlement à ces modifications, une augmentation des dépôts de collagène dans la média a été observée dans des modèles expérimentaux d'HTA et chez les patients hypertendus ^{88;89;90}.

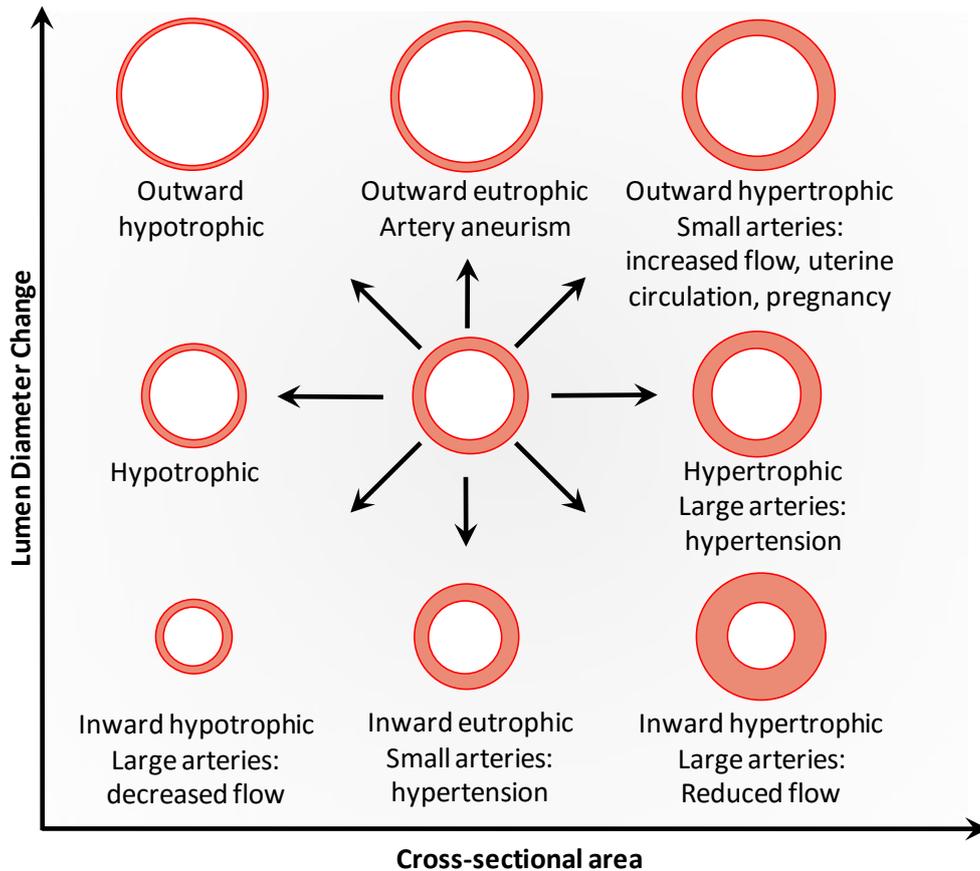


Figure 13 : Schéma des différents types de remodelage artériel dans les pathologies cardiovasculaires (adapté de ⁹¹).

Les artères peuvent se remodeler différemment en fonction du contexte physiopathologique. Dans le cas de l'hypertension artérielle, les gros vaisseaux subissent un remodelage hypertrophique où le diamètre interne est conservé tandis que la paroi s'épaissit. Dans le cas des artères de résistance, le remodelage est qualifié d'eutrophique interne puisque le diamètre interne diminue.

3.6.1.3. Action de l'Ang II sur le remodelage vasculaire

Le déséquilibre de la croissance cellulaire et de l'inhibition de l'apoptose est un des facteurs essentiels du remodelage délétère observé dans les artères des sujets hypertendus ⁹². Différents types de remodelage peuvent avoir lieu en fonction du contexte physiopathologique (Figure 13). Dans l'HTA chronique, une modification appelée remodelage hypertrophique des gros vaisseaux apparaît ³. Ce changement se traduit par un épaississement de la media et une augmentation du diamètre global de l'artère sans changement du diamètre interne. Ce changement permet au vaisseau d'augmenter sa résistance à la pression sanguine grâce à une

paroi plus épaisse. Ce faisant, le diamètre interne ne diminue pas, pour éviter une augmentation accrue de la PA. Dans les artères de petit calibre, le remodelage observé dans l'HTA est d'un type différent, appelé eutrophique interne³. La paroi s'épaissit pour supporter l'augmentation de pression mais la croissance se fait vers l'intérieur du vaisseau car l'apoptose des CMLVs intervient dans la périphérie externe de l'artère. Ce remodelage permet à l'artère de résistance de conserver sa capacité contractile pour réguler la pression en aval mais ce processus aboutit à une augmentation de la résistance périphérique. Cela augmente encore davantage la PA et vice-versa, entraînant une dynamique délétère.

3.6.1.4. Endothéline-1

L'endothéline-1 (ET-1), protéine produite par l'endothélium vasculaire, a une forte implication dans les remodelages vasculaires observés au cours de l'HTA. Elle participe directement à la vasoconstriction des artères de résistance, la prolifération, l'inflammation et la fibrose artérielle³. Elle participe également de manière prédominante au remodelage cardiaque observé dans l'hypertension. De manière générale, elle entretient et aggrave les effets délétères du SRAA observés dans l'HTA induite par une ligature de l'artère rénale⁹³. Un blocage de ses récepteurs ETA et ETB permet d'abolir le remodelage des artères cardiaques et tout phénomène de fibrose cardiaque⁹³.

3.6.2. Hypercontraction vasculaire dans l'HTA

La capacité de contraction en réponse à la pression, appelée tonus myogénique, est également augmentée dans l'HTA⁹⁴. Ce phénomène serait très précoce et participerait directement aux changements vasculaires décrits précédemment⁹⁵. Pour des raisons mécaniques, la réponse contractile des artères de résistance remodelées est augmentée, en particulier en réponse à l'ET-1 et l'Ang II⁹⁶ (Figure 14).

L'action pro-contractante de l'Ang II s'explique tout d'abord par une hausse du taux de Ca²⁺ intracellulaire. Cette augmentation est la conséquence d'une activation des canaux

calciques et d'une libération des stocks de calcium du réticulum sarcoplasmique par la voie de la Phospholipase C- β (PLC β) et de l'Inositol 1,4,5-triphosphate (IP₃). Le complexe Ca²⁺/Calmoduline active alors la Kinase de la Chaîne Légère de Myosine (MLCK), qui phosphoryle la chaîne légère de myosine, aboutissant à une interaction actine-myosine, synonyme de contraction. En parallèle, l'activation de la voie RhoA/Rho kinase et l'action de la Protéine Kinase C (PKC) augmente la sensibilité au Ca²⁺ en inhibant la MLC phosphatase pour l'empêcher de déphosphoryler la chaîne légère de myosine et conserver la contraction. Dans le même temps, l'augmentation de la génération de ROS par la NADPH oxydase entraîne une diminution de la biodisponibilité du NO et une réduction de la capacité vasodilatatrice de l'artère ².

Ces modifications aboutissent à une hausse de la contraction des CMLVs par l'Ang II et du tonus vasculaire. De manière chronique, cette hypercontraction accélère le remodelage artériel et la résistance périphérique mais fragilise la paroi du vaisseau. Les études cliniques visant à évaluer les changements fonctionnels des artères de résistance en cas d'HTA ont observé une baisse de la capacité de vasodilatation endothélium-dépendante ⁹⁷. Une altération de la capacité vasodilatatrice indépendante de l'endothélium a également été suggérée mais n'a pas été observée chez les patients hypertendus. ⁹⁸.

De manière globale, les traitements de l'HTA semblent donc améliorer la fonction endothéliale ⁹⁹.

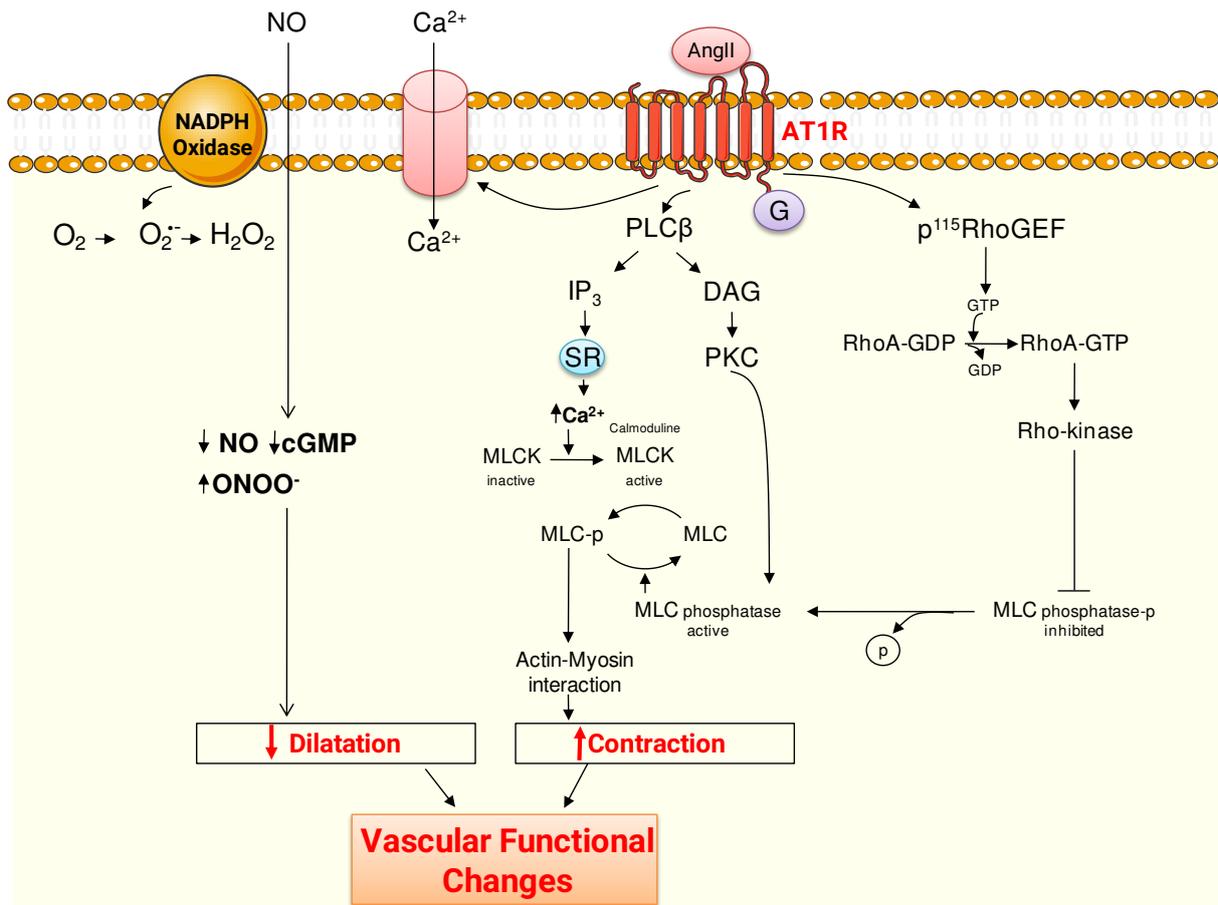


Figure 14 : Schéma des mécanismes de modification de fonction vasculaire dans l'hypertension par l'angiotensine II (modifié à partir de ²).

Le récepteur à l'angiotensine II AT₁R augmente la contraction des cellules musculaires lisses par deux mécanismes. La vasoconstriction est augmentée l'augmentation de l'interaction actine-myosine. La vasodilatation est réduite par la diminution de la biodisponibilité du NO.

3.6.3. Dysfonction endothéliale

La dysfonction endothéliale est une altération phénotypique de l'endothélium vasculaire caractérisée par des troubles pro-thrombotiques, pro-inflammatoires et pro-constrictifs ¹⁰⁰. Approximativement 60% des personnes hypertendues présentent de signes de dysfonction endothéliale, dès le premier grade d'HTA ². Pour ces raisons, la dysfonction endothéliale est un solide baromètre du risque CV ¹⁰¹. Une amélioration de ce paramètre par des traitements spécifiques augmente l'efficacité des traitements anti-hypertenseurs ¹⁰².

3.6.3.1. Analyse de la fonction endothéliale

L'évaluation de la fonction endothéliale peut être réalisée par différentes méthodes, invasives ou non-invasives. L'objectif principal de ces méthodes est de mesurer la biodisponibilité du NO, dont la réduction est une caractéristique centrale de la dysfonction endothéliale. Chez l'humain, la méthode de référence était, il y a plusieurs décennies, une mesure invasive de la vasodilatation à l'ACh dans les artères coronaires par coronarographie¹⁰³. Ses méthodes sont aujourd'hui très peu utilisées en raison de leur coût et de leur agressivité vis-à-vis du patient. Une méthode plus récente et non-invasive est aujourd'hui largement répandue. Il s'agit d'un test de réactivité de l'artère brachiale en réponse à une hausse localisée du flux sanguin, mesurée par ultrasons à haute résolution. Cette capacité de dilatation en réponse au *shear-stress* est appelée dilatation flux-dépendante (DFD). Elle permet à l'artère de réduire les forces de cisaillement s'exerçant sur l'endothélium en adaptant son diamètre. La mesure de la DFD dans l'artère brachiale permet d'établir une prédiction fiable du risque CV¹⁰⁴. Indépendamment de phénomènes athéromateux, la dysfonction endothéliale est également positivement corrélée au niveau d'HTA¹⁰⁵.

3.6.3.2. Relation entre hypertension artérielle et dysfonction endothéliale

La question posée par de nombreux auteurs a été de savoir si la dysfonction endothéliale est une cause ou une conséquence de l'HTA. A ce jour, cette question n'est pas totalement élucidée mais un certain nombre de données laissent penser qu'il s'agit d'une interaction bidirectionnelle. Favorisant l'hypothèse de la cause, des études utilisant des inhibiteurs de la eNOS font état d'une hausse de la PA chez l'Homme et l'animal¹⁰⁶. Rossi et al. ont ainsi montré qu'une dysfonction endothéliale chez les femmes ménopausées augmentait 6 fois le risque de développer une HTA plus tard¹⁰⁷.

D'un autre côté, des études suggèrent que la dysfonction endothéliale serait une conséquence de l'HTA. Chez des étudiants finlandais, Juonala et al. ont montré en 2006

qu'une PA élevée à l'adolescence était associée à une hausse du risque de dysfonction endothéliale à l'âge adulte ¹⁰⁸. Pour englober ces différentes hypothèses et tirer une conclusion claire, une étude majeure nommée Multiethnic Study of Atherosclerosis (MESA) a été menée par Shimbo et al. jusqu'en 2010. Le but de cette étude était d'observer l'incidence d'une future HTA à partir des mesures de DFD chez 3500 patients d'origine diverses. Il en est ressorti qu'une diminution de la DFD n'était pas un facteur prédictif indépendant d'une future HTA ¹⁰⁹. Les auteurs ont également souligné l'implication d'autres paramètres dans cette inter-relation. De manière globale, la conclusion de l'étude supportait plutôt l'hypothèse que l'HTA était une cause et non une conséquence de la dysfonction endothéliale. Cependant, en raison de la diversité du profil des patients dans cette étude par rapport à l'étude de Rossi et al., la question reste ouverte.

De manière indéniable, la plupart des traitements anti-hypertenseurs améliorent également la fonction endothéliale. Nous pouvons notamment citer la restriction sodée qui a un effet très modéré sur la baisse de pression des patients hypertendus mais qui améliore significativement la fonction endothéliale et augmente la biodisponibilité du NO tout en réduisant le stress oxydatif ^{110;111}. Les traitements pharmacologiques ciblant le SRAA comme les inhibiteurs de l'enzyme de conversion (IEC), les ARA2 et les antagonistes de l'aldostérone ont tous des effets bénéfiques à la fois sur la PA et également sur la fonction endothéliale ¹¹². Il en est de même pour les inhibiteurs de la rénine et des minéralocorticoïdes ^{113;114}.

3.6.4. Stress oxydatif

3.6.4.1. Nature moléculaire du stress oxydatif

De nombreuses études attribuent un rôle critique au stress oxydatif dans la physiopathologie de l'HTA et ses conséquences cardiovasculaires évoquées précédemment. Le stress oxydatif est un phénomène caractérisé par une trop forte concentration de molécules hautement instables que sont les espèces réactives oxygénées.

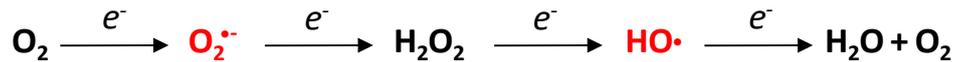


Figure 15 : Réduction de l'oxygène par les électrons de la chaîne respiratoire.

Les électrons se fixent sur l'oxygène pour le réduire. 1 électron aboutit à la production d'anion superoxyde, 2 électrons au peroxyde d'hydrogène, 3 électrons au radical hydroxyl et 4 électrons à la production d'eau.

Les ROS sont retrouvées dans toutes les cellules eucaryotes et participent aux principaux processus cellulaires comme la prolifération, la migration, l'hypertrophie, la différenciation, la dynamique du cytosquelette et le métabolisme ¹¹⁵. La production de ROS dérive très majoritairement de la production d'énergie par les mitochondries et de la phosphorylation oxydative nécessaire à la production d'ATP. Dans un contexte physiologique, le cytochrome c de la chaîne respiratoire mitochondriale transfère 4 électrons à une molécule d'O₂ et expulse des protons dans l'espace intermembranaire ¹¹⁶. Ce gradient de protons permet la production d'ATP et l'oxygène est transformé en H₂O. Toutefois, dans environ 1% des cas, l'oxygène reçoit un nombre insuffisant d'électrons ¹¹⁷. Si l'O₂ obtient 1 électron au lieu de 4, il se transforme en anion superoxide, O₂^{·-}. S'il en obtient 2, il se transforme en peroxyde d'hydrogène H₂O₂. Enfin, s'il en obtient 3, il se transforme en radical hydroxyle, HO[·] ¹¹⁶ (Figure 15). La demi-vie des ROS est extrêmement courte, de l'ordre de la milliseconde.

Ces molécules sont produites en permanence en faible concentration principalement par les mitochondries mais également par les péroxisomes et le réticulum endoplasmique via l'action de trois principales enzymes que sont la NADPH oxydase, la NOS, le cytochrome P450 et l'enzyme glucose oxydase (Figure 16). Dans les vaisseaux, les ROS jouent un rôle de signalisation et participent à l'intégrité cellulaire et au tonus vasculaire ⁴.

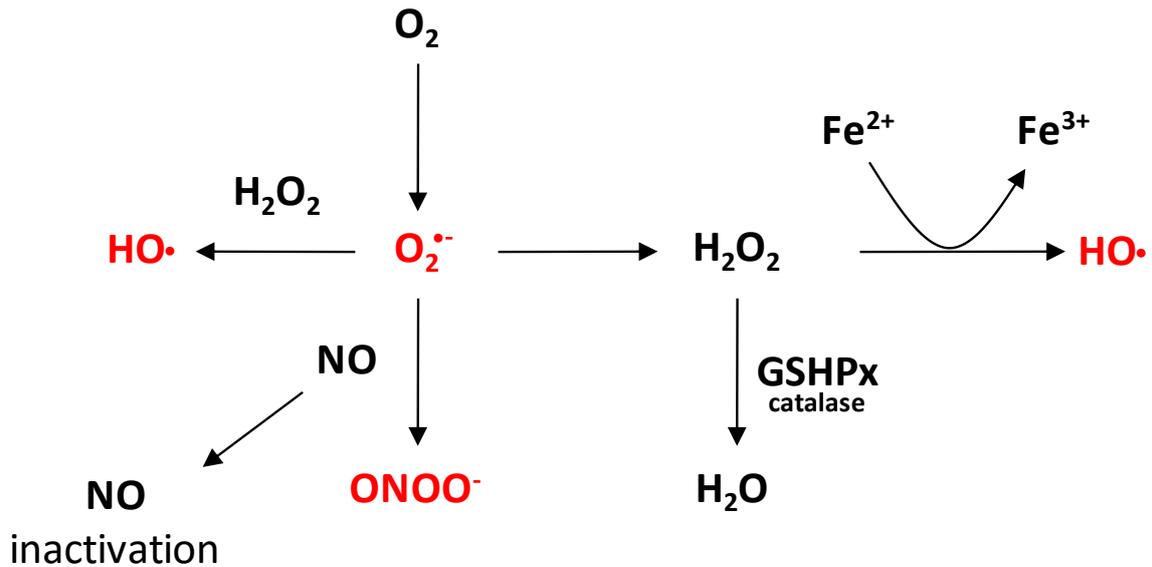


Figure 16 : Réactions de productions des espèces réactives d'oxygène (adapté à partir de ¹¹⁸).

Les espèces réactives d'oxygène sont issues de l'activité de la chaîne respiratoire mitochondriale. Elles sont composées de différentes espèces, comme l'anion superoxyde, le peroxyde d'hydrogène et le radical hydroxyle.

Dans un contexte pathologique, lorsque la concentration de ces molécules devient importante, celles-ci interagissent directement avec les autres composés cellulaires comme les lipides, les acides nucléiques et surtout les protéines qui sont particulièrement sensibles au stress oxydatif ¹¹⁷. Elles en altèrent la structure, la fonction, les interactions, les changements conformationnels, la localisation cellulaire, la sensibilité à la protéolyse, l'immunogénicité et la transcription génique ¹¹⁵. De manière chronique, ces changements sont particulièrement délétères dans le système cardiovasculaire et le rein.

Au niveau de l'endothélium vasculaire, une forte concentration de ROS diminue la biodisponibilité du NO ¹¹⁹. L'oxydation du NO aboutit à la production d'espèces réactives nitrogénées comme le peroxynitrite $ONOO^-$, qui entraînent elles aussi des altérations cellulaires ¹¹⁵.

3.6.4.2. NADPH oxydases

Les NADPH oxydases sont une famille de 7 enzymes différentes liées à la membrane plasmique, qui participent à la production de ROS. Elles sont constituées de 6 sous-unités ¹²⁰ (Figure 17) :

- Une protéine Rho Guanosine Triphosphatase (GTPase)
- l'unité catalytique gp91-phagocytic oxidase (PHOX) ou NOX2, unité variant selon les types de NOXs,
- p22phox,
- p40phox,
- p47phox,
- p67phox.

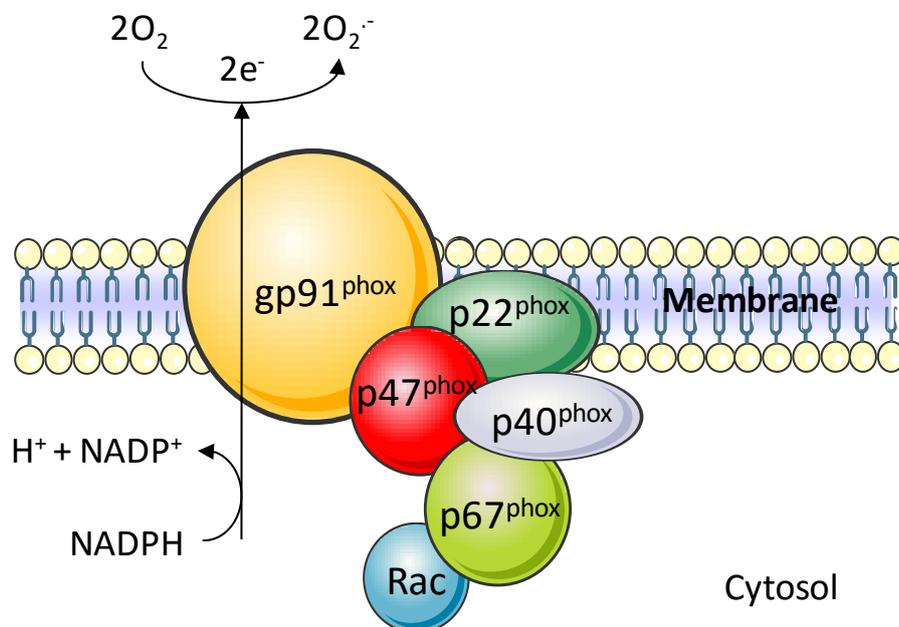


Figure 17 : Schéma de la structure de la NADPH (adapté à partir de ¹²¹).

La NADPH oxydase est un assemblage de différentes sous-unités localisées à la membrane plasmique, gp91^{phox}, p22^{phox}, p47^{phox}, p40^{phox}, p67^{phox} et une GTPase. Elles entraînent l'oxydation de l'oxygène et aboutissent à la production de ROS.

Les NOXs ont d'abord été découvertes et décrites dans les cellules immunitaires phagocytaires telles que les neutrophiles, grâce à l'effet cytolitique des ROS, utilisées pour détruire les pathogènes ¹²². Elles ont ensuite été retrouvées dans d'autres tissus, notamment le tissu vasculaire. Dans les vaisseaux, la NADPH oxydase est stimulée par différents facteurs de croissance (PDGF, EGF, TGF- β 1), des cytokines (TNF- α , IL-1 β , PAF), des stimuli mécaniques (*shear stress*), des facteurs métaboliques (hyperglycémie, hyperinsulinémie, acides gras libres) et des agonistes des récepteurs couplés aux protéines G (RCPG), tels que la sérotonine (5-HT), l'ET-1 et l'Ang II ^{123;124}. Cette dernière, via AT₁R, est un des principaux stimuli de l'augmentation de l'activité de la NADPH oxydase dans l'HTA ¹²⁵.

3.6.4.3. Superoxyde Dismutases

Des défenses anti-oxydantes interviennent lorsque les concentrations de ROS sont trop élevées. Les principales enzymes impliquées dans ce processus sont les Superoxyde Dismutases (SOD), la catalase et la glutathione peroxydase ^{126;127}. Trois formes de SOD existent : la SOD1 ou Cu/Zn, la SOD2 ou MnSOD et la SOD3 ou EC-SOD ¹²⁸. Ces enzymes catalysent la dismutation de l'anion superoxyde pour former du peroxyde d'hydrogène et de l'oxygène. Dans les vaisseaux, l'EC-SOD est majoritaire, produite principalement par les CMLVs ¹²⁹. L'EC-SOD est ainsi la principale enzyme dont l'expression augmente en réponse au stress oxydatif ¹²⁶.

D'autres acteurs agissent en parallèle des SOD. A faible niveau de stress oxydatif, le système glutathione peroxydase est un important système de protection. Lorsque le stress est plus important, le système catalase est plus efficace, prenant en charge le peroxyde d'hydrogène pour le transformer en eau et oxygène moléculaires ¹³⁰. Dans l'HTA, ces défenses anti-oxydantes sont stimulées mais leur activité n'est pas toujours suffisante pour prévenir le stress oxydatif, qui devient alors un des principaux moteurs de l'aggravation de l'hypertension ¹³¹.

3.6.4.4. Implication dans l'hypertension artérielle

3.6.4.4.1. Modifications des protéines

Le stress oxydatif agit en oxydant les acides aminés des protéines et en entraînant des changements conformationnels, d'interaction et de dimérisation. Deux acides aminés, la cystéine et la méthionine, sont particulièrement attaqués en cas de stress oxydatif, à cause de leur atome de soufre. De multiples formes de modifications peuvent avoir lieu, en fonction de la nature de l'espèce réactive et de l'acide aminé impliqué. Une modification de protéine très courante est l'attachement d'un atome d'oxygène directement sur un atome de carbone. Cette modification est irréversible et entraîne souvent une perte de fonction de la protéine visée ¹³².

D'autres modifications sont réversibles. Dans les cellules endothéliales notamment, l'attachement d'un NO sur un résidu cystéine aboutit à la production d'un groupement nitrosylé. Ainsi, plus le stress oxydatif est important, plus le nombre de modifications des protéines sera élevé. Ce niveau global de modifications donne un indice direct sur l'état de stress oxydatif de la cellule et de nombreuses méthodes de mesure ont été mises au point pour évaluer la présence de ROS.

3.6.4.4.2. Effets vasculaires du stress oxydatif dans l'HTA

Dans l'endothélium, le stress oxydatif participe à la progression de la dysfonction endothéliale ¹³³ (Figure 18). La réduction de la biodisponibilité du NO est un des principaux facteurs de la hausse de la vasoconstriction ¹³⁴. Dans les CMLVs, les ROS augmentent le taux intracellulaire de calcium des CMLVs et le tonus vasculaire, tout en activant l'expression de gènes pro-inflammatoires ¹³⁵. L'anion superoxide et le peroxide d'hydrogène stimulent les voies de signalisation impliquées dans la croissance et l'hypertrophie cellulaire, telles que les MAPK, les tyrosine kinases et les facteurs de transcription NF-κB, AP-1 et HIF-1 ^{4;136}.

Ces changements entraînent une hausse de la contraction des artères, de la croissance et de la prolifération des CMLVs, de l'infiltration monocytaire et des dépôts extracellulaires de collagène ¹³³.

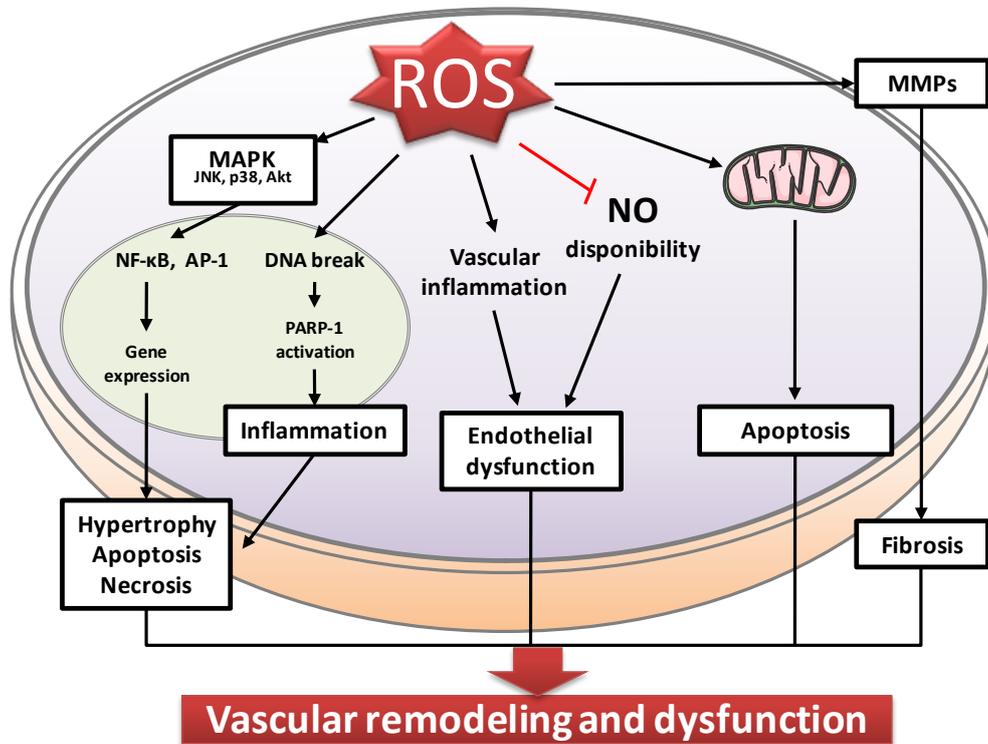


Figure 18 : Mécanismes moléculaires de l'action des ROS dans l'endothélium et les cellules musculaires lisses vasculaires (adapté à partir de ¹¹⁸).

Les ROS agissent sur de multiples mécanismes cellulaires au niveau des vaisseaux, en particulier l'inflammation, l'apoptose et la diminution du NO, entraînant une dysfonction endothéliale et une fibrose. Ces changements détériorent la fonction vasculaire et aggravent la physiopathologie de l'HTA.

Afin d'étudier l'implication de la production de ROS dans l'HTA, des modèles animaux ont été mis au point. Chez des souris p47phox ou gp91phox knockout (délétion du gène cité), l'infusion d'Ang II n'entraînait pas d'augmentation de la PA et une hausse limitée de la production d'anions superoxydes. Il en résultait une baisse du remodelage vasculaire et de la dysfonction endothéliale par rapport aux souris wild-type (sauvages) ^{137;138}. De même, des souris recevant une injection de siRNA dirigés contre la sous-unité p22phox dans le rein

avaient une réduction de la PA et du stress oxydatif malgré une infusion d'Ang II, confirmant ainsi le lien entre ROS et HTA ¹³⁹.

3.6.4.4.3. Essais cliniques utilisant des antioxydants

Pour explorer le potentiel thérapeutique du ciblage des ROS, des études cliniques ont été menées en utilisant des molécules anti-oxydantes chez des patients. Les plus importantes sont la Cambridge Heart Antioxidant Study (2002 patients), l'Alpha Tocopherol, Carotene Cancer Prevention Study (27,271 hommes); ou encore la Antioxidant Supplementation in Atherosclerosis Prevention (ASAP) study (520 patients). En dehors de la dernière étude, qui a montré qu'une supplémentation en vitamines E et C réduisait la progression de l'athérosclérose, toutes les autres études ont échoué à démontrer le potentiel thérapeutique des antioxydants dans le traitement des MCV ¹²². Ces échecs ont été attribués au type de molécules utilisées, leurs voies d'administration, aux types de patients inclus et au design de ces études (durée insuffisante des traitements par exemple).

4. Œstrogènes et protection vasculaire

4.1. Sexe, ménopause et risque cardiovasculaire

Les hommes et les femmes ne sont pas égaux devant le risque de MCV. Avant 50 ans, les femmes ont une PA significativement plus basse que celles des hommes et ont moins de risque d'être sujettes à l'HTA ¹⁴⁰. Cependant, cette différence s'estompe en moins de 10 ans après la ménopause pour finalement s'inverser ¹⁴¹. Au même âge, les femmes ménopausées ont une PA plus élevée que les femmes non-ménopausées ^{142;143}. Ainsi aux Etats-Unis, 75% des femmes de plus de 60 ans sont hypertendues, une proportion supérieure à celle des hommes ¹⁴⁴.

Dans des modèles animaux de MCV, les femelles ont une mortalité plus faible, moins de dégâts vasculaires et une meilleure préservation des capacités cardiovasculaires. Mais ces différences disparaissent après une ovariectomie ou un défaut d'hormones œstrogéniques ^{145;146;147}. L'inhibition de la production d'œstrogènes chez des sujets de sexe masculin entraîne une baisse significative de la DFD de l'artère brachiale, montrant que les effets bénéfiques de ces hormones s'exercent chez les deux sexes ¹⁴⁸. Ces éléments ont permis de mettre en valeur le rôle protecteur des hormones ovariennes, en particulier œstrogéniques, dans le système cardiovasculaire chez les femmes non-ménopausées.

4.2. Nature moléculaire des œstrogènes

Les œstrogènes sont issus de la conversion d'hormones androgènes telles que la testostérone, elles-mêmes dérivées du cholestérol, par une suite de réactions enzymatiques (Figure 19). Cette transformation est catalysée par une enzyme appelée aromatase située dans le réticulum endoplasmique ¹⁴⁹. Chez les femmes non-ménopausées, l'aromatase est principalement retrouvée au niveau des ovaires, puis dans le placenta pendant la grossesse ¹⁵⁰. Après la ménopause, l'aromatase est surtout retrouvée dans les tissus adipeux et la peau ¹⁵⁰. Cette enzyme est présente chez les hommes également où elle occupe une place importante dans la production des hormones œstrogéniques.

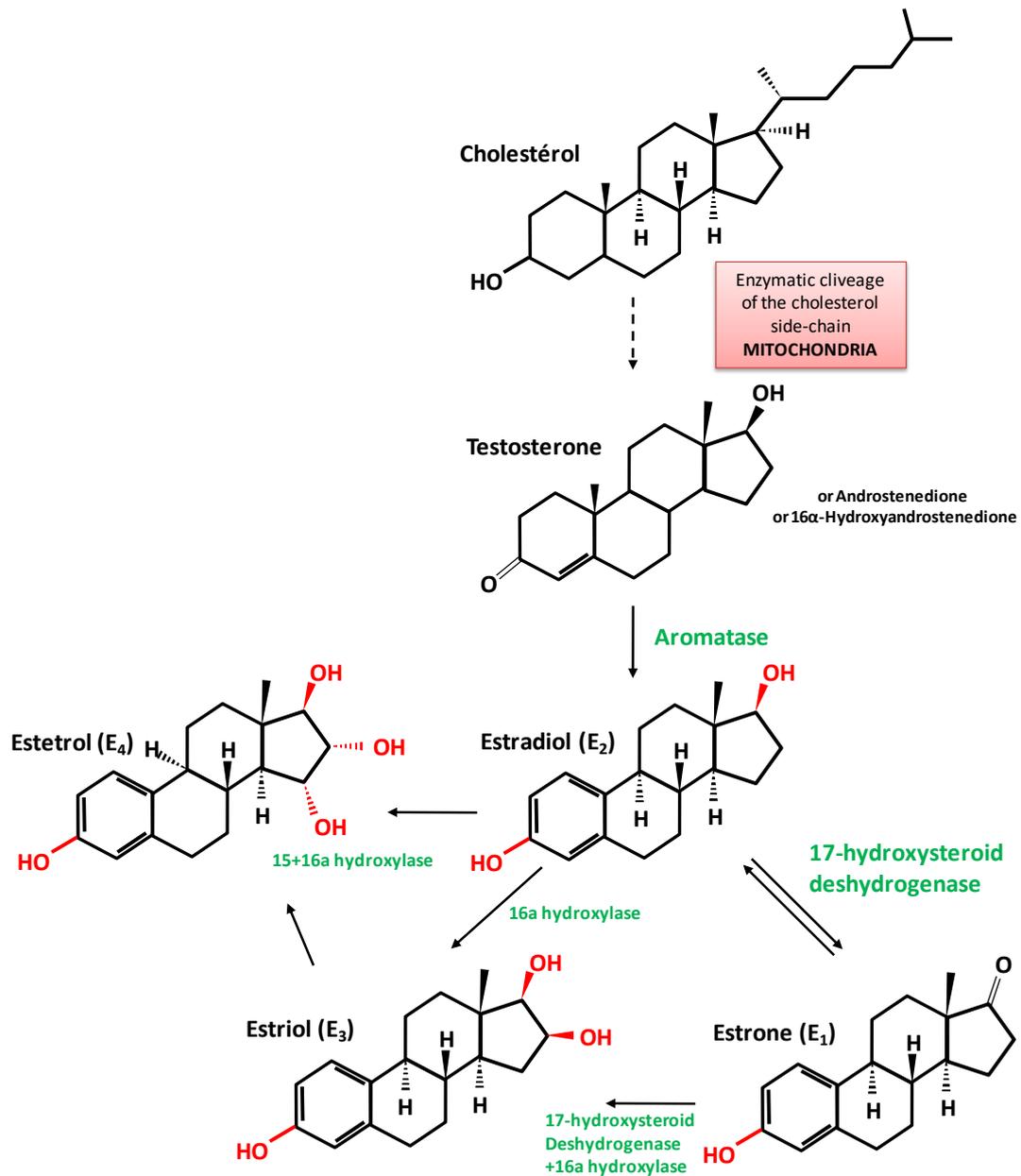


Figure 19 : Synthèse des hormones œstrogéniques à partir du cholestérol.

Les œstrogènes sont synthétisés à partir des androgènes, par l'action de l'aromatase et d'enzymes déshydrogénases. Chaque molécule d'œstrogène se caractérise par la présence de 1 à 4 groupements hydroxyl.

Il existe quatre types d'hormones œstrogéniques, classés par le nombre de groupements hydroxyl contenus dans la molécule :

- Estrone ou E1, le moins abondant des œstrogènes. Chez des femmes ménopausées, les taux plasmatiques de E1 sont négativement corrélés avec le risque d'HTA, d'obésité, de diabète ¹⁵¹.
- Œstradiol ou 17β-œstradiol ou E2, le plus abondant des œstrogènes, responsable de la grande majorité des effets sexuels mais également CV attribués aux hormones œstrogéniques,
- Estriol ou E3, produit par le placenta au cours de la grossesse et en quantité très faible en dehors de ces périodes,
- Estétrol ou E4, produit par le foie du fœtus au cours de la grossesse. Sa production devient quasi-nulle après la naissance.

Ces hormones jouent un rôle majeur dans la détermination sexuelle, le développement des caractères sexuels secondaires, le maintien des tissus reproducteurs, la régulation de la synthèse des lipoprotéines, le maintien des fonctions cognitives et le maintien et la croissance des os longs ¹⁵². Ces effets sont également nécessaires chez les individus de sexe masculin chez qui les œstrogènes assurent le bon développement des organes sexuels et la croissance osseuse ¹⁵³.

4.3. Cycle hormonal et production des œstrogènes

Chez la femme, les hormones œstrogéniques sont produites très majoritairement par les ovaires et le placenta lors de la grossesse. D'autres sources mineures d'œstrogènes existent, notamment les glandes adrénorégiques, le foie, les seins et le tissu adipeux ¹⁴⁹. Le niveau de ces hormones fluctuent au cours du cycle menstruel. L'hypothalamus libère l'hormone Gonadotropin Releasing Hormone (GnRH) qui stimule l'hypophyse. Cette dernière libère l'hormone stimulant le follicule (FSH) et l'hormone lutéinisante (LH) qui activent la synthèse d'œstrogènes par les cellules granuleuses des follicules ovariens ¹⁵⁴. Une augmentation de leurs taux plasmatiques entraîne l'ovulation puis la formation du corps jaune qui synthétisera lui-même des hormones œstrogéniques (Figure 20).

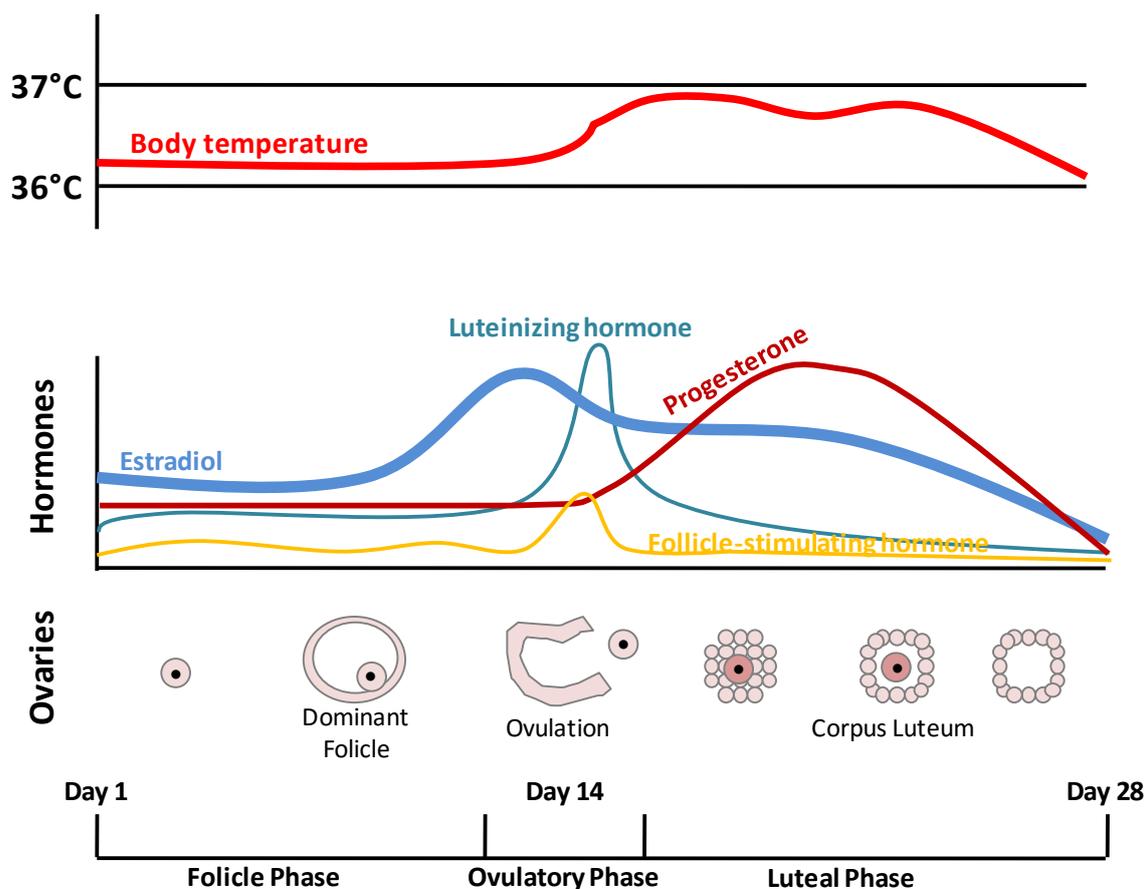


Figure 20 : Schéma du cycle menstruel (adapté à partir de santé-médecine, le journal des femmes).

Le cycle menstruel se déroule sur 28 jours, en 3 phases. La première phase est la phase folliculaire, suivie de la phase ovulatoire, où le pic œstrogénique est le plus élevé. Enfin, la dernière phase est la phase lutéale.

Chez la femme pubère et non-ménopausée, le taux plasmatique de l'E2 est compris entre 27 pg/mL et 436 pg/mL, en fonction de la phase du cycle menstruel¹⁵⁵. Chez la femme post-ménopausée, ce taux devient inférieur à 10 pg/mL, similaire à celui de l'homme.

4.4. Etudes cliniques de remplacement hormonal

4.4.1. Design de la Women Health Initiative

Au vu des effets protecteurs des hormones œstrogéniques vis-à-vis des pathologies cardiovasculaires, des études cliniques ont été menées pour tenter de les reproduire chez des femmes ménopausées. La plus importante d'entre elles, la Women Health Initiative, a démarré en 1991 aux Etats-Unis et avait pour but d'étudier les maladies cardiovasculaires, les cancers et l'ostéoporose chez les femmes ménopausées ¹⁵⁶. Cette étude financée par le National Institutes of Health (NIH) et dirigée par le Dr Bernadine Healy a enrôlé plus de 160 000 femmes ménopausées (NIH almanac - Past NIH directors).

La thérapie hormonale d'intervention était l'un des aspects majeurs de cette étude. L'hypothèse des investigateurs de cette étude était qu'une thérapie hormonale à base d'œstrogènes chez des femmes ménopausées entraînerait une baisse significative des accidents coronaires et de l'ostéoporose. Deux groupes ont donc été constitués, le premier recevant uniquement des œstrogènes et le deuxième recevant une combinaison d'œstrogènes et de progestine, molécule capable de réduire l'effet pro-cancéreux de l'E2 vis-à-vis de l'utérus ¹⁵⁶. Ces groupes ont été comparés à des femmes ménopausées ne recevant pas d'hormones.

4.4.2. Résultats de l'étude

Contrairement à l'hypothèse de départ, il est apparu après 5 ans que les patientes du deuxième groupe avait une augmentation du risque de cancer du sein, de coronaropathies, d'AVC et d'embolie pulmonaire ¹⁵⁶. De même, les patientes du premier groupe n'ont vu aucune diminution de leur risque de coronaropathie. En revanche, les fractures d'ostéoporose et le risque de cancer du sein ont été diminués par la prise d'œstrogènes.

Au vu de ces données, les auteurs ont conclu que la thérapie hormonale à base d'œstrogènes ne devait pas être utilisée de manière préventive chez des femmes ménopausées pour prévenir les MCV.

4.4.3. Critiques de l'étude

Plusieurs critiques ont été formulées par les auteurs de l'étude pour expliquer ces résultats négatifs. La première concernait l'âge des participantes, en moyenne de 63 ans. L'âge moyen de la ménopause étant de 51 ans chez les femmes américaines, les auteurs ont estimé que le délai de l'introduction de la thérapie avait été trop long. En triant les données des femmes plus jeunes incluses dans cette étude, il n'est pourtant pas apparu que la thérapie avait un effet bénéfique quand elle était initiée précocement ¹⁵⁷. Certaines études plus récentes ont néanmoins contredit ce point, estimant que les femmes de 50 à 59 ans ayant été incluses dans cette étude présentaient un risque réduit de coronaropathies ⁵. Toutefois la prise d'œstrogènes augmentait le risque de thrombose veineuse profonde.

Tableau 5 : Critiques de l'étude de remplacement hormonal de la Women Health Initiative

Critique	Hypothèse d'explication
Grande diversité de profils des patientes	Variabilité de l'âge, des antécédents, des pathologies associées et difficulté à évaluer l'impact spécifique du traitement
Age moyen des patientes au début du traitement (63 ans)	Hypothèse du timing : après plusieurs années sans hormones, le corps n'est plus à même de réagir normalement à leur présence
Composé utilisé	Urine de jument contenant de nombreux autres composés
Fort taux d'abandon du traitement	Manque de fiabilité sur le suivi du traitement au long terme
Voie d'administration	Voie orale entraînant une métabolisation/dégradation des composés

La deuxième critique est le mode d'administration des hormones. Les œstrogènes utilisés étaient issus de l'urine de jument. Celle-ci a été purifiée pour obtenir un composé le plus propre possible mais il est estimé aujourd'hui que cette forme d'administration n'est pas

dénuée de risque. En effet, l'urine de jument contient d'autres composés aux effets mal connus ¹⁵⁸. De plus, l'administration par voie orale entraîne une digestion des composés ingérés, sans recul nécessaire sur leur dégradation et leur capacité d'action dans l'organisme une fois métabolisés. Enfin, un certain nombre d'éléments a été remis en cause, notamment le fort taux d'abandon des traitements par les patientes. La grande diversité du profil des patientes en terme d'âge, de poids et du timing de l'initiation de la thérapie hormonale après ménopause a également été mise en cause (Tableau 5) ¹⁵⁶.

De manière globale, il est aujourd'hui accepté que l'action protectrice des hormones œstrogéniques est extrêmement complexe et que leurs effets bénéfiques sont difficiles à reproduire. Il est donc nécessaire de mieux les étudier, décrypter leurs mécanismes d'action en fonction du tissu, du sexe et du contexte physiopathologique.

4.5. Récepteurs aux œstrogènes

Comme toutes les hormones stéroïdiennes, les œstrogènes agissent par l'intermédiaire de récepteurs, appelés récepteurs aux œstrogènes (ERs). Du fait de leur implication dans les processus de reproduction, ces récepteurs sont très anciens et sont restés très conservés entre les mammifères ¹. Ils sont présents dans la quasi-totalité des types cellulaires des vertébrés et impliqués dans une grande diversité de fonctions biologiques ¹⁵⁹. Logiquement, ces ERs sont aussi impliqués dans la physiopathologie de nombreuses maladies, comme les cancers des tissus sexuels (seins, ovaires, prostate, endomètre), des maladies neurodégénératives, d'ostéoporose, d'obésité, de résistance à l'insuline et de MCV ¹⁵⁹.

4.5.1. Structure des récepteurs aux œstrogènes

Il existe trois types d'ERs, ER α , ER β et le G protein-coupled Estrogen Receptor 1 (GPER). ER α et ER β font partie de la superfamille des récepteurs nucléaires qui agissent sur la transcription des gènes cibles. GPER est le récepteur le plus récemment découvert et ne fait pas partie des récepteurs nucléaires ¹⁶⁰.

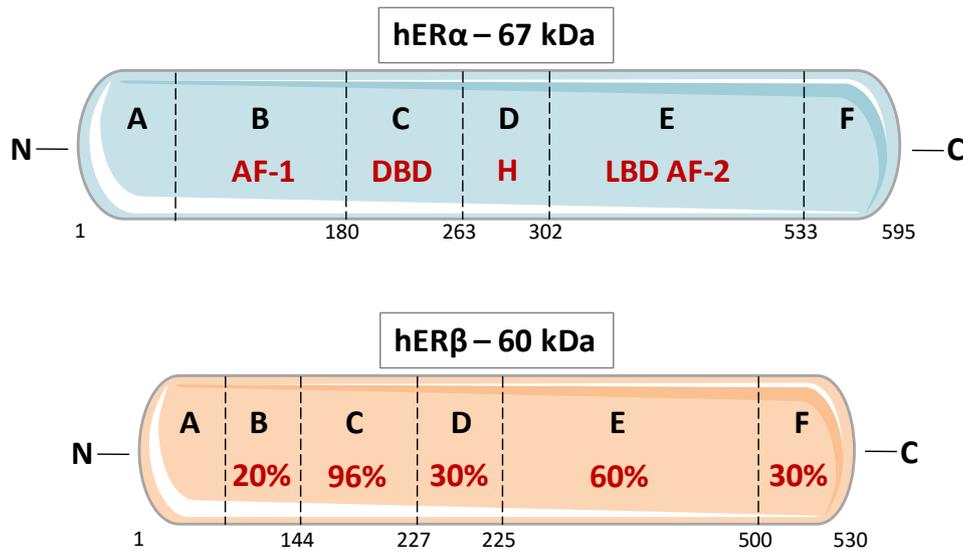


Figure 21 : Structure des récepteurs ER α et ER β et les pourcentages d'homologie entre leurs domaines (inspirés de ¹⁶¹).

Les récepteurs aux œstrogènes ER α et ER β possèdent un domaine AF-1 de transactivation indépendante du ligand, un domaine de liaison à l'ADN (DNA Binding Domain), un domaine charnière (Hinge) et un domaine de transactivation ligand-dépendante (AF-2) contenant le site de liaison au ligand.

Comme tous les membres de la famille des récepteurs nucléaires, ER α et ER β possèdent 6 domaines distincts, nommés de A à F (Figure 21). Le domaine C est caractéristique de cette famille. Il contient deux « zinc fingers » qui lui permettent de se lier spécifiquement à des séquences d'ADN cibles, appelées Estrogen Response Elements (EREs). Le domaine E est le domaine de liaison du ligand. Les fonctions d'activation (AF) sont situées dans les domaines B et E. Ce sont elles qui sont responsables de l'action génique du récepteur ¹.

4.5.2. Différence d'action entre les récepteurs aux œstrogènes

4.5.2.1. Différence d'actions génomiques entre ER α et ER β

ER α et ER β ne partagent que 60 % d'homologie de leur domaine de liaison au ligand. Il en résulte que ces deux récepteurs régulent leurs cibles géniques de manière différente, en fonction du tissu et du contexte physiopathologique ¹. Leur action diffère également en fonction de l'expression de co-activateurs et de co-répresseurs ^{162;163}. A titre d'exemple, le tamoxifène (un modulateur sélectif des ERs) agit en recrutant des co-activateurs dans l'endomètre mais recrute des co-répresseurs dans les cellules du sein ¹⁶⁴.

Dans l'aorte de souris, l'activation d'ER α entraîne une augmentation de l'expression des gènes cibles tandis qu'ER β réduit cette expression ¹⁶⁵. A l'inverse, l'activation d'ER β dans le cœur isolé perfusé augmente globalement l'expression des gènes cibles ¹⁶⁴.

Dans les cellules endothéliales, l'activation d'ER α entraîne une augmentation de l'expression de la eNOS, tandis que dans le muscle cardiaque, cet effet est attribué à ER β ¹⁶⁶ ¹⁶⁷. Dans les CMLVs, l'expression de la iNOS est augmentée par ER β et est diminuée par ER α ¹⁶⁸. ER α et ER β agissent également en synergie, comme c'est le cas dans l'endothélium vasculaire où ER α augmente l'activité de la SOD2 tandis qu'ER β augmente son expression basale ¹⁶⁹. Cette double action permet de réduire le stress oxydatif et les dégâts vasculaires et mitochondriaux associés.

Dans les cardiomyocytes, ER β participe à la prévention œstrogénique de l'hypertrophie cardiaque et de la fibrose induites par un traitement par l'Ang II ¹⁷⁰. Les auteurs de cette étude ont montré que la stimulation d'ER β bloquait les effets de l'Ang II sur l'expression des histones et de certains gènes aux actions délétères ¹⁷⁰.

Pour résumer les différences d'action génomique de ces deux ERs, Menazza et Murphy ont établi un tableau faisant le bilan des rôles respectifs d'ER α et d'ER β dans le système cardiovasculaire ⁵ (Tableau 6).

Tableau 6: Liste non-exhaustive des actions génomiques d'ER α et ER β dans le cœur et les vaisseaux (données issues de ^{171;172;173}).

ER α	ER β
Augmentation de la masse et du volume du VG	Réduction de l'hypertrophie cardiaque pathologique
Réduction de la taille de l'infarctus après infarctus du myocarde	Prévention de l'augmentation de mortalité au cours de l'insuffisance cardiaque chronique
Cardioprotection contre les lésions d'ischémie reperfusion	Cardioprotection contre les lésions d'ischémie reperfusion
Régulation de l'expression de GLUT4 (transporteur du glucose)	Régulation de la fonction vasculaire et de la pression artérielle (résultat controversé)
Régulation de la croissance cardiaque	Modulation de la réponse sexe-spécifique du cœur à l'exercice physique
	Diminution du niveau d'inflammation

Ces résultats soulignent la complexité de l'action des ERs en fonction du tissu cible mais également du sexe et du contexte physiopathologique.

4.5.2.2. Rôle vasculaire de GPER

GPER est classé dans la famille des récepteurs aux œstrogènes mais ne possède pas de fonctions AF. Il n'a donc pas d'action génomique ¹. Il est localisé dans la membrane plasmique tout comme ER α et ER β mais n'est pas présent dans le noyau ¹⁶⁰. GPER a été découvert en 2005 et tout d'abord décrit comme un récepteur « non-classique » aux œstrogènes ¹⁷⁴.

En traitant des artères coronaires de chien et des artères mésentériques de rat avec l'ICI 182.780 (antagoniste d'ER α et ER β et agoniste de GPER), il est apparu que la réponse dilatatrice rapide à l'E2 restait présente ^{175;176}. Pour confirmer le rôle de GPER dans ce processus, plusieurs études ont utilisé un agoniste sélectif de GPER, appelé G-1. Leurs auteurs ont pu observer une vasodilatation dans les artères coronaires de porc, les aortes de rat

et les artères mammaires humaines ^{177;178}. Lindsey et al. ont également observé que le traitement chronique avec G-1 chez des rattes ovariectomisées diminuait la PA des animaux, un effet largement décrit de l'E2 ¹⁷⁹. L'action vasodilatatrice de GPER semble passer par l'activation de la eNOS. En effet, la vasodilatation à G-1 était abolie par le L-N^G-nitroarginine methyl ester (L-NAME), un bloqueur des NOS ¹⁸⁰. Ces travaux suggèrent donc un rôle prépondérant de GPER dans l'endothélium.

Cependant, ces résultats ont été contredits par Yu et al. en 2011. Cette équipe a observé une persistance de la vasodilatation d'aortes et d'artères coronaires de porcs dénudées de leur endothélium, en réponse à G-1 ¹⁸¹. Les auteurs ont donc émis l'hypothèse que GPER n'agirait pas dans l'endothélium mais dans les CMLVs. Le L-NAME ne réduisait pas non plus cet effet sur des artères non-dénudées. Les auteurs ont ensuite montré que le blocage de canaux potassiques des CMLVs suffisait à empêcher la dilatation par G-1, confirmant ainsi leur hypothèse ¹⁸¹.

Ces différents éléments contradictoires ont remis en question la nature exacte de ce récepteur couplé aux protéines G. S'il répond à la présence de l'E2, son action semble différente suivant les modèles, les agonistes et les antagonistes utilisés. A l'heure actuelle, il n'est pas clairement établi si GPER est un « véritable » récepteur aux œstrogènes où s'il s'agit d'une protéine partenaire des fonctions non-génomiques des ERs ¹⁸². Dans certaines études, son absence ne semble pas avoir d'impact sur l'effet de l'E2 sur les cellules endothéliales et son expression est extrêmement faible par rapport aux autres ERs dans l'arbre vasculaire ^{183;184}. Dans d'autres, l'absence de GPER entraîne une hausse de la contraction vasculaire et de la PA ¹⁸⁵. Le manque relatif de sélectivité des agonistes et antagonistes disponibles contribue certainement à l'obtention de résultats discordants. Le rôle et les mécanismes de ce récepteur restent donc à explorer.

4.5.3. Mécanismes d'action d'ER α

4.5.3.1. Action génomique d'ER α

4.5.3.1.1. Mécanisme d'action génomique d'ER α

Dans la plupart des études portant sur les effets des hormones œstrogéniques dans les pathologies cardiovasculaires, le récepteur ER α occupe une place prédominante par rapport aux autres récepteurs ^{1;5;172;166;186;187;188;189}. C'est donc sur celui-ci que ce manuscrit se concentrera. De même, les actions œstrogéniques étant largement dues à la présence d'œstradiol, nous nous référerons régulièrement aux œstrogènes par la référence E2.

Les œstrogènes sont des hormones de nature lipidique et lipophile, donc capables de traverser les membranes cellulaires sans besoin de transporteurs particuliers. Lors de la fixation de l'E2 sur le récepteur ER α , ce dernier se dimérise et se transloque dans le noyau où il interagit avec les éléments de réponse aux œstrogènes (EREs) (Figure 22). Ce schéma classiquement décrit a été remis en cause en 1995 par Parker et al. qui ont observé que ER α était majoritairement présent dans le noyau, même en l'absence de son ligand ¹⁹⁰.

Via ses fonctions d'activation AF-1 et AF-2, le récepteur recrute des corégulateurs et des composés de l'ARN polymérase II pour réguler l'expression des gènes cibles ¹. La fonction AF-1 est une fonction d'activation indépendante du ligand (Figure 21) ¹⁹¹. Elle peut être activée par des facteurs de croissance tels que IGF-1, EGF et le Fibroblast Growth Factor- 2 (FGF-2). Cette activation se fait par l'intermédiaire de séries de phosphorylations d'acides aminés contenus dans le domaine B et indépendamment de l'E2 ¹⁹². A l'inverse, la fonction AF-2 est entièrement dépendante de la présence de l'E2 pour être actif. En effet, le domaine de liaison au ligand est située dans la région du domaine AF-2 (Figure 21) ⁷.

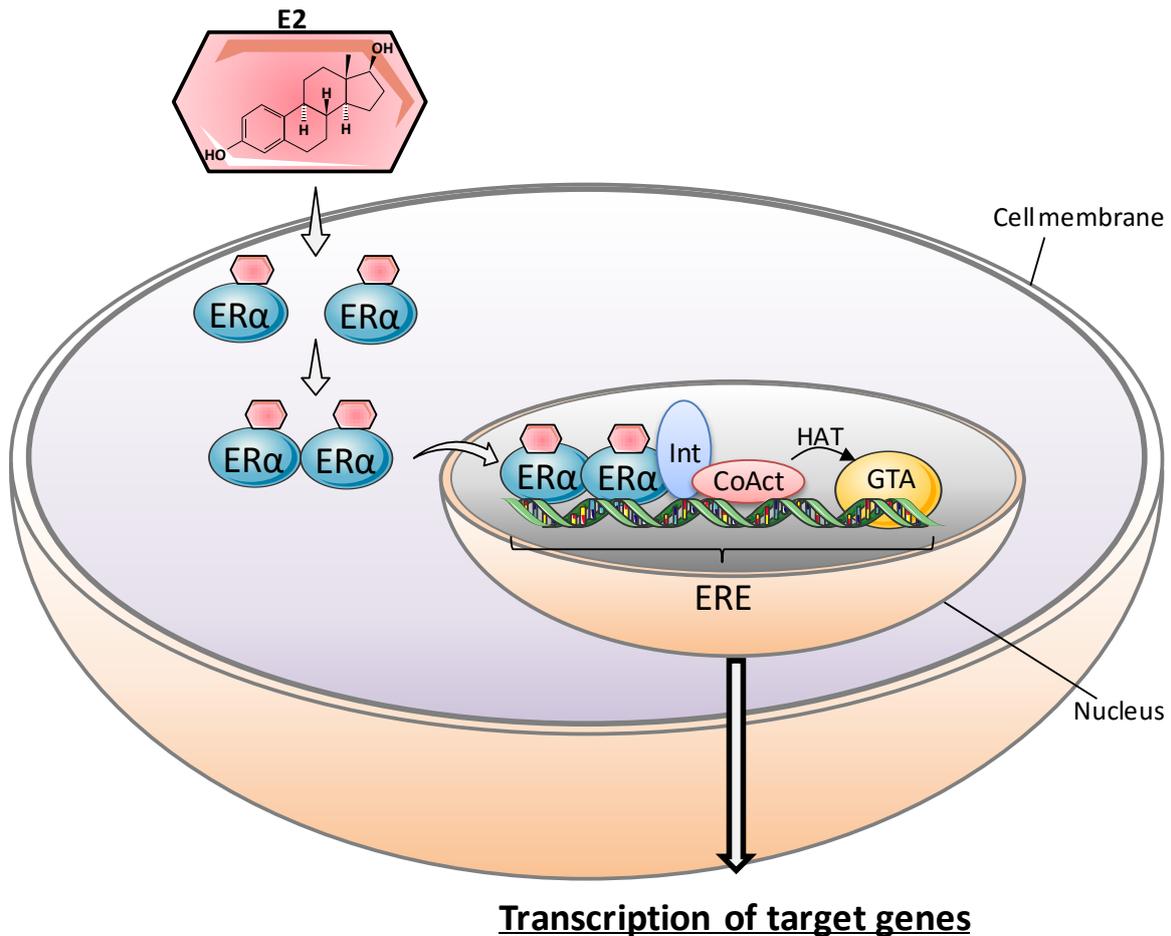


Figure 22 : Action génomique du récepteur ERα.

Le récepteur aux œstrogènes ERα est activé par son ligand au niveau nucléaire ou cytoplasmique. Une fois dimérisé, il se fixe sur une séquence de réponse aux œstrogènes dont il régule la transcription par le recrutement ou l'inhibition de corégulateurs.

ERα exerce donc des actions génomiques indépendantes de l'E2 via AF-1 et dépendantes de l'E2 via AF-2¹⁸⁹. Ces actions ayant toujours lieu dans le noyau et ayant trait à un effet sur l'ADN, elles sont regroupées sous le terme d'actions « génomiques » d'ERα. Cette voie génomique est nécessaire au bon développement et au fonctionnement des organes sexuels que ce soit chez un mâle ou une femelle.

4.5.3.1.2. Rôle vasculaire de la fonction AF-1

Afin d'étudier le rôle de la fonction AF-1 d'ER α dans l'arbre vasculaire, un modèle de souris génétiquement modifiée AF-1^o a été mis au point, exprimant une forme tronquée d'ER α et ne possédant pas la séquence d'acides aminés complète codant pour AF-1¹⁹³. Cette forme d'ER α pèse 49 kDa au lieu des 66 kDa de la forme sauvage. De manière logique, ces souris AF-1^o étaient stériles, soulignant l'implication de cette fonction dans l'effet reproducteur de l'E2¹⁹³. En revanche, la fonction AF-1 n'avait d'impact ni sur la réendothélialisation (le processus de réparation de l'endothélium suite à une blessure), ni sur la production de NO et ni sur la prévention de l'athérome en réponse à l'E2¹⁹³. Les auteurs ont donc conclu que AF-1 n'était pas nécessaire aux effets protecteurs de l'E2 dans la prévention des dommages vasculaires.

Il n'a pas non plus été démontré d'implication de cette fonction dans la prévention par E2 du diabète induit par le régime *high fat* ni dans la prévention de la déminéralisation des os corticaux^{194;195}. En revanche, Smirnova et al. ont montré en 2015 que AF-1 avait un rôle prépondérant dans la prévention de l'hyperplasie néointimale suite à une lésion de l'artère fémorale en réponse à l'E2¹⁸⁷. A la différence des effets vasculaires bénéfiques de l'E2 dans l'endothélium, la fonction AF-1 agit sur les cellules musculaires lisses, suggérant un rôle différentiel des fonctions AF-1/2 entre l'endothélium et les CMLVs.

4.5.3.1.3. Rôle vasculaire de la fonction AF-2

4.5.3.1.3.1. Rôle protecteur d'AF-2 dans l'athérosclérose

De la même manière, un modèle de souris AF2^o exprimant une forme mutée du récepteur a été mis au point dans le but d'étudier le rôle de la fonction AF-2 d'ER α . Dans ce modèle, ER α est délété de 7 acides aminés entre les positions 543 et 549, rendant inopérante la fonction AF-2⁷. Chez les femelles, l'utérus était hypotrophié démontrant que les effets utéro-trophiques de l'E2 dépendent au moins en partie de la fonction génomique AF-2⁹.

En dehors de ces effets sexuels, AF-2 est nécessaire à de nombreux effets vasculaires de l'E2. En utilisant une construction génétique de souris LDLr^{-/-} croisées avec des souris ER α -AF-2^o, Billon-Gallés et al. ont montré que l'absence de la fonction AF-2 entraînait une perte des effets athéroprotecteurs E2-dépendants ⁷. Parallèlement à cet effet vasculaire, la fonction AF-2 est aussi apparue nécessaire à la réduction du cholestérol total par l'E2.

4.5.3.1.3.2. Absence de rôle d'AF-2 dans l'endothélium

Le rôle d'AF-2 a également été exploré dans l'endothélium vasculaire. Un des effets majeurs de la vasculoprotection par l'E2 est l'accélération de la réparation de l'endothélium, appelée réendothélialisation ¹. En utilisant des souris AF2^o, il est apparu que l'absence d'AF-2 n'influait pas l'action de réendothélialisation de l'E2 ⁷. Ces résultats ont été soutenus par le travail de Chambliss et al. qui ont utilisé de l'EDC (Estrogen Dendrimer Conjugate, un agoniste spécifique de l'ER α membranaire) et ont montré *in vitro* que l'EDC stimulait la prolifération et la migration endothéliale sans activer la fonction AF-2 ¹⁸⁶. Il est également apparu que l'EDC augmentait l'activité de la eNOS et donc la production de NO, un effet vasculoprotecteur de l'E2 bien connu. Ce résultat a ainsi pu mettre en évidence qu'AF-2 ne participait pas directement aux effets endothéliaux de l'E2.

4.5.3.2. Action non-génomique d'ER α

4.5.3.2.1. Mécanisme moléculaire de la fonction MISS d'ER α

En 1967, Szego et Davis ont détecté une augmentation rapide du taux d'AMPc dans les cellules de l'utérus de ratte en réponse à des injections d'E2 ¹⁹⁶. Cet effet de l'ordre de la minute étant trop rapide pour être dû à une action génomique, une hypothèse germa alors sur un nouveau mécanisme d'action des ERs, indépendant de l'ADN. Dix ans plus tard en 1977, Pietras et Szego découvrent la présence de sites de liaison de l'E2 dans la membrane plasmique, une première pour ce type de récepteur ¹⁹⁷. Cette hypothèse a été à l'origine de plusieurs décennies d'études sur le sujet. Plusieurs années plus tard, il a été montré qu'une

proportion non-négligeable d'ER α était associée aux cavéoles de la membrane plasmique d'où le récepteur activait une signalisation non-nucléaire ^{198;199}. Cet effet est aujourd'hui appelé Membrane Initiated Steroid Signaling (MISS) ¹.

Il existe différentes caractéristiques de la signalisation MISS ¹. Elle doit (1) fonctionner en absence de noyau (notamment chez les plaquettes et les érythrocytes), (2) agir en présence d'un inhibiteur de la transcription, (3) agir en quelques secondes à quelques minutes, (4) pouvoir être induite par un composé stéroïde qui ne peut pas traverser la membrane plasmique, en étant couplé par exemple à une enveloppe chimique comme l'EDC ²⁰⁰. La signalisation MISS agit sur les voies de signalisation via l'activation de seconds messagers comme le Ca²⁺ et l'AMPc. Ainsi, un traitement ponctuel par l'E2 augmente rapidement le taux intracellulaire de Ca²⁺ dans les cellules endothéliales d'artères humaines en culture ²⁰¹ (Figure 23).

ER α possède un site de palmitoylation situé sur une cystéine en position 447 chez l'homme et 451 chez la souris. Cette modification post-traductionnelle est un facteur important de l'adressage des protéines au compartiment cellulaire où elles doivent agir. Elle consiste en l'accrochage d'un lipide sur un acide aminé. Une proportion très faible (2 à 3%) d'ER α est palmitoylée, adressée à la membrane plasmique et s'associe à la protéine cavéoline-1 ²⁰². Lorsque l'E2 se fixe sur ER α à la membrane, ce dernier voit son motif palmitoylé retiré. Il peut ainsi agir sur des protéines de signalisation co-localisées autour de la cavéole ²⁰³.

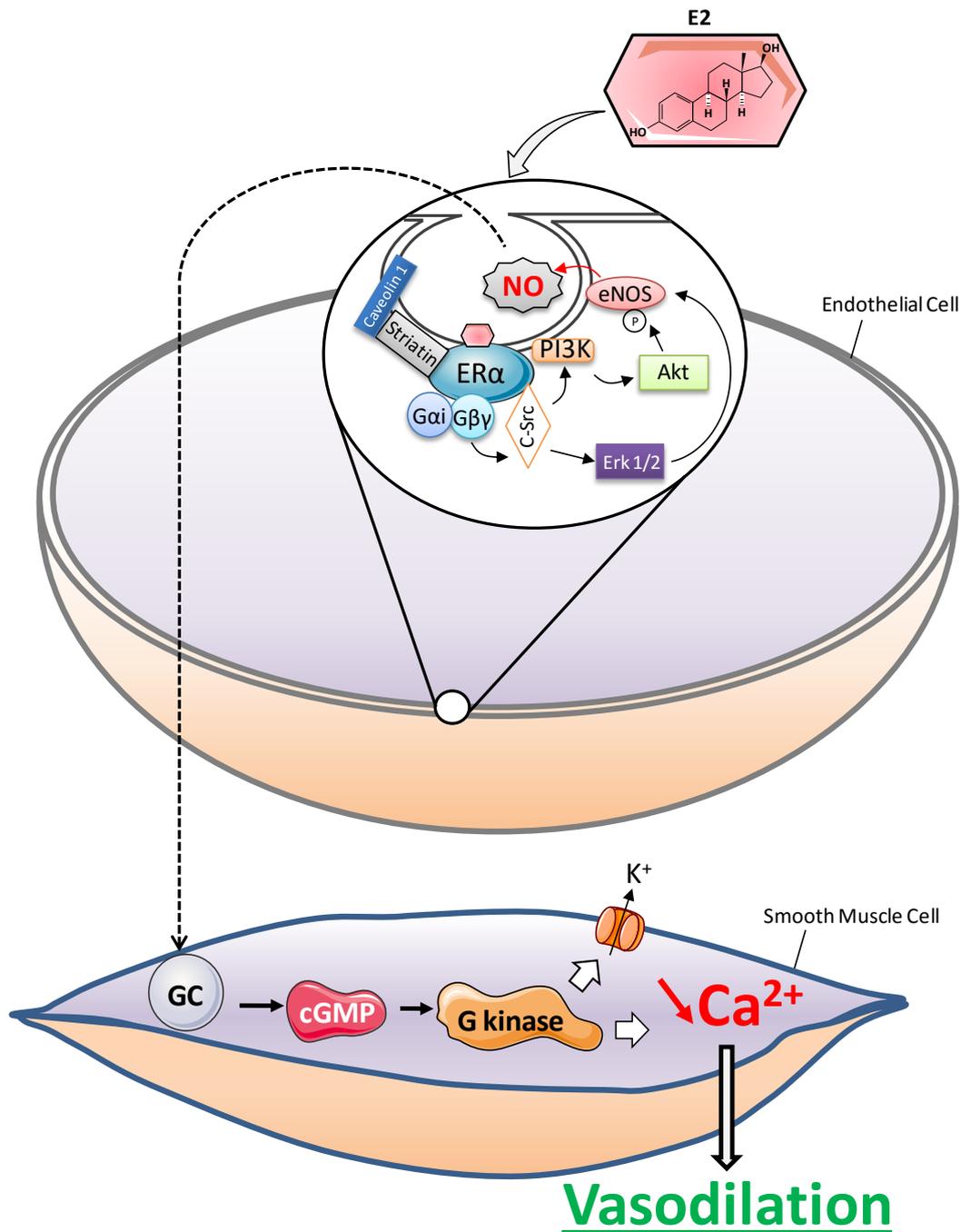


Figure 23 : Action non-génomique du récepteur ER α dans l'endothélium vasculaire (adapté à partir de ²⁰⁴).

Le récepteurs aux œstrogènes ER α est également ancré au niveau des cavéoles de la membrane plasmique. Une fois activé par son ligand, il active différentes protéines partenaires par la voie de la PI3K, notamment la eNOS, entraînant une hausse de la vasodilatation.

4.5.3.2.2. Rôle de MISS dans l'arbre vasculaire

En traitant *in vitro* des cellules endothéliales avec de l'E2, il a été observé une augmentation rapide de l'activité de la eNOS et donc de la production de NO^{205;206}. Cet effet a depuis été attribué à la fonction MISS d'ER α dans l'endothélium vasculaire¹⁸⁹. Il est important de noter qu'un potentiel rôle d'ER β a été étudié dans cette vasodilatation E2-dépendante mais n'a pas été démontré.

Dans l'endothélium, la eNOS est localisée au niveau des cavéoles, tout comme le récepteur ER α ¹. La stimulation de ce dernier par l'E2 entraîne une activation de la protéine G α i. En augmentant la phosphorylation de la Ser-1177 de la eNOS, la voie MISS augmente rapidement l'activité de cette enzyme²⁰⁷. Cet effet est directement induit par une cascade de signalisation impliquant l'action des MAPK au niveau des cellules endothéliales²⁰⁸. Il apparaît donc qu'en plus des effets génomiques d'ER α , la présence de l'E2 chez une femme permet une synthèse accrue et permanente de NO qui augmente la vasodilatation des artères. Cette diminution chronique de la résistance périphérique participe à l'amélioration de l'afflux de sang, notamment au niveau des artères coronaires des femmes non-ménopausées²⁰⁹.

4.5.3.2.2.1. Souris C451A déficientes pour MISS

En 2014, Adlanmerini et al. ont démontré l'implication de la voie MISS d'ER α dans la vasodilatation endothélium-dépendante ainsi que son rôle dans la fertilité chez la souris⁹. En utilisant des souris mutées pour des acides aminés clés dans le processus de palmitoylation, il est apparu que le remplacement de la cystéine située en position 451 par une alanine (C451A) suffisait à empêcher la localisation membranaire d'ER α ^{1;9}. En utilisant ce modèle de délétion, les auteurs ont pu mettre en évidence que les ovaires de ces souris femelles C451A étaient non-fonctionnels, hémorragiques et polykystiques. En revanche, l'utérus de ces animaux se développaient de manière normale, écartant une implication de la voie MISS dans le processus utéro-trophique de l'E2 via ER α ⁹.

4.5.3.2.2.2. MISS et vasodilatation E2-dépendante

En utilisant une approche *in vivo* avec les souris C451A mais également une approche pharmacologique avec l'EDC, les auteurs ont pu démontrer l'implication directe de la voie membranaire d'ER α dans l'effets de l'E2 sur l'endothélium vasculaire. Il est apparu que la forme membranaire était nécessaire à la vasodilatation E2-dépendante au niveau des artères mésentériques ⁹. Les artères mésentériques de ces animaux présentaient une baisse significative de leur capacité vasodilatatrice en réponse à l'E2. En effet, l'absence de palmitoylation d'ER α chez les souris C451A entraînait une nette baisse de la phosphorylation activatrice de la eNOS et une baisse de la production de NO ¹. D'autre part, l'augmentation de la production de NO par ER α améliore la croissance et la migration des cellules endothéliales, tout en inhibant l'adhésion des plaquettes et des leucocytes ^{210;211}.

La vasodilatation par l'E2 est particulièrement importante dans la réduction de la résistance périphérique chez les femmes avant la ménopause et souligne l'importance de la voie MISS dans ce processus protecteur.

4.5.3.2.2.3. MISS et réparation endothéliale

Parallèlement à la vasodilatation, les auteurs ont montré que la voie MISS participait directement à la réendothélialisation en réponse à l'E2. Ce processus est un des effets les plus notables de l'E2 sur l'endothélium vasculaire. Ce mécanisme est particulièrement crucial dans la prévention de la dysfonction endothéliale impliquée dans l'athérosclérose et l'augmentation de la résistance périphérique ¹⁸⁸. Chez les souris C451A, l'E2 n'augmentait plus la réendothélialisation ⁹. Ces résultats ont été confirmés en utilisant l'EDC.

4.5.3.2.2.4. Complexité de l'interaction entre fonction génomique et non-génomique

Pour rajouter une complexité à ce tableau, il semble qu'il y ait une interaction entre la voie MISS et la voie génomique d'ER α . En 2013, Pedram et al. ont utilisé un modèle murin

de récepteur localisé uniquement à la membrane, appelé Membrane Only Estrogen Receptor (MOER). Après avoir ovariectomisé ces souris et les avoir traitées avec un agoniste d'ER α , les auteurs ont utilisé des puces à ADN sur des échantillons de foie pour analyser le profil d'expression génique. Comme attendu, la majorité des gènes étaient régulés par la fonction nucléaire du récepteur ²¹². Toutefois, les ARNm liés à la synthèse d'acides gras, de triglycérides et de cholestérol étaient significativement diminués par rapport aux souris wild-type. Il est intéressant de noter que ces ARNm étaient complètement supprimés chez les souris ER α ^{-/-}.

Comme hypothèse pour expliquer ce mécanisme, il est important de souligner que l'activité de certains facteurs de transcription dépend de leur état de phosphorylation par les kinases. En activant les MAPK via la voie MISS, ER α régule l'expression génique sans utiliser ses fonctions AF ²¹³. Plus récemment, il a été montré qu'environ 25% des gènes régulés par l'E2 étaient modulés par l'EDC, activateur spécifique de la voie membranaire ²¹⁴. Cet effet était complètement aboli chez des souris ER α ^{-/-} chez qui l'EDC ne produisait aucun effet.

De manière intéressante, l'utilisation de l'EDC chez des souris GPER^{-/-} n'a pas mis en évidence de rôle de ce récepteur dans la modulation de la transcription génique par l'E2 ²¹⁴.

4.5.3.2.2.5. Conclusion sur les récepteurs aux œstrogènes

ER α , ER β et GPER agissent tous les trois au niveau cardiovasculaire de manière différente, antagoniste ou en synergie, suivant le contexte et le tissu. Le rôle de GPER dans le système cardiovasculaire reste encore sujet à discussion tandis qu'ER α semble un acteur incontournable des effets vasculoprotecteurs de l'E2. Toutefois, ER α agit par des mécanismes complexes, entre la signalisation rapide MISS et l'action génomique lente passant particulièrement par la fonction AF-2. Les mécanismes respectifs de ces deux voies restent largement à élucider.

4.6. Œstrogènes et Hypertension artérielle

4.6.1. Impact de l'E2 sur la sensibilité au sel

Parmi les nombreux effets bénéfiques des œstrogènes dans le système cardiovasculaire, la prévention de l'hypertension et de ses dégâts associés occupe une place prépondérante avant la ménopause. Chez des femmes non ménopausées, normotensives, non-diabétiques, d'un âge moyen de 47 ans et qui ont subi une hystérectomie-oophorectomie, Schulman et al. ont évalué si la perte des hormones ovariennes impactait l'élévation de la PA en réponse au sel. L'administration du sel a été réalisée en utilisant une infusion intraveineuse de solution saline. Il est ressorti que 4 mois après l'opération, l'élévation de PA en réponse au sel était plus que doublée chez ces femmes dépourvues d'hormones œstrogéniques ²¹⁵.

4.6.2. Impact de l'E2 sur l'activité du SRAA au niveau rénal

Dans les modèles expérimentaux murins, l'ovariectomie est associée à une augmentation de l'expression d'AT₁R dans le rein et une activité accrue du SRAA ²¹⁶. Toutefois, une administration d'E2 par voie cutanée suffit à réduire cette expression, soulignant le lien direct entre E2 et SRAA ²¹⁷. Au niveau rénal, la baisse marquée de l'expression d'ER α au cours du vieillissement ou d'une ovariectomie est associée à une augmentation de la PA, des dégâts rénaux et de la sensibilité au sel au cours du vieillissement ^{218;219}.

4.6.3. Effet central de l'E2 contre l'hypertension artérielle

Afin de mieux comprendre cet effet protecteur dans l'HTA, Xue et al. ont utilisé un modèle expérimental d'HTA par infusion d'Ang II à des souris. Leur but était d'observer si les œstrogènes étaient capables de réduire l'HTA par le biais du NO au niveau du système nerveux central (SNC). En comparant les mâles et les femelles, les auteurs ont bien observé que le traitement par l'E2 augmentait l'action de la nNOS dans le cerveau, au niveau de

l'organe subfornical qui joue un rôle clé dans l'homéostasie hydrosodée et dans la régulation de la volémie ²²⁰. La libération de NO dans cet organe permettait la réduction de l'activité du SRAA au niveau central. Cette étude a montré que l'effet protecteur de l'E2 dépendait en partie d'une action centrale réduisant l'activité sympathique stimulée par l'Ang II.

Les auteurs ont ensuite voulu identifier le rôle précis d'ER α dans cette protection. En utilisant des souris ER $\alpha^{-/-}$, Xue et al. ont pu démontrer que l'effet protecteur de l'E2 au niveau central était entièrement dépendant de la présence d'ER α ²²¹. De manière intéressante, les auteurs ont également pu observer que la région du cerveau concernée, l'organe subfornical, était riche en ER α mais pas en ER β , excluant tout rôle de ce dernier dans cet effet protecteur.

Ces données récentes ont mis en valeur l'importance de l'action multiple d'ER α contre l'HTA. Son action semble passer par une réduction de l'activité sympathique au niveau du cerveau, d'une réduction de l'activité du SRAA au niveau central et rénal et d'une réduction des conséquences vasculaires induite par l'HTA.

5. Etude n°1

5.1. Problématique de l'étude n°1

Si le rôle d'ER α dans la protection contre l'HTA a été précédemment observé, la question du mécanisme moléculaire reste posée. Comme nous l'avons expliqué, ER α agit par plusieurs voies différentes, entre la signalisation membranaire MISS et l'action génomique induite par ses fonctions nucléaires différentielles, AF-1 ou AF-2. Il n'y a à l'heure actuelle aucune donnée sur l'effet de ces voies dans l'HTA.

L'intérêt de l'étude de ces mécanismes est double. Tout d'abord, d'un point de vue fondamental, il est important de mieux comprendre comment les hormones œstrogéniques agissent au niveau moléculaire, cellulaire et physiologique. Deuxièmement, d'un point de vue clinique, il est primordial de mettre en valeur de nouvelles cibles thérapeutiques pour réduire

la prévalence et la morbidité des pathologies cardiovasculaires. De nombreuses études cliniques majeures ont été menées pour tenter de reproduire les effets bénéfiques des œstrogènes, sans succès. Pourtant, ces hormones sont des éléments majeurs de la protection cardiovasculaire des femmes avant la ménopause. Il est donc nécessaire de mieux les comprendre pour tenter de reproduire leurs effets bénéfiques en évitant tout effet délétère. C'est dans cette perspective que le travail de cette première étude s'inscrit.

5.2. Objectifs de l'étude n°1

La première étude que nous avons menée porte sur la dissection des mécanismes moléculaires impliqués dans la protection ER α -dépendante dans l'HTA. Nous avons choisi comme modèle expérimental l'infusion d'Ang II chez la souris femelle de souche C57BL/6, un des modèles d'HTA les plus étudiés. Cette étude a trois principaux objectifs :

- 1) Confirmer le rôle protecteur des œstrogènes et d'ER α dans notre modèle d'HTA,
- 2) Etudier les rôles respectifs des voies membranaire et génomique d'ER α
- 3) Observer les conséquences physiopathologiques de l'absence de ces voies.

Matériel et Méthodes

MATERIEL et METHODES

1. Modèle animal

Cette étude a été réalisée sur des souris femelles de souches C57BL/6, âgées de 5 mois. Le protocole a été approuvé par le Comité d’Ethique d’Expérimentation Animale des Pays de la Loire (CEEA, permis # CEEA PdL 2012.118 and 2012.141). Les souris ont été hébergées dans une salle à la température contrôlée, avec un cycle jour-nuit de 12h/12h. Les souris ont eu un accès à l’eau et à la nourriture *ad libidum*. Les souris utilisées ont été générées par l’équipe du Pr. Jean-François Arnal (INSERM 1048, Toulouse) à la Clinique de la souris à Strasbourg (Pr. P. Chambon).

1.1. Souris sauvages

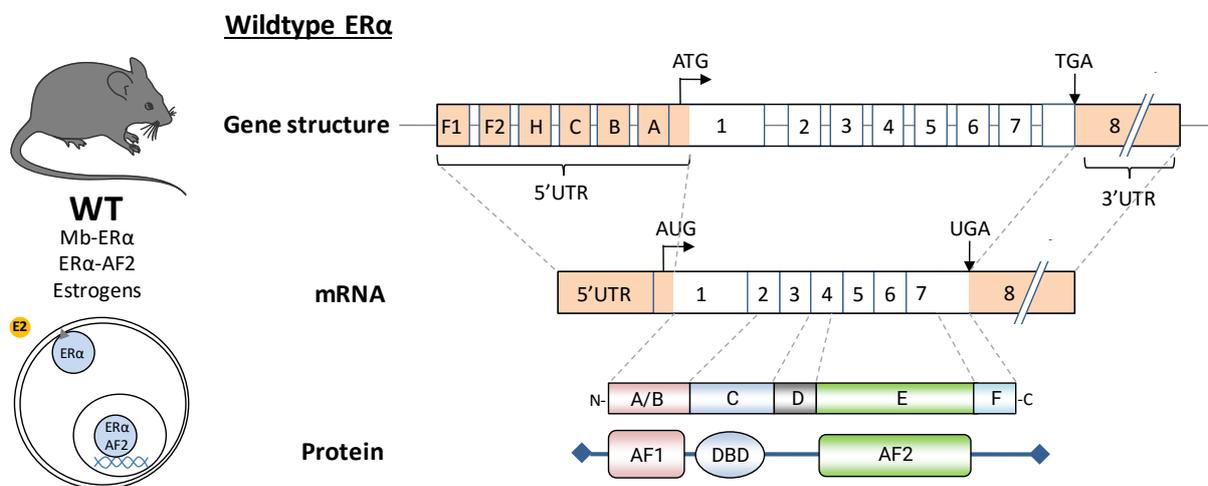


Figure 24 : Schéma de la structure du gène *ESR1*, de l'ARNm et de la protéine *ERα* chez une souris WT.

Les souris du groupe Wildtype (WT) expriment une forme normale du récepteur ERα (Figure 24). Ces souris possèdent les effets protecteurs de l'E2 passant par ERα et sont capables de se reproduire. Nous utilisons deux types de WT : les WT J et les WT N. Les WT J

sont comparées aux souris WT-OVX, $ER\alpha^{-/-}$ et AF2^o dont ces souches sont issues. Les WT N sont comparées aux souris C451A.

1.2. Souris ovariectomisées et $ER\beta^{-/-}$

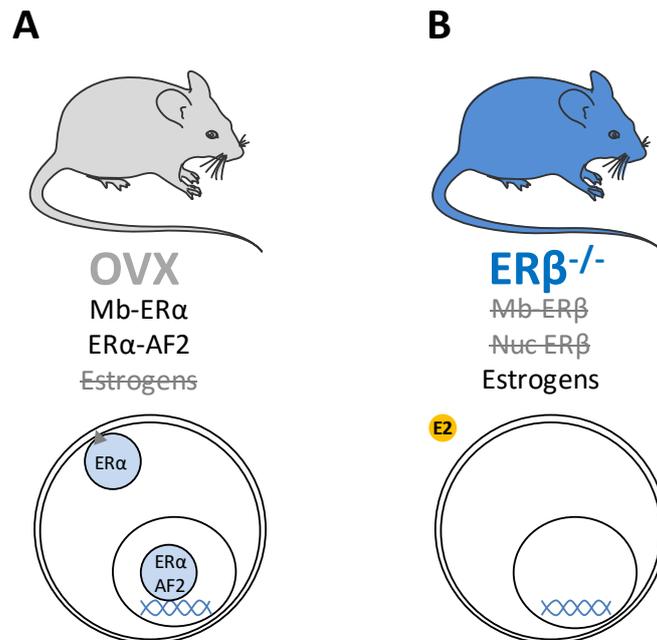


Figure 25: Schéma du groupe ovariectomisé WT-OVX et du groupe $ER\beta^{-/-}$.

Les souris ovariectomisées (OVX) sont des souris C57BL/6 J sauvages ayant subi une ablation bi-latérale des ovaires à environ 5 mois (Figure 25). Ces souris sont stériles et n'ont plus d'hormones œstrogéniques.

Les souris du groupe $ER\beta$ knockout ($ER\beta^{-/-}$) n'expriment pas le récepteur $ER\beta$. Ces souris ne possèdent les effets induits par $ER\beta$ et ne sont pas capables de se reproduire. Elles sont issues de la souche C57BL/6 J et sont donc comparées aux souris WT J.

1.3. Souris ER α ^{-/-}

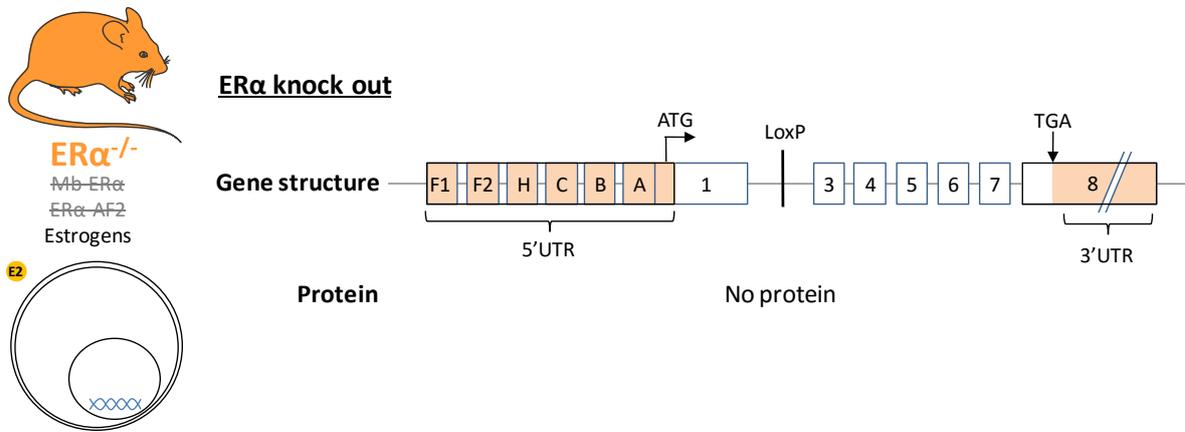


Figure 26 : Schéma de la structure du gène *ESR1* chez une souris ER α ^{-/-}.

Les souris du groupe ER α knockout (ER α ^{-/-}) n'expriment pas le récepteur ER α . Ce modèle de souris a été décrit précédemment²²² (Figure 26). Ces souris ne possèdent les effets induits par ER α et ne sont pas capables de se reproduire. Elles sont issues de la souche C57BL/6J et sont donc comparées aux souris WT J.

1.4. Souris C451A

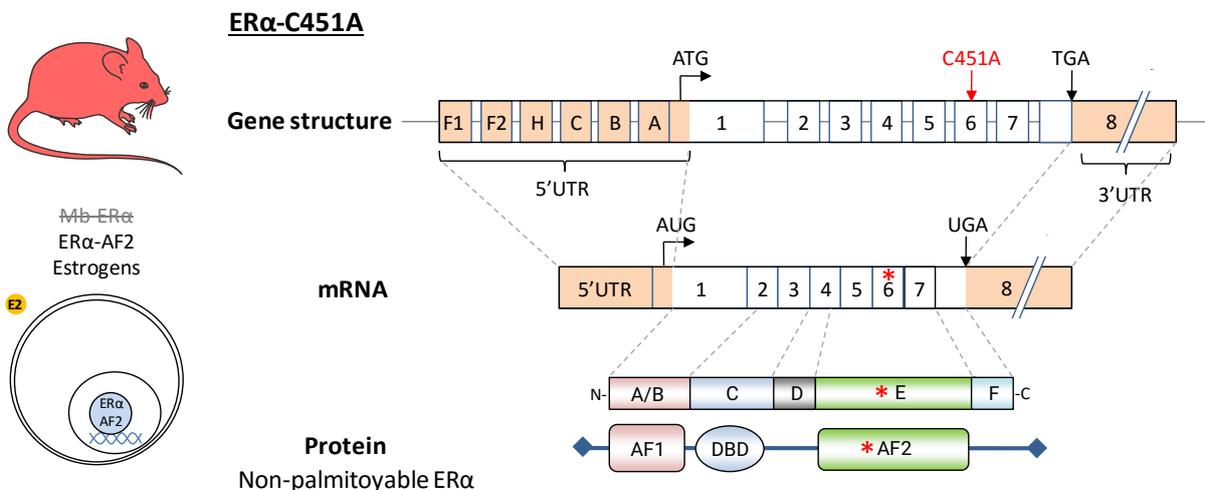


Figure 27 : Schéma de la structure du gène *ESR1*, de l'ARNm et de la protéine ER α chez une souris C451A.

Les souris du groupe ER α -C451A (**C451A**) expriment une forme mutée du récepteur ER α , ne possédant pas de site de palmitoylation en position 451 (Figure 27). ER α est donc présent dans le noyau et le cytoplasme et absent de la membrane plasmique. Ce récepteur est incapable d'activer les voies de signalisation MISS. Ces souris ont été décrites précédemment⁹. Elles sont issues de la souche C57BL/6 N et sont donc comparées aux souris WT N.

1.5. Souris AF-2°

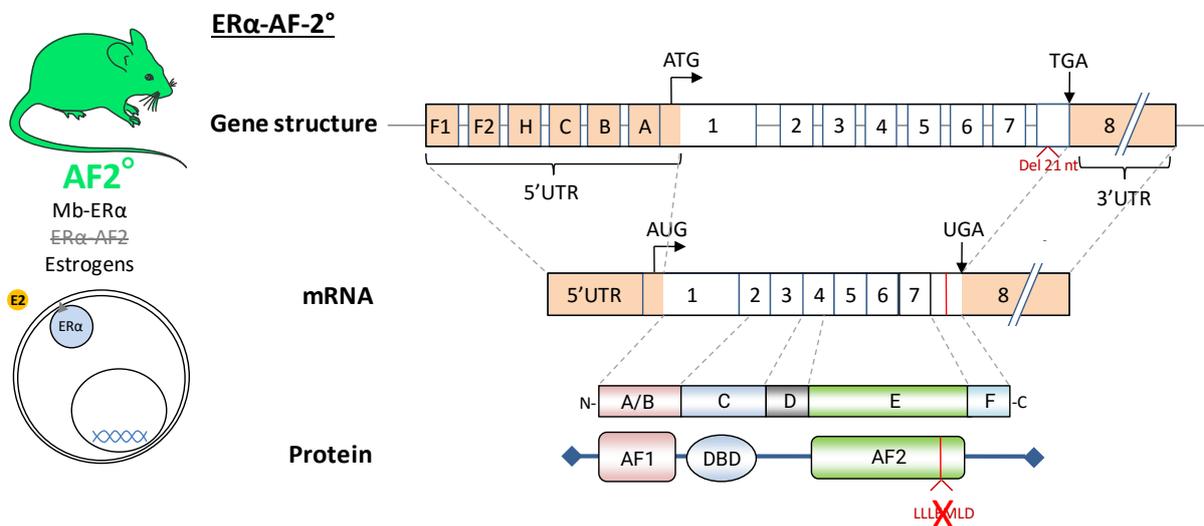


Figure 28 : Schéma de la structure du gène *ESR1*, de l'ARNm et de la protéine ER α chez une souris AF2°.

Les souris du groupe ER α -AF-2° (**AF-2°**) expriment une forme mutée du récepteur ER α , ne possédant pas la fonction AF-2 (Figure 28). ER α est donc présent dans le noyau, le cytoplasme et à la membrane. Mais le récepteur n'est plus capable de réguler la transcription des gènes via sa fonction AF-2. Ces souris ont été décrites précédemment⁷. Elles sont issues de la souche C57BL/6 J et sont donc comparées aux souris WT J.

1.6. Caractéristiques phénotypiques des animaux

Ces souris sont viables et ne possèdent pas d'altérations phénotypiques liées au comportement ou à la mortalité précoce. En revanche, il existent des différences de poids entre les groupes, les œstrogènes étant des régulateurs du métabolisme lipidique²²³. Les souris génétiquement modifiées ont une tendance à avoir un poids plus élevé que les souris WT (Tableau 7).

Tableau 7 : Poids du corps et ratio poids utérus/corps.

	Body weight (g)	Uterus/Body weight
WT J	22.5	0,35
WT J +Ang II	22,2	0,38
WT N	24	0,31
WT N+Ang II	23,6	0,29
WT-OVX	24,7	0,05***
WT-OVX+Ang II	23,4	0,06***
ER β ^{-/-}	24,5	0,05***
ER β ^{-/+} +Ang II	25,3	0,08***
ER α ^{-/-}	25,9	0,06***
ER α ^{-/+} +Ang II	23,9	0,06***
AF2 ^o	24,9	0,05***
AF2 ^o +Ang II	24,1	0,05***
C451A	26,7	0,33
C451A+Ang II	27,6	0,29

2. Modèle d'hypertension artérielle

2.1. Choix du modèle

Différents modèles expérimentaux d'HTA existent chez les rongeurs, chacun présentant des avantages et des inconvénients. Deux catégories principales sont utilisées : les modèles génétiques et les modèles non-génétiques²²⁴. Nos critères de choix du modèle étaient les suivants (1) l'HTA doit être produite chez la souris, (2) l'HTA ne doit pas être spontanée

mais induite, (3) l'intensité de l'HTA doit être contrôlable et (4) le modèle doit avoir une invasivité réduite pour limiter le stress opératoire. Seuls trois modèles d'HTA répondent à ces critères, parmi lesquels l'infusion d'Ang II, l'absorption de L-NAME par eau de boisson et le modèle DOCA salt. L'absorption de L-NAME permet une hausse de la PA mais celle-ci dépend fortement de la consommation d'eau, qui varie en fonction de l'âge et du poids de l'animal. Ce modèle est donc très variable. Le modèle DOCA salt permet d'entraîner une hypertension volume-dépendante mais possède des inconvénients comme les fortes doses d'agents pharmacologiques requises, la nécessité d'une néphrectomie partielle et l'absorption de grandes quantités de NaCl ²²⁵. D'autre part, la procédure chirurgicale induit un risque de mortalité en elle-même et ce modèle d'HTA n'est pas très réaliste par rapport à la pathologie humaine ²²⁶.

Notre choix s'est donc porté sur l'infusion d'Ang II par implantation de pompes osmotiques. Ce modèle présente l'avantage d'être extrêmement contrôlable, de nécessiter une procédure chirurgicale peu agressive, d'être très reproductible et d'être proche de l'HTA humaine dans sa physiopathologie ²²⁵.

2.2. Choix de la dose d'Ang II

La dose d'Ang II utilisée pour induire l'HTA a été choisie après une analyse bibliographique sur les effets presseurs de ce peptide chez la souris. Nous avons comme objectif de choisir une dose suffisante pour augmenter la PAS chez tous les animaux, tout en évitant une dose trop forte qui aurait pu induire des dégâts rénaux et cardiaques et entraîner des biais expérimentaux. En 2013, Brand et al. ont testé l'effet de 4 doses croissantes d'Ang II sur le stress oxydatif et les dommages de l'ADN dans le cœur et le rein de souris. La plus faible dose, de 0,08 mg/kg/j, n'avait aucun effet sur la PAS ²²⁷. La dose la plus forte, de 1,44 mg/kg/j, entraînait une forte hausse de la PAS, du stress oxydatif, de l'apoptose et une destruction des liaisons de la double-hélice d'ADN ²²⁷. Nous avons donc opté pour une dose intermédiaire de 0,5 mg/kg/j suffisante pour induire une augmentation progressive du niveau de PAS sans que celle-ci ne dépasse 140 mmHg chez les animaux WT. Il n'existe pas de définition clinique de l'HTA chez la souris C57BL/6 mais le niveau de PAS entre l'homme et

la souris est très comparable. Nous nous référons donc aux critères d'HTA humaine dans ce manuscrit.

2.3. Protocole d'HTA

L'HTA est induite par une infusion chronique d'Ang II. Le protocole expérimental se découpe en 4 phases (Figure 29) :

- 1- Mesure de la PA basale par photopléthysmographie pendant 1 semaine
- 2- Ovariectomie (uniquement pour les souris des groupes OVX)
- 3- Préparation de la pompe à Ang II et implantation chirurgicale
- 4- Mesure de la PA chez les animaux implantés et *sham* pendant 28 jours

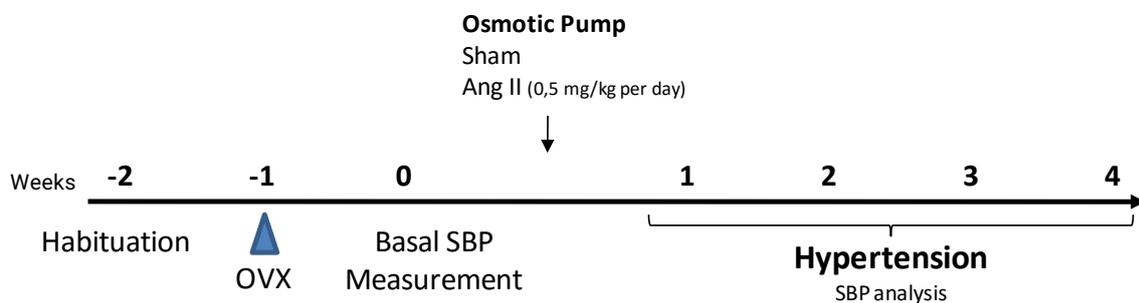


Figure 29 : Schéma du protocole d'infusion de l'Ang II.

2.4. Mesure de la pression artérielle de base

2.4.1. Principe de la photopléthysmographie

La PAS basale est mesurée avant toute opération chirurgicale, par photopléthysmographie (Visitech Systems, BP-2000®) (Figure 30). Cette technique aussi appelée « tail-cuff » est une mesure non-invasive de la PA par gonflement d'un brassard caudal après immobilisation de l'animal. Cette technique a plusieurs avantages : son coût

raisonnable, sa facilité d'utilisation, sa non-invasivité et l'absence de douleurs infligées à l'animal. Elle a toutefois des inconvénients, en particulier la variabilité des mesures, en raison du stress occasionné à l'animal lors de son immobilisation et de ses mouvements qui perturbent les mesures. Un autre inconvénient majeur est le seuil de détection de la PA, pas assez bas pour mesurer correctement la PA diastolique chez la souris.

2.4.2. Protocole de mesure

L'animal est placé dans la boîte de contention où il est immobilisé sur la plateforme de mesure. Cette dernière est chauffée et la boîte est fixée sur la plateforme par des aimants pour éviter tout déplacement de l'animal qui perturberait la mesure. La queue de l'animal est placée dans le brassard et maintenue par un ruban adhésif. L'analyse démarre par 5 pré-mesures d'environ 45 secondes chacune, espacées de 10 secondes, pour que l'animal s'habitue à la mesure. Quinze mesures successives sont ensuite réalisées. Chaque analyse permet de mesurer la PAS, la PAD, la PAM et la FC. La PAS est le paramètre mesuré avec le plus de fiabilité. Jusqu'à 6 souris peuvent être analysées en même temps.

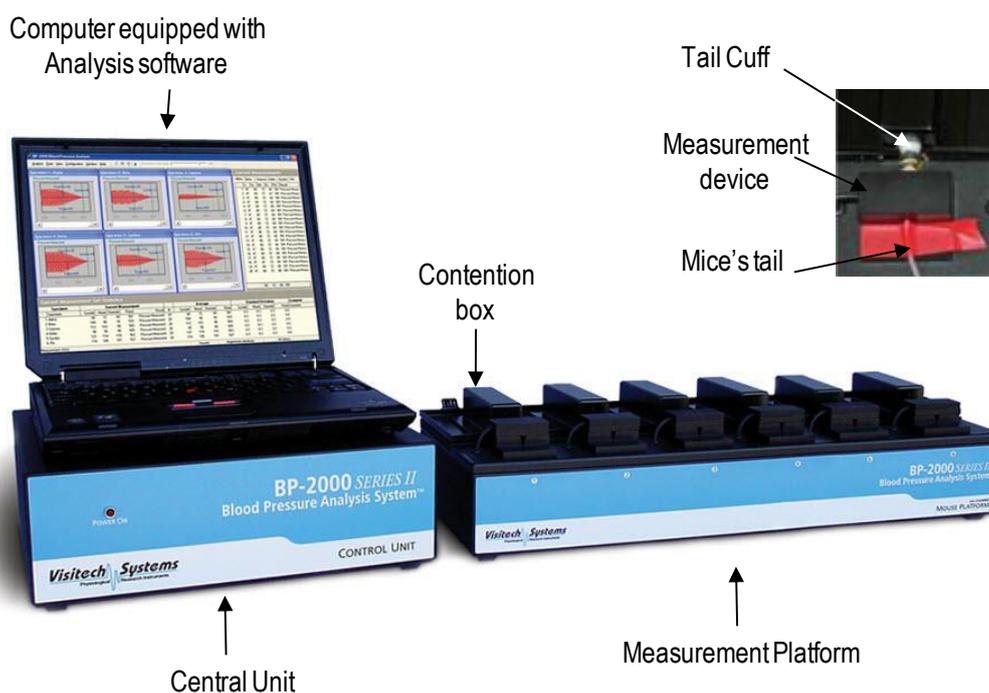


Figure 30 : Dispositif de mesure de pression par photopléthysmographie.

La PAS est mesurée quotidiennement pendant une semaine pour habituer les souris à cette méthode et ne pas induire de biais dû au stress expérimental. On note une diminution importante des réflexes de fuites des animaux après quelques jours de mesure, signe d'une bonne habitude. La semaine suivante, la PAS basale est mesurée pendant 5 jours.

2.4.3. Justification de la méthode de mesure

Le choix d'utilisation de cette méthode de mesure s'est basé sur des données bibliographiques. En 2004, Whitesall et al. ont comparé l'efficacité des mesures de PAS par radiotélémétrie et tail-cuff. Leur conclusion était que les deux méthodes étaient fiables pour mesurer la PAS chez la souris ²²⁸. Toutefois, la variabilité des mesures entre différents dispositifs de tail-cuff était importante. Cette technique doit donc être réalisée avec des dispositifs adéquats. Le choix du laboratoire s'est porté sur le système BP-2000 de Visitech,

le système de mesure de PA à la queue le plus utilisé dans les laboratoires de recherche (selon site fabricant).

2.5. Pompes osmotiques

2.5.1. Principe de fonctionnement des pompes osmotiques Alzet

L'infusion d'Ang II est réalisée à l'aide de pompes osmotiques sous-cutanées de la marque Alzet® et de modèle 2004. Ces pompes ont la particularité de pouvoir accueillir un volume de liquide de l'ordre de 200µL et diffuser son contenu pendant 4 semaines, avec un débit de 0,25 µL/h en permanence. Ces pompes font partie des dispositifs de traitement par voie sous-cutanée les plus utilisés chez les rongeurs. Ces pompes sont biologiquement neutres et n'induisent ni rejet, ni inflammation selon le fabricant et l'expérience du laboratoire.

2.5.2. Préparation des pompes osmotiques et justification de la dose d'Ang II utilisée

La solution d'Ang II utilisée est préparée en fonction de l'animal, pour que celui-ci reçoive une dose de 0,5 mg/kg/j pendant 28 jours. L'Ang II est achetée sous forme de poudre chez Bachem® (Angiotensin II Acetate, #H-1705.0100). La dose d'Ang II utilisée a été choisie selon les données de la bibliographie. L'utilisation d'une dose forte supérieure à 1,5 mg/kg/j entraîne une hausse rapide de la PA mais également des dysfonctions rénales et cardiovasculaires importantes²²⁷. Ces dysfonctions participent directement à l'aggravation de l'HTA et peuvent constituer un biais expérimental. A l'inverse, une dose trop faible ne permet pas d'induire une hypertension. Nous avons donc choisi une dose modérée, de 0,5 mg/kg/j, suffisante pour induire une hypertension sans dégâts rénaux ou cardiaques déclenchés par la toxicité de l'Ang II.

Une fois l'Ang II dissoute dans du NaCl 0,07%, la solution est injectée dans la pompe sous une hotte stérile afin de conserver des conditions d'asepsie pour être en conditions

stériles. La pompe est ensuite laissée à 37°C toute la nuit dans du liquide physiologique pour être amorcée.

2.6. Chirurgie d'implantation des pompes osmotiques délivrant l'Ang II

Le lendemain, la souris est anesthésiée par un mélange gazeux d'isoflurane (4,5% dans la boîte à induction puis 2% dans le masque). L'animal est placé en décubitus ventral. Une solution de buprénorphine (0,1 mg/kg, Temgésic®) est injectée par voie sous-cutanée pour prévenir la douleur post-chirurgicale. La nuque de l'animal est tout d'abord rasée avec un rasoir électrique puis nettoyée avec une solution de Bétadine® scrub puis de Bétadine® dermique. Une incision de la peau est pratiquée de manière transversale sous la nuque puis la peau du dos est décollée afin de glisser la pompe osmotique. La peau est suturée à l'aide de fils de suture 5.0 non-résorbables. L'animal est placé dans une couveuse à 28°C pour prévenir l'hypothermie post-chirurgie. L'ensemble de l'opération est réalisé en une dizaine de minutes.

La pompe reste en place pendant 28 jours. Le niveau basal de PAS chez la souris est d'environ 100 mmHg. Au fil des jours, l'Ang II augmente graduellement cette valeur pour atteindre un plateau en 2 à 3 semaines de traitement.

3. Sacrifice et prélèvements

Après les 28 jours de traitement, les animaux sont sacrifiés par inhalation de CO₂ et les prélèvements sont effectués (Tableau 8).

Tableau 8: Liste des prélèvements effectués chez les souris.

Type de prélèvement :	Utilisation
Plasma	Dosages sanguins Urée-Créatinine, Cholestérol, triglycérides
Cœur	Pesée pour évaluation de l'hypertrophie cardiaque
	Coupes histologiques pour évaluer la fibrose cardiaque
Aorte thoracique	Myographie pour évaluer la fonction vasculaire aortique

	Western Blot pour analyse d'expression protéique
	Histomorphométrie pour évaluation du remodelage aortique
	Immunomarquage pour analyse de l'inflammation et du stress oxydatif
	RT-qPCR pour évaluation de l'expression génique
Artères mésentériques	Myographie pour évaluer la fonction vasculaire mésentérique
	Histomorphométrie pour évaluation du remodelage artériel
	RT-qPCR pour évaluation de l'expression génique
Aorte abdominale	Idem que Aorte thoracique
Rein gauche	Coupes histologiques pour évaluation de la fibrose rénale
	Immunomarquages pour évaluation du stress oxydatif et de l'inflammation rénale
Rein Droit	RT-qPCR pour évaluer l'expression de gènes de l'inflammation, de l'oxydation, etc.
	Analyse de l'ADN mitochondrial par PCR long range pour évaluer la qualité de l'ADN mito et RT-qPCR pour évaluer la quantité d'ADN mito
Glandes surrénales	RT-qPCR pour évaluer l'expression des gènes en lien avec le SRAA
Foie	RT-qPCR ou Western Blot pour évaluer l'expression de gènes métaboliques
Poumons	RT-qPCR ou Western Blot pour évaluer l'expression de gènes inflammatoires ou oxydatifs
Utérus	Mesure du poids de l'utérus pour évaluer l'impact de l'absence ou de la déficience de ER α et des œstrogènes
Rate	RT-qPCR pour évaluer l'expression de gènes de l'inflammation
Ganglion mésentérique	RT-qPCR pour évaluer l'expression de gènes de l'inflammation

Le cœur est disséqué pour enlever les oreillettes et le VD afin de peser le VG et évaluer l'hypertrophie cardiaque. L'utérus est également pesé pour vérifier la présence ou l'absence d'effets œstrogéniques chez les souris.

4. Evaluation de la fonction vasculaire par myographie

4.1. Préparation du vaisseau

L'aorte thoracique est prélevée et disséquée dans du liquide physiologique froid. La graisse périvasculaire est retirée. Le liquide physiologique est composé de (Tableau 9) :

Tableau 9 : Composition du milieu physiologique utilisé en myographie.

Composé (pour 1 L)	Concentration (mM)	Quantité (g pour 1 L)
NaCl	130	7,6

KCl	3,7	0,276
MgSO ₄	1,2	0,294
NaHCO ₃	14,9	1,25
CaCl ₂	1,6	1 mL de 1,6 M
HEPES	5	1,19
KH ₂ PO ₄	1,2	0,164
D glucose	11	1,88
Eau pure	-	QSP 1L

Le pH est ajusté à 7,4. Un anneau aortique de 2 mm de long est utilisé pour analyser la fonction vasculaire par myographie. Cette technique permet de conserver le vaisseau en état de fonctionnement pendant plusieurs heures après sacrifice de l'animal et de mesurer sa capacité contractile ou dilatatrice en réponse à différents agents pharmacologiques.

L'anneau d'aorte est glissé autour de 2 crochets dans la cuve du myographe remplie de 5 mL de liquide physiologique (DMT 610M Multi Wire Myograph System®) (Figure 31).

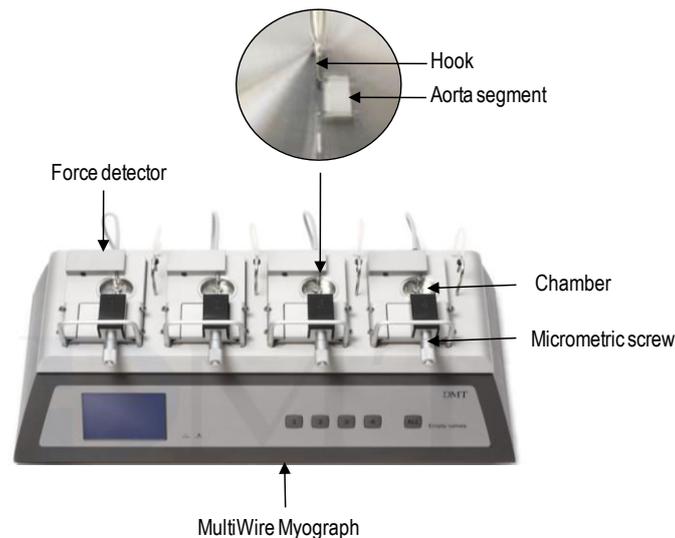


Figure 31: Schéma du dispositif de myographie (modifié à partir du site DMT).

4.2. Analyse de la réactivité aortique

L'anneau est laissé à reposer à 37°C dans le milieu physiologique maintenu à 21% d'oxygène. L'aorte est ensuite étirée graduellement par éloignement des crochets, pour simuler une pression interne de 90 mmHg, proche des conditions physiologiques. Pour évaluer la bonne fonctionnalité du fragment, un test de contraction est réalisé à l'aide d'une

solution physiologique contenant 80 mM de KCl induisant une dépolarisation des CMLVs (Figure 32). Puis la réponse vasodilatatrice est évaluée par une contraction à la phényléphrine (PHE), un agoniste des récepteurs α 1-adrénergiques. Cette contraction est suivie d'une relaxation en réponse à l'acétylcholine (ACh), un agoniste des récepteurs muscariniques agissant sur l'endothélium (Figure 33). Enfin, la relaxation maximale du vaisseau est évaluée par une courbe dose-réponse au Sodium Nitroprusside (SNP), un donneur de NO.

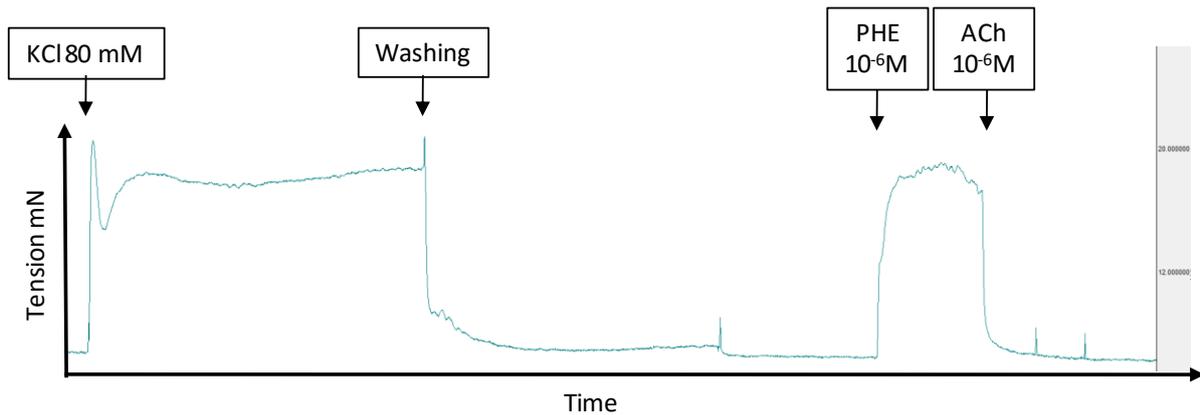


Figure 32 : Illustration d'une courbe de contraction au KCl et du test PHE/ACh.

4.3. Courbe concentration-réponse

Après un temps de repos, la capacité contractile et vasodilatatrice est évaluée par courbe concentration-réponse à la PHE et à l'ACh (Tableau 10).

Tableau 10 : Concentrations de phényléphrine et d'acétylcholine utilisées.

PHE (M)	10^{-9}	3×10^{-9}	10^{-8}	10^{-7}	3×10^{-7}	10^{-6}	3×10^{-6}	10^{-5}
ACh (M)	10^{-9}	3×10^{-9}	10^{-8}	10^{-7}	3×10^{-7}	10^{-6}	3×10^{-6}	10^{-5}

La réponse contractile du vaisseau s'affiche sous la forme suivante (Figure 33) :

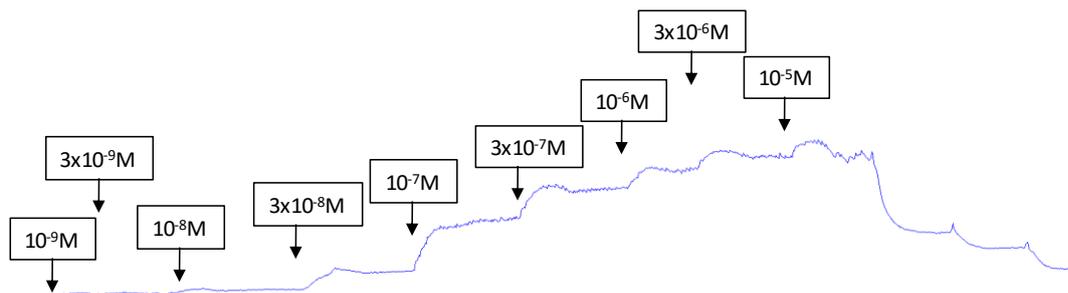


Figure 33 : Exemple de courbe concentration-réponse à la PHE.

5. Histomorphométrie

5.1. Coupes des artères

L'analyse de la structure artérielle est réalisée par histomorphométrie. Un segment aortique disséqué est placé dans du Tissue-tek® ou O.C.T. (Optimal Cutting Temperature Compound, ThermoScientific) puis refroidi au contact de l'azote liquide. Un segment d'artère mésentérique est également inclus dans du Tissue-tek® après avoir été dilaté dans un milieu physiologique sans calcium puis fixé dans une solution à 4% de Paraformaldéhyde (PFA).

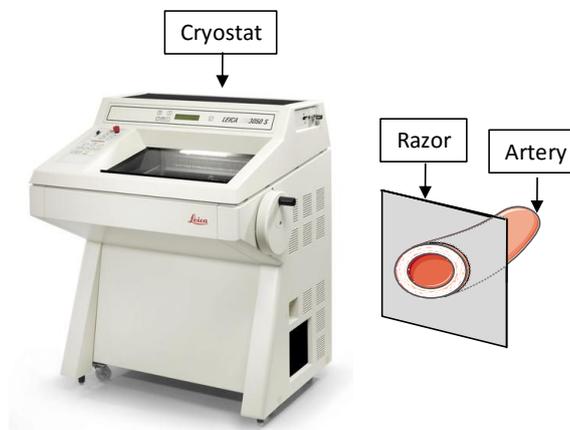


Figure 34 : Dispositif de coupes d'artères par Cryostat.

Une fois solidifié, le bloc d'OCT est placé dans le Cryostat® (Leica CM3050 S) où il est maintenu à basse température (Figure 34). Des sections transversales d'artères d'une épaisseur de 7 μm sont ensuite réalisées puis déposées sur des lames de verre (SuperFrost Ultra Plus, ThermoScientific).

5.2. Coloration des lames élastiques

La structure de l'artère est évaluée en colorant les lames élastiques contenues dans la média. Une fois les coupes réalisées, les lames de verre sont plongées dans plusieurs bains successifs sous une hotte (Tableau 11) :

Tableau 11 : Bains successifs pour la coloration Orcéine.

Liquide	Temps d'incubation (min)
Orcéine	15
Eau	1
Eau	1
Eau lithinée	1
Eau	2
Alcool 100%	5
Xylène	3

L'orcéine est préparée avec 3 g de poudre d'Orcéine (Sigma), 300 mL d'éthanol 70% et 1,8 mL d'HCl 37%. L'eau lithinée est réalisée avec 13,3g de Carbonate de Lithium et 1 L d'eau. Après le séchage des lames, les coupes sont recouvertes d'une solution de Mowiol et recouvertes d'une lamelle de verre. Après séchage des lames, celles-ci sont observées à l'aide d'un microscope en lumière visible relié à une caméra (Sony DXC-390P) et à un ordinateur équipé du logiciel HistoLab.

5.3. Analyse des images

Les images sont analysées par le logiciel ImageJ à l'aide d'une échelle micrométrique pour étalonnage. Celui-ci permet de calculer le périmètre, l'épaisseur, la surface de l'artère et de sa média.

6. Western Blot

6.1. Extraction et dosage des protéines

Les fragments d'aorte congelés sont broyés au contact d'azote liquide pour réduire l'échantillon en poudre à l'aide d'un potter. La poudre est ensuite dissoute dans du tampon d'extraction protéique sur glace (Tableau 12).

Tableau 12 : Composition du tampon d'extraction protéique SDS.

Réactif	Volume pour 1 mL (µL)
Tris 500 mM ph 7,4	20
SDS 20%	50
NaO (Sodium Orthovanadate)	10
β-Glycine	10
NaF (Sodium Fluoride)	10
Inhibiteur de protéases	40
Eau (qsp 1 mL)	860

Après 30 minutes d'attente, le tampon contenant les protéines est centrifugé à 13 000 tours par minutes pendant 25 minutes, puis le surnageant riche en protéines est récupéré. Une gamme de 8 concentrations croissantes de Serum Albumine Bovin (BSA) est utilisée pour avoir une gamme de référence. Le dosage est réalisé à l'aide du kit Micro BCA™ Protein Assay kit (ThermoFisher) dans une plaque 6 puits. En présence du réactif, le lysat protéique se colore de manière proportionnelle à la quantité de protéines. L'absorbance est analysée par spectrophotométrie à la longueur d'onde de 562 nm.

En fonction de la concentration calculée, les échantillons sont dilués pour contenir 10 µg de protéines ainsi qu'une solution de Laemmli diluée au 5ème.

6.2. Migration et transfert des protéines

Les échantillons sont chauffés 5 min à 95°C pour dénaturer les protéines puis placés sur la glace. La migration est réalisée sur un gel de polyacrylamide 4-15% (Mini-PROTEAN® TGX™, Bio-Rad) dans une cuve de migration contenant un tampon d'électrophorèse.

Les protéines sont ensuite transférées du gel sur une membrane de nitrocellulose Trans-Blot® Turbo™ Midi Nitrocellulose (Bio-Rad) à l'aide du système Trans-Blot® Turbo™ Transfer System (Bio-Rad).

La présence de protéines est observée par une incubation de la membrane dans une solution de rouge ponceau. La membrane est ensuite lavée au TBS-Tween 0,1% puis saturée 1h30 sous légère agitation avec une solution de TBS-Tween BSA 5%.

La présence de protéines est ensuite détectée avec des anticorps primaires (Tableau 13) :

Tableau 13 : Liste des anticorps primaires utilisés.

Protéine Ciblée	Anticorps utilisé	Dilution
eNOS	anti-eNOS antibody (BD Biosciences, #610297)	1/1000
EC-SOD	anti-EC-SOD antibody (ADI-SOD-106, Enzo Life Sciences)	1/500
P-ERK	Phospho-p44/42 MAPK Antibody (Cell Signaling #9101)	1/1000
ERK	Anti-ERK antibody (BD Biosciences, #610031)	1/1000
β-actine	anti-β-actin antibody (Sigma, A5316).	1/5000

Après une nuit d'incubation, les membranes sont lavées puis incubées 1h avec des anticorps secondaires dirigés contre les anticorps primaires (concentration 1/10 000). Les membranes sont ensuite lavées.

6.3. Révélation et quantification

La révélation des protéines est effectuée par incubation des membranes avec le kit Pierce™ ECL Western Blotting Substrate (Thermofisher). Les membranes sont ensuite placées dans un appareil de lecture LAS-3000 Imaging System (Fuji) pour être révélées.

Les images sont analysées grâce au logiciel ImageJ pour quantifier l'intensité des bandes correspondant aux protéines d'intérêt. Les valeurs obtenues sont rapportées à celles de la β -actine, une protéine de référence dont la quantité n'est pas différente entre les échantillons.

7. Dosages plasmatiques

Le sang est récupéré après le sacrifice de l'animal par ponction cardiaque. Le sang est placé dans un tube de prélèvement de sang contenant de l'héparine puis centrifugé pendant 15 minutes à 4000 tours par minute. Le plasma est récupéré par prélèvement du surnageant.

Des dosages sont réalisés au Pôle Biologie du CHU d'Angers, grâce à Mme Françoise Jubeau et Dr. Pascal Reynier. Les taux plasmatiques d'urée et de créatinine ont été dosés pour évaluer la fonction rénale. Les taux de HDL et de LDL cholestérol ainsi que les triglycérides ont été dosés pour évaluer le profil lipidique des animaux.

8. Analyses statistiques

Les données sont représentées en moyenne \pm SEM (Standard Error of the Mean). Les analyses statistiques ont été réalisées à l'aide du logiciel GraphPad PRISM ver 5.0. En fonction des expériences, les groupes sont analysés grâce au test non-paramétrique de Mann-Whitney (comparaison de 2 groupes), au test Anova 1 voie (comparaison de plus de 2 groupes avec 1 facteur) ou Anova 2 voies (comparaison de plus de 2 groupes avec au moins 2 facteurs). Une valeur de $p < 0,05$ est considérée comme statistiquement significative. Un symbole *, # ou \$ correspond à $p < 0,05$. Deux symboles **, ## ou \$\$\$ correspondent à $p < 0,01$. Trois symboles ***, ### ou \$\$\$ correspondent à $p < 0,001$.

Résultats

RESULTATS de L'ETUDE 1

La fonction d'activation AF-2 est nécessaire au rôle protecteur du récepteur aux œstrogènes ER α contre l'hypertension artérielle induite par l'angiotensine II chez la souris femelle

1. Les œstrogènes réduisent l'hypertension artérielle induite par l'Ang II et ses conséquences cardiovasculaires

1.1. Hypertension artérielle et hypertrophie cardiaque

Le niveau de PA et le poids du cœur ont été mesurés chez des souris WT et WT-OVX femelles de 5 mois afin de confirmer le rôle des hormones œstrogéniques dans la réduction de l'HTA.

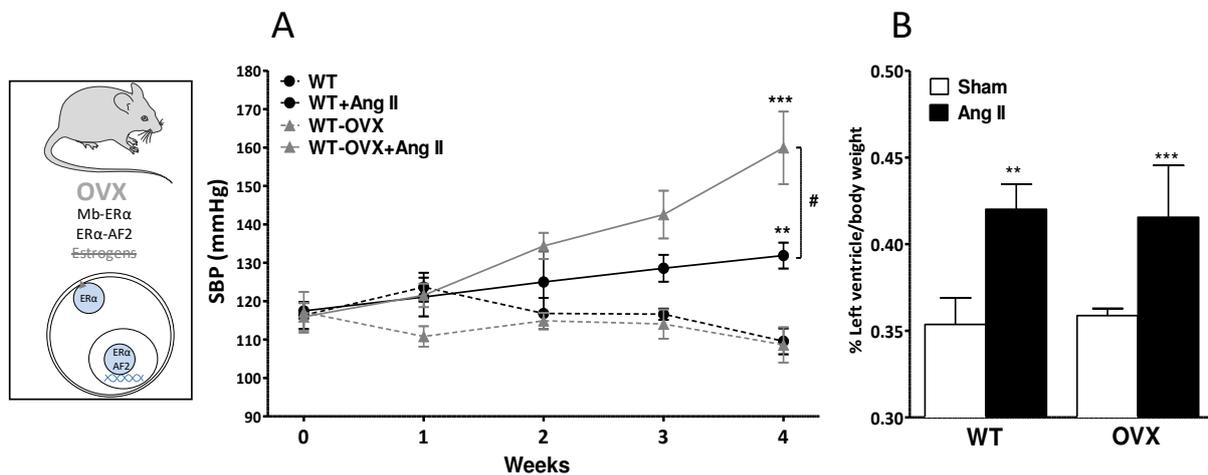


Figure 35 : Effet de l'absence d'hormones œstrogéniques sur l'hypertension artérielle induite par l'Ang II et sur l'hypertrophie cardiaque.

(A) La pression artérielle systolique a été mesurée par photopléthysmographie avant la pose de la pompe à Ang II (0) et pendant 4 semaines après la chirurgie (1 à 4) ; (B) Le poids du ventricule gauche a été rapporté au poids du corps pour évaluer l'hypertrophie cardiaque consécutive au traitement. (n=5 animaux par groupe), ** p<0,01 et *** p<0,001 vs sham respectif ; # vs WT+Ang II, test two way Anova avec un post test de Bonferroni).

La PAS basale, située aux environs de 115 mmHg, est identique entre les différents de groupes de souris. Après 4 semaines, cette PAS reste stable chez les souris *sham*, avec une légère diminution due à une réduction du stress manipulateur.

Dans le groupe WT+Ang II, la PAS est significativement augmentée après 4 semaines de traitement par rapport au groupe WT *sham* ($131\pm 3,3$ mmHg vs $109\pm 3,3$ mmHg) (Figure 35 A).

Dans le groupe WT-OVX+Ang II, la PAS est encore davantage supérieure par rapport au groupe WT-OVX *sham* ($160\pm 9,4$ mmHg vs $108\pm 4,5$ mmHg). Cette pression est significativement plus élevée que celle du groupe WT+Ang II ($160\pm 9,4$ mmHg vs $131\pm 3,3$ mmHg).

Le traitement a également causé une hypertrophie cardiaque dans le groupe WT+Ang II par rapport aux WT *sham* (+20%) et le groupe WT-OVX+Ang II par rapport au groupe WT-OVX *sham* (+19%) (Figure 35 B).

Nous ne constatons pas de différence d'hypertrophie cardiaque entre les groupes WT+Ang II et WT-OVX+Ang II.

1.2. Remodelage artériel

Nous avons évalué les changements de structure vasculaire induits par le traitement par l'Ang II. Les changements structuraux ont été observés sur l'aorte et l'artère mésentérique par coloration des lames élastiques à l'orcéine. Une augmentation du rapport média/lumen indique un remodelage hypertrophique de la paroi du vaisseau.

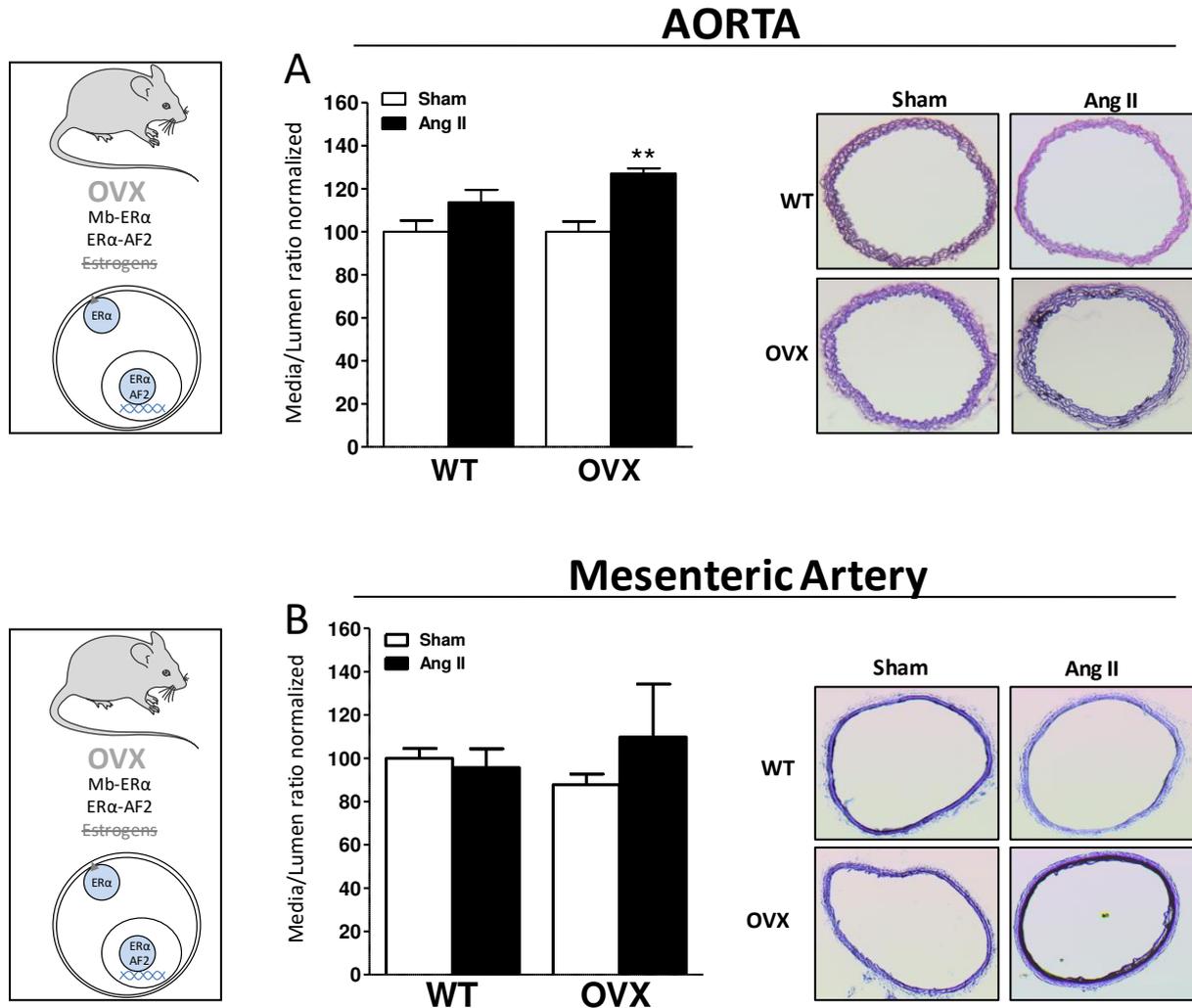


Figure 36 : Effet de l'absence d'hormones œstrogéniques sur le remodelage structurel de l'aorte et de l'artère mésentérique après traitement par l'Ang II.

La structure artérielle a été évaluée par coloration de coupes histologiques à l'orcéine après 28 jours de traitement. (A) Ratio média/lumen de l'aorte (B) Ratio média/lumen de l'artère mésentérique (n=5 animaux par groupe), ** $p < 0,01$ vs *sham* respectif ; test two way Anova avec un post test de Bonferroni).

Dans le groupe WT+Ang II, le traitement par l'Ang II n'a pas changé significativement le rapport média/lumen au niveau de l'aorte et de l'artère mésentérique (Figure 36 A-B).

Dans le groupe OVX+Ang II, le traitement a augmenté significativement le rapport média/lumen aortique par rapport au groupe OVX *sham* (+27%) (Figure 36 A).

La structure de l'artère mésentérique n'a pas été significativement modifiée (Figure 36 B).

1.3. Réactivité vasculaire

Nous avons évalué les conséquences de l'absence d'hormones œstrogéniques sur la fonction vasculaire au niveau aortique, en utilisant la technique de myographie .

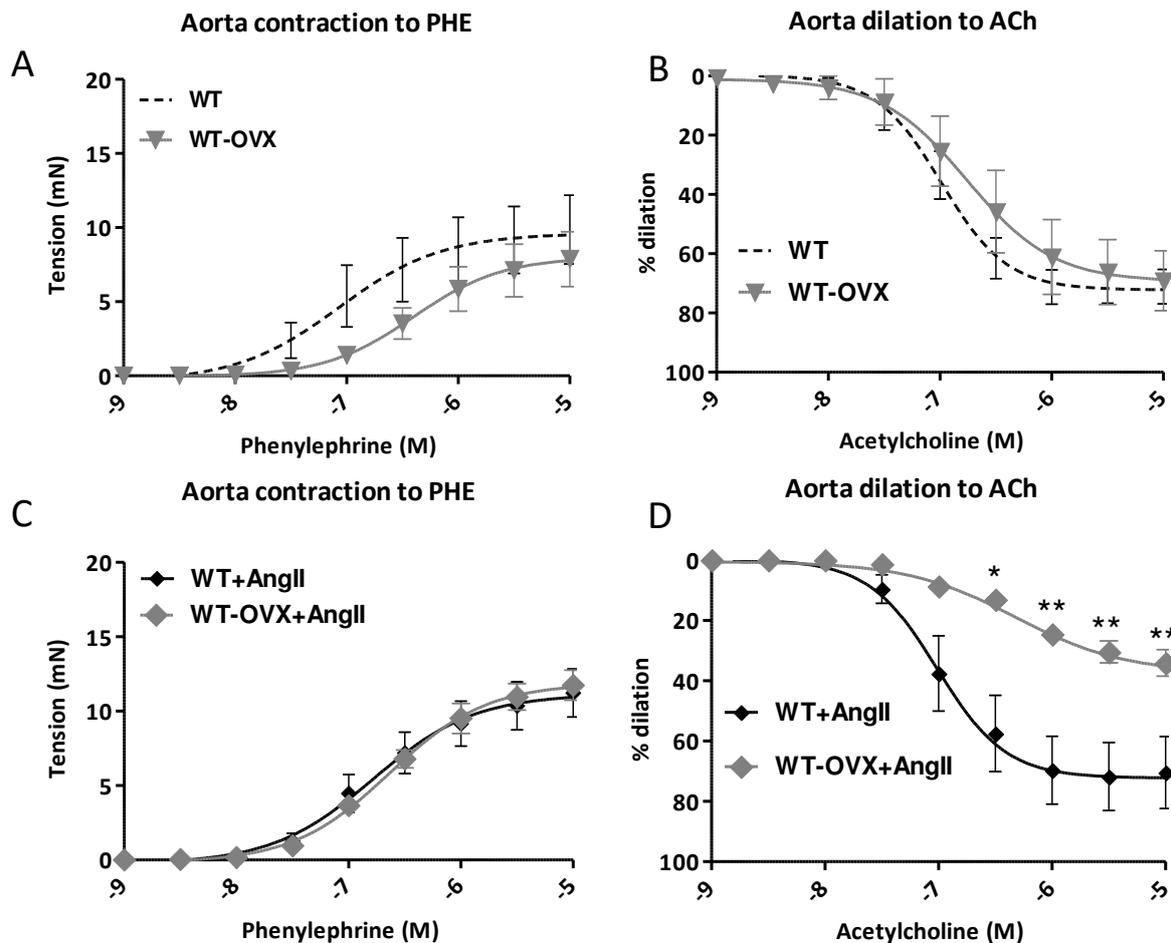


Figure 37 : Effet de l'absence d'hormones œstrogéniques sur la fonction vasculaire de l'aorte.

La fonction vasculaire aortique a été évaluée par myographie après 28 jours de traitement. (A) Evaluation de la contraction par courbe concentration-réponse à la Phényléphrine chez les animaux *sham*. (B) Evaluation de la relaxation endothélium-dépendante par courbe concentration-réponse à l'Acétylcholine chez les animaux *sham*. (C) Evaluation de la contraction par courbe concentration-réponse à la Phényléphrine chez les animaux traités par l'Ang II. (D) Evaluation de la relaxation endothélium-dépendante par courbe concentration-réponse à l'Acétylcholine chez les animaux traités par l'Ang II (n=5 animaux par groupe) ; * p<0,05 vs WT+Ang II ; **p<0,01 vs WT+Ang II ; test two way Anova avec un post test de Bonferroni).

Dans le groupes WT-OVX, nos résultats ne montrent pas de modification de la capacité contractile de l'aorte thoracique (Figure 37 A). De même, la capacité vasorelaxatrice ne semble pas significativement diminuée par l'absence d'hormones (Figure 37 B).

En revanche dans le groupe WT-OVX+Ang II, l'absence d'œstrogènes associée au traitement par l'Ang II réduit considérablement la capacité vasorelaxatrice de l'aorte par rapport aux souris WT+Ang II (-51%) (Figure 37 D) sans changer la capacité contractile (Figure 37 C).

2. Le récepteur ER β ne participe pas à la protection œstrogénique contre l'hypertension artérielle induite par l'Ang II

Afin de déterminer lequel des deux récepteurs ER α ou ER β est responsable des effets anti-hypertenseurs des hormones œstrogéniques, nous avons tout d'abord mesuré la PAS des animaux ER $\beta^{-/-}$ en réponse à l'Ang II.

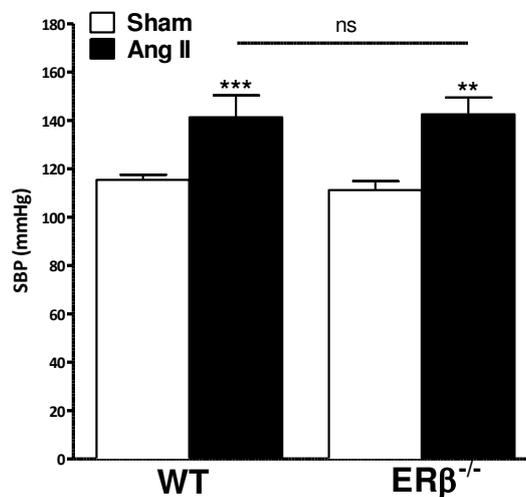


Figure 38 : Effet de la délétion d'ER β dans l'hypertension artérielle induite par l'Ang II.

La pression artérielle a été mesurée par photopléthysmographie. Les valeurs représentées ici correspondent à la moyenne de PAS entre 21 et 28 jours après la pose de la pompe à Ang II (n=5-8 animaux par groupe), **p<0,01, *** p<0,001 vs sham respectif ; test two way Anova avec un post test de Bonferroni.

En l'absence de traitement, la PAS basale est équivalente entre les groupes WT sham et ER $\beta^{-/-}$ sham (environ 116 mmHg).

Après 4 semaines de traitement par l'Ang II, nos résultats ne montrent aucune différence de PAS entre les groupes WT et ER $\beta^{-/-}$. En effet, dans le groupe ER $\beta^{-/-}$ +Ang II, la PAS est de 142 \pm 6,9 contre 139 \pm 2,3 mmHg dans le groupe WT+Ang II (Figure 38).

3. Le récepteur ER α est nécessaire aux effets protecteurs des œstrogènes contre l'hypertension artérielle et ses conséquences cardiovasculaires

3.1. Hypertension artérielle et hypertrophie cardiaque

Le niveau de PAS et le poids du cœur ont été évalués chez des souris ER α ^{-/-} femelles de 5 mois afin de déterminer l'implication du récepteur ER α dans la protection œstrogénique contre l'HTA.

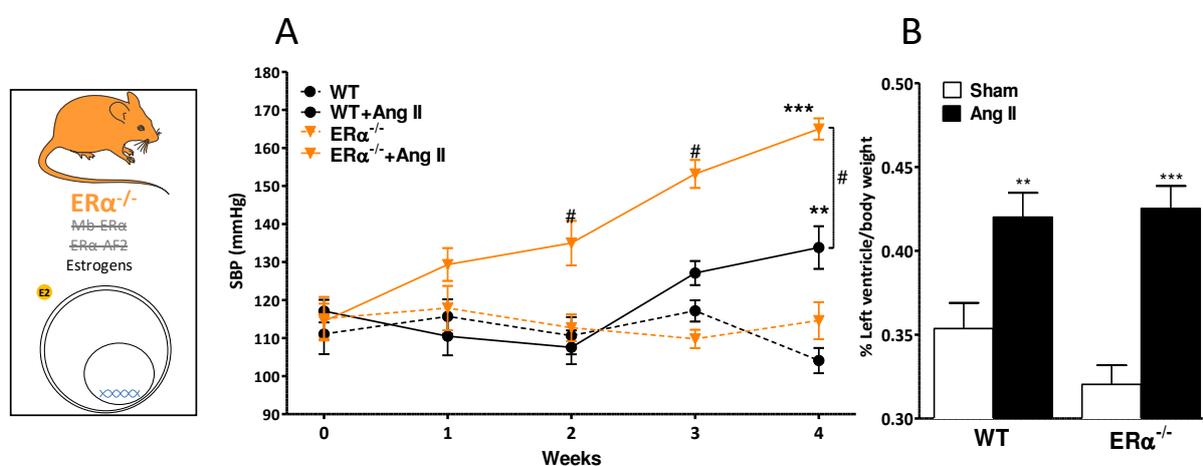


Figure 39 : Effet de l'absence du récepteur ER α sur l'hypertension artérielle induite par l'Ang II et sur l'hypertrophie cardiaque.

(A) La pression artérielle systolique a été mesurée par photopléthysmographie avant la pose de la pompe à Ang II (0) et pendant 4 semaines après la chirurgie (1 à 4) ; (B) Le poids du ventricule gauche a été rapporté au poids du corps pour évaluer l'hypertrophie cardiaque consécutive au traitement. (n=6-8 animaux par groupe), ** p<0,01 et *** p<0,001 vs sham respectif ; # vs WT+Ang II, test two way Anova avec un post test de Bonferroni).

La PAS basale, située aux environs de 115 mmHg, est identique entre les différents de groupes de souris.

Dans le groupe WT+Ang II, la PAS est significativement augmentée après 4 semaines de traitement par rapport au groupe WT sham (133±5,6 mmHg vs 104±3,3 mmHg) (Figure 39 A).

Dans le groupe $ER\alpha^{-/}$ +Ang II, la PAS est encore davantage supérieure par rapport au groupe $ER\alpha^{-/}$ *sham* ($167\pm 2,7$ mmHg vs $114\pm 4,8$ mmHg).

Cette pression est significativement plus élevée que celle du groupe WT+Ang II ($167\pm 2,7$ mmHg vs $133\pm 5,6$ mmHg).

Le traitement a également causé une hypertrophie cardiaque dans le groupe WT+Ang II par rapport au groupe WT *sham* (+20%).

De même, dans le groupe $ER\alpha^{-/}$ +Ang II, le rapport du poids du cœur/poids du corps est significativement plus élevé par rapport au groupe $ER\alpha^{-/}$ *sham* (+28%) (Figure 39 B).

En revanche, nous ne constatons pas de différence d'hypertrophie cardiaque entre les groupes WT+Ang II et WT-OVX+Ang II.

3.2. Remodelage artériel

Nous avons évalué les changements de structures vasculaires induits par le traitement par l'Ang II. Les changements structuraux ont été observés sur l'aorte et l'artère mésentérique par coloration des lames élastiques à l'orcéine. Une augmentation du rapport média/lumen indique un remodelage hypertrophique de la paroi du vaisseau.

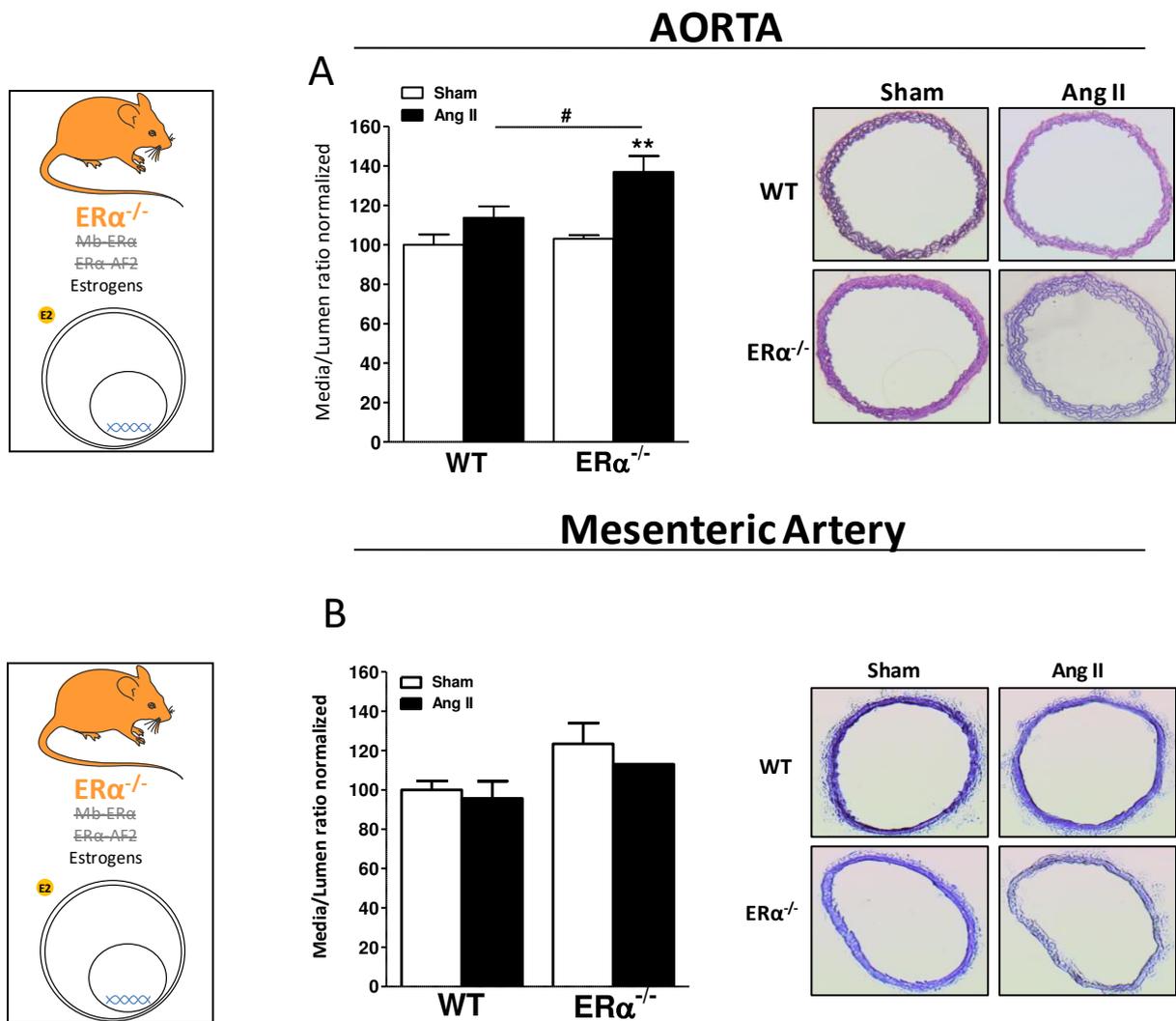


Figure 40 : Effet de l'absence du récepteur ERα sur le remodelage structurel de l'aortique et de l'artère mésentérique après traitement par l'Ang II.

La structure artérielle a été évaluée par coloration de coupes histologiques à l'orcéine après 28 jours de traitement. (A) Ratio média/lumen de l'aorte (B) Ratio média/lumen de l'artère mésentérique (n=6-8 animaux par groupe), ** p<0,01 vs sham respectif ; # p<0,05 vs WT+Ang II ; test two way Anova avec un post test de Bonferroni).

Dans le groupe WT+Ang II, le traitement n'a pas changé significativement le rapport média/lumen de l'aorte et de l'artère mésentérique par rapport au groupe WT *sham* (Figure 40 A-B).

En revanche, dans le groupe ER α ^{-/-}+Ang II, le traitement a entraîné un remodelage hypertrophique de l'aorte par rapport au groupe ER α ^{-/-} *sham* (+37%) et par rapport au groupe WT+Ang II (+24%) (Figure 40 A).

Dans le groupe ER α ^{-/-}+Ang II, la structure de l'artère mésentérique n'a pas été significativement modifiée par le traitement par l'Ang II (Figure 40 B).

3.3. Réactivité vasculaire

Nous avons évalué les conséquences de l'absence du récepteur ER α sur la fonction vasculaire au niveau aortique, en utilisant la technique de myographie.

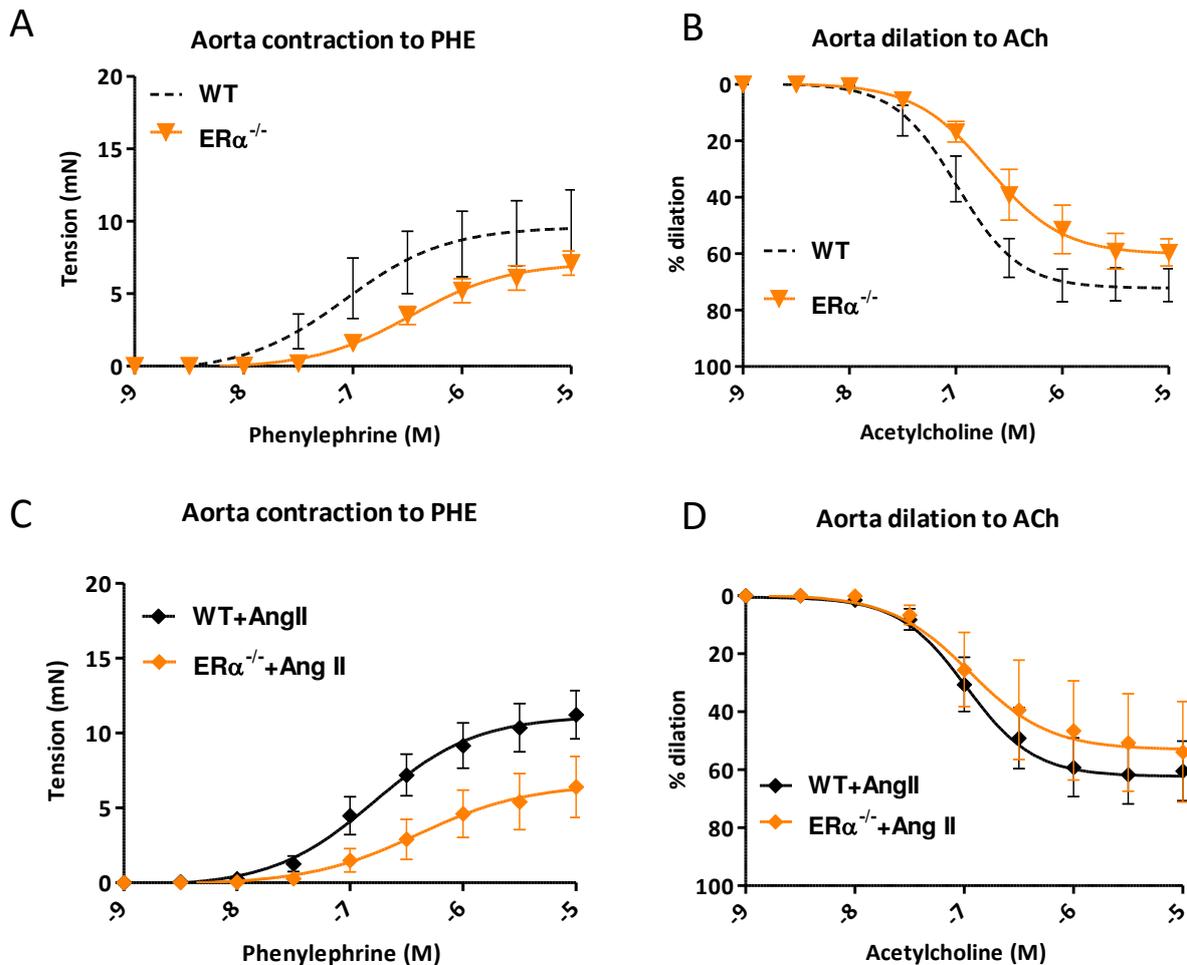


Figure 41 : Effet de l'absence du récepteur ER α sur la réactivité vasculaire de l'aorte.

La fonction vasculaire aortique a été évaluée par myographie après 28 jours de traitement. (A) Evaluation de la contraction par courbe concentration-réponse à la Phényléphrine chez les animaux *sham*. (B) Evaluation de la relaxation endothélium-dépendante par courbe concentration-réponse à l'Acétylcholine chez les animaux *sham*. (C) Evaluation de la contraction par courbe concentration-réponse à la Phényléphrine chez les animaux traités par l'Ang II. (D) Evaluation de la relaxation endothélium-dépendante par courbe concentration-réponse à l'Acétylcholine chez les animaux traités par l'Ang II (n=4-5 animaux par groupe) ; test two way Anova avec un post test de Bonferroni).

Dans le groupe $ER\alpha^{-/}$ *sham*, la capacité contractile et vasorelaxatrice de l'aorte n'est pas significativement modifiée (Figure 41 A-B). Toutefois, malgré l'absence de significativité, nous notons une tendance marquée à une baisse des capacités contractiles (jusqu'à -38%) et relaxatrices de l'aorte des souris $ER\alpha^{-/}$ (jusqu'à -20%) par rapport aux souris WT.

Le traitement par l'Ang II ne change pas significativement ces observations (Figure 41 C-D). Toutefois, la capacité contractile de l'aorte des souris $ER\alpha^{-/}$ +Ang II montre une forte tendance à la réduction (jusqu'à -49%) qui n'est pas significative. La capacité relaxatrice (-16%) est également inchangée.

Le manque de significativité de ces analyses est probablement imputable aux effectifs réduits dans ces groupes.

4. La voie MISS d'ER α n'est pas nécessaire à son effet protecteur dans l'hypertension artérielle

4.1. Hypertension artérielle et hypertrophie cardiaque

Le niveau de PA et le poids du cœur ont été évalués chez des souris C451A femelles de 5 mois afin de déterminer l'implication de la voie membranaire MISS du récepteur ER α dans la protection œstrogénique contre l'HTA.

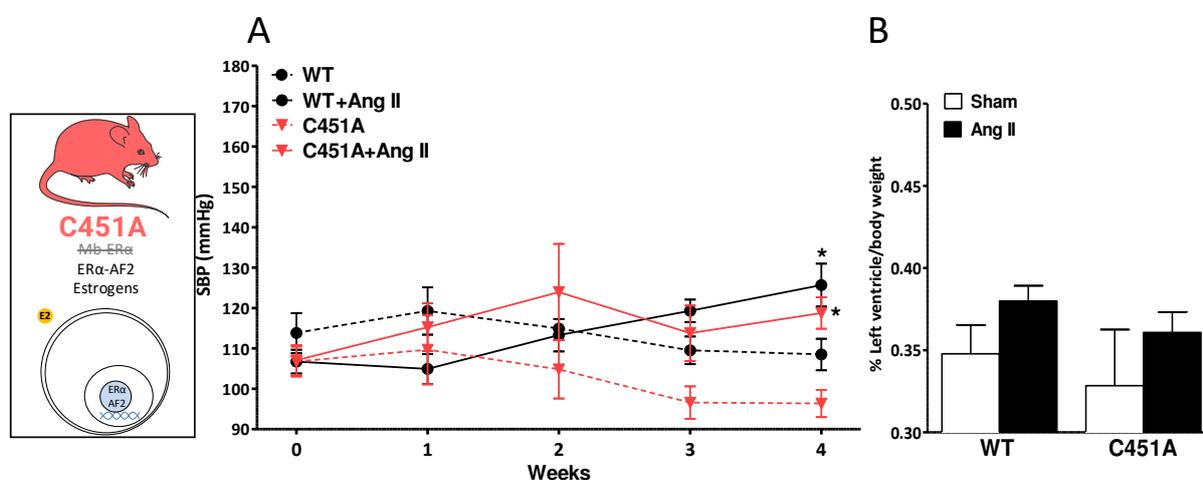


Figure 42 : Effet de l'absence de la forme membranaire d'ER α sur l'hypertension artérielle induite par l'Ang II et sur l'hypertrophie cardiaque.

(A) La pression artérielle systolique a été mesurée par photopléthysmographie avant la pose de la pompe à Ang II (0) et pendant 4 semaines après la chirurgie (1 à 4) ; (B) Le poids du ventricule gauche a été rapporté au poids du corps pour évaluer l'hypertrophie cardiaque consécutive au traitement (n=5-8 animaux par groupe), * p<0,05 et vs sham respectif ; & vs WT+Ang II, test two way Anova avec un post test de Bonferroni).

Dans le groupe WT sham, la PAS basale est de 108±3,9 mmHg après 28 jours de mesure. Dans le groupe C451A sham, la PAS basale est de 96±3,3 mmHg. La différence de PAS n'est pas significative entre les deux groupes (Figure 42 A).

Dans le groupe WT+Ang II, la PAS est significativement augmentée après 4 semaines de traitement par rapport au groupe WT *sham* ($125\pm 5,3$ mmHg vs $108\pm 3,9$ mmHg) (Figure 42 A).

Dans le groupe C451A+Ang II, la PAS est significativement plus élevée que celle des souris C451A *sham* ($119\pm 3,9$ mmHg vs $96\pm 3,3$ mmHg)

En revanche, la PAS des souris C451A+Ang II n'est pas significativement différente des souris WT+Ang II ($119\pm 3,9$ mmHg vs $125\pm 5,3$ mmHg).

Le traitement par l'Ang II n'a pas causé d'hypertrophie cardiaque chez les souris WT+Ang II et les souris C451A Ang II (Figure 42 B).

4.2. Remodelage artériel

Nous avons évalué les changements de structures vasculaires induits par le traitement par l'Ang II. Les changements structuraux ont été observés sur l'aorte et l'artère mésentérique par coloration des lames élastiques à l'orcéine. Une augmentation du rapport média/lumen indique un remodelage hypertrophique de la paroi du vaisseau.

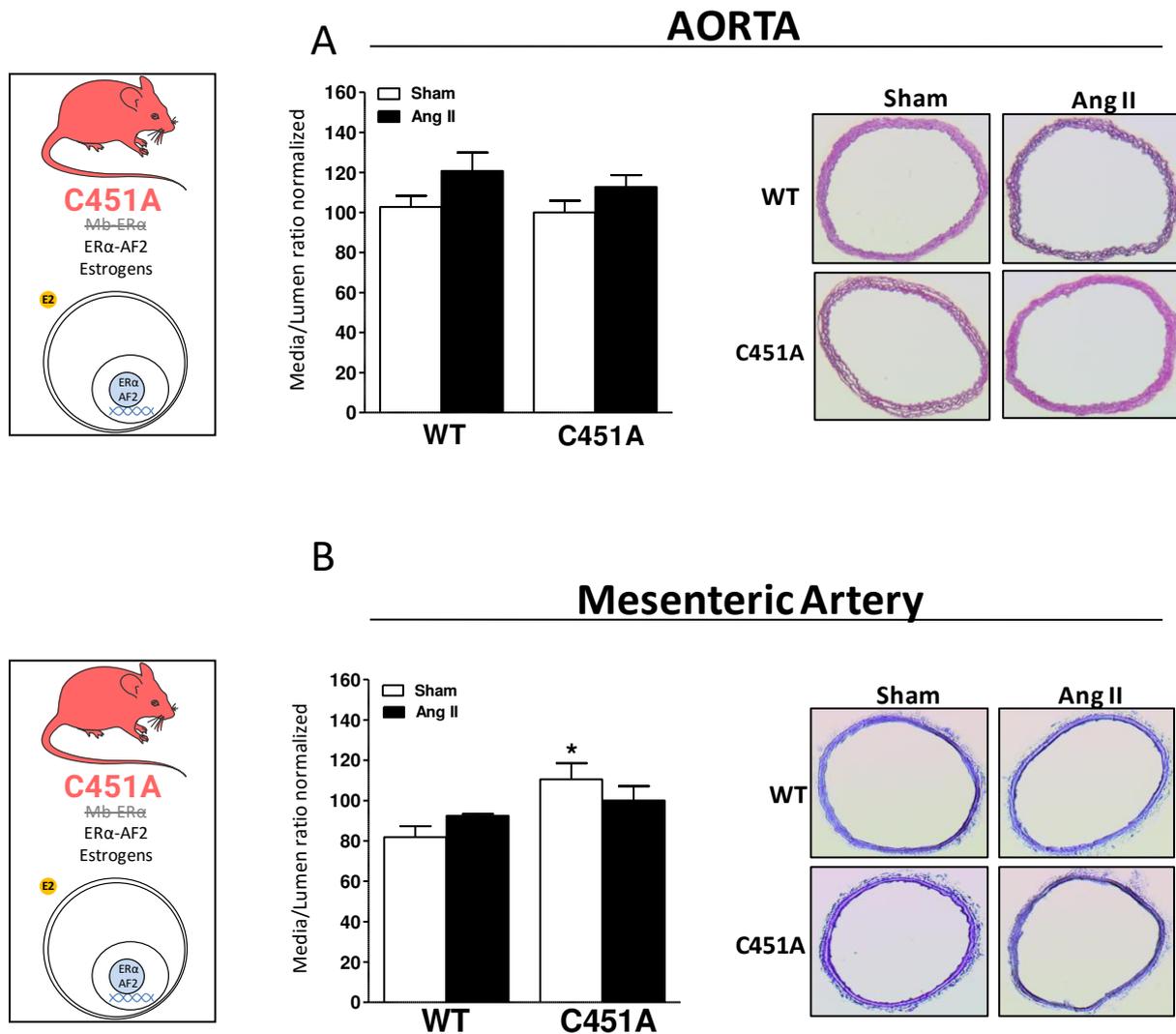


Figure 43 : Effet de l'absence de la forme membranaire d'ER α sur le remodelage structurel de l'aortique et de l'artère mésentérique après traitement par l'Ang II.

La structure artérielle a été évaluée par coloration de coupes histologiques à l'orcéine après 28 jours de traitement. (A) Ratio média/lumen de l'aorte (B) Ratio média/lumen de l'artère mésentérique (n=4-6 animaux par groupe), * p<0,05 vs WT ; test two way Anova avec un post test de Bonferroni).

Dans le groupe WT+Ang II, le traitement par l'Ang II n'a pas changé significativement le rapport média/lumen au niveau de l'aorte et de l'artère mésentérique (Figure 43 A-B).

De même, chez les souris C451A+Ang II, le traitement ne provoque pas de remodelage aortique (+12%) ni mésentérique (-10%) par rapport au groupe C451A *sham*.

Toutefois, nous notons que le rapport média/lumen des artères mésentériques est plus élevé chez les C451A *sham* par rapport au WT *sham* (+29%) (Figure 43 B).

4.3. Réactivité vasculaire

Nous avons évalué les conséquences de l'absence de la voie membranaire MISS du récepteur ER α sur la fonction vasculaire au niveau aortique, en utilisant la technique de myographie.

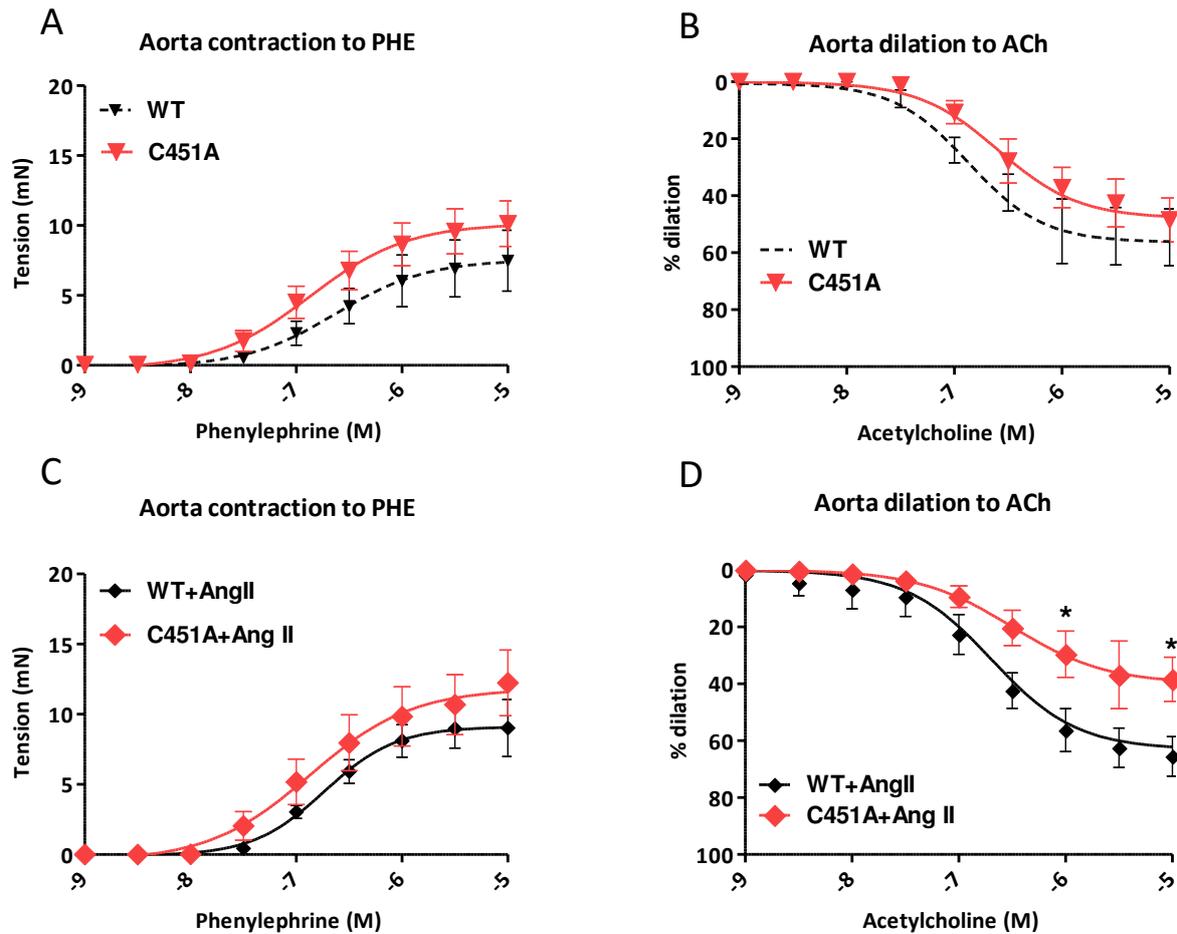


Figure 44 : Effet de l'absence de la fonction membranaire du récepteur ER α sur la réactivité vasculaire de l'aorte.

La fonction vasculaire aortique a été évaluée par myographie après 28 jours de traitement. (A) Evaluation de la contraction par courbe concentration-réponse à la Phényléphrine chez les animaux *sham*. (B) Evaluation de la relaxation endothélium-dépendante par courbe concentration-réponse à l'Acétylcholine chez les animaux *sham*. (C) Evaluation de la contraction par courbe concentration-réponse à la Phényléphrine chez les animaux traités par l'Ang II. (D) Evaluation de la relaxation endothélium-dépendante par courbe concentration-réponse à l'Acétylcholine chez les animaux traités par l'Ang II (n=5-8 animaux par groupe) ; test two way Anova avec un post test de Bonferroni).

Dans le groupe C451A *sham*, nos résultats montrent que l'absence de la voie MISS ne change pas significativement la capacité contractile et vasorelaxatrice de l'aorte par rapport au groupe WT *sham* (Figure 44 A-B).

Le traitement par l'Ang II ne change pas significativement pas la capacité contractile dans le groupe C451A+Ang II (Figure 44 C). En revanche, la capacité relaxatrice est significativement réduite par rapport aux souris WT+Ang II (-41%) (Figure 44 D).

5. La fonction nucléaire AF-2 est nécessaire à la protection d'ER α contre l'hypertension artérielle et ses conséquences cardiovasculaires

5.1. Hypertension artérielle et remodelage hypertrophique

Le niveau de PA et le poids du cœur ont été évalués chez des souris AF2° femelles de 5 mois afin de déterminer l'implication de la fonction de transactivation AF-2 du récepteur ER α dans la protection œstrogénique contre l'HTA.

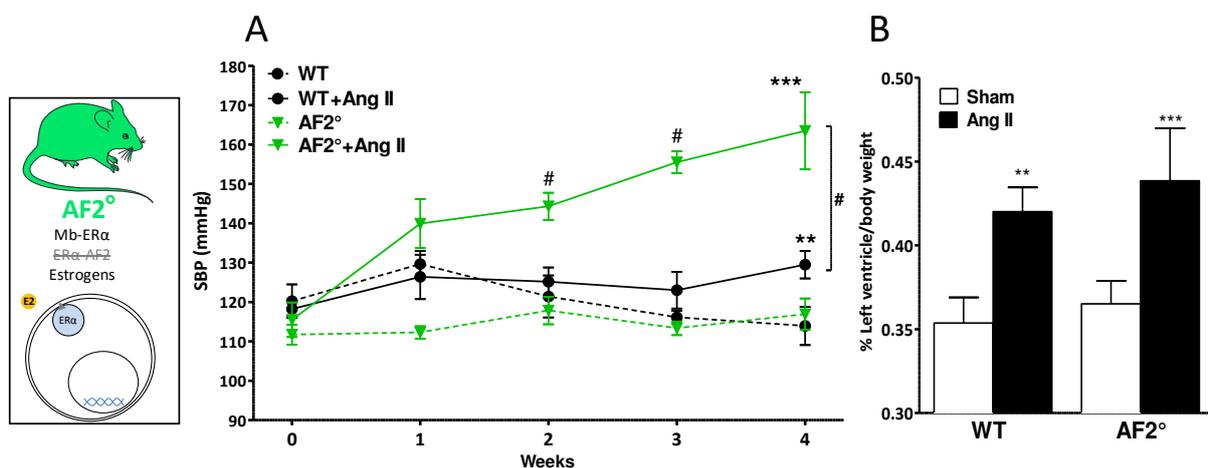


Figure 45 : Effet de l'absence de la fonction de transactivation AF-2 d'ER α sur l'hypertension artérielle induite par l'Ang II et sur l'hypertrophie cardiaque.

(A) La pression artérielle systolique a été mesurée par photopléthysmographie avant la pose de la pompe à Ang II (0) et pendant 4 semaines après la chirurgie (1 à 4) ; (B) Le poids du ventricule gauche a été rapporté au poids du corps pour évaluer l'hypertrophie cardiaque consécutive au traitement. (n=5-8 animaux par groupe), ** p<0,01 et *** p<0,001 vs sham respectif ; # vs WT+Ang II, test two way Anova avec un post test de Bonferroni).

La PAS basale, située aux environs de 115 mmHg, est identique entre les différents de groupes de souris (Figure 45 A).

Dans le groupe WT+Ang II, la PAS est significativement augmentée après 4 semaines de traitement par rapport au groupe WT *sham* ($129\pm 3,5$ mmHg vs $113\pm 4,8$ mmHg).

Dans le groupe AF2°+Ang II, la PAS est très supérieure à celle des souris AF2° *sham* ($163\pm 9,8$ mmHg vs $117\pm 3,9$ mmHg). Cette pression est également significativement plus élevée que celle des souris WT+Ang II ($163\pm 9,8$ mmHg vs $129\pm 3,5$ mmHg).

Le traitement a causé une hypertrophie cardiaque dans le groupe WT+Ang II par rapport au groupe WT *sham* (+19%). De même, nous observons une hypertrophie cardiaque dans le groupe AF2°+Ang II par rapport au groupe AF2° *sham* (+22%) (Figure 45 B).

Nous ne constatons pas de différence d'hypertrophie entre les groupes AF2°+Ang II et WT+Ang II.

5.2. Remodelage artériel

Nous avons évalué les changements de structures vasculaires induits par le traitement par l'Ang II. Les changements structuraux ont été observés sur l'aorte et l'artère mésentérique par coloration des lames élastiques à l'orcéine. Une augmentation du rapport média/lumen indique un remodelage hypertrophique de la paroi du vaisseau.

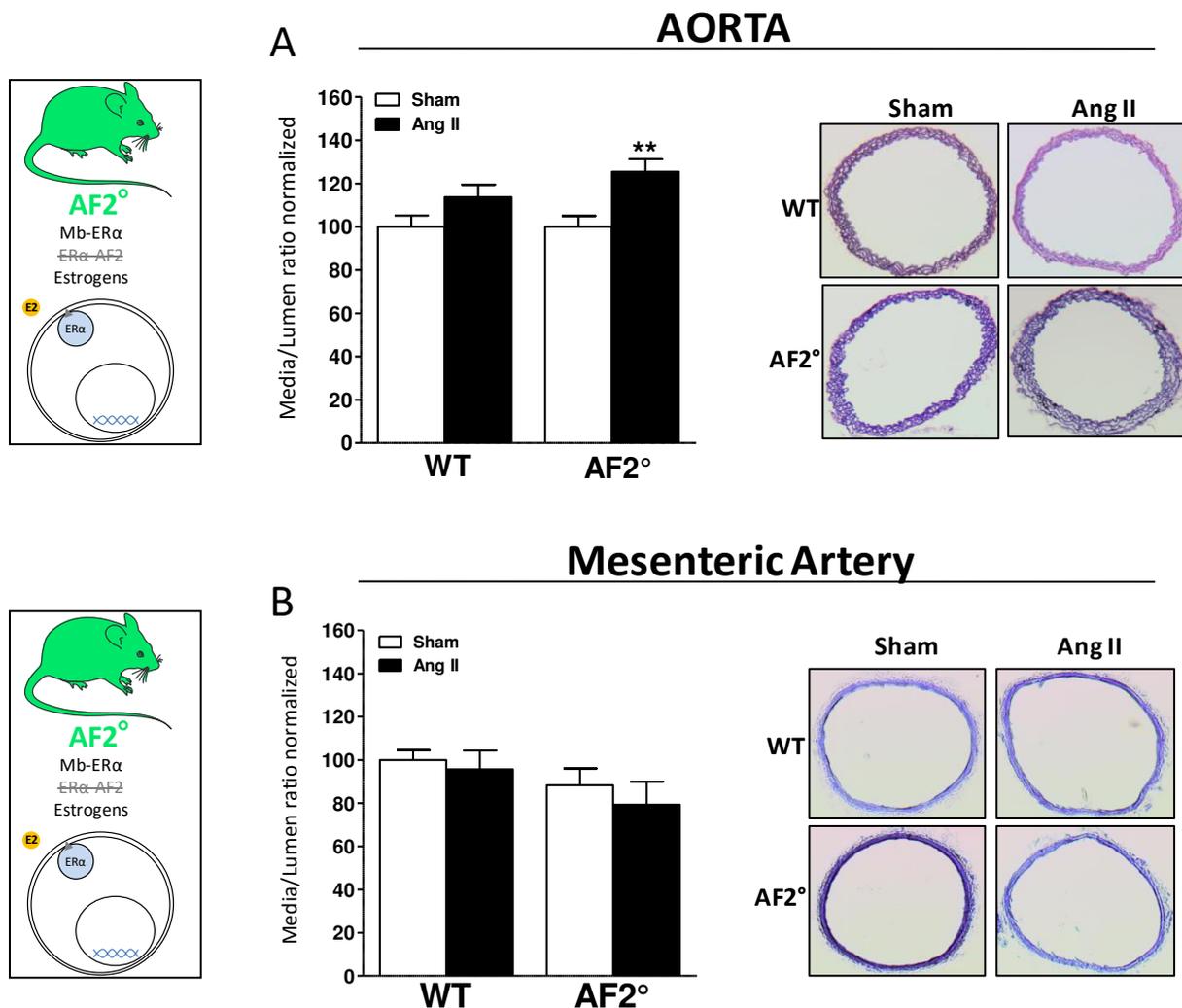


Figure 46 : Effet de l'absence de la fonction de transactivation AF-2 sur le remodelage structurel de l'aortique et de l'artère mésentérique après traitement par l'Ang II.

La structure artérielle a été évaluée par coloration de coupes histologiques à l'orcéine après 28 jours de traitement. (A) Ratio média/lumen de l'aorte (B) Ratio média/lumen de l'artère mésentérique (n=5-8 animaux par groupe), ** p<0,01 vs sham respectif ; test two way Anova avec un post test de Bonferroni).

Dans le groupe WT+Ang II, le traitement n'a pas changé le rapport média/lumen au niveau de l'aorte et de l'artère mésentérique (Figure 46 A-B).

En revanche, dans le groupe AF2°+Ang II, le traitement a augmenté significativement le rapport média/lumen aortique par rapport au groupe AF2° *sham* (+25%) et par rapport au groupe WT+Ang II (+24%) (Figure 46A). La structure de l'artère mésentérique n'a pas été significativement modifiée par le traitement (Figure 46 B).

5.3. Réactivité vasculaire

Nous avons évalué les conséquences de l'absence de la fonction de transactivation AF-2 du récepteur ER α sur la fonction vasculaire au niveau aortique, en utilisant la technique de myographie.

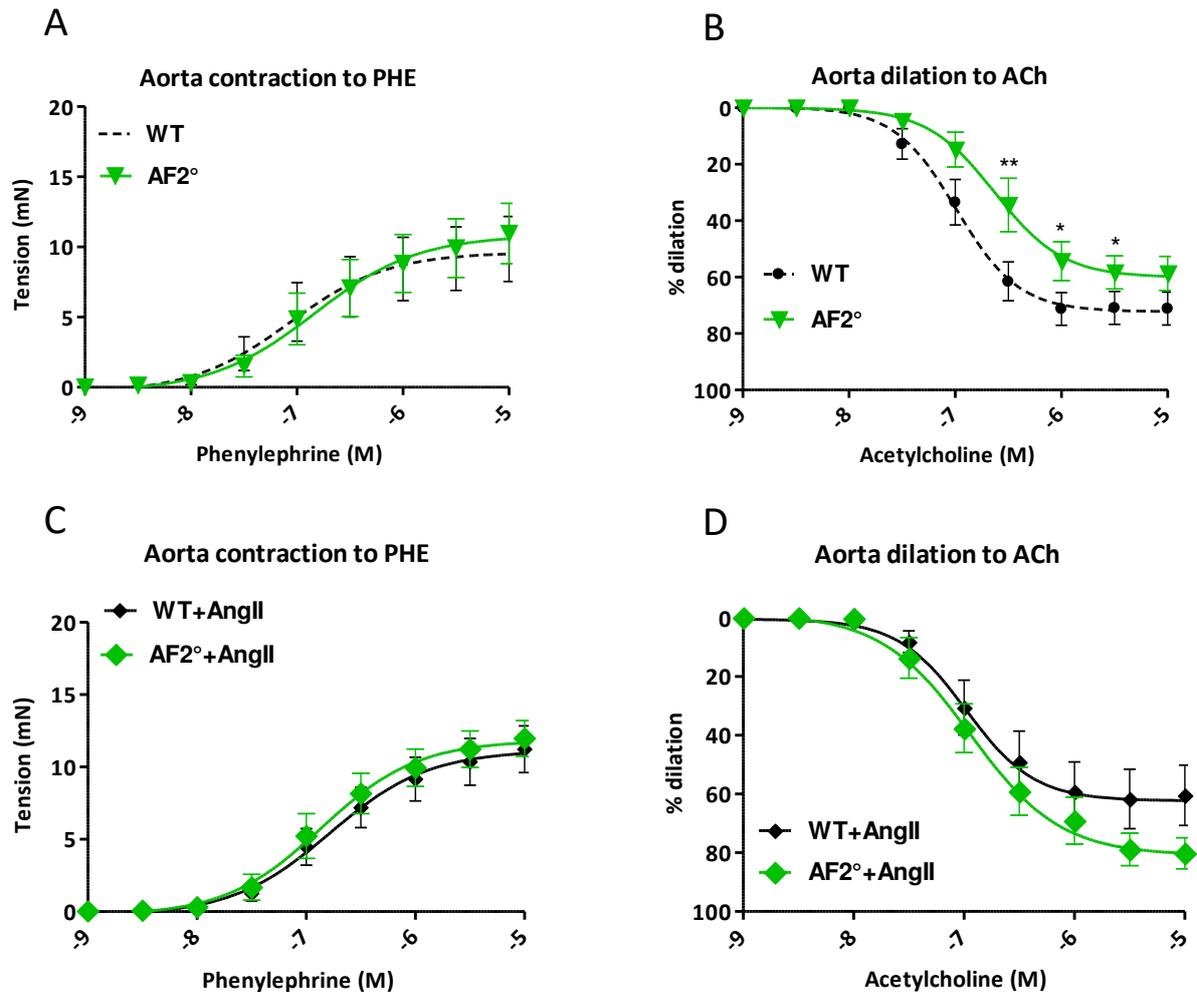


Figure 47 : Effet de l'absence de la fonction de transactivation AF-2 d'ER α sur la réactivité vasculaire de l'aorte.

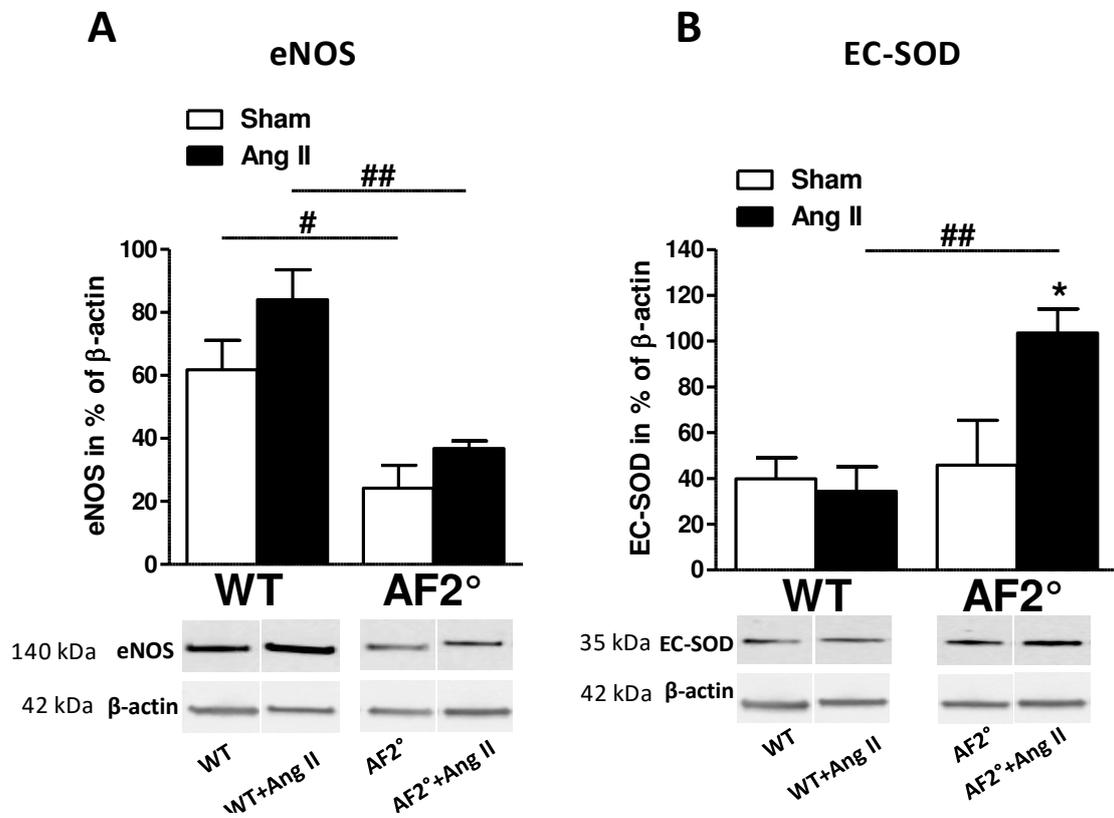
La fonction vasculaire aortique a été évaluée par myographie après 28 jours de traitement. (A) Evaluation de la contraction par courbe concentration-réponse à la Phényléphrine chez les animaux *sham*. (B) Evaluation de la relaxation endothélium-dépendante par courbe concentration-réponse à l'Acétylcholine chez les animaux *sham*. (C) Evaluation de la contraction par courbe concentration-réponse à la Phényléphrine chez les animaux traités par l'Ang II. (D) Evaluation de la relaxation endothélium-dépendante par courbe concentration-réponse à l'Acétylcholine chez les animaux traités par l'Ang II (n=6 animaux par groupe) ; *p<0,05 vs WT ; **p<0,01 vs WT ; test two way Anova avec un post test de Bonferroni).

Dans le groupe AF2° *sham*, nous n'observons pas de modification de la capacité contractile de l'aorte par rapport au groupe WT *sham* (Figure 47 A). En revanche, nous observons une baisse significative de la vasorelaxation de l'aorte (-31%) par rapport aux souris WT *sham* (Figure 47B).

Dans le groupe AF2°+Ang II, nous ne constatons pas de changement de la capacité contractile par rapport au groupe WT+Ang II (Figure 47 C). De manière intéressante, nous observons que la vasorelaxation n'est pas significativement différente entre le groupe AF2°+Ang II et le groupe WT+Ang II (Figure 47 D).

5.4. Expression protéique dans l'aorte

Afin de mieux comprendre les résultats obtenus démontrant que l'absence de la fonction AF-2 augmente la réponse pressive à l'Ang II, nous avons évalué l'expression de certaines protéines clés impliquées dans ce processus dans l'aorte des animaux. Ont été analysées l'expression de l'enzyme eNOS impliquée dans la vasodilatation, de l'EC-SOD impliquée dans la réduction du stress oxydatif et d'ERK1/2 impliquée dans le remodelage hypertrophique vasculaire. Nous avons également mesuré l'activité des protéines ERK1/2, en mesurant leur état de phosphorylation.



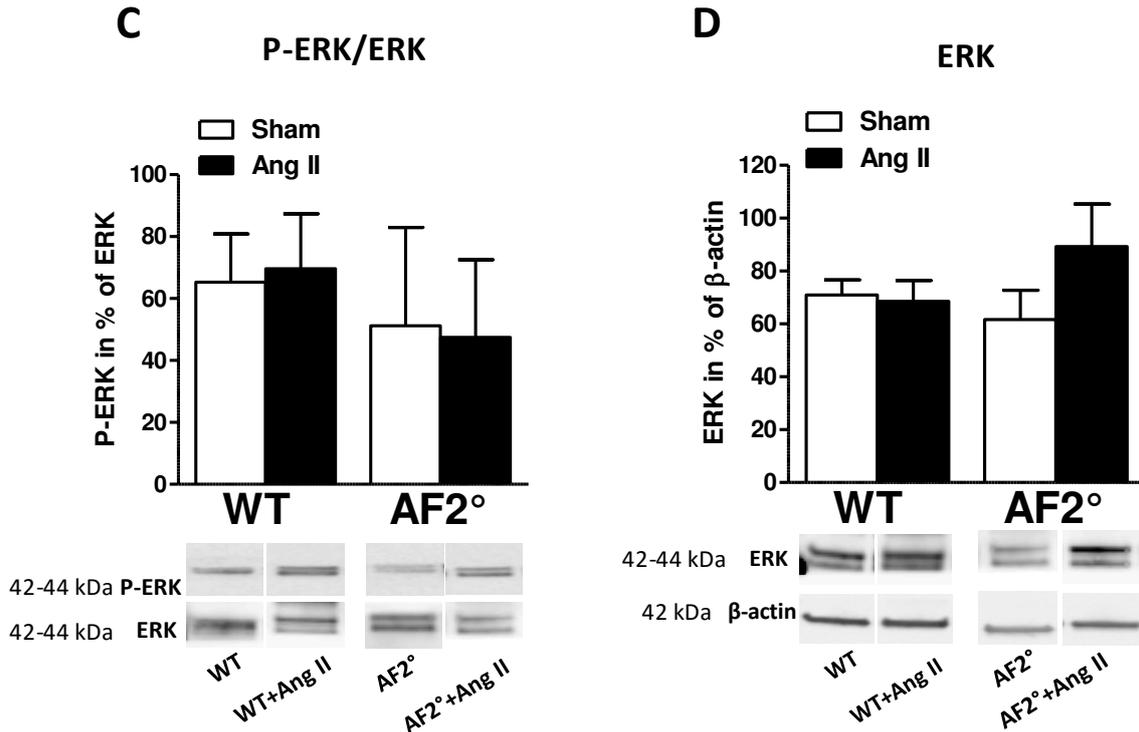


Figure 48 : Effet de l'absence de la fonction de transactivation AF-2 d'ER α sur l'expression des protéines eNOS, EC-SOD, ERK et sur la phosphorylation de ERK par rapport à la β -actine.

L'expression et l'activité de protéines clés dans les processus de vasodilatation a été évaluée par Western Blot. (A) Ratio de l'expression de la protéine eNOS sur l'expression de la β -actine ; (B) ratio de l'expression de la protéine EC-SOD sur l'expression de la β -actine; (C) ratio du niveau de phosphorylation P-ERK1/2 sur l'expression de la protéine ERK; (D) ratio de l'expression de la protéine ERK1/2 sur l'expression de la β -actine (n=5-6 animaux par groupe) ; # p<0,05 vs WT ; * p<0,05 vs sham ; ## p<0,01 vs WT ; test two way Anova avec un post test de Bonferroni.

Nous observons que l'expression de l'enzyme eNOS est significativement réduite dans les aortes du groupe AF2° par rapport au groupe WT, traités ou non (-60% environ) (Figure 48 A).

Nous notons également une hausse de 60% de l'expression de l'EC-SOD dans le groupe AF2°+Ang II par rapport au groupe WT+Ang II (Figure 48 B).

Enfin, nos résultats n'ont pas mis en évidence de modification significative de l'expression ou de l'activité de la protéine ERK1/2 entre les groupes AF2° et WT, traités ou non (Figure 48 C-D).

6. La stimulation des fonctions génomiques d'ER α prévient l'hypertension induite par l'Ang II

Nos résultats précédents ont mis en évidence l'importance de la fonction d'activation AF-2 dans l'effet protecteur d'ER α contre l'hypertension induite par l'Ang II. Pour vérifier cet effet, nous avons traitées des souris OVX+Ang II avec un œstrogène, l'estérol (E4), capable de stimuler spécifiquement les fonctions nucléaires d'ER α , sans activer ses fonctions membranaires.

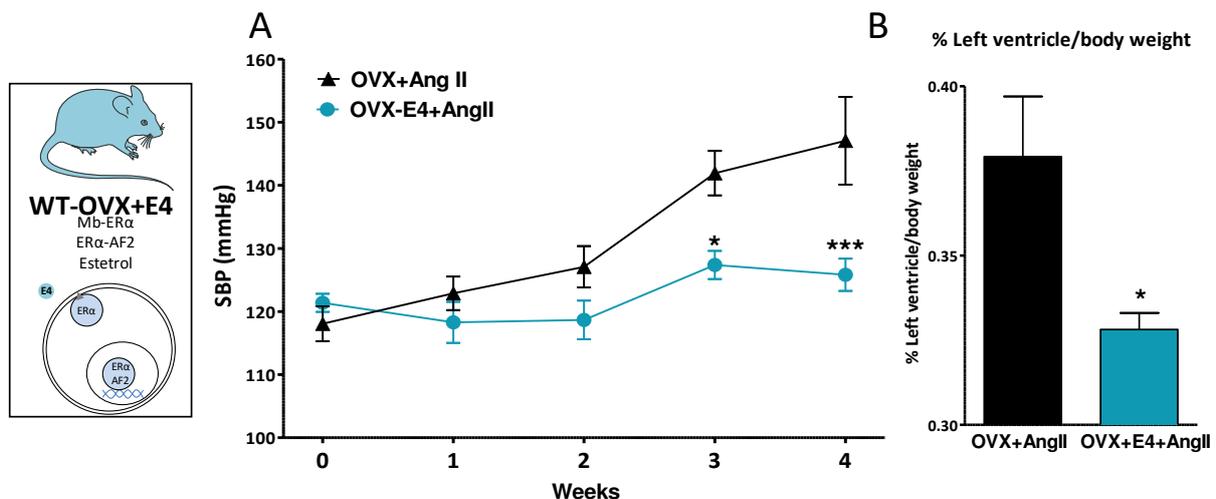


Figure 49 : Effet de la stimulation de la fonction nucléaire d'ER α sur l'hypertension artérielle induite par l'Ang II et sur l'hypertrophie cardiaque.

(A) La pression artérielle systolique a été mesurée par photopléthysmographie avant la pose de la pompe à Ang II (0) et pendant 4 semaines après la chirurgie (1 à 4) ; (B) Le poids du ventricule gauche a été rapporté au poids du corps pour évaluer l'hypertrophie cardiaque consécutive au traitement. (n=7-8 animaux par groupe), * $p < 0,05$ et *** $p < 0,001$ vs WT-OVX+Ang II, test de Student pour chaque semaine).

Nos résultats ont permis d'observer que le traitement par l'E4 abolit complètement l'effet hypertenseur de l'Ang II dans le groupe OVX-E4+Ang II par rapport au groupe OVX+Ang II (Figure 49 A). Ainsi, la PAS finale est de $126 \pm 2,5$ mmHg chez les souris recevant l'E4 contre $147 \pm 6,9$ mmHg pour les souris n'en recevant pas.

De même, le traitement par l'E4 prévient l'apparition de l'hypertrophie cardiaque induite par l'Ang II (-15% par rapport au groupe OVX+Ang II) (Figure 49 B).

Discussion

DISCUSSION

Jusqu'à l'âge de la ménopause, les femmes sont moins touchées que les hommes par l'HTA ¹. Or, après 50 ans, la perte des hormones œstrogéniques entraîne une disparition de cette différence entre les hommes et les femmes et l'augmentation drastique du risque CV chez ces dernières ¹⁴¹. Cet effet protecteur hormonal a poussé à la conduite d'une étude majeure chez les femmes ménopausées, en utilisant l'œstradiol pour tenter de réduire le risque de coronaropathies et d'AVC ¹⁵⁶. Contrairement à l'hypothèse émise par les auteurs de cette étude, la thérapie hormonale n'a pas produit les effets bénéfiques escomptés, soulignant la grande complexité des actions des ces hormones et le besoin d'études plus approfondies.

Le récepteur ER α est le principal acteur à l'origine des effets protecteurs des hormones œstrogéniques dans le système cardiovasculaire ^{1:6}. Au niveau cardiaque, il participe à la réduction de la taille d'infarctus et à l'augmentation de l'angiogénèse ¹⁷¹. Il est également impliqué dans la protection œstrogénique contre les lésions d'ischémie-reperfusion ¹⁷². Au niveau vasculaire, ER α réduit les processus athérosclérotiques ²²⁹, améliore la production de NO ²⁰⁸, le remodelage expansif flux-dépendant ²³⁰ et la réendothélialisation ¹⁸⁸. Ce récepteur participe aussi à des effets indirects bénéfiques sur le système cardiovasculaire comme la régulation du transporteur GLUT4 permettant une meilleure régulation de la glycémie ¹⁷³. Toutefois, comparativement aux études sur son rôle dans l'ostéoporose, les cancers du sein, de l'utérus et de l'endomètre, il existe peu de données sur le rôle protecteur d'ER α dans l'HTA.

Ce récepteur agit à la fois à la membrane d'où il active des voies de signalisation non-génomiques (MISS), mais également dans le noyau où il agit sur la transcription génique via ses fonctions d'activation AF-1 et AF-2. Ces deux voies ont des effets protecteurs différents dans le système cardiovasculaire.

Ces deux fonctions du récepteur, MISS et nucléaire, ont souvent été étudiées séparément en ignorant parfois les effets de l'autre voie. Nous avons donc choisi d'étudier l'implication de ces deux voies dans l'HTA.

Notre étude avait pour objectif d'élucider le mécanisme impliqué dans la protection induite par le récepteur ER α dans l'HTA. Nos résultats ont mis en évidence (1) que le récepteur ER α est nécessaire à la protection contre l'hypertension et ses conséquences cardiovasculaires, (2) via sa fonction génomique d'activation AF-2, (3) sans que la voie MISS ne soit impliquée (4) et que la stimulation de la fonction nucléaire suffisait à prévenir l'apparition de l'HTA en réponse à l'Ang II chez la souris femelle.

1. Rôle protecteur des œstrogènes dans l'hypertension

En utilisant des souris femelles ovariectomisées, nous avons mis en évidence que l'absence d'œstrogènes augmente significativement l'HTA induite par l'Ang II. Associé à cette hausse de la PAS, un remodelage hypertrophique de la paroi aortique était présent chez ces souris, induit par le niveau de pression mais également par l'effet vasoconstricteur et hypertrophiant de l'Ang II ^{2;99}. En outre, la capacité vasodilatatrice des aortes de ces animaux était fortement réduite.

Ces analyses confirment les données de la littérature sur l'effet anti-hypertenseur des œstrogènes ^{231;232;233;234}. Nous avons ensuite cherché à vérifier l'implication de leurs récepteurs ERs dans cet effet.

2. Rôle des récepteurs ER α et ER β dans l'hypertension

2.1. Absence de rôle protecteur d'ER β

ER α et ER β sont les principaux acteurs des actions œstrogéniques dans le système cardiovasculaire ^{1;189;235}. Les données de la bibliographie à propos de ces deux récepteurs mettent en avant le rôle primordial d'ER α dans la médiation des effets protecteurs des

œstrogènes¹. Toutefois, un article paru en 2002 dans la revue Science a révélé un rôle jusqu'alors inconnu d'ER β dans la régulation du tonus vasculaire et de l'HTA chez la souris²³⁶. Dans cette étude, les auteurs ont constaté que les souris ER $\beta^{-/-}$ développaient une HTA spontanée vers l'âge de 6 mois. Dans une étude plus récente parue en 2013, Xue et al. avaient utilisé des siRNA dirigés contre ER β au niveau du noyau paraventriculaire et du noyau réticulaire médullaire rostroventrolatéral dans le cerveau de rat, des centres clés dans la régulation de fonctions physiologiques comme le tonus vasomoteur^{237;238}. En induisant une HTA par infusion d'aldostérone, les auteurs avaient mis en évidence un rôle clé d'ER β dans la protection œstrogénique contre ce type d'HTA²³⁸.

Afin d'évaluer si ce récepteur joue un rôle dans la protection œstrogénique contre l'HTA induite par l'Ang II, nous avons mesuré la PAS chez des souris ER $\beta^{-/-}$ en réponse à l'Ang II. Nos résultats n'ont montré aucune différence avec des souris WT après 4 semaines de traitement.

Différents éléments peuvent être avancés pour expliquer la différence entre ces résultats et les données publiées par Zhu et al, comme le sexe des animaux, leur âge et le modèle d'HTA. Leur étude a été menée chez des souris mâles. Or, le risque d'HTA et les mécanismes de régulation sont différents entre les deux sexes^{140;239}. D'autre part, les auteurs avaient utilisé des souris de 12 mois, donc bien plus âgées que nos animaux. Selon le site du laboratoire Jackson aux Etats-Unis, cet âge est considéré comme un stade de pré-vieillesse. Enfin, l'HTA observée dans cet article se basait sur une augmentation spontanée de la PAS après 6 mois, sans utilisation d'Ang II. Concernant l'étude de Xue et al., cette étude s'était basé sur l'utilisation de rats mâles, avec un modèle d'HTA consistant en une infusion d'aldostérone sur un temps plus court.

Il est donc difficile de comparer les résultats de ces études avec nos données. Toutefois, nos résultats ont permis d'écarter un potentiel rôle protecteur d'ER β contre l'HTA induite par l'Ang II. Nous avons ensuite cherché à évaluer le rôle d'ER α dans notre modèle.

2.2. Rôle protecteur d'ER α

A l'inverse des résultats obtenus avec les souris ER $\beta^{-/-}$, il est apparu que les souris ER $\alpha^{-/-}$ développaient une HTA significativement plus forte que les souris WT en réponse à l'Ang II. De manière intéressante, l'HTA développée chez les souris ER $\alpha^{-/-}$ était très similaire à celle observée chez les souris ovariectomisées. Cette HTA était associée à une hypertrophie cardiaque et à un remodelage hypertrophique de l'aorte. Ces éléments soulignent clairement l'implication d'ER α dans l'effet protecteur de l'E2 contre l'HTA et ses conséquences cardiovasculaires.

L'implication d'ER α dans l'HTA avait déjà été mise en évidence grâce à l'utilisation de souris ER $\alpha^{-/-}$, par Xue et al. en 2006. Les auteurs avaient utilisé un modèle d'HTA basé sur une infusion d'Ang II similaire au nôtre et avaient pu mettre en évidence que l'absence d'ER α abolissait les effets protecteurs des œstrogènes²⁴⁰. Ce résultat avait ensuite été confirmé pharmacologiquement en utilisant un antagoniste des ERs, l'ICI-182,780. Dans une étude suivante, les auteurs avaient émis l'hypothèse qu'ER α réduisait l'HTA en inhibant l'action de l'Ang II au niveau central. Pour le vérifier, une infusion d'ICI-182,780 avait été faite directement dans le cerveau. Il était alors apparu que le blocage d'ER α au niveau central suffisait à augmenter l'HTA, montrant pour la première fois que l'effet protecteur d'ER α contre l'effet presseur de l'Ang II dépendait d'une action dans le SNC²²⁰. Ce résultat a été suivi par des études supplémentaires qui ont montré que l'effet protecteur d'ER α contre l'Ang II dépendait principalement de sa présence au niveau de l'organe subfornical^{220;221;240}. Ce dernier est une partie du cerveau dépourvue de barrière hémato-encéphalique, spécialisée dans l'homéostasie hydrominérale et osmotique. Cet organe est aussi sensible à la présence d'hormones circulantes, comme les œstrogènes^{241;221}. En réponse à ces stimuli, il envoie des informations afférentes vers les noyaux autonomes. L'action protectrice d'ER α dans cet organe est donc tout à fait cohérente.

Néanmoins, malgré ces nouvelles informations, les mécanismes cellulaires et moléculaires de cette protection par ER α n'avaient pas été élucidés.

3. Absence de rôle protecteur de la voie MISS

Une complexité inhérente à ER α est sa localisation à la fois cytoplasmique mais également membranaire. Grâce à son ancrage au niveau des cavéoles par un motif de palmitoylation, ER α régule des voies de signalisation aux effets rapides, regroupées sous le nom de Membrane Initiated Steroid Signaling. La voie membranaire MISS exerce des effets vasculoprotecteurs en stimulant deux fonctions primordiales dans le maintien de l'endothélium que sont la réendothélialisation et la vasodilatation^{9;104}.

Pour étudier son implication dans l'effet protecteur d'ER α dans l'HTA, nous avons utilisé des souris C451A, nommées d'après le nom de la mutation qui empêche la palmitoylation du récepteur et son adressage à la membrane. Nos résultats ont permis de voir que l'absence de la forme membranaire n'impactait pas le niveau de PAS en réponse à l'Ang II. Les souris C451A ne développaient pas d'HTA, ni d'hypertrophie cardiaque et aucune forme de remodelage artériel. Nous pouvons donc en conclure que la voie MISS n'est pas nécessaire à l'action protectrice du récepteur ER α . Toutefois, pour confirmer ces résultats, nous prévoyons d'utiliser l'EDC, un activateur pharmacologique de la voie MISS chez des souris OVX+Ang II. Si le traitement n'occasionne pas de diminution de la PA, notre hypothèse sera ainsi confirmée.

Il est intéressant de noter que la PAS basale des souris C451A est légèrement plus faible que celle des souris WT. Nous n'avons à l'heure actuelle aucun élément permettant d'expliquer cette observation mais nous pensons qu'il pourrait être intéressant d'évaluer la production de NO vasculaire chez ces animaux. En effet, dans un modèle d'hypotension chez le rat, une production excessive de NO au niveau vasculaire avait été suspectée. Pour le vérifier, les auteurs avaient traité les animaux avec du L-NAME et avaient observé une restauration de la PAS basale²⁴². D'autre part, la production de NO au niveau du SNC entraîne une réduction de la stimulation orthosympathique²⁴³. Il pourrait donc être intéressant d'évaluer l'activité sympathique chez nos animaux C451A. Nous avons également observé un rapport média/lumen plus élevé dans les artères mésentériques des souris C451A, expliqué par une diminution du diamètre interne pour lequel nous n'avons pas d'explication à ce jour.

Ayant écarté un éventuel rôle de la voie MISS d'ER α dans la protection contre l'HTA induite par l'Ang II, nous avons ensuite étudié l'implication de la fonction génomique d'ER α via la fonction AF-2.

4. Rôle protecteur d'AF-2 contre l'hypertension

4.1. Impact sur la réponse à l'Ang II

Parallèlement à son action membranaire, la voie nucléaire du récepteur a également des effets bénéfiques dans les vaisseaux ²⁴⁴. En 2015, Smirnova et al. ont montré que la fonction de transactivation indépendante du ligand AF-1 était nécessaire à la prévention de l'hyperplasie néointimale par l'E2 après une lésion de l'artère fémorale ¹⁸⁷. Toutefois, en dehors de cet effet, AF-1 ne semble pas nécessaire aux principaux effets vasculoprotecteurs induits par l'E2 que sont la production de NO, la réendothélialisation et la prévention de l'athérome ¹⁹³. La fonction AF-2 en revanche, est indispensable voire suffisante aux autres fonctions génomiques protectrices d'ER α . A titre d'exemple, Billon-Galés et al. ont montré en 2011 que la fonction AF-2 était nécessaire et suffisante pour la réduction des dépôts locaux de lipides dans les artères, un mécanisme hautement athéroprotecteur des œstrogènes ⁷.

Nous avons donc voulu analyser l'implication de la fonction AF-2 dans l'effet protecteur d'ER α contre l'HTA induite par l'Ang II. Pour ce faire, nous avons utilisé des souris AF2^o, déficientes pour la fonction d'activation AF-2 d'ER α . Ces souris ont développé une HTA importante en réponse à l'Ang II par rapport aux souris WT et C451A. Le profil de la PAS était très similaire à celui des souris OVX et ER α ^{-/-}. Associée à cette HTA, les souris AF2^o+Ang II développaient une hypertrophie cardiaque et un remodelage aortique hypertrophique marqué. Nous en avons conclu que l'absence d'AF-2 abolissait totalement la protection ER α -dépendante contre l'HTA induite par l'Ang II. L'action anti-hypertensive d'ER α dépend donc de ses actions génomiques, via sa fonction AF-2.

4.2. Impact sur la fonction vasculaire et les défenses anti-oxydantes

4.2.1. Impact sur la vasodilatation

L'évaluation de la fonction vasculaire aortique nous a permis d'observer une baisse significative de sa capacité vasorelaxatrice endothélium-dépendante en réponse à l'ACh. Pour s'assurer que l'effet d'AF-2 dépendait bien de l'endothélium et pas des CMLVs, nous avons utilisé le Sodium NitroPrusside (SNP), un donneur de NO, capable de dilater le muscle lisse vasculaire de manière indépendante de l'endothélium.

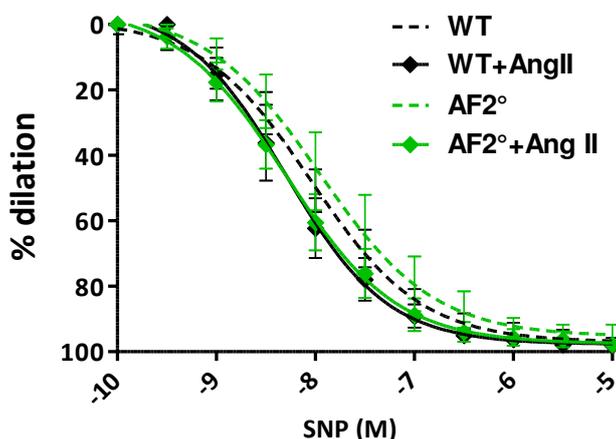


Figure 50 : Relaxation endothélium-indépendante de l'aorte chez les souris AF2° en réponse au SNP.

La fonction vasculaire aortique a été mesurée par myographie. La capacité de dilatation du muscle lisse a été évaluée par courbe concentration-réponse du Sodio NitroPrusside (SNP). (n=5-8 animaux par groupe), test two way Anova avec un post test de Bonferroni).

Nos résultats ne montrent pas de diminution de la sensibilité au NO de l'aorte chez les souris AF2° (Figure 50). Nous avons donc évalué par western blot l'expression de la eNOS dans l'aorte, principale enzyme impliquée dans la vasodilatation endothélium-dépendante. Nous avons pu observer une diminution de 60% de l'expression de l'enzyme chez les souris AF2°, hypertendues ou non. Ceci explique probablement la baisse de capacité vasodilatatrice

des aortes de ces animaux. Les résultats obtenus dans les autres groupes sont encore préliminaires et doivent être complétés.

Pour compléter ce résultat, il pourrait être intéressant d'évaluer l'activité de la eNOS en analysant son état de phosphorylation. Nous n'avons malheureusement pas pu réaliser cette manipulation en raison du délai aléatoire et souvent long entre le sacrifice de l'animal et le temps de congélation de l'aorte. Ce temps s'explique par la nécessité d'utiliser les prélèvements en myographie qui doivent être réalisés en priorité pour conserver la fonctionnalité des vaisseaux. Nous n'avons également pas pu évaluer l'expression de la eNOS dans les artères de petit calibre comme les artères mésentériques, en raison de la très faible quantité de tissu de ces vaisseaux.

4.2.2. Impact sur l'expression de l'EC-SOD

Le stress oxydatif joue un rôle prépondérant dans le remodelage et la dysfonction endothéliale au cours de l'hypertension ^{2;137}. L'enzyme EC-SOD est un puissant agent protecteur qui élimine les ROS. En 1999, Fukai et al. ont observé qu'une infusion d'Ang II pendant 7 jours à la dose d'1,1 mg/kg/j entraînait une augmentation de l'expression de l'EC-SOD, sans modification de la forme cytosolique Cu/Zn SOD ²⁴⁵. Les auteurs ont émis l'hypothèse que cette expression augmentait en réponse au stress oxydatif pour limiter ses effets délétères. Afin d'étudier l'implication de cette enzyme dans l'HTA Ang II dépendante, Gongora et al. ont montré qu'une infusion d'Ang II augmentait significativement le niveau de PAS chez des souris EC-SOD^{-/-} par rapport aux souris WT ¹²⁶.

Nous avons donc évalué l'expression de cette enzyme dans l'aorte des souris AF2°. Nos résultats ont montré qu'en réponse à l'Ang II, l'expression de l'EC-SOD était fortement majorée dans le groupe AF2°+Ang II par rapport au groupe WT+Ang II. Ce résultat suggère un statut oxydatif délétère dans l'aorte des souris AF2° hypertendues. Nous avons analysé l'expression de l'EC-SOD dans nos autres groupes d'animaux mais les résultats sont encore préliminaires. Toutefois, nous avons déjà pu observer que l'expression de l'EC-SOD était augmentée de manière similaire chez les animaux ER α ^{-/-}, même en l'absence de traitement.

Il serait intéressant de compléter ces résultats en analysant l'expression des sous-unités de la NADPHox, enzyme impliquée dans la génération des ROS. Nous souhaiterions également mesurer le stress oxydatif par des analyses chimiques ou immunohistochimiques sur des coupes d'aortes. Malgré nos essais, nous n'avons pas réussi à mettre au point un protocole de marquage au DHE suffisamment robuste et reproductible pour évaluer le stress oxydatif dans nos échantillons. Nous avons également utilisé un anticorps anti-nitrotyrosine, permettant de mesurer de manière indirecte le niveau d'oxydation des protéines, sans plus de succès à ce jour.

Les résultats obtenus avec les souris AF2° ont pu mettre en évidence la nécessité de la fonction AF-2 dans la protection d'ER α contre l'HTA. Nous avons ensuite cherché à confirmer son implication par une approche pharmacologique.

5. L'estérol prévient l'hypertension induite par l'Ang II

L'estérol (E4) est un œstrogène produit uniquement au cours de la gestation par le foie du fœtus²⁴⁶. Après la naissance, les enzymes qui participent à sa synthèse cessent d'être produites. En 2014, Abot et al. ont démontré que l'E4 avait des effets comparables à l'E2 au niveau de l'expression génique dans l'utérus, via les fonctions d'activation d'ER α ⁸. Dans les artères carotides de souris LDLr^{-/-}, l'E4 avait des effets athéroprotecteurs similaires à l'E2. En revanche, l'E4 bloquait les effets MISS-dépendants induits par l'E2. Les auteurs en ont conclu que l'E4 agissait comme un modulateur d'ER α en stimulant ses fonctions génomiques tout en bloquant ses fonctions membranaires MISS. Pour ces raisons, l'E4 est actuellement en phase de test pour de nombreuses applications thérapeutiques, notamment dans le cadre de la contraception orale et de la thérapie hormonale pour les femmes ménopausées contre les bouffées de chaleur²⁴⁷.

Nous avons pu observer que les animaux ovariectomisés traités par l'E4 ne développaient pas d'HTA en réponse à l'Ang II. Ce résultat a ainsi mis en évidence que la voie génomique d'ER α était non seulement indispensable pour réduire l'HTA, mais que sa seule stimulation suffisait à reproduire les effets protecteurs des œstrogènes, confirmant ainsi

notre hypothèse. A ce stade de l'étude, nous ne pouvons toutefois pas écarter l'implication de la fonction AF-1 dans cette protection génique. Nous prévoyons donc d'utiliser des souris AF-1^o dans un futur protocole pour déterminer un rôle éventuel de cette fonction dans la protection conférée par ER α .

L'E4 a des effets bénéfiques contre l'athérosclérose et a comme avantage de ne pas avoir d'effets secondaires pro-thrombotiques lorsqu'il est utilisé comme contraceptif oral, contrairement à l'E2^{248;249}. Compte tenu de ses effets bénéfiques contre l'HTA et de sa spécificité d'action nucléaire, nous pensons que cette molécule pourrait être un outil thérapeutique innovant pour la prévention des pathologies cardiovasculaires, notamment chez les femmes ménopausées.

CONCLUSION de l'ETUDE 1

Dans cette étude, nous avons exploré le mécanisme de protection du récepteur ER α dans l'hypertension artérielle. En utilisant un modèle d'infusion d'angiotensine II chez des souris génétiquement modifiées, nous avons confirmé que le récepteur ER α était nécessaire à l'action protectrice des hormones œstrogéniques contre l'hypertension. Nos résultats ont permis de mettre en évidence l'implication de la fonction d'activation génomique AF-2 dans ce processus, suggérant que la protection d'ER α dépend de son activité transcriptionnelle au niveau du noyau. Ces données ont été confirmées en utilisant un agoniste sélectif de la fonction nucléaire d'ER α , l'estétrol, qui a complètement aboli l'hypertension induite par l'Ang II.

Cette étude vient donc renforcer et compléter les connaissances actuelles sur le rôle protecteur d'ER α dans le système cardiovasculaire.

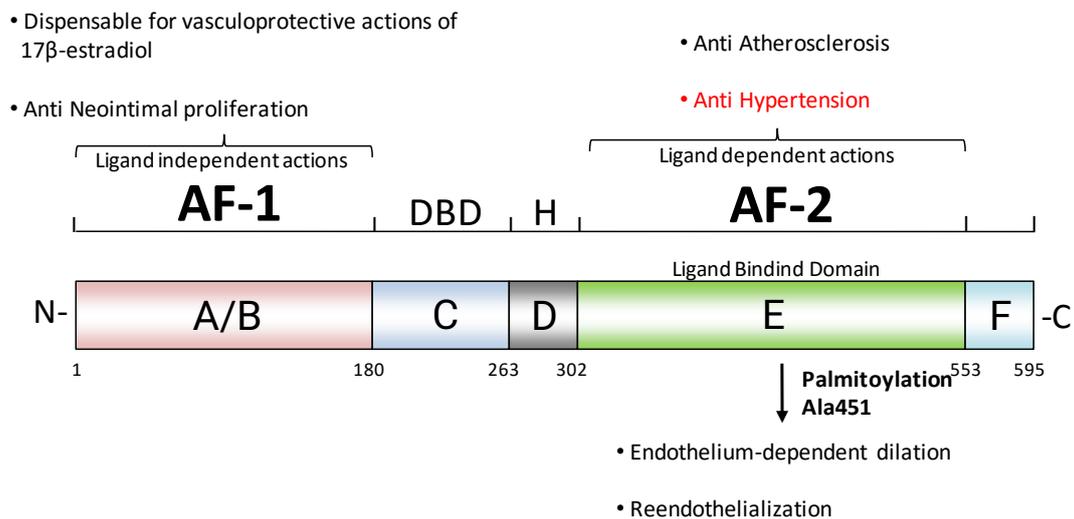
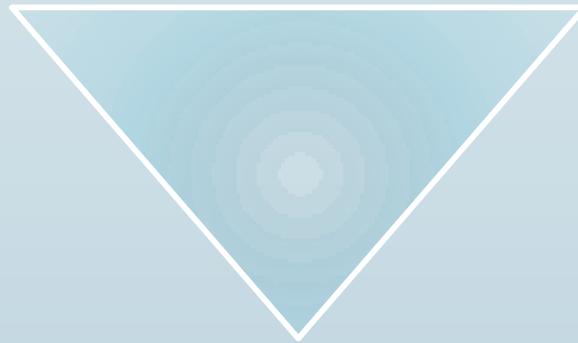


Figure 51 : Résumé des différentes actions connues des fonctions AF et MISS du récepteur ER α dans le système cardiovasculaire.

ETUDE 2

Œstrogènes

Vieillessement



Mitochondrie

Etude du rôle des œstrogènes dans le vieillissement cardiovasculaire, rénal et mitochondrial

Emmanuel Guivarc'h; Aurélien Flatres; Anne-Laure Guihot; Julie Favre; Emilie Vessières; Nada-Joe Melhem; Jamal Wakim; Gilles Kauffenstein; Pascal Reynier; Vincent Le Corre; Guillaume Geffroy; Majida Charif; Guy Lenaers; Françoise Lenfant; Laurent Loufrani; Jean-François Arnal; Vincent Procaccio; Daniel Henrion

INTRODUCTION

Vieillessement

Mitochondrie

Œstrogènes

Rein

ER α

INTRODUCTION de l'ETUDE 2

Cette introduction ne développe pas les éléments déjà décrits dans la première étude. Elle a été réalisée grâce à l'aide d'un livre et de trois revues de référence sur les sujets abordés.^{44;250;251;252}. Les figures illustratives ont été réalisées grâce aux éléments de la banque d'images Servier. Les résultats présentés dans cette étude ont été obtenus en collaboration avec Aurélien Flatres, Nada-Joe Melhem et l'équipe du Pr. Procaccio.

1. Le vieillissement

1.1. Généralités sur le vieillissement

L'espérance de vie des êtres humains augmente partout dans le monde et avec elle, la proportion de personnes âgées. En 2030, on estime que 20% de la population mondiale sera âgée de plus de 65 ans et que les MCV représenteront 40% des décès⁴⁴.

La majorité de ces pathologies comme l'AVC et les coronaropathies apparaissent chez les personnes âgées et rarement chez les sujets jeunes. Cet élément résulte d'une forte corrélation entre l'âge et le risque cardiovasculaire. Grâce aux données de l'étude de Framingham, une étude majeure sur le risque cardiovasculaire, le vieillissement est classé comme un facteur de risque non-modifiable des MCV²⁵³.

Malgré cette corrélation, la plupart des études portant sur les MCV sont réalisées en utilisant des modèles animaux jeunes, en dehors du processus de vieillissement qui reste encore mal compris, voire mystérieux.

Gilbert S.F. définit le vieillissement comme une « *détérioration liée au temps des fonctions physiologiques nécessaires à la survie et à la fertilité* »²⁵⁰. La différence entre ce processus et une pathologie propre est qu'il touche tous les organismes et ce de manière irréversible. Tous les individus ont une durée de vie maximale, inhérente à leur espèce. Chez l'humain, on estime qu'elle se situe aux environs de 126 ans²⁵⁴. On considère que l'âge à partir duquel l'âge devient un facteur de risque de pathologies cardiovasculaires se situe à 65 ans²⁵⁵. Chez la souris C57BL/6, l'âge seuil du vieillissement se situe à partir 15 mois et la durée de vie maximale est de 36 mois selon le laboratoire Jackson, producteur de ces souris.

1.2. Causes du vieillissement

Le vieillissement est un mécanisme multifactoriel qui se caractérise par une sénescence des cellules et des organes. Plusieurs facteurs ont été identifiés comme causes possibles de ce processus.

1.2.1. Rôle du stress oxydatif

Une des principales explications du processus de vieillissement réside dans le fonctionnement des cellules eucaryotes. Pour produire de l'énergie sous forme d'adénosine triphosphate (ATP), la cellule utilise des nutriments et de l'oxygène grâce à ses mitochondries. Comme nous l'avons évoqué dans l'introduction de la première étude, une faible proportion de l'oxygène n'est pas suffisamment réduite, aboutissant à la production de ROS. Ces molécules hautement réactives endommagent les lipides, les protéines mais également les acides nucléiques^{256;257}. Ces dommages aboutissent à des changements délétères des structures et des fonctions cellulaires. Pour démontrer le lien entre stress oxydatif et vieillissement, Orr et Sohal ainsi que Parkes et al. ont utilisé des drosophiles surexprimant l'enzyme SOD qui réduit de manière active le niveau de ROS. Ces animaux vivaient en moyenne 30 à 40% plus longtemps que des animaux contrôles^{258;259}. Ces résultats ont par ailleurs été observés chez d'autres espèces animales comme le *C. elegans*^{260;261}. Ces données ont confirmé l'impact du stress oxydatif sur la sénescence cellulaire.

Le lien entre ROS et vieillissement a aussi été exploré chez les mammifères. Néanmoins, en utilisant des souris sur-exprimant la Mn-SOD, Ho et al. ainsi que Melov et al. n'ont pas mis en évidence d'augmentation de la durée de vie des animaux^{262;263}. Gilbert S.F. émet l'hypothèse que cette différence avec des animaux invertébrés pourrait résider dans la plus grande redondance du génome des mammifères qui entrainerait des phénomènes de compensation qui seraient mis en place plus facilement chez ces derniers²⁵⁰.

Chez l'Homme, la restriction calorique est associée à une baisse de la consommation d'énergie et à une plus faible production de ROS²⁶⁴. En 1999, Lee et al. ont montré qu'une restriction calorique retardait le profil d'expression génique lié au vieillissement dans le

muscle squelettique de souris ²⁶⁵. Les auteurs avaient examiné 6347 gènes régulant le métabolisme et la synthèse des macromolécules cellulaires. Selon les auteurs, cet effet pourrait être dû à un shift métabolique favorisant le renouvellement des protéines et à une réduction des mutations génétiques observées au cours du vieillissement.

Le stress oxydatif constitue donc une cause majeure du vieillissement. Toutefois, elle n'est pas la seule explication de ce phénomène.

1.2.2. Diminution des capacités réparatrices de l'ADN

Une théorie a émergé au début du XX^{ème} siècle suggérant que l'accumulation de traumatismes au cours de la vie d'un organisme augmente le nombre de mutations génétiques et réduit l'efficacité des enzymes cellulaires ²⁶⁶. Des mutations dans les gènes codant pour les enzymes de réplication ou de réparation de l'ADN accélèreraient ainsi la sénescence de l'organisme ²⁶⁷.

Au cours de la vie d'un organisme, un grand nombre de facteurs favorisent l'apparition de mutations génétiques. Chez l'Homme, ces mutations peuvent être responsables de l'apparition de cancers (Tableau 14). A ces différentes causes nous pouvons également ajouter des facteurs environnementaux et comportementaux comme l'exposition aux ultraviolets, la consommation excessive d'alcool ou une alimentation mal équilibrée ^{268;269;270}.

Le lien entre mutations génétiques et vieillissement a été renforcé par les travaux de Murray et Holliday en 1981 qui ont observé que les ADN polymérase des cellules sénescents étaient moins efficaces dans la réplication que celles des cellules jeunes et produisaient plus de mutations ²⁷¹. En 1996, Yu et al. ont observé que les patients atteints du syndrome de Werner, une maladie entraînant un vieillissement prématuré, présentaient des mutations des gènes codant pour les ADN hélicases. Ces enzymes sont fortement impliquées dans la réplication de l'ADN ²⁷². Ces résultats ont été confirmés plus tard par Sun et al. dans un syndrome de vieillissement différent, le syndrome de Bloom ²⁷³.

Tableau 14 : Liste non-exhaustive des causes biologiques, biophysiques et biochimiques associées aux mutations génétiques chez l'Homme (source ²⁷⁴).

Élément carcinogène	Sites cancéreux	Sources
Benzène	Sang et Lymphe	Pétrole, Peinture, détergent, caoutchouc
Cadmium	Prostate	Batterie, peinture
Oxyde d'éthylène	Sang	Gazs, agent de maturation des fruits
Nickel	Nez, poumons	Batteries, céramiques, alliages ferreux
Radon	Poumons	Sous-sols, mines, uranium
Chlorure de vinyle	Foie	Réfrigérateurs, colles
Fumée de cigarette/pollution de l'air	Poumons, côlon	Cigarette, pollution de l'air
Gazoil, essence	Sang, Poumons	Gazoil, essence
Formaldéhyde	Nez, Pharynx	Hôpitaux/Laboratoires
Colorants pour cheveux	Vessie	Coiffeurs et barbiers
Radiations ionisantes	Moelle osseuse	Radiographie/Radiologie
Virus de l'hépatite B et C	Foie	Hôpital, consommation de drogues
Virus de l'Herpès	Cervix, peau, tête/cou	Partenaires sexuels multiples
Helico-bacter Pylori	Estomac	Infection chronique bactérienne

Ces données ont clairement mis en évidence la corrélation directe entre mutations génétiques et vieillissement de l'organisme. Les mutations sont aussi étroitement liées avec le stress oxydatif, facteur majeur de dommages de l'ADN ²⁷⁵.

1.2.3. Raccourcissement des télomères

Les télomères sont des séquences d'ADN riches en guanine situées aux extrémités des chromosomes. A chaque division cellulaire, ces séquences se raccourcissent un peu plus car elles ne sont pas répliquées par l'ADN polymérase. L'enzyme télomérase a pour rôle de maintenir les télomères, prévenant ainsi leur raccourcissement. Chez l'Homme comme chez tous les animaux sexués, l'activité télomérase est présente principalement dans les cellules germinales, dans une moindre mesure dans les cellules souches mais est quasiment indétectable dans les cellules somatiques ²⁷⁶. Lorsque la taille des télomères devient inférieure à un certain seuil critique, la cellule rentre alors en apoptose et meurt ²⁷⁷.

A la fin du XX^{ème} siècle, une théorie émerge suggérant que les télomères seraient un mécanisme naturel du vieillissement cellulaire, destiné à empêcher la réplication des cellules altérées²⁵⁰. Pour vérifier cette théorie, des équipes de recherche ont fait surexprimer l'enzyme télomérase à des fibroblastes en culture. Ces équipes ont ainsi pu observer que ces cellules continuaient de se diviser bien plus longtemps que des cellules contrôles^{278;279}. Si le lien entre raccourcissement des télomères et vieillissement a ainsi été montré, rien n'indique que cette augmentation de la durée de vie était associée à une absence d'altérations dues au vieillissement.

De manière intéressante, un lien entre les hormones œstrogéniques et l'activité télomérase a récemment été démontré²⁸⁰. En 2015, Cen et al. ont étudié l'activité et l'expression de l'enzyme télomérase dans le cœur, le foie et le cerveau de rattes. Deux groupes d'animaux ont été utilisés, le premier constitué de rattes ovariectomisées, le deuxième constitué de rattes ovariectomisées traitées à l'E2. Les auteurs ont ainsi montré que des rattes n'ayant pas d'E2 présentaient une activité télomérase plus basse que des rattes recevant de l'E2, sans toutefois indiquer si l'espérance de vie était accrue avec le traitement œstrogénique²⁸⁰.

1.2.4. Vieillissement mitochondrial

Une autre théorie suggère que le vieillissement cellulaire est causé par un vieillissement des mitochondries. Ces dernières possèdent un ADN propre, l'ADN mitochondrial (ADNmt) qui code pour une faible proportion des protéines de cet organelle. A l'inverse de l'ADN nucléaire qui est fortement protégé, l'ADNmt ne dispose pas de la machinerie de réparation et de réplication contenue dans le noyau. Au cours de la vie cellulaire, il accumule donc les mutations génétiques 10 à 20 fois plus vite que son homologue génomique²⁸¹. Les cellules possèdent plusieurs centaines à plusieurs milliers de copies d'ADNmt ce qui permet de compenser les mutations présentes par d'autres mitochondries. La cellule finit ainsi par posséder un mélange hétéroplasmique de mitochondries saines et pathologiques. Si l'hétéroplasmie est faible, la cellule reste

fonctionnelle et conserve une durée de vie normale. En revanche, au-delà d'un certain seuil d'hétéroplasmie, la fonction mitochondriale diminue, aboutissant à une augmentation du stress oxydatif, à une baisse de la capacité de production d'énergie et à une augmentation de l'apoptose^{250;282;283}. L'augmentation du niveau de ROS participe ensuite à la dégradation de l'ADNmt. Les mitochondries touchées produisent alors plus de ROS, aboutissant à la mise en place d'un cercle vicieux (Figure 52)²⁸⁴.

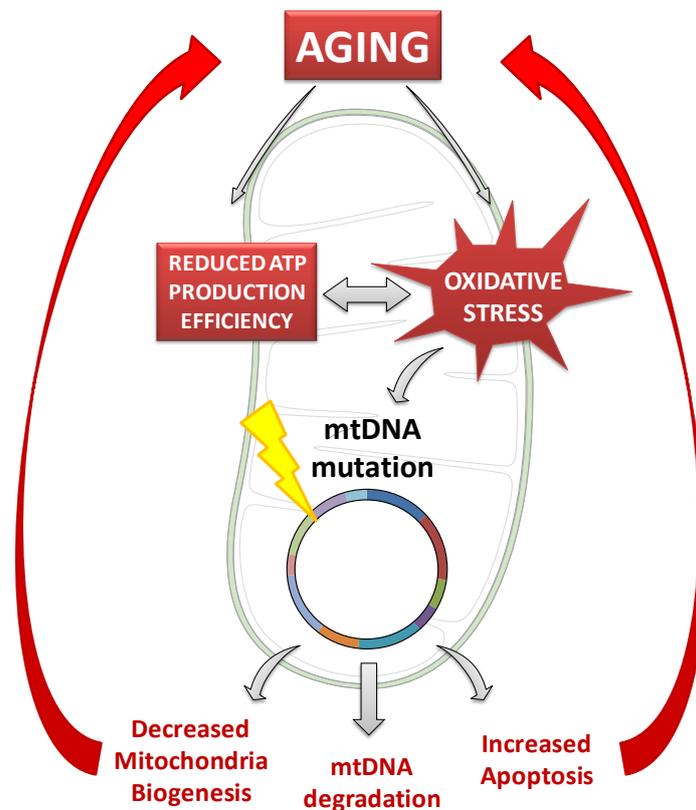


Figure 52 : Relation entre vieillissement et dysfonction mitochondriale.

Le vieillissement entraîne une accumulation des mutations de l'ADNmt. Les mitochondries se détériorent, aboutissant à une altération des fonctions cellulaires. Ces mitochondries sénescentes produisent plus de ROS, qui aggravent les altérations mitochondriales dues au vieillissement. Un cercle vicieux est mis en place et qui aboutit à la mort cellulaire.

Il a été montré qu'en cas de stress oxydatif important, l'enzyme télomérase se transloquait vers la mitochondrie et entraînait une réduction du stress oxydatif et une

amélioration de la fonction mitochondriale ²⁸⁵. Ces données soulignent la relation complexe entre les différents facteurs du vieillissement cellulaire.

En 2016, Wiley et al. ont utilisé des rayons X et des agents chimiques pour muter l'ADNmt de cellules en culture ou de souris. Les auteurs ont observé que la dysfonction mitochondriale entraînait une sénescence prématurée qui diminuait les capacités de différenciation et de croissance cellulaires ²⁸⁶. Ce vieillissement accéléré se caractérisait également par la diminution du ratio NAD⁺/NADH, reflet direct d'une altération de la fonction mitochondriale.

Pour toutes ces raisons, les mitochondries sont considérées comme « l'horloge biologique » de la cellule. Leur dégradation entraîne l'apparition de nombreuses pathologies immunologiques, neurologiques, cancéreuses, cardiovasculaires ou encore rénales ^{287;251;288}.

1.2.5. Rôle de p66^{shc} dans le vieillissement et la mitochondrie

Les protéines p66^{shc}, p52^{shc} et p46^{shc} sont d'importants agents régulant la fonction mitochondriale. Elles sont codées à partir du gène SHC1 ²⁸⁹. Ces protéines n'ont aucune activité enzymatique mais possèdent de nombreux domaines de recrutements protéiques ²⁹⁰. Elles régulent ainsi des voies de signalisation impliquées dans de nombreux processus biologiques comme la production de ROS et l'apoptose ²⁹¹ (Figure 53). Leurs dérégulations sont responsables de nombreuses pathologies comme le cancer, les maladies neurodégénératives et les MCV ^{292;293;294}.

La protéine p66^{shc} est considérée comme un déterminant négatif de la durée de vie des mammifères ²⁹⁵. En 2008, Cosentino et al. ont souligné son importance dans la physiopathologie en montrant son implication à la fois dans le vieillissement mais également dans la progression des MCV ²⁹⁶. En utilisant des souris p66^{shc^{-/-}}, Migliaccio et al. ont observé une baisse du stress oxydatif et un allongement de la durée de vie des animaux ²⁸⁹. Dans un modèle d'AVC ischémique, les souris p66^{shc^{-/-}} présentaient une baisse importante des lésions cérébrales ²⁹⁷.

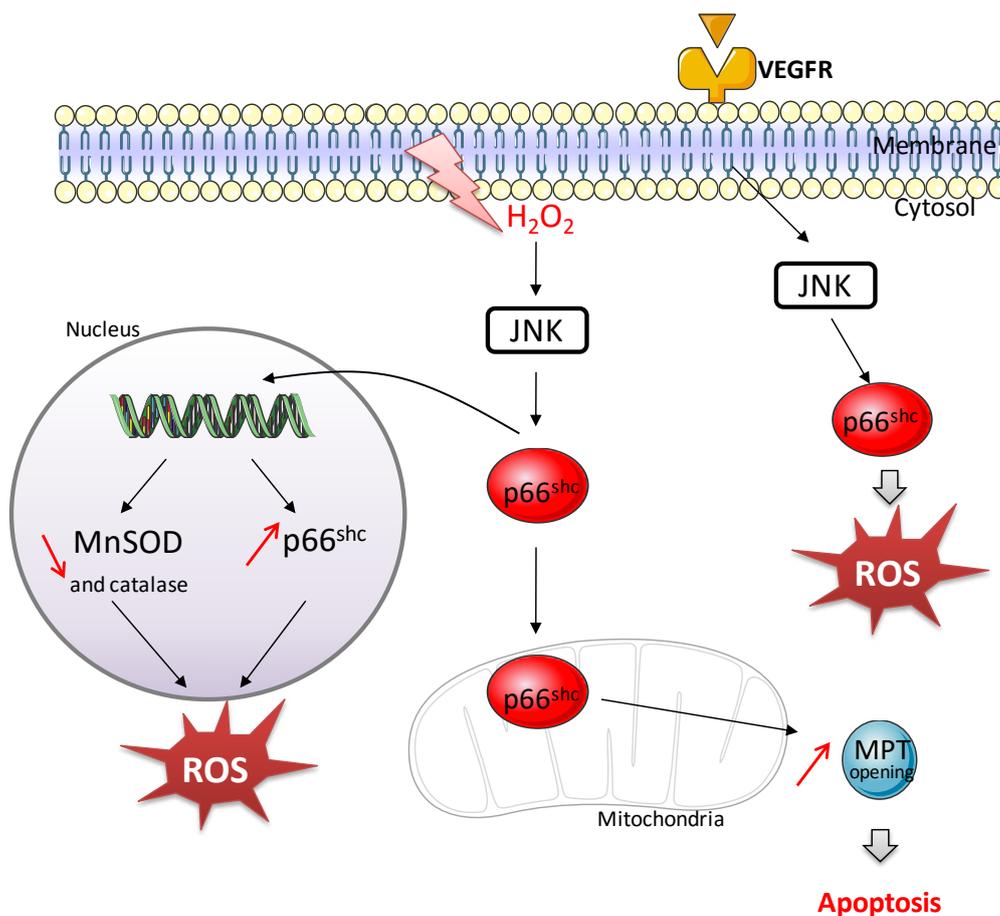


Figure 53 : p66^{shc} joue un rôle clé dans la régulation du stress oxydatif et l'apoptose (modifié à partir de ²⁹⁰).

La protéine p66^{shc} peut être activée par des récepteurs tyrosine kinase comme le VEGFR, mais également l'H₂O₂ et les ultraviolets. Cette protéine augmente la production de ROS, diminue l'expression des enzymes anti-oxydantes et augmente l'apoptose.

Dans le contexte du diabète chez la souris, la protéine p66^{shc} est activée au niveau vasculaire et entraîne une augmentation de la production de ROS et de l'apoptose en altérant les mitochondries ²⁹⁸. Toutefois, lorsque la glycémie redevient normale, l'activité de p66^{shc} reste élevée, participant à la poursuite de la glycation des protéines, dans un phénomène qualifié de « mémoire du diabète ». En 2012, Paneni et al. ont démontré que la suppression de p66^{shc} *in vitro* et *in vivo* entraînait la disparition de cette mémoire diabétique, une baisse de la production de ROS et une réduction de la libération du cytochrome C suite à la normalisation de la glycémie ²⁹⁸.

Pour explorer le lien entre p66^{shc} et la mitochondrie, Savino et al. ont évalué l'implication de cette protéine dans l'encéphalomyélite, une pathologie neuroinflammatoire sévère. Celle-ci se caractérise par une ouverture excessive du pore de transition mitochondriale (MTPT) qui participe à la mort cellulaire (Figure 53)²⁹⁹. Les auteurs ont pu observer que les souris p66^{shc-/-} présentaient une forte réduction de l'ouverture du MTPT et de l'apoptose par rapport aux souris sauvages en réponse à la pathologie³⁰⁰.

Ces données ont pu démontré le rôle délétère de la protéine p66^{shc} dans le vieillissement cellulaire et la fonction mitochondriale.

1.2.6. Fusion et fission mitochondriales

La fusion et la fission mitochondriales sont des processus majeurs contrôlant sa fonction. Contrairement à une idée préconçue, les mitochondries ne sont pas des organites isolés dans la cellule, agissant de manière individuelle. Au contraire, elles interagissent en permanence sous forme d'un réseau dynamique complexe. Pour ce faire, elles réalisent des fusions et des fissions fréquentes³⁰¹. Pour une fonction mitochondriale normale, l'équilibre entre fusion et fission doit être maintenu. La perturbation de cet équilibre aboutit à des désordres pathologiques³⁰².

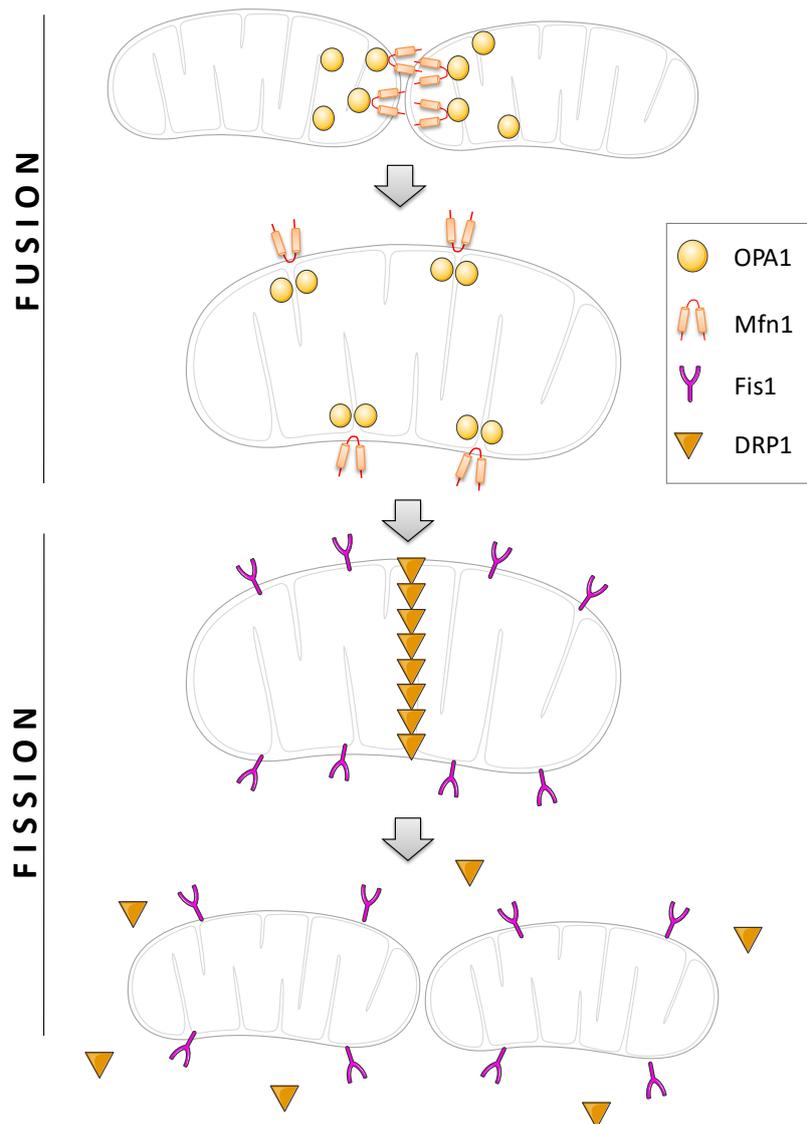


Figure 54 : Fusion et fission mitochondriales (modifiée à partir de ³⁰³).

Les mitochondries fusionnent grâce à l'action des protéines OPA1 et Mfn1, qui permettent la fusion des membranes mitochondriales. Les mitochondries forment ainsi un réseau complexe dans la cellule, permettant l'échange de protéines, de nutriments et d'ADNmt. Ce réseau peut se dissocier grâce à l'action des enzymes DRP1 et Fis1, qui séparent l'organite en répartissant équitablement les composants mitochondriaux entre les deux nouvelles entités.

1.2.6.1. Rôle d'OPA-1

La fusion est primordiale pour créer un réseau tubulaire mitochondrial stable et permettre un partage des composants mitochondriaux (Figure 54). Ce réseau facilite également le transfert d'énergie entre le centre et la périphérie de la cellule, permettant un bon fonctionnement cellulaire ³⁰⁴. La fusion mitochondriale est régulée par une GTPase nommée

Optic Atrophy type 1 (OPA1), qui interagit avec les protéines Mitofusine 1 et 2 (Mfn1) et (Mfn2). OPA-1 régule positivement l'efficacité de la chaîne respiratoire et la bioénergétique mitochondriale³⁰⁵. Cette protéine prévient également l'apoptose en inhibant la libération du cytochrome C³⁰⁶. A noter qu'une délétion complète d'OPA-1 n'est pas viable chez la souris ce qui souligne son importance dans la cellule³⁰⁷.

Les patients ayant une perte de fonction d'OPA-1 présentent une atrophie optique dominante, caractérisée par une dégénération des cellules ganglionnaires de la rétine et une cécité³⁰⁸. Il a ainsi été observé qu'en cas de déficience d'OPA-1, la fission mitochondriale devenait prépondérante³⁰². Cet effet aboutit à une destruction du réseau mitochondrial, à une diminution de la quantité d'ADNmt et à une augmentation du stress oxydatif³⁰⁹.

Dans un modèle d'ischémie-reperfusion, une diminution d'expression d'OPA1 augmente les lésions myocardiques³¹⁰. Pour mieux comprendre son rôle dans le système cardiovasculaire, le rôle d'OPA1 dans l'HTA est actuellement étudié au sein de notre laboratoire.

1.2.6.2. Rôle de DRP1

La fission permet aux mitochondries de se diviser et aux mitochondries filles de recevoir les composants nécessaires à leur fonctionnement. A l'inverse d'OPA-1, la GTPase Dynamine-Related Protein 1 (DRP1) participe au processus de fission mitochondriale, en association avec la protéine Fis1³¹¹ (Figure 54). La fission mitochondriale joue un rôle clé dans l'apoptose cellulaire^{302;312}. Toutefois, contrairement à la fusion, la fission a des effets délétères. Dans un contexte d'insuffisance cardiaque, un traitement par l'aide d'un inhibiteur de DRP1 (le Mdivi-1) a permis d'améliorer la fonction cardiaque en restaurant l'homéostasie mitochondriale³¹³. Cet effet a été imputé à une inhibition de l'apoptose favorisée par la fission³¹⁴.

S'il existe un nombre de données limité sur l'impact d'OPA-1 et de DRP1 sur le vieillissement et les pathologies cardiovasculaires et rénales, leur rôle dans les pathologies neurodégénératives a été très étudié. De manière globale et dans un contexte pathologique, un déséquilibre favorisant la fission a des effets délétères tandis qu'un excès de fusion tend à être bénéfique³⁰².

A travers les différents éléments que nous venons de détailler, il apparait clairement que la mitochondrie joue un rôle primordial dans le vieillissement cellulaire. Toutefois, tous les organes ne sont pas impactés de la même manière par le vieillissement. Certains organes comme le rein et le muscle cardiaque, particulièrement consommateurs d'énergie et riches en mitochondries, subissent des altérations plus importantes au cours du vieillissement^{315;316;317;318;319}.

2. Vieillissement du système cardiovasculaire et rénal

2.1. Vieillissement du cœur

Chez l'être humain, le vieillissement entraîne une augmentation du poids du cœur, causée par une hypertrophie du VG³²⁰. Au niveau cellulaire, le vieillissement est associé à une augmentation de l'apoptose des cardiomyocytes. En parallèle, les dépôts de collagène augmentent et entraînent une rigidification et la fibrose cardiaque³²¹ (Figure 55). Le vieillissement se caractérise également par la calcification des valves cardiaques³²². Ces modifications aboutissent à des changements structurels et fonctionnels, comme la réduction du remplissage au cours de la diastole et de la réponse à la stimulation catécholaminergique^{323;324}. La fraction d'éjection systolique ainsi que le rythme cardiaque sont également réduits³²⁵.

2.2. Vieillissement de l'arbre vasculaire

Les artères des sujets âgés subissent également des altérations au cours du vieillissement (Figure 55). La lumière des artères de gros calibre devient plus large, tandis que la paroi s'épaissit, particulièrement au niveau de l'intima et de la média³²⁶. Les CMLVs sont plus présentes au niveau du sous-endothélium, en raison d'une plus forte prolifération et migration³²¹. Ce phénomène s'accompagne d'une augmentation des dépôts de collagène, d'élastine et de protéoglycanes ainsi qu'une infiltration de leucocytes et de macrophages. D'autres substances comme les molécules d'adhésion, les MMPs, le TGF- β 1 et les cytokines pro-inflammatoires sont aussi davantage présentes dans l'endothélium^{327;328}.

Au niveau moléculaire et cellulaire, ces changements aboutissent à une augmentation de l'inflammation et du stress oxydatif. Au niveau du tissu, ces changements entraînent une augmentation de la rigidité artérielle, un épaississement de la paroi et une dysfonction endothéliale ⁴⁴. En résulte une augmentation de la résistance périphérique qui accroît la PA, les processus athéromateux et consécutivement, le risque d'AVC et d'infarctus du myocarde

325

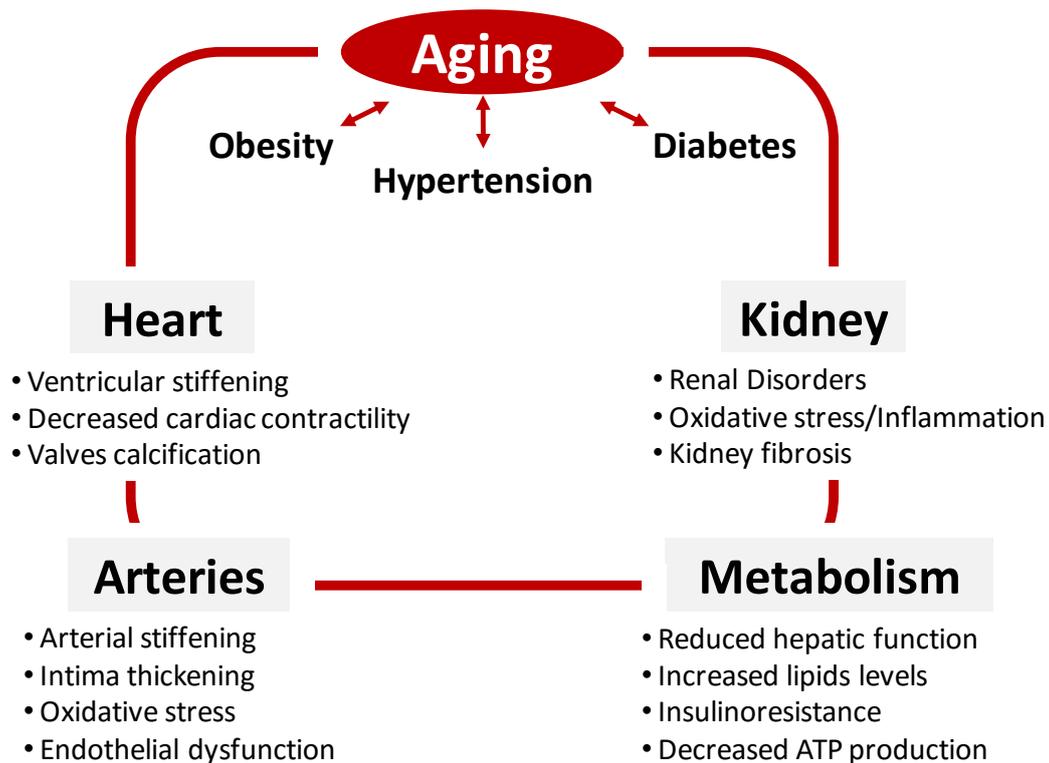


Figure 55 : Effets du vieillissement sur le système cardiovasculaire et rénal au cours du vieillissement.

Le vieillissement se caractérise par des altérations du système cardiovasculaire, comme une baisse de la contractilité cardiaque, une rigidification artérielle et la dysfonction endothéliale. Au niveau rénal, l'âge est associé à une augmentation de l'inflammation et de la fibrose. Au niveau métabolique, l'organisme devient moins sensible à l'insuline et la production d'ATP diminue. Les facteurs de risque comme l'obésité, l'hypertension ou le diabète aggrave encore davantage ces altérations.

2.3. Vieillessement du rein

2.3.1. Modifications du rein au cours du vieillissement

2.3.1.1. Modifications fonctionnelles

Le rein est un organe dont le vieillissement est étroitement associé à l'apparition de pathologies cardiovasculaires. On estime que c'est l'organe dont les changements structuraux et fonctionnels sont les plus drastiques au cours du vieillissement²⁵¹. Sa fonction est de filtrer le sang pour en épurer les déchets par l'urine, tout en conservant les éléments nutritifs et biologiques indispensables au bon fonctionnement de l'organisme. Il permet par ailleurs d'évacuer l'excès de fluide et régule la PA³²⁹. La fonction rénale peut être évaluée à partir de la mesure du débit de filtration glomérulaire (DFG). A partir de 40 ans, le DFG diminue progressivement d'environ 0,8 mL/min/1,73 m² chaque année^{330;331}. Il est important de noter que cette diminution est extrêmement hétérogène entre les individus. Un certain nombre de facteurs de risque peuvent l'accélérer (Tableau 15).

Tableau 15 : Facteurs de risque accélérant la diminution de la fonction rénale au cours du vieillissement.

Facteurs de risque	Références
Hypertension artérielle	332:333
Exposition au plomb	334
Tabac	335:333
Dyslipidémies	333
Athérosclérose	335
Marqueurs pro-inflammatoires	336:337
Produits avancés de glycation	337
Obésité	338:339
Sexe masculin	340
Antécédent de lésion rénale	341

La dysfonction rénale qui a lieu au cours du vieillissement se caractérise par la hausse de la concentration plasmatique en créatinine, un produit de dégradation issu du métabolisme musculaire et cérébral ²⁵¹.

2.3.1.2. Modifications structurelles

Au niveau structurel, le vieillissement rénal est aussi caractérisé par une augmentation des dépôts de collagène autour de l'unité de filtration du rein, le glomérule. Ce processus nommé glomérulosclérose est défini comme l'ensemble des lésions non-spécifiques aboutissant à la lente destruction du glomérule ³⁴². A l'âge de 40 ans, moins de 5% des glomérules sont sclérotiques tandis que cette proportion avoisine les 30% après 80 ans ^{343;344}. Les glomérules sclérotiques ont moins de surface de filtration disponible, ce qui explique la baisse graduelle du DFG au cours du vieillissement. Le nombre de glomérules diminue lui aussi au cours du vieillissement ³⁴⁵.

La fibrose rénale touche aussi les autres structures rénales comme les tubules transverses. Le vieillissement du rein se caractérise de plus par une réduction de la taille et du poids du rein ²⁵¹ (Figure 55). La protéine TGF- β 1 joue un rôle clé en augmentant la progression de la fibrose et l'inflammation rénale ³⁴⁶. Elle active également la protéine caspase-7 pro-apoptotique et qui participe à l'aggravation des lésions fibrotiques rénales ³⁴⁷.

2.3.2. Implication du SRAA dans le vieillissement rénal

L'activité du rein dépend de sa perfusion sanguine par le biais des artères rénales. Au cours du vieillissement, ces artères deviennent plus sensibles aux agents vasoconstricteurs et moins sensibles aux agents vasodilatateurs ^{348;349;350}. En 1994, Anderson et al. ont montré que l'utilisation d'inhibiteurs de l'enzyme de conversion de l'Ang II (ECA) permettait de réduire les dommages rénaux chez le rat vieillissant ³⁵¹. Ces résultats avaient précédemment été observés chez la souris. Les auteurs avaient également rapporté un allongement de la durée de vie des animaux traités ³⁵². Comme nous l'avons développé dans l'introduction de la première

étude, le SRAA joue un rôle clé dans la régulation de la PA et de la perfusion rénale. Ce système est également impacté par le vieillissement et est à l'origine de troubles hydrosodés et de lésions rénales ³⁵³.

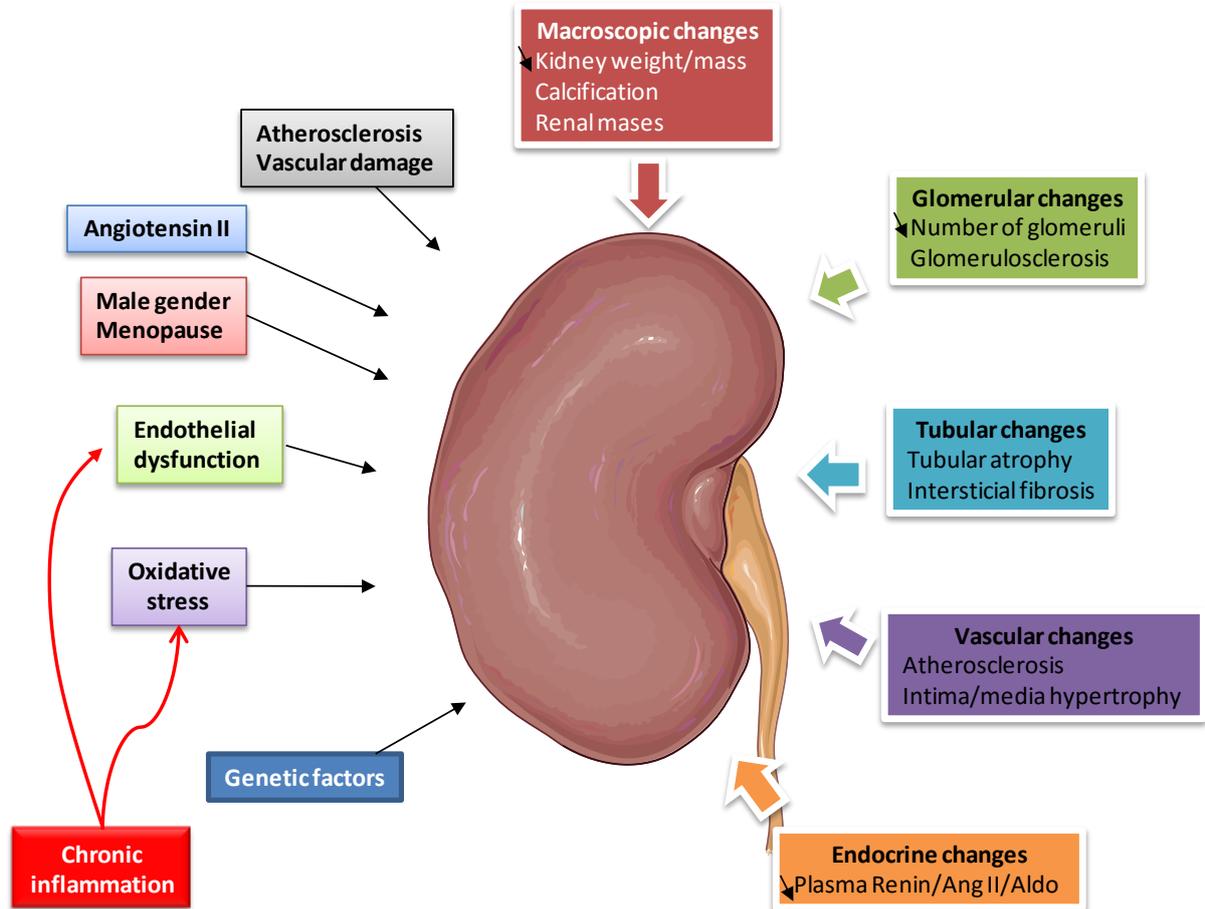


Figure 56 : Changements macroscopiques, microscopiques et facteurs de risques dans le vieillissement rénal (modifié à partir de ³⁵⁴).

Le vieillissement se caractérise par des changements délétères qui altèrent la structure et la fonction rénale. Le rein voit sa masse diminuée avec l'âge, avec une réduction du nombre de gloméruli, une augmentation de la fibrose, du stress oxydatif et de l'inflammation.

En 1995, Jung et al. ont noté une baisse de l'activité du SRAA dans le rein au cours du vieillissement chez le rat. Cette baisse se caractérisait par une réduction de l'expression des ARNm de la rénine et de l'ECA ^{355;356}. Les taux plasmatiques de rénine et d'aldostérone étaient également réduits ³⁵⁶. Cette baisse d'activité entraîne une baisse de la réponse aux agents hypertenseurs comme les IEC ³⁵⁶. Une baisse de la production de monoxyde d'azote

(NO) au niveau des artères rénales a aussi été observée lors du vieillissement ³⁴⁰. Cette diminution augmente la vasoconstriction rénale, la rétention sodée et l'augmentation de la production de la matrice extracellulaire ^{357;358}. Ces éléments ont ainsi une conséquence directe sur la baisse du DFG (Figure 56). En 2003, Ferder et al. montrent que le blocage du SRAA à l'aide d'IEC chez le rat Wistar prévient les altérations rénales dues au vieillissement comme la glomérulosclérose, la fibrose interstitielle et la baisse du DFG ³⁵⁹.

3. Rôle des œstrogènes dans le vieillissement et la mitochondrie

3.1. Les œstrogènes protègent le rein au cours du vieillissement

Tout comme c'est le cas dans la plupart des MCV, le risque de maladie rénale chronique est plus faible chez les femmes que chez les hommes ^{360;361}. Les processus pathologiques observés dans le rein vieillissant sont tous atténués chez les femmes ³⁶². Cette différence s'explique par l'action protectrice des hormones œstrogéniques comme l'E2. En étudiant une cohorte de 51 122 hommes et de 56 070 femmes, Iseki et al. ont mis en évidence que le sexe masculin était un facteur de risque de développer une maladie rénale chronique ³⁶³. Chez les hommes, la présence excessive d'hormones androgènes comme la testostérone est directement responsable de l'accélération de la baisse du DFG ³⁶⁴. En traitant des rats avec ces hormones, Tanaka et al. ont augmenté les dégâts rénaux et la dysfonction rénale observés lors du vieillissement ³⁶⁵.

Par ailleurs, la testostérone augmente l'activité du SRAA tandis que l'E2 la réduit, comme nous avons pu le voir dans la première étude ³⁶⁶. De manière logique, l'hormonothérapie par l'E2 a permis de réduire le vieillissement des artères rénales chez le rat ³⁶². La production de NO au niveau des artères rénales est également plus importante chez les femmes que chez les hommes ³⁶⁷.

3.2. Hormones œstrogéniques et mitochondrie

3.2.1. Implication des récepteurs aux œstrogènes ER α et ER β dans la régulation de la fonction mitochondriale

En 2007, Gavrilova-Jordan et Price expliquaient que l'étude de l'impact des hormones stéroïdes sur la fonction mitochondriale représentait « une nouvelle ère d'investigation »³⁶⁸. Cette constatation résultait de la découverte de la localisation des récepteurs des glucocorticoïdes, des œstrogènes, des androgènes et de la progestérone dans la mitochondrie. Mais le rôle de ces hormones vis-à-vis de cet organe restait inconnu. Plusieurs études se sont depuis penchées sur un potentiel rôle protecteur des hormones œstrogéniques dans la mitochondrie.

3.2.1.1. Rôle des œstrogènes dans la mitochondrie

L'ADNmt est un petit ADN circulaire de 16,5 kilobases codant pour 13 ARNm (messager), 2 ARNr (ribosomique) et 22 ARNt (transfert). Il y a environ 10^3 à 10^4 copies d'ADNmt par cellule de mammifère³⁶⁹. Sur les 80 protéines nécessaires à la chaîne respiratoire mitochondriale, 13 sont encodées par l'ADNmt, le reste étant fourni par l'ADN nucléaire. Une fois produites, les protéines sont adressées à la mitochondrie par des translocases³⁷⁰. Il a été montré que l'E2 augmente l'expression des protéines participant à la chaîne respiratoire mitochondriale comme la sous-unité E de l'ATP-synthase ainsi que de nombreux autres gènes³⁷¹.

Le facteur de transcription NRF-1 est impliqué dans la régulation de l'expression des protéines mitochondriales et sa délétion par modification génique est létale au niveau embryonnaire³⁷². Stirone et al. ont observé que le traitement par l'E2 chez des rattes ovariectomisées était associé à une augmentation de l'expression de NRF-1, une amélioration de la capacité mitochondriale et une réduction du stress oxydatif au niveau des vaisseaux du cerveau³⁷². Ces résultats ont été observés dans les cellules MCF-7 du sein et H1793 du poumon par Mattingly et al. qui ont observé que le traitement par l'E2 augmentait

l'expression de NRF-1³⁷³. Toutefois le mécanisme moléculaire sous-jacent reste encore inconnu.

3.2.1.2. Implication des récepteurs aux œstrogènes dans la biogénèse mitochondriale

La biogénèse mitochondriale est définie comme la croissance et la division de mitochondries préexistantes³⁷⁴. Elle implique une action coordonnée de l'ADNmt et de protéines produites par l'ADN génomique comme NRF-1, NRF-2, Tfam et PGC-1 α qui régulent l'expression des gènes mitochondriaux encodés par l'ADN nucléaire²⁵². La biogénèse mitochondriale peut être évaluée à partir du nombre de copies d'ADNmt dans la cellule. Dans les cellules MCF-7, le traitement par l'E2 augmente significativement la biogénèse mitochondriale³⁷³. Cette biogénèse accrue est associée à une hausse de l'expression des protéines impliquées dans la réplication comme NRF-1 et Tfam³⁷⁵. En traitant les cellules avec des siRNA anti-NRF-1, les auteurs ont observé une abolition de l'effet pro-biogénèse de l'E2, soulignant l'implication d'un effet transcriptionnel dans l'action bénéfique des ERs³⁷⁵.

ER α et ER β sont présents dans le noyau où ils agissent sur l'ADN génomique et dans la mitochondrie où ils agissent sur l'ADNmt. Leur activité transcriptionnelle permet la modulation de l'expression de nombreuses protéines mitochondriales^{376;252;369}. En utilisant des souris ER $\alpha^{-/-}$ et ER $\beta^{-/-}$, O'lonne et al. ont montré que ces deux récepteurs régulaient l'expression de NRF-1 de manière différente, voire opposée¹⁶⁵. ER α tendait à augmenter son expression tandis qu'ER β la diminuait. En 2008, Mattingly et al. ont montré que l'inhibition pharmacologique des ERs abolissait complètement l'effet pro-biogénèse de l'E2 via l'augmentation de l'expression de NRF-1³⁷³. À l'inverse, Rodriguez-Cuenca et al. ont observé que l'E2 réduisait l'expression de NRF-1 dans des adipocytes bruns, montrant que les effets transcriptionnels des ERs étaient tissus-dépendants³⁷⁷.

3.2.2. Relation entre les pathologies cardiovasculaires, rénales et effets œstrogéniques au niveau mitochondrial

Les hormones œstrogéniques ont un rôle protecteur primordial dans certaines pathologies cardiovasculaires comme nous l'avons expliqué dans la première partie de ce manuscrit. Des études ont tenté de vérifier la relation entre cette protection et l'effet de ces hormones sur la mitochondrie.

3.2.2.1. Modèle de trauma hémorragique

Dans un modèle de trauma hémorragique chez la souris mâle, Hsieh et al. ont mesuré la biogénèse mitochondriale dans le cœur en réponse au diarylpropionitrile (DPN), un agoniste d'ER β . Les auteurs ont observé une augmentation de la biogénèse mitochondriale dépendante d'ER β ³⁷⁸. Cet effet était associé à un accroissement de la transcription de l'ADNmt et de l'activité de la chaîne respiratoire mitochondriale. Dans une étude antérieure sur le même modèle, les auteurs avaient mis en évidence que l'action protectrice de l'E2 vis-à-vis de la fonction cardiaque suite au trauma hémorragique était associée à une augmentation de l'expression de PGC-1 α , un acteur majeur de la biogénèse mitochondriale³⁷⁹.

3.2.2.2. Isoflavones et biogénèse mitochondriale

Les isoflavones sont des phytoestrogènes agonistes des ERs. Elles exercent à la fois des effets dépendants mais aussi indépendants des ERs²⁵². Dans les cellules du tube contourné proximal du rein de lapin, le traitement *in vitro* par des isoflavones favorisait la biogénèse mitochondriale³⁸⁰. Les isoflavones augmentaient l'expression et l'activité de sirtuine-1 (SIRT1), un activateur de PGC-1 α ³⁸¹. En parallèle à ces actions, les isoflavones réduisaient le niveau de stress oxydatif via les actions non-génomiques des ERs³⁸² (Figure 57).

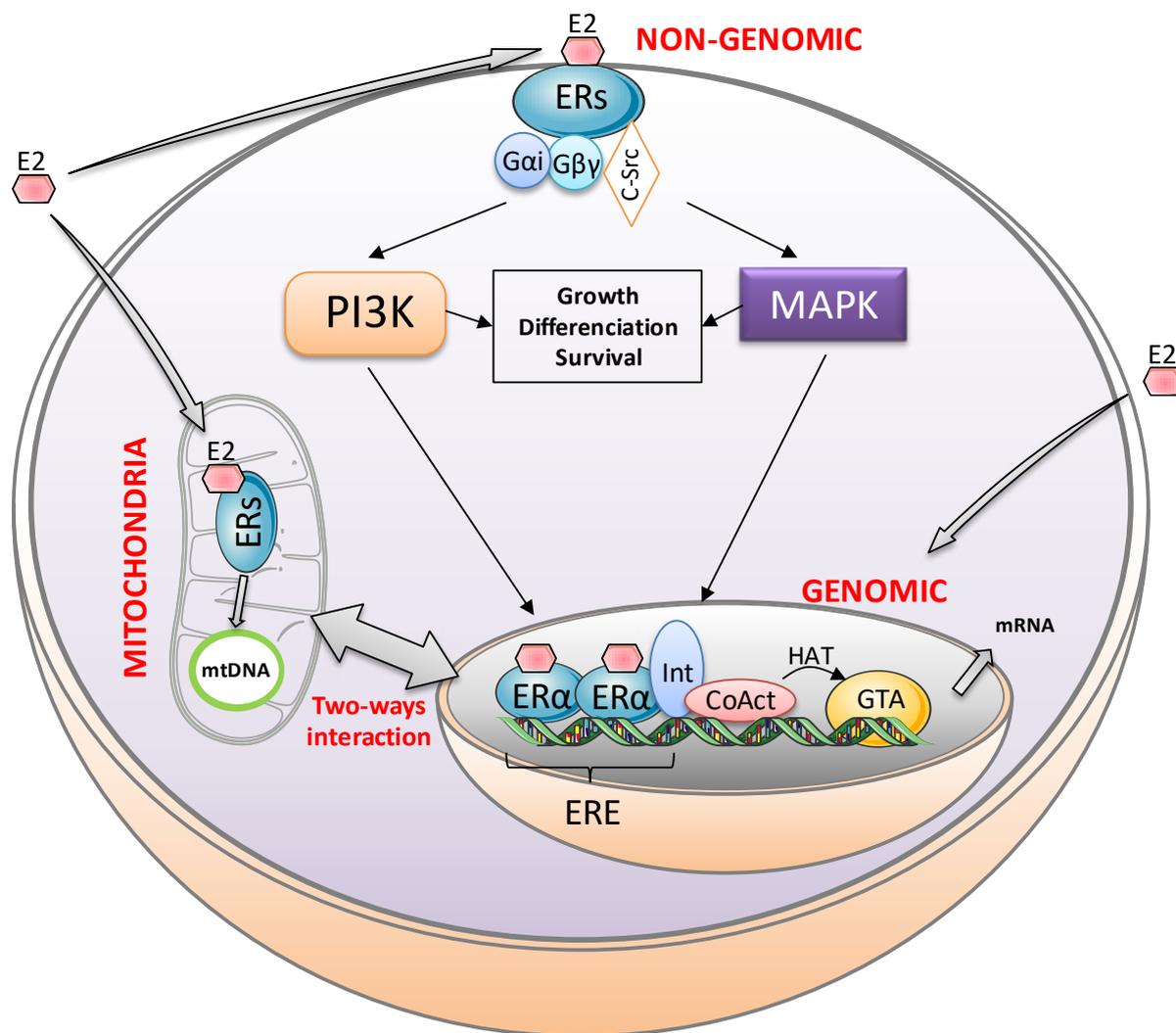


Figure 57 : Schéma des effets génomiques et non-génomiques des ERs dans la mitochondrie et le noyau (modifié à partir de ²⁵²).

Les récepteurs aux œstrogènes agissent au niveau cellulaire par l'intermédiaire de la voie de la PI3K et des MAPKs pour stimuler la croissance, la différenciation et la survie cellulaire. En parallèle, les ERs sont également présents dans les mitochondries au sein desquelles ils agissent en réduisant le stress oxydatif et en protégeant l'ADNmt.

3.2.2.1. Ischémie-reperfusion

L'ischémie-reperfusion cardiaque induit des lésions résultant d'une mort cellulaire des cardiomyocytes par apoptose et par nécrose. Par des approches de preconditionnement ischémique, des voies de protection peuvent être activées pour réduire les altérations de l'ischémie-reperfusion. Les mitochondries jouent un rôle prépondérant dans ce processus

puisqu'elles sont directement impliquées dans l'initiation de mort cellulaire ³⁸³. Chez des rattes ovariectomisées subissant une ischémie-reperfusion, ces auteurs avaient montré qu'un traitement par l'E2 prévenait la dégradation de la fonction mitochondriale cardiaque ³⁸⁴.

En utilisant des souris ER α ^{-/-} soumises au même protocole, les auteurs avaient observé une aggravation des dommages cardiaques par rapport aux animaux WT et émis l'hypothèse qu'ER α exerçait son effet protecteur vis-à-vis des mitochondries cardiaques ³⁸⁵. A noter que le récepteur ER β ne jouait aucun rôle dans cet effet protecteur ¹⁶⁵.

4. Etude 2

4.1. Hypothèse

Les éléments que nous avons décrits dans cette introduction suggèrent une relation complexe entre récepteurs aux œstrogènes, la mitochondrie et le vieillissement. Les œstrogènes ont été décrits comme ayant des effets protecteurs au cours du vieillissement, en particulier dans le rein et dans le système cardiovasculaire. Le mécanisme à l'origine de cette protection n'a pas encore été élucidé et résulte sans doute d'actions complexes, dépendantes du tissu, du contexte et du temps.

Nous émettons l'hypothèse que les œstrogènes réduisent les altérations rénales et cardiovasculaires dues au vieillissement en protégeant les mitochondries de ces organes.

4.2. Design et objectif de l'étude 2

Cette étude toujours en cours s'est déroulée en 3 phases principales. Dans un premier temps, nous avons étudié les modifications cardiovasculaires et rénales dues au vieillissement chez la souris femelle. Pour ce faire, nous avons comparé des souris jeunes et âgées en étudiant différents paramètres dont la PAS, l'hypertrophie cardiaque, la fonction et la structure vasculaire, la fonction et l'inflammation rénale, les marqueurs de stress oxydatifs, d'inflammation et d'apoptose et les paramètres lipidiques sanguins.

Dans un deuxième temps, nous avons évalué l'impact de l'absence du récepteur ER α sur les paramètres précédemment cités. Pour ce faire, nous avons utilisé les souris ER $\alpha^{-/-}$ décrites dans la première étude que nous avons comparées aux souris WT du même âge.

Enfin dans un dernier temps et pour répondre à notre hypothèse, nous avons étudié l'impact du vieillissement et de l'absence d'ER α sur la biogénèse mitochondriale chez nos animaux.

Matériel et Méthodes

MATERIEL et METHODES

Les animaux, les protocoles et les techniques déjà utilisés dans la première étude ne seront pas décrits dans cette partie.
Nous détaillons ici les techniques spécifiques à cette étude non décrites précédemment.

1. Modèle animal

Cette étude a été réalisée sur des souris C57BL/6 J femelles de souche $ER\alpha^{+/+}$ et $ER\alpha^{-/-}$ âgées de 17 mois et comparées à des souris de 5 mois (Figure 58). Le protocole a été approuvé par le Comité d’Ethique d’Expérimentation Animale des Pays de la Loire (CEEA, permis # CEEA Pays de la Loire 2012.118 and 2012.141). Les souris ont été hébergées dans une salle à la température contrôlée, avec un cycle jour-nuit de 12h/12h. Les souris ont eu un accès à l’eau et à la nourriture *ad libidum*. Les souris utilisées ont été générées par l’équipe du Pr. Jean-François Arnal (INSERM 1048, Toulouse) à la Clinique de la souris à Strasbourg (Pr. P. Chambon).

Une description plus précise des souris est faite dans la première étude.

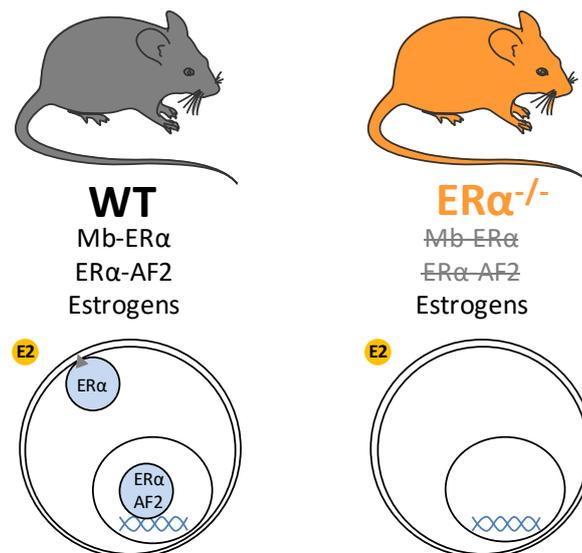


Figure 58 : Modèles de souris utilisées dans cette étude.

2. Caractéristiques phénotypiques des animaux

Les animaux jeunes ou âgés ne présentent pas d'altération phénotypique majeure en terme de poids, de taille ou de mortalité prématurée. Les souris $ER\alpha^{-/-}$ de 17 mois ont un poids plus élevé que les animaux WT, sont stériles et possèdent un utérus hypotrophié. Les caractéristiques des animaux jeunes sont présentés dans la première étude.

Tableau 16 : Poids du corps et de l'utérus des souris femelles WT et $ER\alpha^{-/-}$ de 17 mois.

	Body weight (g)	Uterus/Body weight
WT	26	0,40
$ER\alpha^{-/-}$	31,8*	0,04***

3. Sacrifice et prélèvements

Après les 28 jours de traitement, les animaux sont sacrifiés par inhalation de CO_2 et des prélèvements sont effectués.

Tableau 17: Liste des prélèvements effectués chez les souris.

Type de prélèvement	Utilisation faite ou envisagée
Plasma	Dosages sanguins Urée-Créatinine, Cholestérol, triglycérides
Cœur	Pesée pour évaluation de l'hypertrophie cardiaque
	Coupes histologiques pour évaluer la fibrose cardiaque
Aorte thoracique	Myographie pour évaluer la fonction vasculaire aortique
	Western Blot pour analyse d'expression protéique
	Histomorphométrie pour évaluation du remodelage aortique
	Immunomarquage pour analyse de l'inflammation et du stress oxydatif
Artères mésentériques	RT-qPCR pour évaluation de l'expression génique
	Myographie pour évaluer la fonction vasculaire mésentérique
	Histomorphométrie pour évaluation du remodelage artériel
Aorte abdominale	Idem que Aorte thoracique
Rein gauche	Coupes histologiques pour évaluation de la fibrose rénale
	Immunomarquages pour évaluation du stress oxydatif et de l'inflammation rénale
Rein Droit	RT-qPCR pour évaluer l'expression de gènes inflammatoires, oxydatifs, etc.

	Analyse de l'ADN mitochondrial par PCR long range pour évaluer la qualité de l'ADN mito et RT-qPCR pour évaluer la quantité d'ADN mito
Glandes surrénales	RT-qPCR pour évaluer l'expression des gènes en lien avec le SRAA
Foie	RT-qPCR ou Western Blot pour évaluer l'expression de gènes métaboliques
Poumons	RT-qPCR ou Western Blot pour évaluer l'expression de gènes inflammatoires ou oxydatifs
Utérus	Mesure du poids de l'utérus pour évaluer l'impact de l'absence ou de la déficience de ER α et des œstrogènes
Rate	RT-qPCR pour évaluer l'expression de gènes inflammatoires
Ganglion mésentérique	RT-qPCR pour évaluer l'expression de gènes inflammatoires

4. Evaluation de la fonction vasculaire

La fonction vasculaire de l'aorte et de l'artère mésentérique est évaluée par myographie (description du protocole dans l'étude 1). Pour évaluer les effets du vieillissement sur la fonction vasculaire, les analyses réalisées sur l'aorte sont comparés entre WT jeunes et WT âgées. Pour analyser l'impact de l'absence d'ER α sur la fonction vasculaire lors du vieillissement, les analyses réalisées sur l'aorte et l'artère mésentérique sont comparées entre ER $\alpha^{-/-}$ âgées et WT âgées.

5. Evaluation de la structure vasculaire

La structure de l'aorte est évaluée par histomorphométrie chez les souris WT et ER $\alpha^{-/-}$ âgées et comparée à celle des souris WT et ER $\alpha^{-/-}$ jeunes (description du protocole dans l'étude 1).

6. Immunomarquages rénaux

L'infiltration de cellules immunitaires au niveau rénal est évaluée par immunomarquages contre la protéine CD45, un antigène de surface des leucocytes.

Le rein gauche est inclus dans l'O.C.T. puis congelé. Des coupes de 10 μ m d'épaisseur sont réalisées. Les coupes sont réhydratées à T°A 5 minutes avec 500 μ L de PBS puis fixées avec 200 μ L de PFA 4% pH 7,4 pendant 10min. Les lames sont rincées avec 500 μ L de PBS 3x5min à T°A. Une étape de saturation de 40min à T°A est effectuée avec 200 μ L de PBS-

BSA 10%. Une perméabilisation est ensuite réalisée, 40min à température ambiante avec 200µL de PBS-BSA-Tween 0,1% conservé à 4°C. L'immunomarquage est réalisé à l'aide d'une solution d'anticorps primaire anti-CD45 conjugué PE (1:200) et les noyaux colorés avec du DAPI (1:200). Les échantillons sont incubés toute la nuit à 4°C en chambre humide puis rincés 3x5min à T°A avec 500µL de PBS. Les coupes sont ensuite montées entre lames et lamelles et observées au microscope à épifluorescence après 2h de séchage.

7. Dosages plasmatiques

Le sang est récupéré après le sacrifice de l'animal par ponction cardiaque. Le sang est placé dans un tube de prélèvement de sang contenant de l'héparine (BD Vacutainer®). Le tube est ensuite centrifugé pendant 15 minutes à 4000 tours/min puis le plasma est récupéré.

Les dosages sont réalisés au Pôle Biologie du CHU d'Angers, grâce à Mme Françoise Joubreau et Pr Pascal Reynier. Les taux plasmatiques d'urée et de créatinine sont dosés pour évaluer la fonction rénale. Les taux de HDL-c, de LDL-c et les triglycérides sont dosés pour évaluer le profil lipidique des animaux.

8. Etude de l'expression génique par RT-qPCR

8.1. Extraction d'ARN

L'extraction d'ARN est réalisée à partir de 30 mg de rein avec le kit RNeasy Mini (Quiagen). L'échantillon est broyé dans 1 ml de Quiazol (Quiagen) à l'aide d'un ultraturax. 200 µl de chloroforme (Sigma-Aldrich) sont ajoutés et les tubes sont centrifugés 18 min à 12 000 g. La phase supérieure est récupérée, 500 µl d'éthanol 70% sont ajoutés puis le précipité est centrifugé 30 secondes à 10 000 g. 700 µl de tampon RW1 et 500 µl de RPE sont successivement déposés sur la colonne puis une centrifugation de 2 minutes à 10 000 g est effectuée à chaque étape. 40 µl d'eau sont déposés afin d'éluer l'ARN, qui est conservé à -20°C avant vérification de sa qualité par spectrophotométrie (Nanodrop, Thermo Scientific).

8.2. RT-qPCR

L'ARN est ensuite transcrit en ADN complémentaire (ADNc) avec le kit Quantitech Reverse Transcription (Quiagen). L'échantillon est dilué pour obtenir 1000 ng d'ARN dans un volume final de 7 µl d'eau. L'ADN génomique contaminant est éliminé avec 2 µl de gDNA wipeout (Quiagen) et un cycle de 2 min à 42°C. Un mix est constitué, contenant l'enzyme RT (Reverse Transcriptase), le RT buffer, les primers RT et l'ARN. Les échantillons sont placés dans le thermocycleur, 30 min à 42°C puis 3 min à 95°C. Les échantillons sont ensuite dilués à une concentration finale de 2,5 ng/µl. La qPCR est réalisée avec 10 ng d'ADNc. Les paramètres utilisés sont : 95°C (10 min) puis 40 cycles: 95°C (15s), 60°C (1 min) puis run de dissociation. L'efficacité des oligonucléotides utilisés pour amplifier les gènes d'intérêt a été validée si un seul pic de dissociation est observé, avec une efficacité entre 1,8 et 2,1. La GAPHD et l'HPRT sont utilisés comme gènes de référence pour la normalisation de l'expression des gènes d'intérêt. Les oligonucléotides suivants sont utilisés :

Tableau 18 : Séquences des oligonucléotides utilisés.

NRF1	F : gaaagaaagctgcaagccta R : atgcctgggtccatgaaa	Collagène I	F : catgttcagctttgtggacct R : gcagctgacttcagggatgt
TFAM	F : caaaggatgattcggtcag R : aagctgaatatatgcctgcttttc	Collagène III	F : gcacagcagtcacaactgaga R : gacatctctagactcataggactgacc
OPA1	F : accaggagaagtagactgtgtcaa R : tctcaaataaacgcagaggtg	TGF-β1	F : tggagcaacatgtggaactc R : cagcagccggttaccag
Mfn1	F : aaaacatactggactcagtaaactg R : ggtcttccctctctccattg	P66^{shc}	F : ggaccattctgcctcctct R : gccagctcaggttgctcat
Mfn2	F : cattctgtggtcggaggag R : aaggagagggcgatgagtct	SOD1	F : caggacctcatttaacctcac R : tgcccaggtctccaacat
DRP1	F : agatcgtcgtagtgggaacg R : ccactaggcttccagcact	SOD2	F : gaccattgcaaggaacaa R : gtagtaagcgtgctccacac
Fis1	F : gagaccttagtgtgaggcttca R : tcagactgaaatttccttcaaaat	PGC1-α	F : tgtggaactctctggaactgc R : agggttatctctggtggcttta

9. Analyse de l'ADN mitochondrial

9.1. Quantification de l'ADNmt par Q-PCR

9.1.1. Extraction d'ADN

Les échantillons de reins sont broyés au mortier et au pilon dans un tube Eppendorf avec 180 µL de tampon ALT (Kit 69504 Qiagen). Les tissus sont découpés en présence de 20 µL de protéinase K. Après agitation, les tubes sont placés à 56°C pendant 3h jusqu'à digestion complète du tissu. Après agitation au vortex, 200 µL de tampon AL et 200 µL d'éthanol absolu sont ajoutés. Le précipité est déposé sur une colonne et centrifugé 1 min à 10 000 g à T ambiante. Après changement de colonne, 500 µL de tampon AW1 sont ajoutés et le précipité est centrifugé 1 min à 10 000 g. La colonne est à nouveau changée et 500 µL de tampon AW2 sont ajoutés. Le précipité est centrifugé 3 min à 20 000 g afin de sécher complètement la colonne. Celle-ci est transférée dans un nouveau tube Eppendorf et 100 µL de tampon AE sont ajoutés. Après une incubation pendant 1 min, les échantillons sont centrifugés 1 min à 10 000g. L'ADN récupéré est dosé par spectrophotométrie afin de vérifier sa qualité et sa pureté (NanoDrop 2000, Thermo Scientific). L'ADN est conservé au congélateur à -20°C.

9.1.2. Quantification de l'ADNmt

Les échantillons d'ADN sont préparés dans des barrettes et dilués avec de l'H₂O dans un volume final de 50µL afin d'obtenir une concentration de 10 ng/µL. Gamme de dilution : 10ng / 5ng / 2,5ng.

Tableau 19 : Séquences des amorces utilisés pour la quantification de l'ADNmt.

Gènes	Séquences Amorces
Cox3	F : 5'-TCATGCATATCACATAGTTAATCC-3' R : 5'-AGACCTGATGTTAGAAGGAG-3'
Nd2	F : 5'-CCATTCCACTTCTGATTACC-3' R : 5'-GTCATGTAAGAAGAATAAGTCC-3'

Gm412	F: 5'-TTGTCACAGGGCAACAACAG-3' R: 5'-GCTCACCCACCTTGT-TTGT-3'
Actg1	F: 5'-GAGCACGCTGTAGATGAGAAA-3' R: 5'-GATCACTCAGTGGTGCTACA-3'

La quantité d'ADN est de 30 ng par échantillon. Paramètres PCR utilisés : 95°C (10 min) puis 40 cycles: 95°C (15s), 60°C (1 min) puis run de dissociation.

9.2. Evaluation de la qualité de l'ADNmt par PCR long range

L'ADN est extrait comme décrit précédemment. Les échantillons sont préparés dans des barrettes de PCR à la concentration de 10 ng/μL. La gamme de dilution est identique à celle utilisée en qPCR. Paramètres des cycles : 1min à 94C°, [10 sec à 98C°, 15min à 68C°]*32, 10min à 72C° et 14C° infini. Le mix utilisé est le Mix Taq TAKARA. Cette Taq polymérase est particulièrement efficace pour les amplifications de grands fragments.

9.2.1. Préparation du mix de PCR

Tableau 20 : Préparation du mix de PCR longue.

Composant du mix de PCR (pour 1 tube)	Volume
H ₂ O ultra pure	25,5 μL
Buffer	5 μL
dNTPs	8 μL
Amorces (F+R) (à 20 μM)	5 μL
Taq TAKARA	0,5 μL

Tableau 21 : Séquences des amorces utilisés pour la PCR longue.

	Amorces PCR longues	
1 ^{er} couple d'amorces	For2	5' GCTTAATAACAAAGCAAAGCACTG -3'
	Rev2	5' TGTTGATCCAATAAATATGATTAGGG -3'
2 ^{ème} couple d'amorces	For3	5' CACCAAAAGGACGAACATGA -3'
	Rev3	5' TTTTGGTTCACGGAACATGA -3'

Il est déposé 6 µL d'échantillon dans 44 µL du mix réactionnel.

9.2.2. Electrophorèse

Gel d'agarose 1%, 2g pour 200 ml de TBE 0,5X. Dépôt de 18 µL par puits avec 15 µL du produit de digestion et 3 µL de tampon de chargement. Il a également été déposé 7 µL de DNA Ladder pour vérification des poids moléculaires. La migration est réalisée à 150V pendant 45min.

9.2.3. Révélation

Pour révéler l'ADN, le gel est plongé 15-20 min dans une solution de « gel Red », puis une solution de lavage et enfin une solution de coloration. Une lecture de 10 secondes à 600 nm est ensuite effectuée.

10. Analyses statistiques

Les données sont représentées en moyenne \pm SEM (Standard Error of the Mean). Les analyses statistiques ont été réalisées à l'aide du logiciel GraphPad PRISM version 5.0. En fonction des expériences, les groupes sont comparés grâce au test non-paramétrique de Mann-Whitney (comparaison de 2 groupes), au test Anova 1 voie (comparaison de plus de 2 groupes

avec 1 facteur) ou Anova 2 voies (comparaison de plus de 2 groupes avec au moins 2 facteurs). Une valeur de $p < 0,05$ est considérée comme statistiquement significative. Un symbole *, #, & ou \$ correspond à $p < 0,05$. Deux symboles **, ##, && ou \$\$\$ correspondent à $p < 0,01$. Trois symboles ***, ###, &&& ou \$\$\$ correspondent à $p < 0,001$.

Résultats

RESULTATS de L'ETUDE 2

Etude du rôle des œstrogènes dans le vieillissement cardiovasculaire, rénal et mitochondrial

1. Impact du vieillissement sur le système cardiovasculaire et rénal

1.1. Evolution de la pression artérielle, de l'hypertrophie cardiaque et de la structure vasculaire

Afin d'évaluer l'impact du vieillissement sur le système cardiovasculaire, nous avons mesuré la PAS, le poids du VG et le rapport média/lumen de l'aorte chez des souris WT jeunes (5 mois) et des souris WT âgées (17 mois).

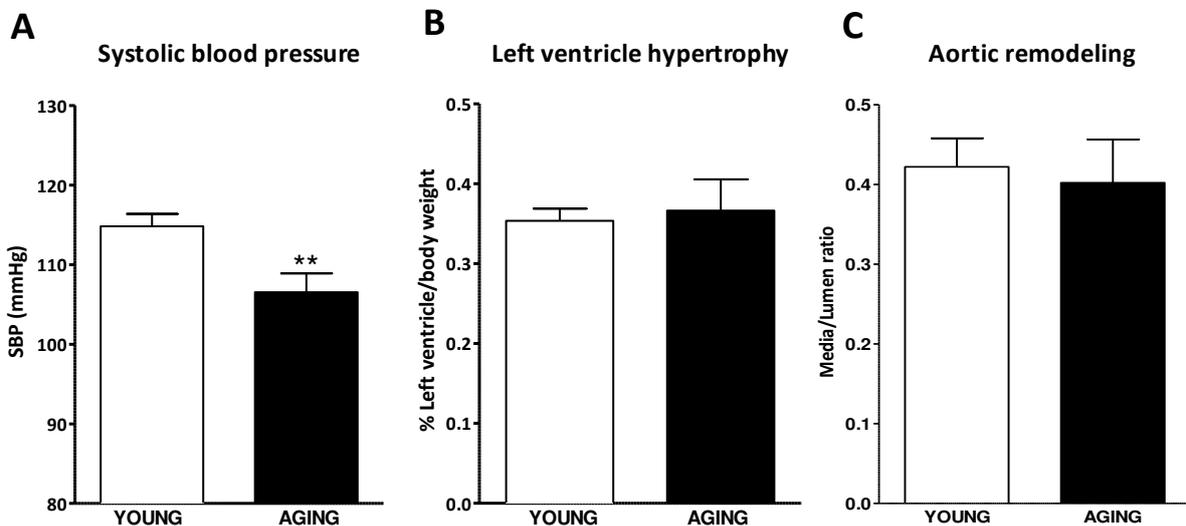


Figure 59 : Analyse de la pression artérielle systolique, du remodelage du ventricule gauche et de la structure de l'aorte chez les souris WT jeunes et âgées.

(A) La PAS a été mesurée par photopléthysmographie, les valeurs présentées ici sont les moyennes de 5 jours de mesure ; (B) Le poids du ventricule gauche a été rapporté au poids du corps pour évaluer l'hypertrophie cardiaque ; (C) La structure de l'aorte a été évaluée par coloration de coupes histologiques à l'aide d'orcéine (n=10-12 animaux par groupe), **p<0,01 ; test non-paramétrique de Mann-Whitney.

Nos analyses montrent une baisse significative de la PAS au cours du vieillissement ($106 \pm 6,2$ mmHg vs $115 \pm 5,3$ mmHg) (Figure 59 A). Nous n'observons aucune modification du poids du ventricule gauche par rapport au poids du corps (Figure 59 B). Le rapport média/lumen de l'aorte est également inchangé, n'indiquant aucun remodelage hypertrophique de la média au cours du vieillissement (Figure 59 C).

Le vieillissement chez la souris femelle âgée de 17 mois n'entraîne pas d'hypertension, d'hypertrophie cardiaque ou de remodelage artériel hypertrophique.

1.2. Evolution de la fonction vasculaire

Afin d'évaluer l'impact du vieillissement sur la fonction vasculaire aortique, nous avons mesuré la capacité contractile et dilatatrice de l'aorte chez des souris femelles WT jeunes (5 mois) et des souris WT âgées (17 mois).

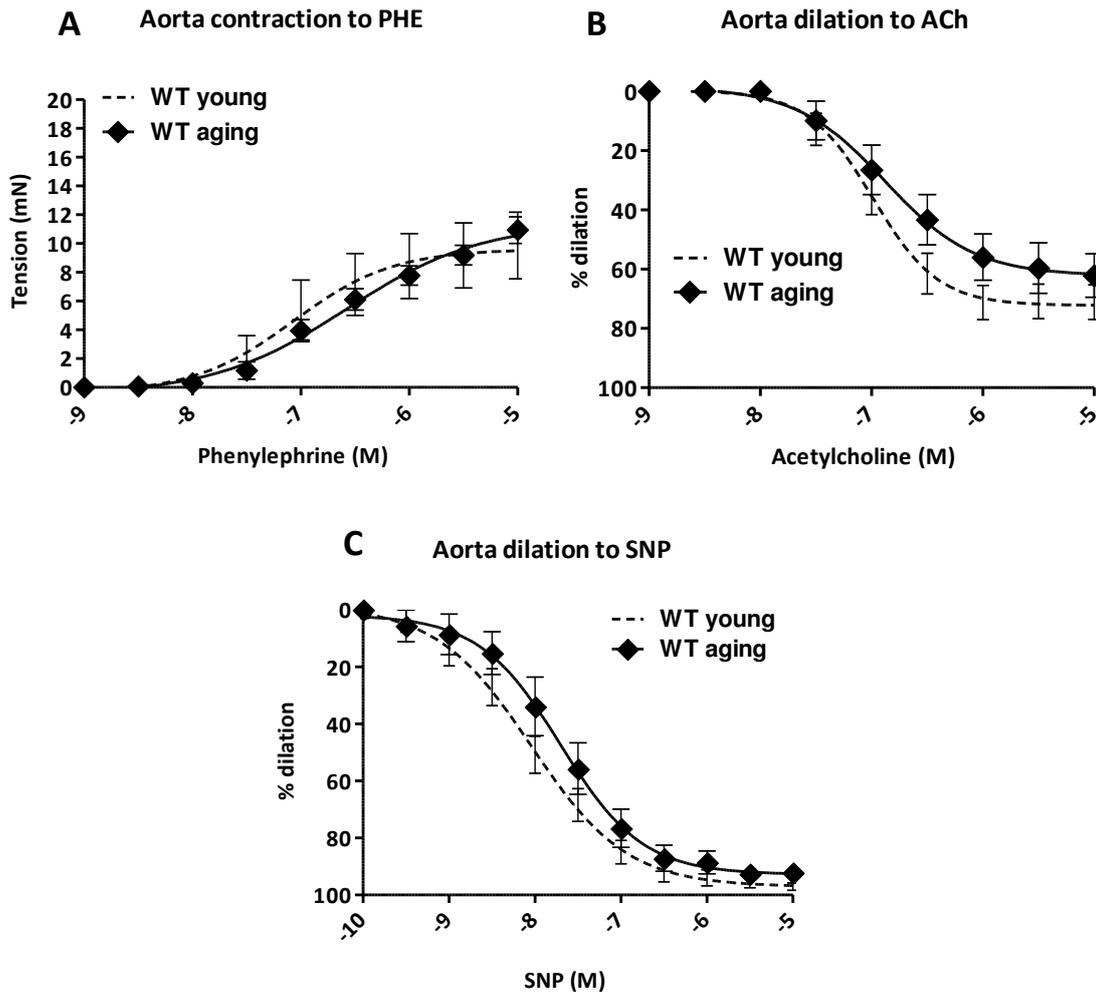


Figure 60 : Impact du vieillissement sur la capacité contractile et dilatatrice de l'aorte thoracique chez les souris WT jeunes et âgées.

La fonction vasculaire aortique a été évaluée par myographie. (A) Evaluation de la contraction par courbe concentration-réponse à la Phényléphrine (B) Evaluation de la dilatation endothélium-dépendante par courbe concentration-réponse à l'Acétylcholine, (C) Evaluation de la dilatation endothélium indépendante par courbe concentration-réponse au Sodium Nitroprusside (SNP) (n=7-8 animaux par groupe) ; test two way Anova avec un post test de Bonferroni).

Nos analyses ne montrent pas de modification significative de la capacité contractile de l'aorte en réponse à la phényléphrine entre les souris WT jeunes et âgées (Figure 60 A).

La capacité dilatatrice aortique en réponse à l'ACh n'est pas non plus modifiée significativement chez les souris âgées (Figure 60 B). Nous observons toutefois une tendance à la diminution chez les souris âgées avec une baisse avoisinant 20% entre 10^{-6} et 10^{-5} M d'ACh (Figure 60 B).

Nous avons également évalué la capacité de réponse au NO des CMLVs à l'aide du SNP et n'avons pas observé de différence entre les souris WT jeunes et âgées (Figure 60 C).

Le vieillissement chez la souris femelle âgée de 17 mois n'altère pas la réponse contractile et relaxatrice de l'aorte.

1.3. Evolution des paramètres rénaux et métaboliques

Afin d'évaluer l'impact du vieillissement sur la fonction rénale, nous avons mesuré les taux plasmatiques d'urée et de créatinine chez des souris WT jeunes (5 mois) et des souris WT âgées (17 mois). Nous avons également analysé le métabolisme lipidique en mesurant le taux de HDL-c, de LDL-c et de triglycérides.

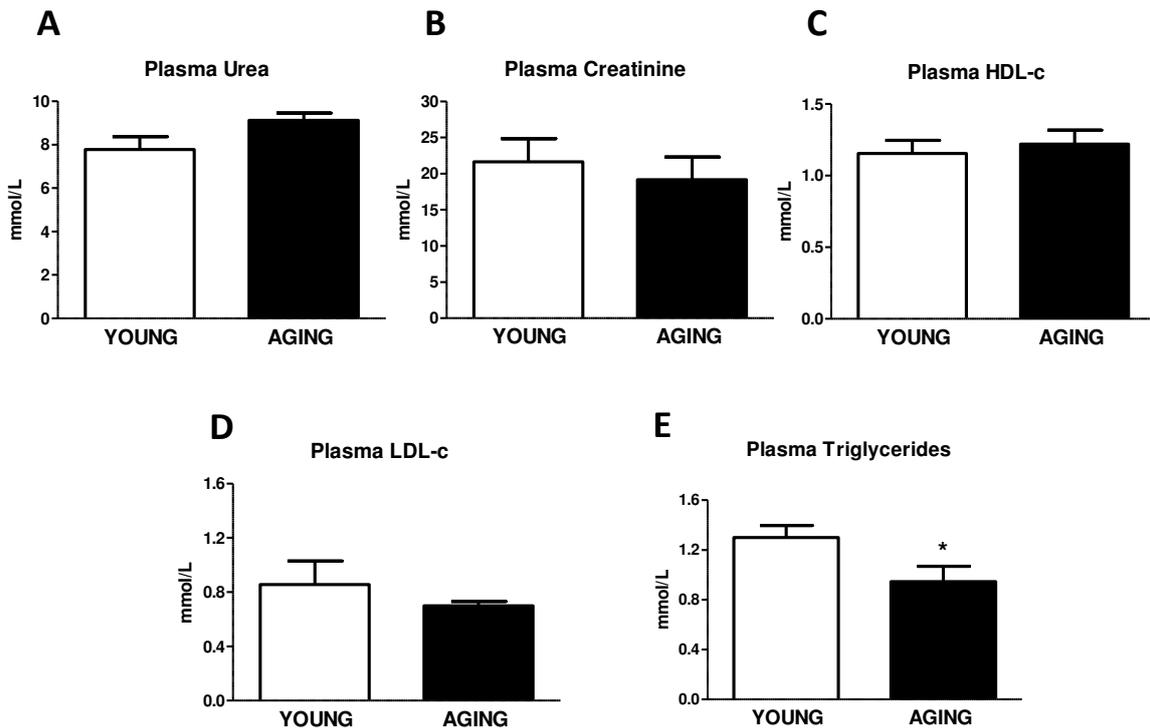


Figure 61 : Impact du vieillissement sur le taux d'urée, de créatinine et les paramètres métaboliques plasmatiques chez les souris WT jeunes et âgées.

(A) Taux plasmatique d'urée, (B) taux plasmatique de créatinine, (C) taux plasmatique de HDL-c, (D) taux plasmatique de LDL-c, (E) taux plasmatique de triglycérides (n=10-12 animaux par groupe) ; *p<0,05 vs WT young ; ** p<0,01 vs WT young ; test non-paramétrique Mann-Whitney).

Nos analyses ne montrent pas d'impact du vieillissement sur le taux d'urée et de créatinine ($9,11 \pm 0,58$ vs $7,78 \pm 0,34$ mmol/L pour l'urée et $21 \pm 3,23$ vs $19 \pm 3,13$ mmol/L pour la créatinine) (Figure 61 A-B).

L'évaluation des paramètres lipidiques n'indique pas de modification du taux d'HDL-c chez les souris âgées ($1,22 \pm 0,09$ vs $1,15 \pm 0,09$ mmol/L) (Figure 61 C). Le taux de LDL-c plasmatique reste également inchangé ($0,7 \pm 0,03$ vs $0,85 \pm 0,17$ mmol/L) (Figure 61 D). En revanche, le taux de triglycérides est significativement plus bas chez les souris âgées ($0,94 \pm 0,12$ vs $1,3 \pm 0,09$ mmol/L) (Figure 61 E).

Le vieillissement chez la souris femelle âgée de 17 mois n'altère pas la fonction rénale et le métabolisme lipidique.

1.4. Evolution de l'expression des gènes liés à fibrose, l'inflammation et le stress oxydatif

Afin d'évaluer l'impact du vieillissement sur la fibrose, l'inflammation et le stress oxydatif au niveau rénal, nous avons mesuré l'expression de gènes clés impliqués dans ces processus chez des souris WT jeunes (5 mois) et des souris WT âgées (17 mois).

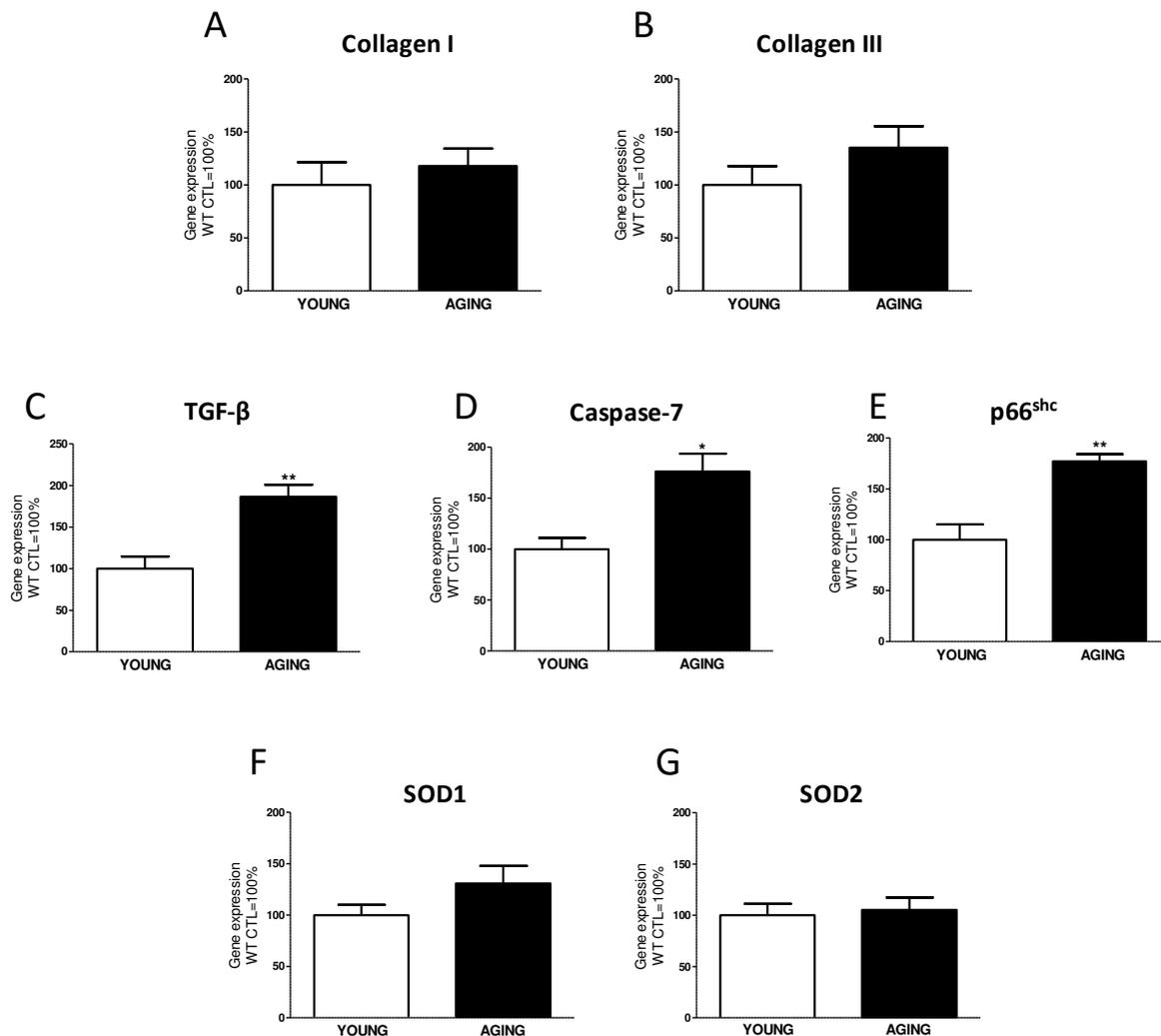


Figure 62 : Expression des gènes liés à la fibrose, à l'apoptose et au stress oxydatif chez les souris WT jeunes et âgées.

Niveaux d'expression, normalisés à l'expression des gènes de référence, des ARNm codant pour (A) Collagène I, (B) Collagène III, (C) TGF-β1, (D) Caspase-7, (E) p66^{shc}, (F) SOD1, (G) SOD2, (n=4-5 animaux par groupe), les valeurs sont exprimées en pourcentage par rapport au WT young=100% ; *p<0,05 vs WT young ; **p<0,01 vs WT young ; test non paramétrique de Mann-Whitney).

L'expression du collagène de type I et III, du TGF- β 1 et de la caspase-7 ont été analysés en lien avec la fibrose, l'inflammation et l'apoptose. L'expression de p66^{shc} a été évaluée en lien avec l'apoptose et le stress oxydatif. L'expression de SOD1 (Cu/Zn SOD) et de SOD2 (MnSOD) a été analysée en lien avec le stress oxydatif. L'expression de SOD3 (EC-SOD) n'a pas pu être analysée.

Nos analyses ne montrent pas d'augmentation de l'expression du collagène I et III au cours du vieillissement (Figure 62 A-B). En revanche, l'expression du TGF- β 1 (+86% vs WT young) et de la caspase 7 (+76% vs WT young) sont significativement augmentées (Figure 62 C-D).

Nos résultats montrent également une augmentation significative de l'expression de p66^{shc} au cours du vieillissement (+77%) (Figure 62 E). En revanche, l'expression de SOD1 et SOD2 n'est pas modifiée (Figure 62 F-G).

Le vieillissement chez la souris femelle âgée de 17 mois est associé à une hausse de l'expression de facteurs pro-inflammatoires, apoptotiques et oxydatifs au niveau du rein.

1.1. Evolution de l'inflammation rénale

Afin d'évaluer l'impact du vieillissement sur l'inflammation rénale, nous avons réalisé des immunomarquages CD45 sur des coupes de rein. Cet anticorps marque l'ensemble des leucocytes présents dans le tissu et est un indice reflétant le niveau d'inflammation locale.

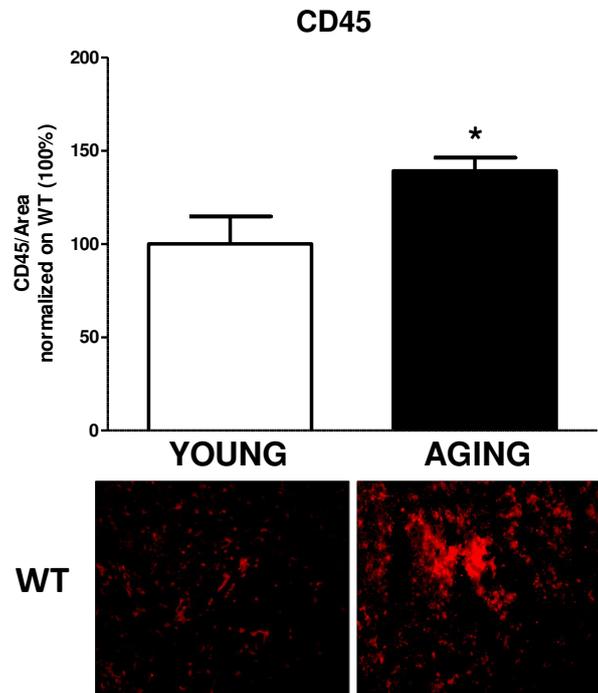


Figure 63 : Analyse de l'infiltration de cellules inflammatoires au niveau rénal chez les souris WT jeunes et âgées.

L'infiltration de cellules immunitaires a été quantifiée par immunomarquage CD45 sur des coupes histologiques de rein (n=5-6 animaux par groupe). La couleur rouge sur les images illustratives représente la fluorescence émise par les anticorps fixés sur la protéine CD45 ; les valeurs sont exprimées en pourcentage par rapport au WT young=100% ; *p<0,05 vs jeunes ; test non-paramétrique de Mann-Whitney).

Nos analyses montrent une augmentation d'environ 40% de la quantité de cellules immunitaires présentes au niveau rénal par rapport aux animaux jeunes (Figure 63).

Le vieillissement chez la souris femelle âgée de 17 mois entraîne une augmentation de l'inflammation au niveau du rein.

2. Impact du récepteur ER α sur le vieillissement cardiovasculaire et rénal

2.1. Rôle d'ER α dans la pression artérielle, l'hypertrophie cardiaque et la structure vasculaire

Nous avons émis l'hypothèse que le récepteur ER α jouait un rôle protecteur dans le vieillissement cardiovasculaire et rénal. Afin d'évaluer son rôle, nous avons mesuré la PAS, le poids du VG et le rapport média/lumen de l'aorte chez des souris ER $\alpha^{-/-}$ jeunes (5 mois) et âgées (17 mois) en les comparant aux souris WT du même âge.

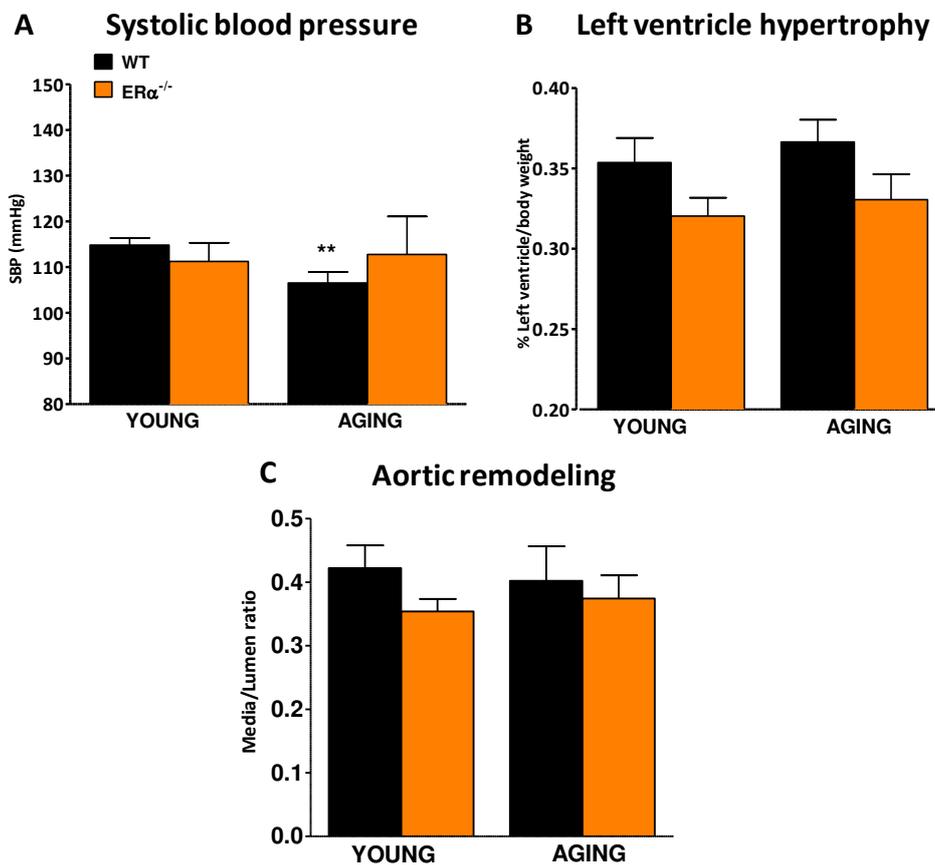


Figure 64 : Analyse de la pression artérielle systolique, du remodelage du ventricule gauche et de la structure de l'aorte chez les souris ER $\alpha^{-/-}$ et WT jeunes et âgées.

(A) La PAS a été mesurée par photopléthysmographie, les valeurs présentées ici sont les moyennes de 5 jours de mesure ; (B) Le poids du ventricule gauche a été rapporté au poids du corps pour évaluer l'hypertrophie cardiaque ; (C) La structure de l'aorte a été évaluée par coloration de coupes histologiques à l'aide d'orcéine. (n=5-10 animaux par groupe), **p<0,01 vs WT young ; test non paramétrique de Mann-Whitney).

Nos analyses ne font apparaitre aucune différence significative de PAS, d'hypertrophie cardiaque et de structure de l'aorte entre les animaux WT et $ER\alpha^{-/-}$, que ce soit chez les animaux jeunes ou âgés (Figure 64). Nous notons une légère tendance à la baisse du rapport poids VG/poids du corps chez les souris $ER\alpha^{-/-}$, sans doute dû au poids légèrement plus important de ces souris (Figure 64 B et Tableau 16). Le rapport média/lumen de l'aorte chez les animaux $ER\alpha^{-/-}$ n'est pas modifié par rapport aux souris WT (Figure 64 C).

L'absence d' $ER\alpha$ chez la souris femelle âgée de 17 mois n'entraîne pas de changement de la PAS, d'hypertrophie cardiaque ou de remodelage artériel au cours du vieillissement.

2.2. Rôle d'ER α sur le vieillissement de la fonction vasculaire

Afin d'évaluer l'impact du récepteur ER α sur l'évolution de la fonction vasculaire au cours du vieillissement, nous avons mesuré la capacité contractile et dilatatrice de l'aorte et de l'artère mésentérique chez des souris ER $\alpha^{-/-}$ âgées en les comparant aux souris WT du même âge.

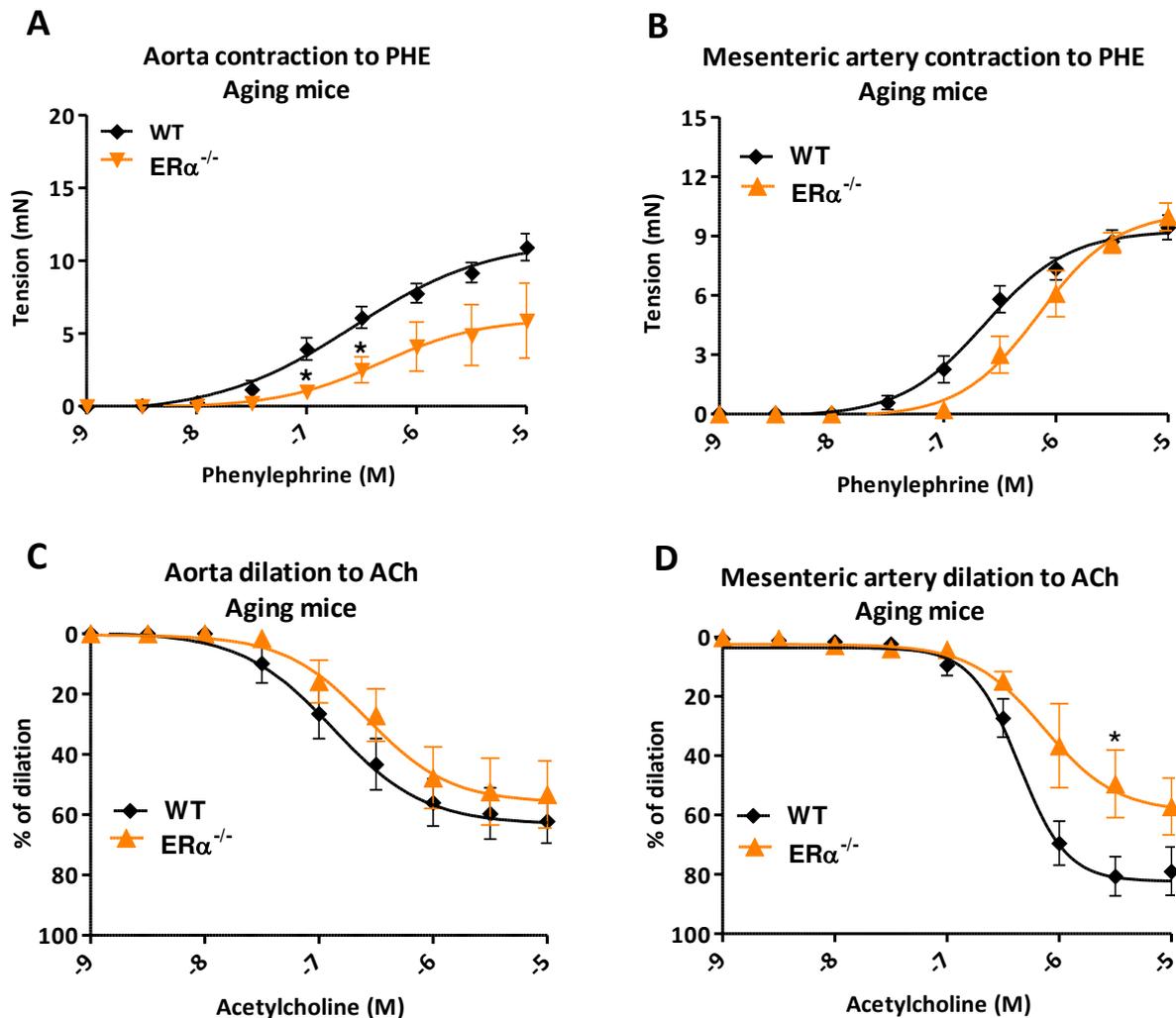


Figure 65 : Evaluation de la fonction vasculaire de l'aorte et de l'artère mésentérique chez les souris ER $\alpha^{-/-}$ et WT jeunes et âgées.

La fonction vasculaire a été évaluée par myographie. (A) Evaluation de la capacité de contraction de l'aorte par courbe concentration-réponse à la Phényléphrine ; (B) Evaluation de la capacité de contraction de l'artère mésentérique par courbe concentration-réponse à la Phényléphrine ; (C) Evaluation de la capacité de dilatation endothélium-dépendante de l'aorte par courbe concentration-réponse à l'Acétylcholine ; (D) Evaluation de la capacité de dilatation endothélium-dépendante de l'artère mésentérique par courbe concentration-réponse à l'Acétylcholine (n=4-8 animaux par groupe), *p<0,05 vs WT ; test two way Anova avec un post test de Bonferroni).

Nos analyses indiquent une baisse significative de la contraction de l'aorte sans changement de la vasorelaxation chez les souris $ER\alpha^{-/-}$ par rapport aux souris WT (Figure 65 A-C). A l'inverse, la capacité contractile de l'artère mésentérique des $ER\alpha^{-/-}$ n'est pas modifiée tandis que la vasorelaxation est significativement réduite entre 10^{-5} et 10^{-6} M d'ACh (Figure 65 B-D).

L'absence d' $ER\alpha$ chez la souris femelle âgée de 17 mois entraîne une baisse de la capacité contractile de l'aorte (également observée chez les souris jeunes dans la première étude) et une baisse de la capacité vasorelaxatrice de l'artère mésentérique.

2.3. Rôle d'ER α dans l'évolution des paramètres rénaux et métaboliques au cours du vieillissement

Afin d'évaluer l'impact du récepteur ER α sur la fonction rénale au cours du vieillissement, nous avons mesuré les taux plasmatiques d'urée et de créatinine chez nos animaux ER α ^{-/-} et WT jeunes et âgés.

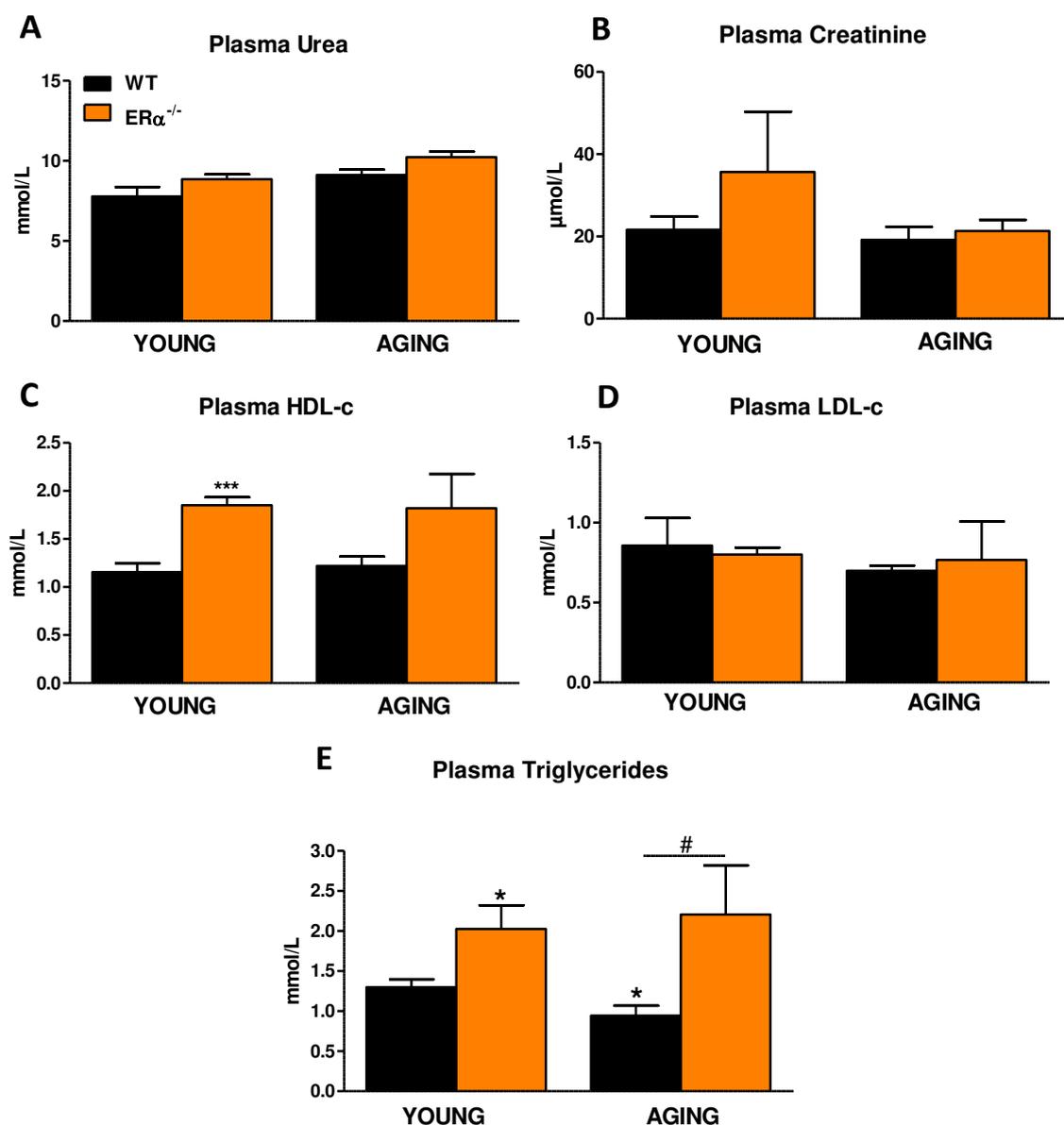


Figure 66 : Analyses des taux d'urée, de créatinine et des paramètres métaboliques plasmatiques chez les souris ER α ^{-/-} et WT jeunes et âgées.

(A) Taux plasmatique d'urée, (B) taux plasmatique de créatinine, (C) taux plasmatique de HDL-c, (D) taux plasmatique de LDL-c, (E) taux plasmatique de triglycérides (n=5-10 animaux par groupe) ; *p<0,05 vs WT young ; *** p<0,001 vs WT young ; #p<0,05 vs WT aging ; ### p<0,001 vs WT aging ; test two way Anova avec un post-test de Bonferroni).

Nos résultats ne font pas état d'une modification significative du taux d'urée et de créatinine en l'absence d'ER α que ce soit chez les souris jeunes et âgées (Figure 66 A-B).

Nous avons également analysé les paramètres lipidiques en mesurant le taux de HDL-c, de LDL-c et de triglycérides. Chez les souris jeunes, l'absence d'ER α est associée à une hausse du taux de HDL-c par rapport aux WT ($1,85\pm 0,08$ vs $1,15\pm 0,09$ mmol/L) (Figure 66 C). Chez les souris âgées, l'absence d'ER α semble avoir un effet similaire mais en raison de la dispersion des valeurs, la significativité n'est pas atteinte ($1,82\pm 0,08$ vs $1,22\pm 0,09$ mmol/L).

Enfin, l'absence d'ER α entraîne une hausse du taux de triglycérides chez les souris jeunes ($2,02\pm 0,29$ vs $1,30\pm 0,09$ mmol/L) mais également chez les souris âgées ($2,20\pm 0,61$ vs $0,94\pm 0,12$) (Figure 66 E).

L'absence d'ER α chez la souris femelle âgée de 17 mois n'entraîne pas de dysfonction rénale mais modifie les paramètres lipidiques.

2.4. Rôle d'ER α dans l'évolution de l'expression des gènes liés à la fibrose, à l'inflammation et au stress oxydatif

Afin d'évaluer l'impact de l'absence du récepteur ER α sur la fibrose, l'inflammation et le stress oxydatif au niveau rénal, nous avons mesuré l'expression de gènes clés impliqués dans ces processus chez des souris ER $\alpha^{-/-}$ jeunes (5 mois) et âgées (17 mois) en les comparant aux souris WT.

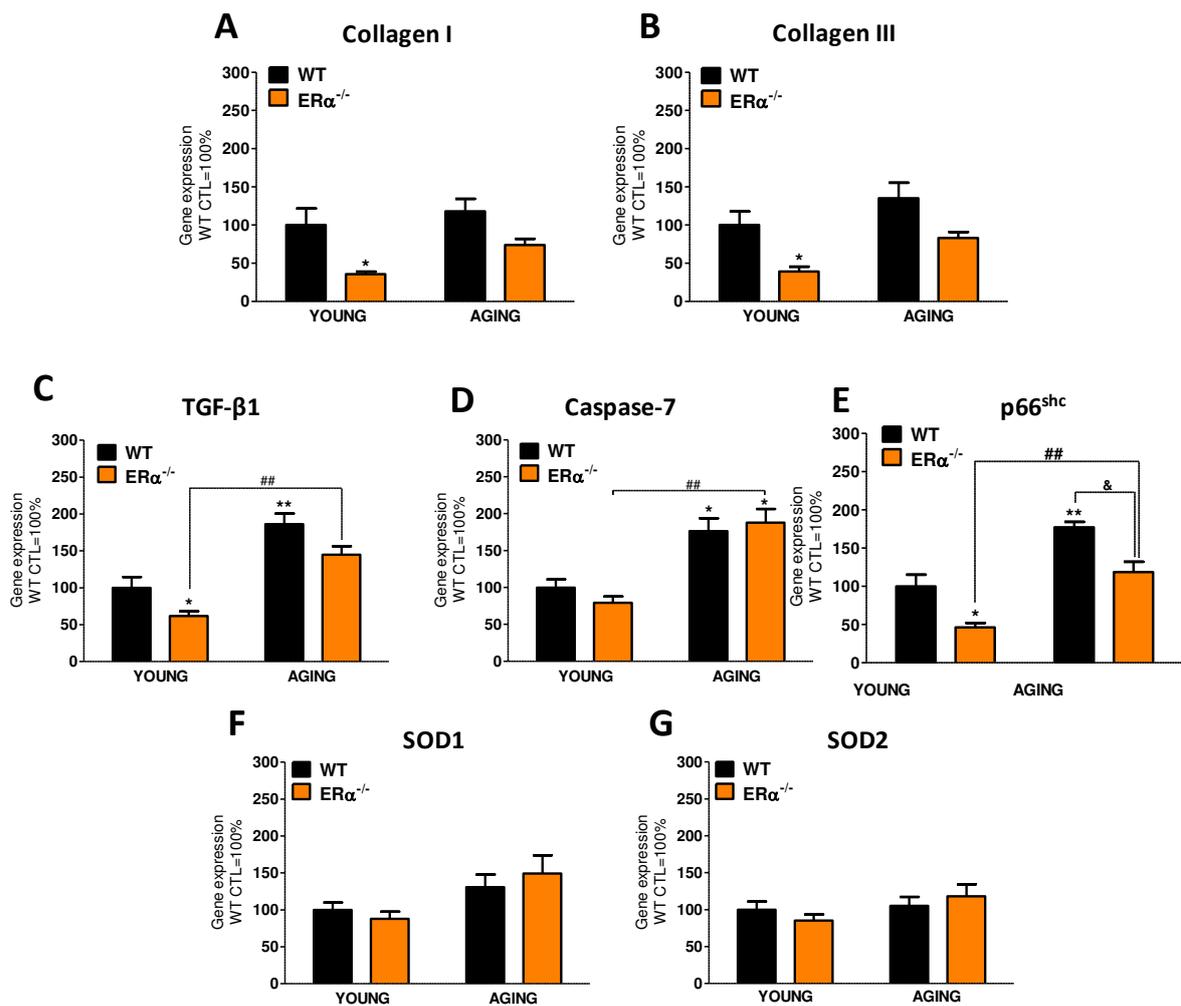


Figure 67 : Expression des gènes liés au remodelage, à l'inflammation et au stress oxydatif chez les souris ER $\alpha^{-/-}$ et WT jeunes et âgées.

Niveaux d'expression, normalisés à l'expression des gènes de référence, des ARNm codant pour (A) Collagène I, (B) Collagène III, (C) TGF- β 1, (D) Caspase-7, (E) p66^{shc}, (F) SOD1, (G) SOD2, (n=4-5 animaux par groupe), les valeurs sont exprimées en pourcentage par rapport au WT young=100% ; *p<0,05 vs WT young ; **p<0,01 vs WT young ; test two-way Anova avec un post test de Bonferroni).

Chez les souris $ER\alpha^{-/-}$ jeunes, nous observons une baisse significative de l'expression du collagène I (-65%), du collagène III (-60%) et du TGF- β 1 (-38%) comparées aux souris WT (Figure 67 A-B-C). Nous observons également une baisse de l'expression de $p66^{shc}$ (-56%) (Figure 67 E).

En revanche, chez les souris $ER\alpha^{-/-}$ âgées, nous n'observons plus de baisse significative de l'expression du collagène I, du collagène III et de TGF- β 1 par rapport aux souris WT âgées (Figure 67 A-B-C). L'expression de $p66^{shc}$ reste toutefois diminuée par rapport aux souris WT (-33%), comme chez les souris jeunes (Figure 67 E).

L'expression de la caspase-7 augmente de manière similaire au cours du vieillissement chez les souris WT et $ER\alpha^{-/-}$ (+75% environ) et nous n'observons pas de modification de l'expression de SOD1 et SOD2, quel que soit l'âge (Figure 67 D-F-G).

L'absence d' $ER\alpha$ chez la souris femelle jeune de 5 mois entraîne une baisse de l'expression des gènes pro-fibrotiques et pro-inflammatoires comme le collagène I/III, le TGF- β 1 et $p66^{shc}$. Chez la souris femelle âgée de 17 mois, l'absence d' $ER\alpha$ entraîne une diminution de l'expression de $p66^{shc}$.

2.1. Rôle d'ER α dans l'évolution de l'inflammation rénale

Afin d'évaluer l'impact de l'absence d'ER α sur l'inflammation rénale, nous avons réalisé des immunomarquages CD45 sur des coupes de rein. Cet anticorps marque l'ensemble des leucocytes présents dans le tissu et est un indice du niveau d'inflammation.

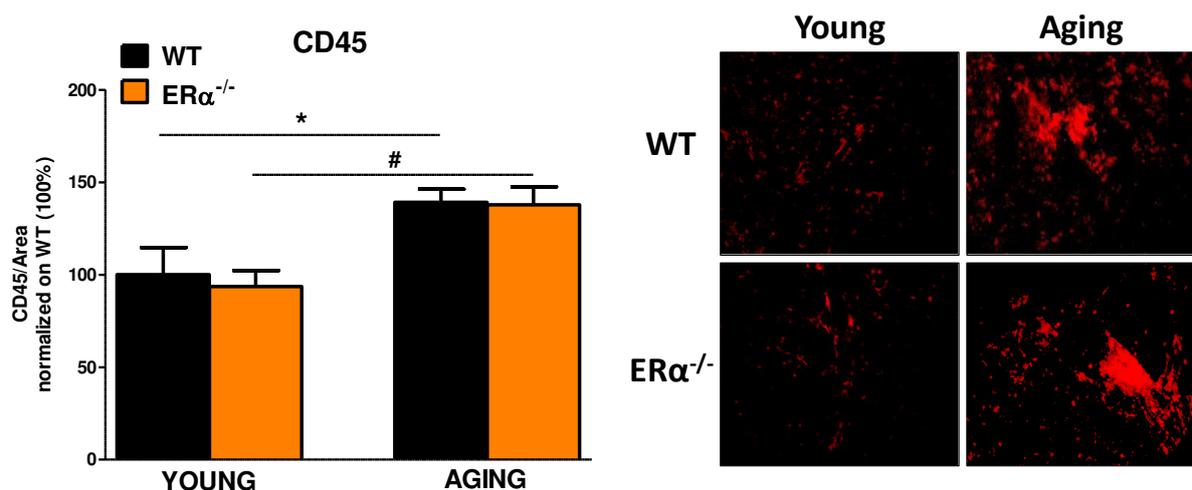


Figure 68 : Analyse de l'infiltration de cellules inflammatoires au niveau rénal chez les souris ER $\alpha^{-/-}$ et WT jeunes et âgées.

L'infiltration de cellules immunitaires a été quantifiée par immunomarquage CD45 sur des coupes histologiques de rein (n=5-6 animaux par groupe). La couleur rouge sur les images illustratives représente la fluorescence émise par les anticorps fixés sur la protéine CD45 ; les valeurs sont exprimées en pourcentage par rapport au WT young=100% ; *p<0,05 vs WT young ; # vs ER $\alpha^{-/-}$ young ; test two-way Anova avec un post test de Bonferroni).

Le vieillissement augmente le niveau d'infiltration immunitaire au niveau rénal mais nos résultats ne montrent aucune différence entre les souris ER $\alpha^{-/-}$ et WT, jeunes ou âgées (Figure 68).

L'absence d'ER α chez la souris femelle âgée de 17 mois n'entraîne pas de hausse de l'infiltration immunitaire au niveau rénal.

3. Impact du vieillissement et d'ER α sur la mitochondrie

3.1. Impact du vieillissement et d'ER α sur l'expression de gènes de régulation mitochondriale

Nous avons émis l'hypothèse que ER α exerçait un rôle bénéfique au cours du vieillissement par le biais d'une protection des mitochondries.

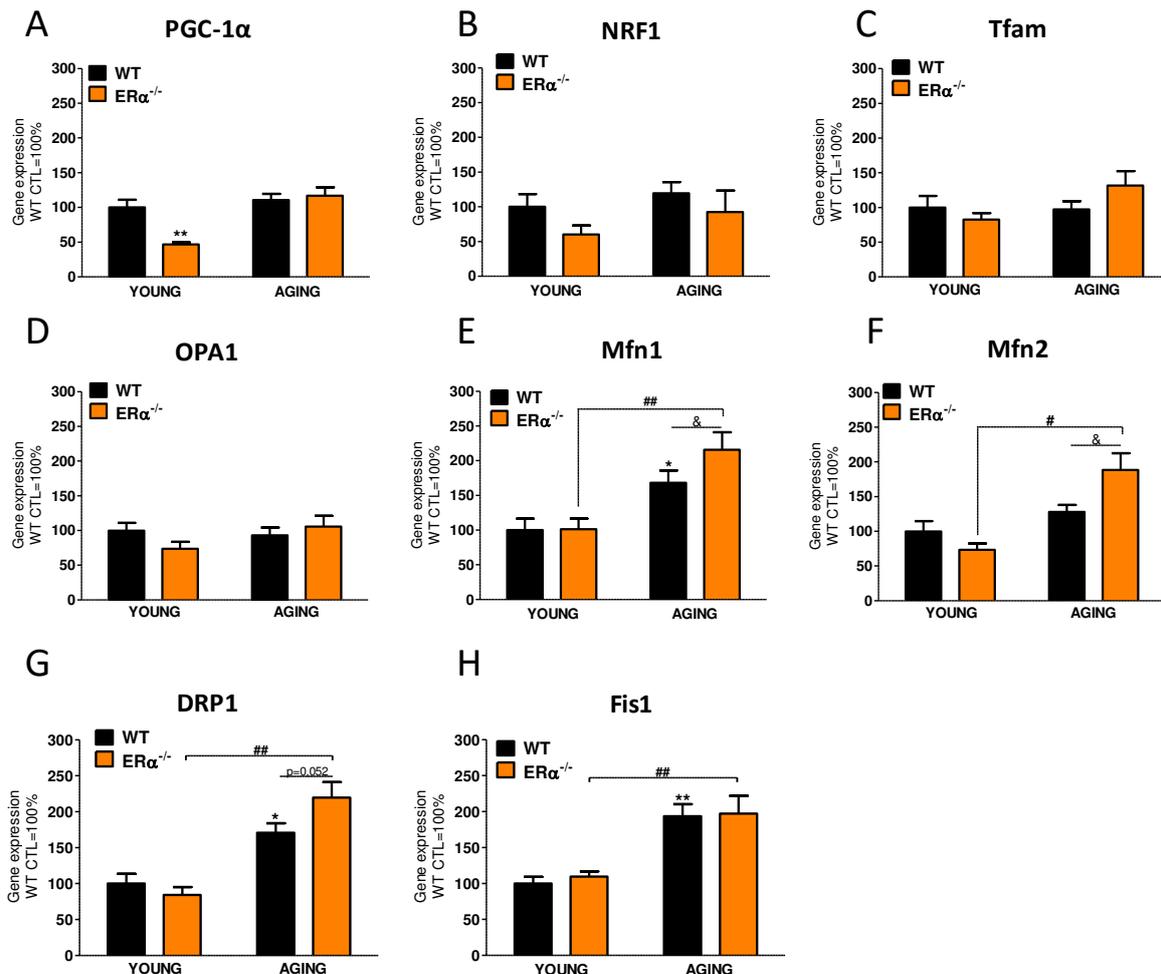


Figure 69 : Expression des gènes régulant la biogénèse, la fusion et la fission mitochondriale chez les souris ER $\alpha^{-/-}$ et WT jeunes et âgées.

Niveaux d'expression, normalisés à l'expression des gènes de référence, des ARNm codant pour (A) PGC-1 α , (B) NRF1, (C) Tfam, (D) OPA-1, (E) Mfn1, (F) Mfn2, (G) DRP1, (H) Fis1 (n=4-5 animaux par groupe), les valeurs sont exprimées en pourcentage par rapport au WT young=100% ; *p<0,05 vs WT young ; **p<0,01 vs WT young ; #p<0,05 vs ER $\alpha^{-/-}$ young ; ##p<0,01 vs ER $\alpha^{-/-}$ young ; & p<0,05 vs WT aging ; test two-way Anova avec un post test de Bonferroni).

Nos résultats précédents n'ont pas mis en évidence de rôle protecteur d'ER α au cours du vieillissement au niveau cardiovasculaire et rénal. Toutefois, afin de répondre à notre hypothèse, nous avons exploré différents paramètres mitochondriaux chez nos animaux WT et ER α ^{-/-}.

Afin d'évaluer l'impact du vieillissement et de l'absence du récepteur ER α sur la biogénèse et la fonction mitochondriales, nous avons mesuré l'expression de gènes clés impliqués dans ces processus chez des souris ER α ^{-/-} jeunes (5 mois) et des souris ER α ^{-/-} âgées (17 mois) en les comparant aux souris WT du même âge.

Les gènes codant pour PGC1- α , NRF1 et Tfam ont été analysés en lien avec la biogénèse mitochondriale. Les gènes codant pour OPA1, Mfn1 et Mfn2 ont été analysés en lien avec la fusion mitochondriale. Enfin, les gènes codant pour DRP1 et Fis1 ont été analysés en lien avec la fission mitochondriale.

Chez les animaux jeunes, l'absence du récepteur ER α entraîne une réduction de l'expression de PGC-1 α par rapport aux souris WT (-63%) (Figure 69 A). En revanche, il n'y a pas de modification de l'expression de NRF1, Tfam, OPA1, Mfn1/2, DRP1 et Fis1 (Figure 69 B-C-D-E-F-G-H).

Chez les animaux WT âgés, l'expression de Mfn1 (+68%), de DRP1 (+70%) et de Fis1 (+93%) est significativement augmentée par rapport aux animaux WT jeunes (Figure 69 E-G-H). En revanche, l'expression de PGC-1 α , de NRF1, Tfam, OPA1 et de Mfn2 n'est pas modifiée (Figure 69 A-B-C-D-F).

Chez les animaux ER α ^{-/-} âgés, l'expression de Mfn1 (+21%) et de Mfn2 (+32%) est significativement augmentée par rapport aux souris WT âgées (Figure 69 E-F). L'expression de PGC-1 α , de NRF1, Tfam, OPA1, DRP1 et Fis1 n'est pas significativement différente

(Figure 69 A-B-C-D-G-H). Nous notons également que l'expression de PGC-1 α qui est réduite chez les souris ER α ^{-/-} jeunes est normale chez les souris ER α ^{-/-} âgées (Figure 69 A).

Le vieillissement chez la souris femelle âgée de 17 mois entraîne une augmentation de l'expression des gènes de fusion et de fission sans modification des gènes de biogénèse.

Chez les souris femelles de 5 mois, l'absence d'ER α réduit l'expression des gènes de biogénèse. Chez les souris femelles âgées de 17 mois, l'absence d'ER α augmente l'expression des gènes de fusion.

3.2. Impact du vieillissement et d'ER α sur la quantité d'ADN mitochondrial

Afin d'évaluer l'impact du vieillissement sur la biogénèse mitochondriale, nous avons analysé la quantité d'ADNmt en rapport avec la quantité d'ADN génomique chez des souris WT, ER α ^{-/-} et AF2° jeunes (5 mois) ou âgées (17 mois).

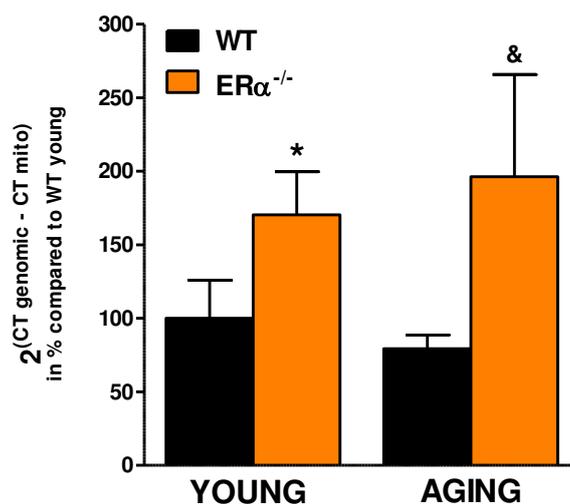


Figure 70 : Quantification de l'ADNmt par rapport à l'ADN génomique chez les souris ER α ^{-/-} et WT jeunes et âgés.

La quantité d'ADNmt a été évaluée par Q-PCR en faisant la différence entre les Ct des gènes mitochondriaux et les Ct des gènes génomiques (n=5-6 animaux par groupe) ; les valeurs sont exprimées en pourcentage par rapport au WT young=100% ; *p<0,05 vs WT young; & p<0,05 vs WT aging; test non-paramétrique two-way Anova avec un post test de Bonferroni).

Nos résultats ne montrent pas d'effet significatif du vieillissement sur la quantité d'ADNmt entre les souris jeunes et âgées, quelque soit le génotype (Figure 70). En revanche, l'absence d'ER α entraîne une augmentation de la quantité d'ADNmt chez les souris jeunes (+70%) et âgées (+116%) par rapport aux souris contrôles.

Le vieillissement ne modifie pas la quantité d'ADNmt au niveau du rein. De manière surprenante, l'absence d'ER α est associée à une hausse de la quantité d'ADNmt, chez les individus jeunes et âgés.

3.3. Impact du vieillissement et d'ER α sur la qualité de l'ADN mitochondrial

Nos résultats précédents font état d'une hausse de quantité d'ADNmt en absence d'ER α , un résultat tout à fait inattendu au vu de la littérature. Nous avons envisagé la possibilité que cette augmentation de quantité pouvait être un phénomène de compensation dû à une détérioration de la qualité de l'ADNmt. Pour vérifier notre hypothèse, nous avons évalué la qualité des échantillons en réalisant une amplification longue des deux moitiés du génome mitochondrial. Les produits d'amplification sont ensuite migrés sur un gel d'agarose. La bande attendue se situe à environ 8 kb. La présence de bandes de poids inférieur est un indicateur d'une fragmentation du génome.

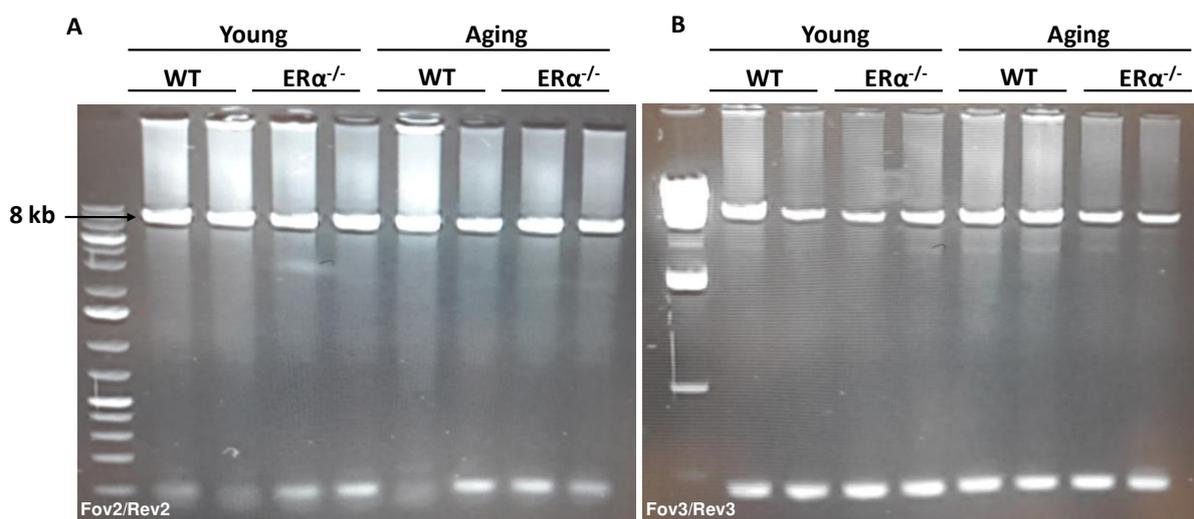


Figure 71 : Evaluation de la qualité de l'ADNmt chez les souris ER $\alpha^{-/-}$ et WT jeunes et âgées.

La qualité de l'ADNmt a été évaluée en amplifiant deux moitiés du génome mitochondrial et en les faisant migrer séparément sur un gel d'agarose. (A) Moitié du génome amplifié par les amorces Fov2/Rev2, (B) moitié du génome amplifié par Fov3/Rev3 (n=4 par groupe).

Nos résultats ne font état d'aucune délétion visible de l'ADNmt chez des animaux ER $\alpha^{-/-}$ (Figure 71). Nous n'observons pas non plus de délétion chez les animaux âgés.

Ni le vieillissement ni l'absence d'ER α chez la souris femelle âgée de 17 mois n'entraîne délétion importante de l'ADNmt au niveau rénal.

Discussion

DISCUSSION

Au cours du vieillissement, les femmes sont moins touchées que les hommes par les altérations cardiovasculaires et rénales^{46;239;340;351}. Cette différence s'explique, en partie, par l'action protectrice des hormones œstrogéniques avant la ménopause^{386;387;388}. Parallèlement à ces effets, les œstrogènes protègent la mitochondrie en augmentant sa biogénèse, sa fonction, en réduisant la dégradation de son ADNmt et le niveau de stress oxydatif^{371;372}.

Dans notre première étude, nous avons mis en évidence un rôle protecteur d'ER α dans la prévention d'un facteur de risque modifiable de MCV, l'HTA. Dans cette deuxième étude que nous pourrions qualifier d'exploratoire, nous avons voulu étudier son rôle protecteur dans un facteur de risque non-modifiable de MCV, le vieillissement. Nous avons émis l'hypothèse qu'ER α réduirait les altérations cardiovasculaires et rénales dues à l'âge en protégeant les mitochondries de ces organes. Pour répondre à notre hypothèse, nous avons tout d'abord analysé l'impact du vieillissement chez des souris femelles sauvages. En deuxième lieu, nous avons analysé l'effet de l'absence d'ER α dans notre modèle. Enfin, nous avons exploré le lien entre altérations physiopathologiques et dégradation mitochondriale.

Nos résultats ont mis en évidence que (1) le vieillissement n'entraîne pas d'altération cardiovasculaires et rénales notables, (2) que le vieillissement augmente le niveau d'inflammation et les facteurs pro-apoptotiques et oxydatifs, (3) que l'absence d'ER α n'altère pas les paramètres cardiovasculaires et rénaux que nous avons mesurés, (4) que les récepteurs aux œstrogènes régulent la quantité d'ADNmt.

1. Les souris femelles âgées ne présentent pas d'altérations notables du système cardiovasculaire

1.1. Evolution des paramètres cardiovasculaires

Les effets du vieillissement ont tout d'abord été observés en comparant des souris femelles WT de 17 mois à des souris WT de 5 mois. Les résultats obtenus ont montré que le vieillissement entraînait une baisse significative de la PAS, sans hypertrophie cardiaque ou remodelage hypertrophique de l'aorte. La capacité contractile ou dilatatrice de l'aorte est également intacte chez les souris âgées. Pourtant chez l'Homme, le vieillissement est associé à une augmentation progressive de la PAS et de la prévalence de l'hypertrophie cardiaque tout au long de la vie adulte ^{389;390}. Dans le système artériel, le vieillissement entraîne une réduction de l'élasticité de la paroi, une rigidification artérielle et une baisse de la vasodilatation endothélium-dépendante ^{391;392}.

Nos résultats sont donc tout à fait étonnants au vu de la bibliographie sur ce sujet. Il existe très peu d'études sur le vieillissement chez la souris femelle mais en 1998, Han et al. avaient démontré que les altérations cardiaques et rénales liées à l'âge décrites chez l'Homme étaient également présentes chez la souris sénescence, mâle ou femelle ³⁹³. Pourtant, dans les paramètres qui ont été étudiés dans notre étude, aucune de ces altérations n'a été observée.

Comme élément explicatif, il est important de préciser que les souris utilisées dans cette étude ne sont pas ovariectomisées. Il est donc tout à fait possible que les animaux conservent une protection hormonale capable de prévenir les altérations classiquement décrites dans le vieillissement. Pour répondre à cette hypothèse, nous avons mesuré la PAS de souris WT mâles âgées de 17 mois issues des mêmes portées que nos souris. Tout comme chez les femelles, les souris mâles présentaient une baisse significative de la PAS (données non-publiées). Il est donc possible qu'un autre facteur soit responsable de ces différences. Au vu de la littérature, nous pouvons d'ores et déjà écarter une PAS trop élevée chez nos souris jeunes ^{394;395}.

1.2. Evolution des paramètres lipidiques circulants

Les analyses des taux de lipides circulants ont permis d'observer une baisse du taux de triglycérides sans modification significative du taux de HDL-c ni de LDL-c. Chez l'Homme, les taux de triglycérides et de LDL-c plasmatiques augmentent jusqu'à environ 50 ans pour les hommes et 60 pour les femmes puis diminuent^{396,397,398}. Cette diminution est indépendante du sexe ou du poids des individus^{399,400}. En revanche, le taux de HDL-c reste relativement stable au cours de la vie⁴⁰¹.

Pour s'assurer de l'absence d'éventuelles altérations métaboliques chez nos souris jeunes, nous avons comparé nos valeurs aux données de référence sur la souris C57BL/6 fournies par l'institut Jackson. Selon leur site, le taux de HDL-c est de 1,5 mmol/L chez les femelles de 4 mois (Physiological data C57BL6, Jackson Institute). Nos résultats rapportent un taux très proche de 1,15 mmol/L chez nos souris femelles de 6 mois. Il en est de même pour les taux de triglycérides et de LDL-c. Le profil lipidique plasmatique des souris jeunes est donc normal.

Malgré une étude approfondie de la littérature sur le sujet, nous n'avons pas trouvé d'étude sur l'évolution des paramètres lipidiques chez la souris femelles C57BL/6 J. Nous avons contacté l'Institut Jackson pour plus de renseignements mais ils n'ont pas été en mesure de fournir des données sur les taux lipidiques plasmatiques chez les femelles de plus de 5 mois. Il apparaît clairement que des études dans ce sens sont nécessaires pour mieux comprendre les différences de vieillissement en fonction du sexe.

Au vu de ces résultats, le vieillissement n'entraîne donc aucune altération métabolique notable chez la souris femelles WT de 17 mois.

2. Le vieillissement augmente l'inflammation du rein sans altérer sa fonction

2.1. Fonction rénale

Dans un deuxième temps, nous avons évalué l'impact du vieillissement sur la fonction rénale. Pour cela, les taux d'urée et de créatinine plasmatiques ont été mesurés chez nos animaux WT jeunes et âgés. Cette mesure est un outil classiquement utilisé pour évaluer la capacité de filtration du rein. L'augmentation du taux d'urée et de créatinine au niveau sanguin est un reflet d'une insuffisance rénale.

Nos résultats ne montrent aucune augmentation de ces paramètres au cours du vieillissement, voire une diminution.

Chez l'Homme, le taux de créatinine plasmatique est corrélé positivement avec l'âge à partir de 40 ans chez les hommes et de 60 ans chez les femmes ⁴⁰². Parallèlement, le taux d'urée plasmatique est directement lié à une baisse du DFG au cours du vieillissement ⁴⁰³. En revanche chez la souris, les études publiées sont plus contradictoires. Hackbarth et Harrison ont étudié les changements de fonction et de structure rénales au cours du vieillissement et n'ont pas observé de modification des niveaux d'urée et de créatinine plasmatiques chez les souris C57BL/6 J ⁴⁰⁴. Chez le rat, Gomes et al. ont observé que la fonction rénale, mesurée par analyse de la créatininémie, n'était pas modifiée avec l'âge ⁴⁰⁵. Toutefois, d'autres études sur le sujet font état d'une baisse du DFG avec l'âge chez la souris ⁴⁰⁶. Les données sont donc controversées.

A ce stade de l'étude, nous n'avons pas d'hypothèse précise pour expliquer les différences entre nos analyses et les données de la littérature. Il est possible que certaines altérations ne soient pas détectables avec la mesure de l'urémie et de la créatininémie. Pour mieux étudier la fonction rénale, il serait intéressant de mesurer le taux d'urée et de créatinine urinaires pour calculer la clairance de ces éléments. Cette information serait un indicateur plus solide pour évaluer d'éventuelles altérations.

Si nous n'avons pas constaté de baisse de la fonction rénale chez nos souris, il n'est pas exclu que les reins des souris âgées présentent certaines altérations. Nous avons donc cherché à évaluer le niveau d'inflammation et de fibrose rénale.

2.2. Inflammation et fibrose rénales

La fonction rénale dépend de l'intégrité des glomérules et des structures tubulaires. Leur atteinte par la fibrose au cours du vieillissement diminue leur capacité de filtration²⁵¹. Nous avons donc cherché à quantifier la fibrose par des colorations histologiques. Malheureusement, nous n'avons pas pu mettre au point de coloration fiable et reproductible, en raison du mode de prélèvement du rein sans fixation au paraformaldéhyde.

L'expression de gènes clés dans la physiopathologie de l'insuffisance rénale a donc été quantifiée pour évaluer l'impact du vieillissement sur ces processus. Ont été analysés le collagène de type I/III, le TGF- β 1, la caspase-7 et p66^{shc}, des gènes clés dans la fibrose et l'inflammation rénale^{293;347;407}. Il a été montré que le taux plasmatique de TGF- β 1 est positivement corrélé à l'apparition et l'aggravation de l'insuffisance rénale chronique chez la souris⁴⁰⁸. Une de ses principales actions délétères est l'augmentation de l'inflammation locale par le recrutement et l'activation des macrophages et des cellules T^{346;407}. Cette inflammation est étroitement liée aux dommages rénaux comme la glomérulosclérose, la fibrose tubulaire et la baisse du DFG^{337;409;410}. Le TGF- β 1 augmente également l'expression de la protéine caspase-7, un acteur clé de l'apoptose et de l'inflammation rénale³⁴⁷. Pour toutes ces raisons, le TGF- β 1 est considéré comme une cible thérapeutique importante contre la fibrose rénale⁴¹¹. De son côté, p66^{shc} joue un rôle délétère majeur dans le stress oxydatif, l'inflammation, la fibrose et le vieillissement et participe à la progression des altérations rénales^{291;296;412}.

Nos résultats ont permis d'observer une hausse significative de l'expression du TGF- β 1, de la caspase-7 et de p66^{shc} au cours du vieillissement. Ces données soulignent donc un statut pro-fibrotique et pro-inflammatoire au niveau rénal qui, s'il est maintenu, entrainerait inévitablement une détérioration de la structure et de la fonction rénale⁴¹³. Nous avons voulu confirmer ces observations en quantifiant l'infiltration de cellules immunitaires au niveau

rénal, reflet du niveau d'inflammation locale. Pour cela, un marquage immunofluorescent a été effectué pour détecter la protéine CD45, un antigène commun à tous les leucocytes ⁴¹⁴. Les résultats obtenus ont mis en évidence une augmentation de l'infiltration leucocytaire chez nos souris âgées.

Ces résultats confirment donc une hausse de l'inflammation rénale chez nos animaux âgés. En revanche, l'expression des gènes du collagène I/III n'est pas modifiée. Nous ne pouvons donc pas conclure quant à l'état de fibrose rénale chez nos animaux. Cet élément étant primordial dans notre étude, nous prévoyons d'utiliser un anticorps anti-collagène III par immunomarquage sur des coupes de rein, technique fiable utilisée en anatomopathologie pour évaluer la fibrose chez les patients ⁴¹⁵.

Nous avons émis l'hypothèse que le récepteur ER α jouait un rôle protecteur clé dans le vieillissement du système cardiovasculaire et rénal. L'absence d'altérations fonctionnelles chez nos souris âgées pourrait potentiellement être due à une action protectrice d'ER α . En utilisant des souris ER $\alpha^{-/-}$, nous avons voulu vérifier si l'absence d'ER α aggravait les paramètres que nous avons évalués.

3. Rôle d'ER α dans le vieillissement cardiovasculaire et rénal

3.1. Paramètres cardiovasculaires, rénaux et lipidiques

Dans la première étude, nous avons évoqué les nombreux effets bénéfiques d'ER α sur le système cardiovasculaire. En revanche, il existe peu de données sur son impact au cours du vieillissement rénal. En analysant les études de la base de données MEDLINE publiées entre 1966 et 2007, Lane P.H. a montré que les souris ER $\alpha^{-/-}$ présentaient une croissance du rein plus faible et qu'elles étaient plus sensibles aux altérations rénales pathologiques, comme dans le diabète ⁴¹⁰. Il a également été montré que l'expression d'ER α était augmentée dans le rein au cours du vieillissement de la souris femelle, alors qu'ER β restait indétectable sous forme d'ARNm ou de protéine ⁴¹⁶. Ces données suggèrent un rôle clé d'ER α dans le rein. De manière globale, la littérature souligne clairement le rôle bénéfique des hormones œstrogéniques contre la glomérulosclérose et la fibrose interstitielle tubulaire, notamment par l'inhibition du SRAA, de l'inflammation et de la production de collagène ^{218;362;416}.

En mesurant la PAS, l'hypertrophie cardiaque, la fonction et la structure vasculaires ainsi que la fonction et l'inflammation rénales, nous n'avons noté aucune incidence notable de l'absence d'ER α , que ce soit chez les souris jeunes ou âgées. Il est donc envisageable qu'ER α n'ait aucun rôle dans les paramètres que nous avons évalués. Mais au vu de son importance dans la physiologie cardiovasculaire, cette hypothèse paraît incertaine.

A notre grande surprise, les analyses d'expression génique que nous avons effectuées chez les souris ER α ^{-/-} ont indiqué une baisse significative de l'expression du collagène de type I/III, du TGF- β 1 et de p66^{shc} dans le rein de ces souris. Ces résultats suggèrent un statut moins favorable à la fibrose rénale que les souris WT. Nos analyses plasmatiques ont également mis en avant que les souris ER α ^{-/-} présentaient un taux de HDL-c supérieur à celui des souris WT tandis que le taux de LDL-c était similaire. A l'inverse, le taux de triglycérides était supérieur à celui des souris WT. Ce profil est observable chez les animaux jeunes et âgés. Dans la littérature, il est décrit qu'une hausse des triglycérides est corrélée à une baisse du taux de HDL-c⁴¹⁷. Ce profil lipidique est donc étonnant et difficile à interpréter quand à son impact cardiovasculaire. Il semble à la fois bénéfique du fait de la hausse du HDL-c et délétère à cause de celle des triglycérides.

Ces données ainsi que celles concernant le profil d'expression génique dans le rein des souris ER α ^{-/-} n'ont jamais été rapportées dans la littérature. Nous pouvons donc émettre l'hypothèse que l'absence d'un récepteur aussi important qu'ER α serait compensée par des mécanismes moléculaires protecteurs. Pour vérifier l'implication d'autres récepteurs aux œstrogènes, nous prévoyons de mesurer l'expression d'ER β et de GPER qui pourraient se substituer à ER α .

Une autre hypothèse repose sur le rôle ambivalent des ERs dans l'organisme. Leurs actions sont très variables en fonction du contexte, du tissu et du temps⁵. Il est avéré qu'ER α joue un rôle protecteur dans un contexte pathologique comme l'hypertension artérielle et l'infarctus du myocarde. Dans un contexte physiologique sain, il est possible qu'ER α n'exerce plus d'effet protecteur. A l'heure actuelle, il n'existe pas d'étude qui apporte une réponse sur ce point.

3.2. Le récepteur ER α modifie la biogénèse mitochondriale

3.2.1. Le vieillissement ne modifie pas la quantité d'ADNmt

Le vieillissement est associé à une altération de la fonction mitochondriale, caractérisée par une diminution de la production d'ATP, une augmentation du stress oxydatif et une accumulation des mutations de l'ADNmt⁴¹⁸. Dans le cœur, le rein et d'autres organes, le vieillissement entraîne une baisse du nombre de mitochondries³⁰². Pour répondre à notre hypothèse sur un potentiel lien entre vieillissement et la mitochondrie, nous avons mesuré la quantité d'ADNmt dans les cellules rénales et évalué l'expression de gènes clés impliqués dans le maintien de ces organites.

Les résultats obtenus n'ont montré aucune modification de la quantité d'ADNmt, reflet direct de la biogénèse mitochondriale au cours du vieillissement. De même, l'expression des gènes PGC-1 α , NRF1 et Tfam régulant la biogénèse mitochondriale n'a pas été modifiée au cours du vieillissement. En revanche, l'expression de la protéine de fusion Mfn1 et des protéines de fission DRP1 et Fis1 a augmenté. Toutefois, l'équilibre entre l'expression des gènes de fusion et de fission semble conservé au cours du vieillissement, cet équilibre étant primordial dans le maintien de l'intégrité de la mitochondrie au cours du vieillissement^{302;419}.

Il apparaît donc que la quantité d'ADNmt n'est pas altérée chez nos souris femelles âgées. Nous avons émis l'hypothèse que le récepteur ER α , présent dans ces organites, les protégeait au cours du vieillissement. Nous avons donc vérifié la quantité d'ADNmt chez les souris déficientes en ER α .

3.2.2. L'absence d'ER α modifie la quantité d'ADNmt

Chez les souris ER $\alpha^{-/-}$, les résultats obtenus ont permis d'observer une baisse significative de l'expression de PGC-1 α chez les animaux jeunes. Chez les souris ER $\alpha^{-/-}$ âgées, l'expression de PGC-1 α était normale tandis que l'expression des protéines de fusion Mfn1 et de Mfn2 étaient augmentées. Le vieillissement n'altère donc pas l'expression des gènes clés dans la régulation mitochondriale et l'absence d'ER α semble favoriser la fusion mitochondriale chez les animaux âgés.

Les données de la littérature ne sont pas catégoriques quant aux changements de quantité d'ADNmt au cours du vieillissement. Chez l'Homme, Cree et al. et Welle et al. ont observé une réduction de la quantité d'ADNmt respectivement dans le pancréas et le muscle squelettique chez des patients âgés ^{420;421}. A l'inverse, Barrientos et al. et Pesce et al. ont rapporté une augmentation du nombre de copies de l'ADNmt au niveau du muscle squelettique au cours du vieillissement ^{422;423}. Enfin, de manière similaire à nos observations, d'autres équipes n'ont rapporté aucune modification du nombre de copies d'ADNmt dans le cerveau, le muscle squelettique et le cœur au cours du vieillissement ^{424;425}. Selon Kazachkova et al. ce manque de consensus pourrait être dû à des différences de méthodes de mesure ⁴²⁶. Pour le vérifier, les auteurs ont comparé les études ayant été faites uniquement avec la technique de RT-qPCR et avec les mêmes amorces. Les résultats restaient néanmoins divergents. Les autres études menées chez la souris sont tout aussi contradictoires que celles menées chez l'Homme ^{427;428;429;430;431}.

Chez la souris C57BL/6, il n'existe à l'heure actuelle qu'une seule étude ayant quantifié l'ADNmt dans le rein au cours du vieillissement et celle-ci rapporte une augmentation ⁴³². En revanche, que ce soit chez la souris jeune ou âgée, l'absence d'ER α est associée à une augmentation de la quantité d'ADNmt. Les données publiées sur le sujet ne sont pas catégoriques quant à l'effet pro-biogénèse d'ER α sur la mitochondrie mais un faisceau d'arguments solides le suggèrent, notamment via la surexpression de NRF1/2 et de Tfam ^{369;372;433}. De plus, nous avons observé une diminution de l'expression de PGC-1 α dans le rein des souris ER α ^{-/-}, un facteur de stimulation de la biogénèse. L'augmentation de la quantité d'ADNmt chez ces souris est donc, encore une fois, très surprenante.

Quelques pistes explicatives peuvent être avancées pour mieux comprendre ces observations. Les œstrogènes sont décrits comme d'importants facteurs de stimulation de la biogénèse des mitochondries ^{252;369;378;379}. En effet, au niveau du muscle squelettique chez le rat, la masse, la fonction et la biogénèse mitochondriales sont supérieures chez les femelles ou les individus traités par l'E2 par rapport aux mâles ou aux femelles ovariectomisées ⁴³⁴. Or, chez les souris ER α ^{-/-}, le taux d'œstrogènes est largement supérieur à celui des souris WT (42,7 pg/mL contre 5,2 pour les WT) ¹⁹⁵. Il est donc possible que ce taux d'hormones induise une plus forte biogénèse, de manière indépendante d'ER α , en passant par exemple par ER β .

3.2.3. L'absence des œstrogènes, d'ER α et d'ER β , modifie la quantité d'ADNmt

Pour vérifier cette hypothèse, nous avons réalisé une analyse de la quantité d'ADNmt chez des souris ovariectomisées et des souris ER β ^{-/-} jeunes en les comparant aux souris WT.

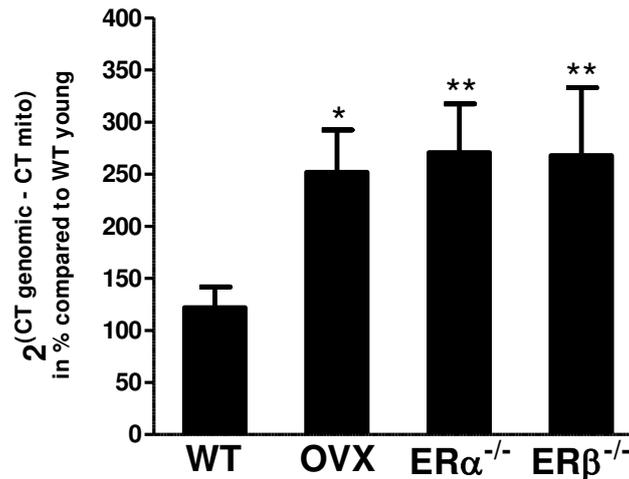


Figure 72 : Analyse de la quantité d'ADNmt chez les souris WT, OVX, ER α ^{-/-} et ER β ^{-/-}.

La quantité d'ADNmt a été évaluée par Q-PCR en faisant la différence entre les Ct des gènes mitochondriaux et les Ct des gènes génomiques (n=4-8 animaux par groupe) ; *p<0,05 vs WT ; **p<0 ;01 vs WT ; test non-paramétrique Kruskal-Wallis avec un post test de Dunns).

Il est apparu que la quantité d'ADNmt était augmentée de manière similaire chez les souris ER α ^{-/-}, ovariectomisés et ER β ^{-/-}, infirmant notre hypothèse (Figure 72). Cependant, la quantité d'ADNmt ne constitue pas une mesure absolue de la biogénèse mitochondriale, même si elle en est une indication. Cette analyse doit être complétée par d'autres expériences, notamment la quantification des protéines de références mitochondriales comme le canal anionique voltage dépendant (VDAC) et les protéines du complexe de la chaîne respiratoire mitochondriale. Si ces expériences ne fournissent pas de résultats, nous prévoyons également d'étudier l'activité mitochondriale de manière directe par analyse des fonctions respiratoires par oxygraphie.

4. Le vieillissement et l'absence d'ER α n'altèrent pas la qualité de l'ADN mitochondrial

S'il n'existe pas de consensus entre le vieillissement et la quantité d'ADNmt au cours du vieillissement, la corrélation positive entre l'âge et l'altération de la qualité de l'ADNmt est clairement établie. Chez l'Homme, le vieillissement entraîne une forte accumulation de mutations et de délétions de l'ADNmt qui détériore la fonction mitochondriale au niveau du rein^{283;418;435}. Ce constat est identique chez la souris^{436;437}. L'augmentation de la quantité d'ADNmt observé chez nos souris OVX, ER $\alpha^{-/-}$ et ER $\beta^{-/-}$ pourrait servir de mécanisme compensatoire pour pallier à une accumulations de mutations.

Nous avons donc voulu vérifier le niveau d'altération de l'ADNmt chez nos souris. Pour ce faire, une amplification du génome mitochondrial a été réalisée en deux parties de 8 kb. Les produits d'amplification ont ensuite été migrés sur un gel d'agarose pour observer la présence éventuelle de bandes de poids inférieur à 8 kb, reflet d'une dégradation de l'ADNmt. Toutefois, les résultats obtenus n'ont pas mis en évidence de délétion de l'ADNmt entre des souris WT et ER $\alpha^{-/-}$, jeunes et ou âgées.

Néanmoins, la technique de PCR longue que nous avons utilisée ne permet pas de détecter les mutations, ni les délétions de petites tailles. Nous avons donc souhaité nous assurer de sa fiabilité en testant des échantillons de souris POLG et Twinkle. Les souris POLG sont des souris mutantes qui expriment une forme mutée de la DNA polymérase- γ , seule polymérase présente dans la mitochondrie^{438;439}. Cette mutation supprime l'activité exonucléotidase impliquée dans la vérification des erreurs de répllication de l'ADNmt⁴⁴⁰. Ces souris créées par l'équipe du Pr. Larsson N.G. au sein de l'institut Max-Planck présentent ainsi des mutations importantes de l'ADNmt qui s'accumulent rapidement avec le temps. Ces animaux développent des signes de sénescence prématurée et représentent un modèle idéal pour étudier le lien entre mutations de l'ADNmt et vieillissement. Les souris Twinkle sont des souris construites sur le même raisonnement au sein du même laboratoire mais dont la mutation affecte la DNA hélicase Twinkle, entraînant également des mutations de l'ADNmt

avec l'âge ⁴⁴¹. En collaboration avec le Dr. Olivier Barris, nous avons obtenu des échantillons de ces souris que nous avons analysés par PCR longue et migration sur gel d'agarose.

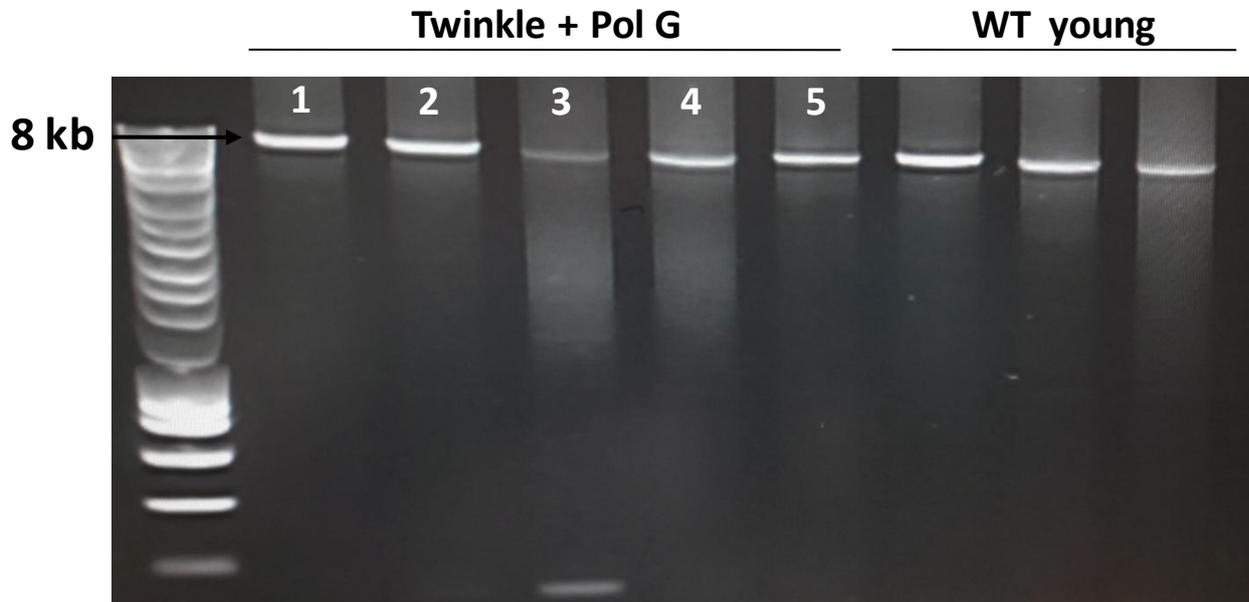


Figure 73 : Evaluation de la qualité de l'ADNmt par PCR longue chez des souris Pol G et Twinkle.

La qualité de l'ADNmt a été évaluée en amplifiant deux moitiés du génome mitochondrial et en les faisant migrer séparément sur un gel d'agarose (génomme amplifié par les amorces Fov2/Rev2) (1) POLG muscle squelettique, (2) POLG cœur, (3) Twinkle muscle squelettique, (4) Twinkle muscle squelettique, (5) POLG muscle squelettique.

Les résultats obtenus ne montrent qu'un seul échantillon de muscle de souris Twinkle présentant des délétions de l'ADNmt (Figure 73, piste 3). Le reste des échantillons issus de souris Twinkle et POLG ne présente pas d'altération. Ce résultat nous a donc poussé à remettre en question la fiabilité de notre méthode, dont le seuil de sensibilité est probablement trop élevé. Nous prévoyons de séquencer nos échantillons à l'aide de la technique de NGS de séquençage à haut débit, plus sensible et permettant de détecter les mutations ponctuelles ainsi que les délétions courtes.

5. Hypothèses et perspectives

Contrairement à nos hypothèses et à ce que les données de la littérature laissaient suggérer, nous n'avons pas observé d'altérations notables dues au vieillissement, que ce soit en présence ou en absence d'ER α . En revanche, nous avons observé un certain nombre d'effets intéressants, notamment vis-à-vis de l'augmentation de la quantité d'ADNmt chez les souris ER α ^{-/-} mais également OVX et ER β ^{-/-}. Aucune donnée de la littérature n'expliquant à l'heure actuelle ces observations, nous prévoyons d'approfondir ces analyses pour mieux comprendre le lien entre récepteurs aux œstrogènes et régulation mitochondriale.

Concernant notre modèle de vieillissement qui ne présente pas de dysfonction majeure, deux éléments peuvent être mis en avant pour expliquer cette différence entre nos résultats et la littérature. Le premier élément est l'âge des souris. Nous utilisons des souris âgées de 17 mois. Le choix de cet âge est basé sur la bibliographie. Selon le site du laboratoire Jackson, producteur des souris C57BL/6 J, les souris sont considérées comme jeunes adultes matures entre 3 et 6 mois. A partir de 6 mois, des signes de sénescence apparaissent, notamment une baisse de la capacité reproductrice. Ce n'est qu'à partir de 15 mois que les souris sont considérées comme âgées. Nous avons donc choisi un âge qui corresponde à un stade de vieillissement suffisamment précoce pour que les altérations secondaires ne constituent pas un biais expérimental en raison de la forte hétérogénéité du vieillissement entre les individus. Il reste néanmoins possible que l'âge de 17 mois ne soit pas assez avancé pour observer des altérations notables.

Le deuxième argument est crucial puisqu'il concerne le sexe des souris utilisées. Dans les études publiées sur l'évolution de la PA, de la fonction rénale et de la fonction mitochondriale avec l'âge, les animaux utilisés sont des mâles. La ménopause n'existant pas chez la souris C57BL/6 femelle, nos souris continuent donc d'être potentiellement protégées par ces hormones⁴⁴². Il serait intéressant de vérifier cette hypothèse en ovariectomisant des souris femelles à un âge précoce puis en les laissant vieillir afin de répéter nos analyses.

CONCLUSION sur l'ETUDE 2

Au cours de cette deuxième étude, nous avons cherché à évaluer le rôle protecteur d'ER α dans le vieillissement cardiovasculaire et rénal. Nous avons émis l'hypothèse qu'ER α protégerait les mitochondries de ces organes, prévenant ainsi les altérations dues au vieillissement.

En comparant des souris femelles jeunes et âgées, nous n'avons pas mis en évidence de rôle protecteur du récepteur ER α vis-à-vis de la fonction cardiovasculaire et rénale. Toutefois, nous avons pu observer un lien encore jamais décrit entre les récepteurs aux œstrogènes et la quantité d'ADNmt.

Nos résultats vont globalement à l'inverse de ce que la littérature permettait de prévoir, ce qui a rendu difficile la conduite de cette étude. Néanmoins, des explications potentielles existent et ce travail doit maintenant être approfondi dans le futur afin de dégager des conclusions plus claires.

Conclusion finale

CONCLUSION FINALE

Les hormones œstrogéniques jouent un rôle clé dans la physiologie des mammifères et agissent sur tous les organes. De nombreuses études ont souligné leurs effets bénéfiques dans les pathologies cardiovasculaires comme l'athérosclérose, la dysfonction endothéliale ou encore l'ischémie-reperfusion. L'action de ces hormones dans le système cardiovasculaire est extrêmement complexe et dépend du sexe, du tissu ciblé, des récepteurs et du contexte physiopathologique.

Gender?	Male / Female
Hormone?	E1 / E2 / E3 / E4
Tissue?	Heart / Arteries / Kidney
Receptor?	ERα / ERβ / GPER
Pathway?	Membrane / Nuclear
Effect?	Protective / Deleterious

Figure 74 : Niveaux de complexité de l'étude des mécanismes d'action œstrogénique.

Le récepteur ER α est le principal acteur des effets positifs des œstrogènes dans les pathologies cardiovasculaires. Toutefois, ce récepteur agit de manière complexe, avec des effets génomiques nucléaires (via les fonctions AF-1 et AF-2) et des effets de signalisation membranaire MISS.

Dans notre première étude, nous avons étudié le rôle protecteur d'ER α dans une pathologie majeure, l'hypertension artérielle. Nous avons confirmé que ce récepteur était nécessaire à la protection œstrogénique contre cette pathologie et ses conséquences cardiovasculaires. Nous avons de plus démontré pour la première fois que la fonction génomique AF-2 d'ER α était responsable de cette protection, et non la signalisation membranaire MISS. Enfin, nous avons prouvé que l'estérol, un œstrogène capable d'activer spécifiquement les fonctions génomiques d'ER α , était capable de prévenir le développement de l'hypertension artérielle induite par l'angiotensine II chez la souris femelle.

Dans une deuxième étude, nous avons tenté de comprendre comment les œstrogènes protègent le système cardiovasculaire et rénal contre les altérations du vieillissement. La mitochondrie joue un rôle clé dans le vieillissement et les œstrogènes protègent cet organe. Nous avons donc tenté d'établir un lien entre protection œstrogénique au cours du vieillissement et protection mitochondriale. Contrairement à notre hypothèse de départ, nous n'avons pas pu observer d'altérations notables dues au vieillissement que ce soit chez des souris sauvages ou génétiquement déficientes en ER α . Toutefois, nous avons pu observer que les œstrogènes régulaient l'homéostasie mitochondriale dans le rein d'une manière encore jamais décrite. Cette étude n'est pas encore terminée et il reste à approfondir ces différents mécanismes.

Avec ces deux études différentes, nous avons tenté de mieux comprendre comment les hormones œstrogéniques agissent dans le système cardiovasculaire et rénal. De très nombreuses questions ont été soulevées lors de ces études et n'ont pas toujours obtenu de réponse. Ce travail a toutefois permis d'apporter des éléments nouveaux contribuant à une meilleure compréhension de l'action de ces hormones.

BIBLIOGRAPHIE

1. Arnal, J.-F. *et al.* Membrane and Nuclear Estrogen Receptor Alpha Actions: From Tissue Specificity to Medical Implications. *Physiol. Rev.* **97**, 1045–1087 (2017).
2. Schiffrin, E. L. From bedside to bench to bedside: role of renin-angiotensin-aldosterone system in remodeling of resistance arteries in hypertension. *AJP Heart Circ. Physiol.* **287**, H435–H446 (2004).
3. Intengan, H. D. & Schiffrin, E. L. Vascular Remodeling in Hypertension. *Hypertension* **38**, 581–587 (2001).
4. Touyz, R. M., Tabet, F. & Schiffrin, E. L. Redox-dependent signalling by angiotensin II and vascular remodelling in hypertension. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* **30**, 860–866 (2003).
5. Menazza, S. & Murphy, E. The Expanding Complexity of Estrogen Receptor Signaling in the Cardiovascular System. *Circ. Res.* **118**, 994–1007 (2016).
6. Arnal, J.-F., Scarabin, P.-Y., Trémollières, F., Laurell, H. & Gourdy, P. Estrogens in vascular biology and disease: where do we stand today? *Curr. Opin. Lipidol.* **18**, 554–560 (2007).
7. Billon-Gales, A. *et al.* Activation function 2 (AF2) of estrogen receptor- is required for the atheroprotective action of estradiol but not to accelerate endothelial healing. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **108**, 13311–13316 (2011).
8. Abot, A. *et al.* The uterine and vascular actions of estetrol delineate a distinctive profile of estrogen receptor modulation, uncoupling nuclear and membrane activation. *EMBO Mol. Med.* **6**, 1328–1346 (2014).

9. Adlanmerini, M. *et al.* Mutation of the palmitoylation site of estrogen receptor in vivo reveals tissue-specific roles for membrane versus nuclear actions. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **111**, E283–E290 (2014).
10. Michiels, C. Endothelial cell functions. *J. Cell. Physiol.* **196**, 430–443 (2003).
11. Pries, A. R. & Kuebler, W. M. Normal endothelium. *Handb. Exp. Pharmacol.* 1–40 (2006).
12. Mehta, D. & Malik, A. B. Signaling mechanisms regulating endothelial permeability. *Physiol. Rev.* **86**, 279–367 (2006).
13. Zwaginga, J. J., Sixma, J. J. & de Groot, P. G. Activation of endothelial cells induces platelet thrombus formation on their matrix. Studies of new in vitro thrombosis model with low molecular weight heparin as anticoagulant. *Arterioscler. Dallas Tex* **10**, 49–61 (1990).
14. Bevilacqua, M. P. Endothelial-leukocyte adhesion molecules. *Annu. Rev. Immunol.* **11**, 767–804 (1993).
15. Peiró, C. *et al.* Influence of endothelium on cultured vascular smooth muscle cell proliferation. *Hypertens. Dallas Tex 1979* **25**, 748–751 (1995).
16. Lerman, A. & Burnett, J. C. Intact and altered endothelium in regulation of vasomotion. *Circulation* **86**, III12-19 (1992).
17. Furchgott, R. F. & Zawadzki, J. V. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature* **288**, 373–376 (1980).
18. Kubes, P., Kanwar, S., Niu, X. F. & Gaboury, J. P. Nitric oxide synthesis inhibition induces leukocyte adhesion via superoxide and mast cells. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* **7**, 1293–1299 (1993).

19. Tsihlis, N. D. *et al.* Nitric oxide inhibits vascular smooth muscle cell proliferation and neointimal hyperplasia by increasing the ubiquitination and degradation of UbcH10. *Cell Biochem. Biophys.* **60**, 89–97 (2011).
20. Blatter, L. A. & Wier, W. G. Nitric oxide decreases $[Ca^{2+}]_i$ in vascular smooth muscle by inhibition of the calcium current. *Cell Calcium* **15**, 122–131 (1994).
21. Xie, Q. W. *et al.* Carboxyl terminus of inducible nitric oxide synthase. Contribution to NADPH binding and enzymatic activity. *J. Biol. Chem.* **269**, 28500–28505 (1994).
22. Vincent, J.-L., Zhang, H., Szabo, C. & Preiser, J.-C. Effects of Nitric Oxide in Septic Shock. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **161**, 1781–1785 (2000).
23. Davis, M. E., Grumbach, I. M., Fukai, T., Cutchins, A. & Harrison, D. G. Shear stress regulates endothelial nitric-oxide synthase promoter activity through nuclear factor kappaB binding. *J. Biol. Chem.* **279**, 163–168 (2004).
24. Bae, S. W. *et al.* Rapid increase in endothelial nitric oxide production by bradykinin is mediated by protein kinase A signaling pathway. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **306**, 981–987 (2003).
25. Arnal, J. F., Dinh-Xuan, A. T., Pueyo, M., Darblade, B. & Rami, J. Endothelium-derived nitric oxide and vascular physiology and pathology. *Cell. Mol. Life Sci. CMLS* **55**, 1078–1087 (1999).
26. Chambliss, K. L. & Shaul, P. W. Estrogen modulation of endothelial nitric oxide synthase. *Endocr. Rev.* **23**, 665–686 (2002).
27. Takahashi, S. & Mendelsohn, M. E. Calmodulin-dependent and -independent activation of endothelial nitric-oxide synthase by heat shock protein 90. *J. Biol. Chem.* **278**, 9339–9344 (2003).

28. Fulton, D. *et al.* Localization of endothelial nitric-oxide synthase phosphorylated on serine 1179 and nitric oxide in Golgi and plasma membrane defines the existence of two pools of active enzyme. *J. Biol. Chem.* **277**, 4277–4284 (2002).
29. Bátori, R. *et al.* Interplay of myosin phosphatase and protein phosphatase-2A in the regulation of endothelial nitric-oxide synthase phosphorylation and nitric oxide production. *Sci. Rep.* **7**, 44698 (2017).
30. Loufrani, L. & Henrion, D. Role of the cytoskeleton in flow (shear stress)-induced dilation and remodeling in resistance arteries. *Med. Biol. Eng. Comput.* **46**, 451–60 (2008).
31. Harris, M. B., Ju, H., Venema, V. J., Blackstone, M. & Venema, R. C. Role of heat shock protein 90 in bradykinin-stimulated endothelial nitric oxide release. *Gen. Pharmacol.* **35**, 165–170 (2000).
32. Jin, Z.-G. *et al.* Ligand-independent activation of vascular endothelial growth factor receptor 2 by fluid shear stress regulates activation of endothelial nitric oxide synthase. *Circ. Res.* **93**, 354–363 (2003).
33. Haynes, M. P. *et al.* Membrane estrogen receptor engagement activates endothelial nitric oxide synthase via the PI3-kinase-Akt pathway in human endothelial cells. *Circ. Res.* **87**, 677–682 (2000).
34. Vanhoutte, P. M. & Tang, E. H. C. Endothelium-dependent contractions: when a good guy turns bad! *J. Physiol.* **586**, 5295–5304 (2008).
35. Newby, A. C. & Henderson, A. H. Stimulus-secretion coupling in vascular endothelial cells. *Annu. Rev. Physiol.* **52**, 661–674 (1990).
36. Shah, B. H. Estrogen stimulation of COX-2-derived PGI₂ confers atheroprotection. *Trends Endocrinol. Metab.* **16**, 199–201 (2005).

37. Giles, T. D., Sander, G. E., Nossaman, B. D. & Kadowitz, P. J. Impaired vasodilation in the pathogenesis of hypertension: focus on nitric oxide, endothelial-derived hyperpolarizing factors, and prostaglandins. *J. Clin. Hypertens. Greenwich Conn* **14**, 198–205 (2012).
38. Cowan, C. L. & Cohen, R. A. Two mechanisms mediate relaxation by bradykinin of pig coronary artery: NO-dependent and -independent responses. *Am. J. Physiol.* **261**, H830-835 (1991).
39. Marrelli, S. P., Eckmann, M. S. & Hunte, M. S. Role of endothelial intermediate conductance KCa channels in cerebral EDHF-mediated dilations. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* **285**, H1590-1599 (2003).
40. Sudhahar, V., Shaw, S. & Imig, J. D. Epoxyeicosatrienoic Acid Analogs and Vascular Function. *Curr. Med. Chem.* **17**, 1181–1190 (2010).
41. Bellien, J., Joannides, R., Richard, V. & Thuillez, C. Modulation of cytochrome-derived epoxyeicosatrienoic acids pathway: a promising pharmacological approach to prevent endothelial dysfunction in cardiovascular diseases? *Pharmacol. Ther.* **131**, 1–17 (2011).
42. Hye Khan, M. A., Falck, J. R., Manthati, V. L., Campbell, W. B. & Imig, J. D. Epoxyeicosatrienoic acid analog attenuates angiotensin II hypertension and kidney injury. *Front. Pharmacol.* **5**, (2014).
43. Ozkor, M. A. & Quyyumi, A. A. Endothelium-Derived Hyperpolarizing Factor and Vascular Function. *Cardiol. Res. Pract.* **2011**, e156146 (2011).
44. North, B. J. & Sinclair, D. A. The Intersection Between Aging and Cardiovascular Disease. *Circ. Res.* **110**, 1097–1108 (2012).
45. Maas, A. H. E. M. & Appelman, Y. E. A. Gender differences in coronary heart disease. *Neth. Heart J.* **18**, 598–602 (2010).

46. Mendelsohn, M. E. & Karas, R. H. Molecular and Cellular Basis of Cardiovascular Gender Differences. *Science* **308**, 1583–1587 (2005).
47. Nettleship, J. E., Jones, R. D., Channer, K. S. & Jones, T. H. Testosterone and coronary artery disease. *Front. Horm. Res.* **37**, 91–107 (2009).
48. Bachmann, J. M., Willis, B. L., Ayers, C. R., Khera, A. & Berry, J. D. Association Between Family History and Coronary Heart Disease Death Across Long-Term Follow-Up in Men. *Circulation* **125**, 3092–3098 (2012).
49. Weber, M. A. *et al.* Clinical practice guidelines for the management of hypertension in the community: a statement by the American Society of Hypertension and the International Society of Hypertension. *J. Clin. Hypertens. Greenwich Conn* **16**, 14–26 (2014).
50. ESH/ESC Task Force for the Management of Arterial Hypertension. 2013 Practice guidelines for the management of arterial hypertension of the European Society of Hypertension (ESH) and the European Society of Cardiology (ESC): ESH/ESC Task Force for the Management of Arterial Hypertension. *J. Hypertens.* **31**, 1925–1938 (2013).
51. Barton, M., Husmann, M. & Meyer, M. R. Accelerated Vascular Aging as a Paradigm for Hypertensive Vascular Disease: Prevention and Therapy. *Can. J. Cardiol.* **32**, 680–686.e4 (2016).
52. Hecht, S. S. Cigarette smoking and lung cancer: chemical mechanisms and approaches to prevention. *Lancet Oncol.* **3**, 461–469 (2002).
53. Messner, B. & Bernhard, D. Smoking and cardiovascular disease: mechanisms of endothelial dysfunction and early atherogenesis. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **34**, 509–515 (2014).

54. Farley, T. M., Meirik, O., Chang, C. L. & Poulter, N. R. Combined oral contraceptives, smoking, and cardiovascular risk. *J. Epidemiol. Community Health* **52**, 775–785 (1998).
55. Olokoba, A. B., Obateru, O. A. & Olokoba, L. B. Type 2 Diabetes Mellitus: A Review of Current Trends. *Oman Med. J.* **27**, 269–273 (2012).
56. Deshpande, A. D., Harris-Hayes, M. & Schootman, M. Epidemiology of Diabetes and Diabetes-Related Complications. *Phys. Ther.* **88**, 1254–1264 (2008).
57. Grundy, S. M. *et al.* Diabetes and Cardiovascular Disease. *Circulation* **100**, 1134–1146 (1999).
58. Liu, M. *et al.* Cardiovascular disease and its relationship with chronic kidney disease. *Eur. Rev. Med. Pharmacol. Sci.* **18**, 2918–2926 (2014).
59. Warren, T. Y. *et al.* Sedentary Behaviors Increase Risk of Cardiovascular Disease Mortality in Men. *Med. Sci. Sports Exerc.* **42**, 879–885 (2010).
60. Muñoz-Garach, A., Cornejo-Pareja, I. & Tinahones, F. J. Does Metabolically Healthy Obesity Exist? *Nutrients* **8**, (2016).
61. Kaur, J. A comprehensive review on metabolic syndrome. *Cardiol. Res. Pract.* **2014**, 943162 (2014).
62. Barazanji, M. W. & Cornish, K. G. Carotid and aortic baroreceptor control of heart rate in conscious monkey. *Am. J. Physiol.* **253**, H811-817 (1987).
63. Coffman, T. M. Under pressure: the search for the essential mechanisms of hypertension. *Nat. Med.* **17**, 1402–1409 (2011).
64. Gabb, G. M. *et al.* Guideline for the diagnosis and management of hypertension in adults — 2016. *Med. J. Aust.* **205**, (2016).
65. Woolf, K. J. & Bisognano, J. D. Nondrug Interventions for Treatment of Hypertension. *J. Clin. Hypertens.* **13**, 829–835 (2011).

66. Duprez, D. A. Role of the renin-angiotensin-aldosterone system in vascular remodeling and inflammation: a clinical review. *J. Hypertens.* **24**, 983–991 (2006).
67. Suzuki, J. *et al.* Role of angiotensin II-regulated apoptosis through distinct AT1 and AT2 receptors in neointimal formation. *Circulation* **106**, 847–853 (2002).
68. Horiuchi, M., Akishita, M. & Dzau, V. J. Recent progress in angiotensin II type 2 receptor research in the cardiovascular system. *Hypertens. Dallas Tex 1979* **33**, 613–621 (1999).
69. Henrion, D., Kubis, N. & Lévy, B. I. Physiological and pathophysiological functions of the AT(2) subtype receptor of angiotensin II: from large arteries to the microcirculation. *Hypertens. Dallas Tex 1979* **38**, 1150–1157 (2001).
70. Aguilar, A. Hypertension: AT2R activation counteracts hypertension. *Nat. Rev. Nephrol.* **12**, 443 (2016).
71. Carey, R. M., Jin, X. H. & Siragy, H. M. Role of the angiotensin AT2 receptor in blood pressure regulation and therapeutic implications. *Am. J. Hypertens.* **14**, 98S–102S (2001).
72. Tian, B., Liu, J., Bitterman, P. & Bache, R. J. Angiotensin II modulates nitric oxide-induced cardiac fibroblast apoptosis by activation of AKT/PKB. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* **285**, H1105-1112 (2003).
73. Sakai, K. *et al.* Local production of angiotensin II in the subfornical organ causes elevated drinking. *J. Clin. Invest.* **117**, 1088–1095 (2007).
74. Bollag, W. B. Regulation of aldosterone synthesis and secretion. *Compr. Physiol.* **4**, 1017–1055 (2014).
75. Perlman, R. L. & Chalfie, M. Catecholamine release from the adrenal medulla. *Clin. Endocrinol. Metab.* **6**, 551–576 (1977).

76. Macova, M. *et al.* Estrogen Reduces Aldosterone, Upregulates Adrenal Angiotensin II AT₂ Receptors and Normalizes Adrenomedullary Fra-2 in Ovariectomized Rats. *Neuroendocrinology* **88**, 276–286 (2008).
77. Salyer, S. A. *et al.* Aldosterone regulates Na(+), K(+) ATPase activity in human renal proximal tubule cells through mineralocorticoid receptor. *Biochim. Biophys. Acta* **1833**, 2143–2152 (2013).
78. Morton, J. J., Garcia del Rio, C. & Hughes, M. J. Effect of acute vasopressin infusion on blood pressure and plasma angiotensin II in normotensive and DOCA-salt hypertensive rats. *Clin. Sci. Lond. Engl.* 1979 **62**, 143–149 (1982).
79. Gibbons, G. H., Pratt, R. E. & Dzau, V. J. Vascular smooth muscle cell hypertrophy vs. hyperplasia. Autocrine transforming growth factor-beta 1 expression determines growth response to angiotensin II. *J. Clin. Invest.* **90**, 456–461 (1992).
80. Ward, M. R., Pasterkamp, G., Yeung, A. C. & Borst, C. Arterial Remodeling. *Circulation* **102**, 1186–1191 (2000).
81. Callera, G. E. *et al.* c-Src Inhibition Improves Cardiovascular Function but not Remodeling or Fibrosis in Angiotensin II-Induced Hypertension. *Hypertens. Dallas Tex* 1979 **68**, 1179–1190 (2016).
82. Wada, T. & Penninger, J. M. Mitogen-activated protein kinases in apoptosis regulation. *Oncogene* **23**, 2838–2849 (2004).
83. Zhang, W. & Liu, H. T. MAPK signal pathways in the regulation of cell proliferation in mammalian cells. *Cell Res.* **12**, 9–18 (2002).
84. Pueyo, M. E. *et al.* Angiotensin II stimulates endothelial vascular cell adhesion molecule-1 via nuclear factor-kappaB activation induced by intracellular oxidative stress. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **20**, 645–651 (2000).

85. Szabó, C. *et al.* Angiotensin II–Mediated Endothelial Dysfunction: Role of Poly(ADP-ribose) Polymerase Activation. *Mol. Med.* **10**, 28–35 (2004).
86. Navalkar, S., Parthasarathy, S., Santanam, N. & Khan, B. V. Irbesartan, an angiotensin type 1 receptor inhibitor, regulates markers of inflammation in patients with premature atherosclerosis. *J. Am. Coll. Cardiol.* **37**, 440–444 (2001).
87. Page-McCaw, A., Ewald, A. J. & Werb, Z. Matrix metalloproteinases and the regulation of tissue remodelling. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **8**, 221–233 (2007).
88. Risler, N., Castro, C., Cruzado, M., González, S. & Miatello, R. Early changes in proteoglycans production by resistance arteries smooth muscle cells of hypertensive rats. *Am. J. Hypertens.* **15**, 416–421 (2002).
89. Rossi, G. P. *et al.* Aortic smooth muscle cell phenotypic modulation and fibrillar collagen deposition in angiotensin II-dependent hypertension. *Cardiovasc. Res.* **55**, 178–189 (2002).
90. Delva, P. *et al.* Collagen I and III mRNA gene expression and cell growth potential of skin fibroblasts in patients with essential hypertension. *J. Hypertens.* **20**, 1393–1399 (2002).
91. Mulvany, M. J. *et al.* Vascular remodeling. *Hypertens. Dallas Tex 1979* **28**, 505–506 (1996).
92. Rizzoni, D. *et al.* Time course of apoptosis in small resistance arteries of spontaneously hypertensive rats. *J. Hypertens.* **18**, 885–891 (2000).
93. Hocher, B. *et al.* Endothelin system-dependent cardiac remodeling in renovascular hypertension. *Hypertens. Dallas Tex 1979* **33**, 816–822 (1999).
94. Izzard, A. S. & Heagerty, A. M. Impaired flow-dependent dilatation in distal mesenteric arteries from the spontaneously hypertensive rat. *J. Physiol.* **518**, 239–245 (1999).

95. Park, J. B. & Schiffrin, E. L. Small artery remodeling is the most prevalent (earliest?) form of target organ damage in mild essential hypertension. *J. Hypertens.* **19**, 921–930 (2001).
96. Schiffrin, E. L., Deng, L. Y. & Larochele, P. Morphology of resistance arteries and comparison of effects of vasoconstrictors in mild essential hypertensive patients. *Clin. Investig. Med. Med. Clin. Exp.* **16**, 177–186 (1993).
97. Taddei, S., Viridis, A., Mattei, P. & Salvetti, A. Vasodilation to acetylcholine in primary and secondary forms of human hypertension. *Hypertension* **21**, 929–933 (1993).
98. Panza, J. A., Quyyumi, A. A., Brush, J. E. & Epstein, S. E. Abnormal endothelium-dependent vascular relaxation in patients with essential hypertension. *N. Engl. J. Med.* **323**, 22–27 (1990).
99. Schiffrin, E. L. & Deng, L. Y. Structure and function of resistance arteries of hypertensive patients treated with a beta-blocker or a calcium channel antagonist. *J. Hypertens.* **14**, 1247–1255 (1996).
100. Dharmashankar, K. & Widlansky, M. E. Vascular Endothelial Function and Hypertension: Insights and Directions. *Curr. Hypertens. Rep.* **12**, 448–455 (2010).
101. Vita, J. A. & Keaney, J. F. Endothelial function: a barometer for cardiovascular risk? *Circulation* **106**, 640–642 (2002).
102. Modena, M. G., Bonetti, L., Coppi, F., Bursi, F. & Rossi, R. Prognostic role of reversible endothelial dysfunction in hypertensive postmenopausal women. *J. Am. Coll. Cardiol.* **40**, 505–510 (2002).
103. Ludmer, P. L. *et al.* Paradoxical vasoconstriction induced by acetylcholine in atherosclerotic coronary arteries. *N. Engl. J. Med.* **315**, 1046–1051 (1986).
104. Widlansky, M. E., Gokce, N., Keaney, J. F. & Vita, J. A. The clinical implications of endothelial dysfunction. *J. Am. Coll. Cardiol.* **42**, 1149–1160 (2003).

105. Panza, J. A., García, C. E., Kilcoyne, C. M., Quyyumi, A. A. & Cannon, R. O. Impaired endothelium-dependent vasodilation in patients with essential hypertension. Evidence that nitric oxide abnormality is not localized to a single signal transduction pathway. *Circulation* **91**, 1732–1738 (1995).
106. Sander, M., Chavoshan, B. & Victor, R. G. A large blood pressure-raising effect of nitric oxide synthase inhibition in humans. *Hypertens. Dallas Tex 1979* **33**, 937–942 (1999).
107. Rossi, R. *et al.* Flow-mediated vasodilation and the risk of developing hypertension in healthy postmenopausal women. *J. Am. Coll. Cardiol.* **44**, 1636–1640 (2004).
108. Juonala, M. *et al.* Elevated blood pressure in adolescent boys predicts endothelial dysfunction: the cardiovascular risk in young Finns study. *Hypertens. Dallas Tex 1979* **48**, 424–430 (2006).
109. Shimbo, D. *et al.* Endothelial dysfunction and the risk of hypertension: the multi-ethnic study of atherosclerosis. *Hypertens. Dallas Tex 1979* **55**, 1210–1216 (2010).
110. Jablonski, K. L., Gates, P. E., Pierce, G. L. & Seals, D. R. Low dietary sodium intake is associated with enhanced vascular endothelial function in middle-aged and older adults with elevated systolic blood pressure. *Ther. Adv. Cardiovasc. Dis.* **3**, 347–356 (2009).
111. McCall, D. O. *et al.* Dietary intake of fruits and vegetables improves microvascular function in hypertensive subjects in a dose-dependent manner. *Circulation* **119**, 2153–2160 (2009).
112. Mancini, G. B. *et al.* Angiotensin-converting enzyme inhibition with quinapril improves endothelial vasomotor dysfunction in patients with coronary artery disease. The TREND (Trial on Reversing ENdothelial Dysfunction) Study. *Circulation* **94**, 258–265 (1996).
113. Imanishi, T. *et al.* Renin inhibitor aliskiren improves impaired nitric oxide bioavailability and protects against atherosclerotic changes. *Hypertens. Dallas Tex 1979* **52**, 563–572 (2008).

114. Pitt, B. *et al.* The effect of spironolactone on morbidity and mortality in patients with severe heart failure. Randomized Aldactone Evaluation Study Investigators. *N. Engl. J. Med.* **341**, 709–717 (1999).
115. Griendling, K. K. *et al.* Measurement of Reactive Oxygen Species, Reactive Nitrogen Species, and Redox-Dependent Signaling in the Cardiovascular System: A Scientific Statement From the American Heart Association. *Circ. Res.* **119**, e39-75 (2016).
116. Apel, K. & Hirt, H. REACTIVE OXYGEN SPECIES: Metabolism, Oxidative Stress, and Signal Transduction. *Annu. Rev. Plant Biol.* **55**, 373–399 (2004).
117. Dean, R. T., Fu, S., Stocker, R. & Davies, M. J. Biochemistry and pathology of radical-mediated protein oxidation. *Biochem. J.* **324**, 1–18 (1997).
118. Tsutsui, H., Kinugawa, S. & Matsushima, S. Oxidative stress and heart failure. *Am. J. Physiol. - Heart Circ. Physiol.* **301**, H2181–H2190 (2011).
119. Cadenas, E. & Davies, K. J. A. Mitochondrial free radical generation, oxidative stress, and aging. *Free Radic. Biol. Med.* **29**, 222–230 (2000).
120. Sahoo, S., Meijles, D. N. & Pagano, P. J. NADPH oxidases: key modulators in aging and age-related cardiovascular diseases? *Clin. Sci.* **130**, 317–335 (2016).
121. Gardiner, G. J. *et al.* A role for NADPH oxidase in antigen presentation. *Front. Immunol.* **4**, 295 (2013).
122. Paravicini, T. M. & Touyz, R. M. NADPH Oxidases, Reactive Oxygen Species, and Hypertension. *Diabetes Care* **31**, S170–S180 (2008).
123. Bayraktutan, U., Blayney, L. & Shah, A. M. Molecular Characterization and Localization of the NAD(P)H Oxidase Components gp91-phox and p22-phox in Endothelial Cells. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **20**, 1903–1911 (2000).
124. Takeya, R. & Sumimoto, H. Regulation of novel superoxide-producing NAD(P)H oxidases. *Antioxid. Redox Signal.* **8**, 1523–1532 (2006).

125. Ushio-Fukai, M., Alexander, R. W., Akers, M. & Griendling, K. K. p38 Mitogen-activated Protein Kinase Is a Critical Component of the Redox-sensitive Signaling Pathways Activated by Angiotensin II ROLE IN VASCULAR SMOOTH MUSCLE CELL HYPERTROPHY. *J. Biol. Chem.* **273**, 15022–15029 (1998).
126. Gongora, M. C. *et al.* Role of Extracellular Superoxide Dismutase in Hypertension. *Hypertension* **48**, 473–481 (2006).
127. Sui, H., Wang, W., Wang, P.-H. & Liu, L.-S. Effect of glutathione peroxidase mimic ebselen (PZ51) on endothelium and vascular structure of stroke-prone spontaneously hypertensive rats. *Blood Press.* **14**, 366–372 (2005).
128. Welch, W. J. *et al.* Role of extracellular superoxide dismutase in the mouse angiotensin slow pressor response. *Hypertension* **48**, 934–941 (2006).
129. Wassmann, S., Wassmann, K. & Nickenig, G. Modulation of Oxidant and Antioxidant Enzyme Expression and Function in Vascular Cells. *Hypertension* **44**, 381–386 (2004).
130. Cai, H. Hydrogen peroxide regulation of endothelial function: origins, mechanisms, and consequences. *Cardiovasc. Res.* **68**, 26–36 (2005).
131. Harrison, D. G. & Gongora, M. C. Oxidative stress and hypertension. *Med. Clin. North Am.* **93**, 621–635 (2009).
132. Dalle-Donne, I., Giustarini, D., Colombo, R., Rossi, R. & Milzani, A. Protein carbonylation in human diseases. *Trends Mol. Med.* **9**, 169–176 (2003).
133. Taniyama, Y. & Griendling, K. K. Reactive oxygen species in the vasculature: molecular and cellular mechanisms. *Hypertens. Dallas Tex 1979* **42**, 1075–1081 (2003).
134. Ermak, G. & Davies, K. J. A. Calcium and oxidative stress: from cell signaling to cell death. *Mol. Immunol.* **38**, 713–721 (2002).

135. Tabet, F., Savoia, C., Schiffrin, E. L. & Touyz, R. M. Differential calcium regulation by hydrogen peroxide and superoxide in vascular smooth muscle cells from spontaneously hypertensive rats. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* **44**, 200–208 (2004).
136. Chiarugi, P. & Cirri, P. Redox regulation of protein tyrosine phosphatases during receptor tyrosine kinase signal transduction. *Trends Biochem. Sci.* **28**, 509–514 (2003).
137. Landmesser, U. *et al.* Role of p47(phox) in vascular oxidative stress and hypertension caused by angiotensin II. *Hypertens. Dallas Tex 1979* **40**, 511–515 (2002).
138. Jung, O. *et al.* gp91phox-Containing NADPH Oxidase Mediates Endothelial Dysfunction in Renovascular Hypertension. *Circulation* **109**, 1795–1801 (2004).
139. Modlinger, P. *et al.* RNA Silencing In Vivo Reveals Role of p22phox in Rat Angiotensin Slow Pressor Response. *Hypertension* **47**, 238–244 (2006).
140. Reckelhoff, J. F. Gender Differences in the Regulation of Blood Pressure. *Hypertension* **37**, 1199–1208 (2001).
141. Hajjar I & Kotchen TA. Trends in prevalence, awareness, treatment, and control of hypertension in the united states, 1988-2000. *JAMA* **290**, 199–206 (2003).
142. Owens, J. F., Stoney, C. M. & Matthews, K. A. Menopausal status influences ambulatory blood pressure levels and blood pressure changes during mental stress. *Circulation* **88**, 2794–2802 (1993).
143. Mercurio, G. *et al.* Menopause induced by oophorectomy reveals a role of ovarian estrogen on the maintenance of pressure homeostasis. *Maturitas* **47**, 131–138 (2004).
144. Barton, M. & Meyer, M. R. Postmenopausal hypertension: mechanisms and therapy. *Hypertens. Dallas Tex 1979* **54**, 11–18 (2009).
145. Wang, F. *et al.* Augmented healing process in female mice with acute myocardial infarction. *Gend. Med.* **4**, 230–247 (2007).

146. Dent, M. R., Tappia, P. S. & Dhalla, N. S. Gender differences in apoptotic signaling in heart failure due to volume overload. *Apoptosis Int. J. Program. Cell Death* **15**, 499–510 (2010).
147. Javeshghani, D., Schiffrin, E. L., Sairam, M. R. & Touyz, R. M. Potentiation of vascular oxidative stress and nitric oxide-mediated endothelial dysfunction by high-fat diet in a mouse model of estrogen deficiency and hyperandrogenemia. *J. Am. Soc. Hypertens. JASH* **3**, 295–305 (2009).
148. Lew, R., Komesaroff, P., Williams, M., Dawood, T. & Sudhir, K. Endogenous estrogens influence endothelial function in young men. *Circ. Res.* **93**, 1127–1133 (2003).
149. Nelson, L. R. & Bulun, S. E. Estrogen production and action. *J. Am. Acad. Dermatol.* **45**, S116–S124 (2001).
150. Simpson, E. R. *et al.* Aromatase cytochrome P450, the enzyme responsible for estrogen biosynthesis. *Endocr. Rev.* **15**, 342–355 (1994).
151. Silva, T. C. B. F., Barrett-Connor, E., Ramires, J. a. F. & Mansur, A. P. Obesity, estrone, and coronary artery disease in postmenopausal women. *Maturitas* **59**, 242–248 (2008).
152. Cagnacci, A. *et al.* Effects of low doses of transdermal 17 beta-estradiol on carbohydrate metabolism in postmenopausal women. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **74**, 1396–1400 (1992).
153. Carani, C. *et al.* Effect of testosterone and estradiol in a man with aromatase deficiency. *N. Engl. J. Med.* **337**, 91–95 (1997).
154. Reed, B. G. & Carr, B. R. The Normal Menstrual Cycle and the Control of Ovulation. in *Endotext* (eds. De Groot, L. J. *et al.*) (MDText.com, Inc., 2000).
155. Estradiol: Reference Range, Interpretation, Collection and Panels. (2016).

156. Writing Group for the Women's Health Initiative Investigators. Risks and benefits of estrogen plus progestin in healthy postmenopausal women: Principal results from the women's health initiative randomized controlled trial. *JAMA* **288**, 321–333 (2002).
157. Banks, E. & Canfell, K. Invited Commentary: Hormone therapy risks and benefits--The Women's Health Initiative findings and the postmenopausal estrogen timing hypothesis. *Am. J. Epidemiol.* **170**, 24–28 (2009).
158. Ortmann, J., Traupe, T., Vetter, W. & Barton, M. [Postmenopausal hormone replacement therapy and cardiovascular risk: role of conjugated equine estrogens and medroxyprogesterone acetate]. *Praxis* **93**, 904–914 (2004).
159. Deroo, B. J. & Korach, K. S. Estrogen receptors and human disease. *J. Clin. Invest.* **116**, 561–570 (2006).
160. Barton, M. Position paper: The membrane estrogen receptor GPER--Clues and questions. *Steroids* **77**, 935–942 (2012).
161. Khan, D. & Ansar Ahmed, S. The Immune System Is a Natural Target for Estrogen Action: Opposing Effects of Estrogen in Two Prototypical Autoimmune Diseases. *Front. Immunol.* **6**, (2016).
162. Lindberg, M. K. *et al.* Estrogen receptor (ER)-beta reduces ERalpha-regulated gene transcription, supporting a 'ying yang' relationship between ERalpha and ERbeta in mice. *Mol. Endocrinol. Baltim. Md* **17**, 203–208 (2003).
163. Couse, J. F., Lindzey, J., Grandien, K., Gustafsson, J.-A. K. & Korach, K. S. Tissue Distribution and Quantitative Analysis of Estrogen Receptor- α (ER α) and Estrogen Receptor- β (ER β) Messenger Ribonucleic Acid in the Wild-Type and ER α -Knockout Mouse. *Endocrinology* **138**, 4613–4621 (1997).
164. Nikolic, I. *et al.* Treatment with an estrogen receptor-beta-selective agonist is cardioprotective. *J. Mol. Cell. Cardiol.* **42**, 769–780 (2007).

165. O'Lone, R. *et al.* Estrogen receptors alpha and beta mediate distinct pathways of vascular gene expression, including genes involved in mitochondrial electron transport and generation of reactive oxygen species. *Mol. Endocrinol. Baltim. Md* **21**, 1281–1296 (2007).
166. Tan, E., Gurjar, M. V., Sharma, R. V. & Bhalla, R. C. Estrogen receptor-alpha gene transfer into bovine aortic endothelial cells induces eNOS gene expression and inhibits cell migration. *Cardiovasc. Res.* **43**, 788–797 (1999).
167. Nuedling, S. *et al.* Activation of estrogen receptor beta is a prerequisite for estrogen-dependent upregulation of nitric oxide synthases in neonatal rat cardiac myocytes. *FEBS Lett.* **502**, 103–108 (2001).
168. Tsutsumi, S. *et al.* Differential regulation of the inducible nitric oxide synthase gene by estrogen receptors 1 and 2. *J. Endocrinol.* **199**, 267–273 (2008).
169. Liu, Z. *et al.* Estradiol improves cardiovascular function through up-regulation of SOD2 on vascular wall. *Redox Biol.* **3**, 88–99 (2014).
170. Pedram, A. *et al.* Estrogen inhibits cardiac hypertrophy: role of estrogen receptor-beta to inhibit calcineurin. *Endocrinology* **149**, 3361–3369 (2008).
171. Mahmoodzadeh, S. *et al.* Cardiomyocyte-specific Estrogen Receptor Alpha Increases Angiogenesis, Lymphangiogenesis and Reduces Fibrosis in the Female Mouse Heart Post-Myocardial Infarction. *J. Cell Sci. Ther.* **5**, 153 (2014).
172. Favre, J. *et al.* Endothelial estrogen receptor {alpha} plays an essential role in the coronary and myocardial protective effects of estradiol in ischemia/reperfusion. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **30**, 2562–2567 (2010).
173. Barros, R. P. A., Machado, U. F., Warner, M. & Gustafsson, J.-Å. Muscle GLUT4 regulation by estrogen receptors ER β and ER α . *Proc. Natl. Acad. Sci.* **103**, 1605–1608 (2006).

174. Revankar, C. M., Cimino, D. F., Sklar, L. A., Arterburn, J. B. & Prossnitz, E. R. A transmembrane intracellular estrogen receptor mediates rapid cell signaling. *Science* **307**, 1625–1630 (2005).
175. Meyer, M. R., Baretella, O., Prossnitz, E. R. & Barton, M. Dilatation of epicardial coronary arteries by the G protein-coupled estrogen receptor agonists G-1 and ICI 182,780. *Pharmacology* **86**, 58–64 (2010).
176. Shaw, L., Taggart, M. J. & Austin, C. Mechanisms of 17 beta-oestradiol induced vasodilatation in isolated pressurized rat small arteries. *Br. J. Pharmacol.* **129**, 555–565 (2000).
177. Bologna, C. G. *et al.* Virtual and biomolecular screening converge on a selective agonist for GPR30. *Nat. Chem. Biol.* **2**, 207–212 (2006).
178. Han, G. *et al.* Essential role of the 90-kilodalton heat shock protein in mediating nongenomic estrogen signaling in coronary artery smooth muscle. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **329**, 850–855 (2009).
179. Lindsey, S. H., Cohen, J. A., Brosnihan, K. B., Gallagher, P. E. & Chappell, M. C. Chronic treatment with the G protein-coupled receptor 30 agonist G-1 decreases blood pressure in ovariectomized mRen2.Lewis rats. *Endocrinology* **150**, 3753–3758 (2009).
180. Pfeiffer, S., Leopold, E., Schmidt, K., Brunner, F. & Mayer, B. Inhibition of nitric oxide synthesis by NG-nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME): requirement for bioactivation to the free acid, NG-nitro-L-arginine. *Br. J. Pharmacol.* **118**, 1433–1440 (1996).
181. Yu, X. *et al.* Activation of G protein-coupled estrogen receptor induces endothelium-independent relaxation of coronary artery smooth muscle. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* **301**, E882–888 (2011).
182. Levin, E. R. G protein-coupled receptor 30: estrogen receptor or collaborator? *Endocrinology* **150**, 1563–1565 (2009).

183. Pedram, A., Razandi, M. & Levin, E. R. Nature of functional estrogen receptors at the plasma membrane. *Mol. Endocrinol. Baltim. Md* **20**, 1996–2009 (2006).
184. Isensee, J. *et al.* Expression pattern of G protein-coupled receptor 30 in LacZ reporter mice. *Endocrinology* **150**, 1722–1730 (2009).
185. Meyer, M. R., Prossnitz, E. R. & Barton, M. GPER/GPR30 and Regulation of Vascular Tone and Blood Pressure. *Immunol. Endocr. Metab. Agents Med. Chem.* **11**, 255–261 (2011).
186. Chambliss, K. L. *et al.* Non-nuclear estrogen receptor alpha signaling promotes cardiovascular protection but not uterine or breast cancer growth in mice. *J. Clin. Invest.* **120**, 2319–2330 (2010).
187. Smirnova, N. F. *et al.* The Activation Function-1 of Estrogen Receptor Alpha Prevents Arterial Neointima Development Through a Direct Effect on Smooth Muscle Cells. *Circ. Res.* **117**, 770–778 (2015).
188. Brouchet, L. *et al.* Estradiol accelerates reendothelialization in mouse carotid artery through estrogen receptor- α but not estrogen receptor- β . *Circulation* **103**, 423–428 (2001).
189. Arnal, J.-F. *et al.* Estrogen Receptors and Endothelium. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **30**, 1506–1512 (2010).
190. Parker, M. G. Structure and function of estrogen receptors. *Vitam. Horm.* **51**, 267–287 (1995).
191. Maggi, A. Liganded and unliganded activation of estrogen receptor and hormone replacement therapies. *Biochim. Biophys. Acta* **1812**, 1054–1060 (2011).
192. Kato, S. *et al.* Activation of the estrogen receptor through phosphorylation by mitogen-activated protein kinase. *Science* **270**, 1491–1494 (1995).

193. Billon-Galés, A. *et al.* The transactivating function 1 of estrogen receptor α is dispensable for the vasculoprotective actions of 17β -estradiol. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **106**, 2053 (2009).
194. Handgraaf, S. *et al.* Prevention of obesity and insulin resistance by estrogens requires ER α activation function-2 (ER α AF-2), whereas ER α AF-1 is dispensable. *Diabetes* **62**, 4098–4108 (2013).
195. Borjesson, A. E. *et al.* Roles of transactivating functions 1 and 2 of estrogen receptor- in bone. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **108**, 6288–6293 (2011).
196. Szego, C. M. & Davis, J. S. Adenosine 3',5'-monophosphate in rat uterus: acute elevation by estrogen. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **58**, 1711–1718 (1967).
197. Pietras, R. J. & Szego, C. M. Specific binding sites for oestrogen at the outer surfaces of isolated endometrial cells. *Nature* **265**, 69–72 (1977).
198. Levin, E. R. & Pietras, R. J. Estrogen receptors outside the nucleus in breast cancer. *Breast Cancer Res. Treat.* **108**, 351–361 (2008).
199. Mendelsohn, M. E. & Karas, R. H. Rapid progress for non-nuclear estrogen receptor signaling. *J. Clin. Invest.* **120**, 2277–2279 (2010).
200. Losel, R. M. *et al.* Nongenomic steroid action: controversies, questions, and answers. *Physiol. Rev.* **83**, 965–1016 (2003).
201. Stampfer, M. J. *et al.* Postmenopausal estrogen therapy and cardiovascular disease. Ten-year follow-up from the nurses' health study. *N. Engl. J. Med.* **325**, 756–762 (1991).
202. Acconcia, F. *et al.* Palmitoylation-dependent estrogen receptor alpha membrane localization: regulation by 17β -estradiol. *Mol. Biol. Cell* **16**, 231–237 (2005).
203. Marino, M. & Ascenzi, P. Membrane association of estrogen receptor alpha and beta influences 17β -estradiol-mediated cancer cell proliferation. *Steroids* **73**, 853–858 (2008).

204. Wu, Q., Chambliss, K., Umetani, M., Mineo, C. & Shaul, P. W. Non-nuclear Estrogen Receptor Signaling in the Endothelium. *J. Biol. Chem.* **286**, 14737–14743 (2011).
205. Caulin-Glaser, T., García-Cardena, G., Sarrel, P., Sessa, W. C. & Bender, J. R. 17 beta-estradiol regulation of human endothelial cell basal nitric oxide release, independent of cytosolic Ca²⁺ mobilization. *Circ. Res.* **81**, 885–892 (1997).
206. Lantin-Hermoso, R. L. *et al.* Estrogen acutely stimulates nitric oxide synthase activity in fetal pulmonary artery endothelium. *Am. J. Physiol.* **273**, L119-126 (1997).
207. Simoncini, T. *et al.* Interaction of oestrogen receptor with the regulatory subunit of phosphatidylinositol-3-OH kinase. *Nature* **407**, 538–541 (2000).
208. Chen, Z. *et al.* Estrogen receptor α mediates the nongenomic activation of endothelial nitric oxide synthase by estrogen. *J. Clin. Invest.* **103**, 401–406 (1999).
209. Reis, S. E. *et al.* Ethinyl estradiol acutely attenuates abnormal coronary vasomotor responses to acetylcholine in postmenopausal women. *Circulation* **89**, 52–60 (1994).
210. Guo, X. Estrogen Induces Vascular Wall Dilation: MEDIATION THROUGH KINASE SIGNALING TO NITRIC OXIDE AND ESTROGEN RECEPTORS AND. *J. Biol. Chem.* **280**, 19704–19710 (2005).
211. Mendelsohn, M. E. Nongenomic, ER-mediated activation of endothelial nitric oxide synthase: how does it work? What does it mean? *Circ. Res.* **87**, 956–960 (2000).
212. Pedram, A. *et al.* Estrogen reduces lipid content in the liver exclusively from membrane receptor signaling. *Sci. Signal.* **6**, ra36 (2013).
213. Marino, M., Acconcia, F., Bresciani, F., Weisz, A. & Trentalance, A. Distinct nongenomic signal transduction pathways controlled by 17beta-estradiol regulate DNA synthesis and cyclin D(1) gene transcription in HepG2 cells. *Mol. Biol. Cell* **13**, 3720–3729 (2002).

214. Madak-Erdogan, Z. *et al.* Nuclear and extranuclear pathway inputs in the regulation of global gene expression by estrogen receptors. *Mol. Endocrinol. Baltim. Md* **22**, 2116–2127 (2008).
215. Schulman, I. H. *et al.* Surgical menopause increases salt sensitivity of blood pressure. *Hypertens. Dallas Tex 1979* **47**, 1168–1174 (2006).
216. Harrison-Bernard, L. M., Schulman, I. H. & Raij, L. Postovariectomy hypertension is linked to increased renal AT1 receptor and salt sensitivity. *Hypertens. Dallas Tex 1979* **42**, 1157–1163 (2003).
217. Scuteri, A., Lakatta, E. G., Anderson, D. E. & Fleg, J. L. Transdermal 17 beta-oestradiol reduces salt sensitivity of blood pressure in postmenopausal women. *J. Hypertens.* **21**, 2419–2420 (2003).
218. Davila, M. E., Craig, T., Maric, C. & Hinojosa-Laborde, C. Effect of Age on Estrogen Receptor Alpha and Beta in Kidney of Dahl Salt Sensitive Rats. *FASEB Journal* **20**, A338 (2006).
219. Esqueda, M. E. D., Craig, T. & Hinojosa-Laborde, C. Effect of ovariectomy on renal estrogen receptor-alpha and estrogen receptor-beta in young salt-sensitive and -resistant rats. *Hypertens. Dallas Tex 1979* **50**, 768–772 (2007).
220. Xue, B., Singh, M., Guo, F., Hay, M. & Johnson, A. K. Protective actions of estrogen on angiotensin II-induced hypertension: role of central nitric oxide. *Am. J. Physiol. - Heart Circ. Physiol.* **297**, H1638–H1646 (2009).
221. Xue, B. *et al.* Genetic knockdown of estrogen receptor-alpha in the subfornical organ augments ANG II-induced hypertension in female mice. *Am. J. Physiol. - Regul. Integr. Comp. Physiol.* **308**, R507–R516 (2015).

222. Dupont, S. *et al.* Effect of single and compound knockouts of estrogen receptors alpha (ERalpha) and beta (ERbeta) on mouse reproductive phenotypes. *Development* **127**, 4277–4291 (2000).
223. Mattiasson, I., Rendell, M., Törnquist, C., Jeppsson, S. & Hulthén, U. L. Effects of estrogen replacement therapy on abdominal fat compartments as related to glucose and lipid metabolism in early postmenopausal women. *Horm. Metab. Res. Horm. Stoffwechselforschung Horm. Metab.* **34**, 583–588 (2002).
224. Lerman, L. O., Chade, A. R., Sica, V. & Napoli, C. Animal models of hypertension: an overview. *J. Lab. Clin. Med.* **146**, 160–173 (2005).
225. Dornas, W. C. & Silva, M. E. Animal models for the study of arterial hypertension. *J. Biosci.* **36**, 731–737 (2011).
226. Doggrell, S. A. & Brown, L. Rat models of hypertension, cardiac hypertrophy and failure. *Cardiovasc. Res.* **39**, 89–105 (1998).
227. Brand, S., Amann, K. & Schupp, N. Angiotensin II-induced hypertension dose-dependently leads to oxidative stress and DNA damage in mouse kidneys and hearts. *J. Hypertens.* **31**, 333–344 (2013).
228. Whitesall, S. E., Hoff, J. B., Vollmer, A. P. & D'Alecy, L. G. Comparison of simultaneous measurement of mouse systolic arterial blood pressure by radiotelemetry and tail-cuff methods. *Am. J. Physiol.-Heart Circ. Physiol.* **286**, H2408–H2415 (2004).
229. Billon-Galés, A. *et al.* Endothelial estrogen receptor-alpha plays a crucial role in the atheroprotective action of 17beta-estradiol in low-density lipoprotein receptor-deficient mice. *Circulation* **120**, 2567–2576 (2009).
230. Tarhouni, K. *et al.* Key Role of Estrogens and Endothelial Estrogen Receptor α in Blood Flow-Mediated Remodeling of Resistance Arteries. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **33**, 605–611 (2013).

231. Xue, B., Pamidimukkala, J. & Hay, M. Sex differences in the development of angiotensin II-induced hypertension in conscious mice. *Am. J. Physiol. - Heart Circ. Physiol.* **288**, H2177–H2184 (2005).
232. Harrison-Bernard, L. M., Schulman, I. H. & Raij, L. Postovariectomy hypertension is linked to increased renal AT1 receptor and salt sensitivity. *Hypertens. Dallas Tex 1979* **42**, 1157–1163 (2003).
233. Várбірó, S. *et al.* Effect of ovariectomy and hormone replacement therapy on small artery biomechanics in angiotensin-induced hypertension in rats. *J. Hypertens.* **18**, 1587–1595 (2000).
234. Varbiro, S. *et al.* Hormone replacement reduces elevated in vivo venous tone in hypertensive ovariectomized rats. *J. Soc. Gynecol. Investig.* **8**, 98–103 (2001).
235. Harris, H. A., Katzenellenbogen, J. A. & Katzenellenbogen, B. S. Characterization of the Biological Roles of the Estrogen Receptors, ER α and ER β , in Estrogen Target Tissues *in Vivo* through the Use of an ER α -Selective Ligand. *Endocrinology* **143**, 4172–4177 (2002).
236. Zhu, Y. *et al.* Abnormal Vascular Function and Hypertension in Mice Deficient in Estrogen Receptor β . *Science* **295**, 505–508 (2002).
237. Xue, B. *et al.* Estrogen receptor- β in the paraventricular nucleus and rostroventrolateral medulla plays an essential protective role in aldosterone/salt-induced hypertension in female rats. *Hypertens. Dallas Tex 1979* **61**, 1255–1262 (2013).
238. Turner, A. *et al.* Rostroventrolateral medulla neurons with commissural projections provide input to sympathetic premotor neurons: anatomical and functional evidence. *Eur. J. Neurosci.* **38**, 2504–2515 (2013).
239. Qiao, X., McConnell, K. R. & Khalil, R. A. Sex steroids and vascular responses in hypertension and aging. *Gend. Med.* **5**, S46–S64 (2008).

240. Xue, B., Pamidimukkala, J., Lubahn, D. B. & Hay, M. Estrogen receptor- mediates estrogen protection from angiotensin II-induced hypertension in conscious female mice. *AJP Heart Circ. Physiol.* **292**, H1770–H1776 (2006).
241. Hindmarch, C. C. T. & Ferguson, A. V. Physiological roles for the subfornical organ: a dynamic transcriptome shaped by autonomic state. *J. Physiol.* **594**, 1581–1589 (2016).
242. Raikar, G. V., Hisamochi, K., Raikar, B. L. & Schaff, H. V. Nitric oxide inhibition attenuates systemic hypotension produced by protamine. *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.* **111**, 1240-1246; discussion 1246-1247 (1996).
243. Wang, Y. & Golledge, J. Neuronal nitric oxide synthase and sympathetic nerve activity in neurovascular and metabolic systems. *Curr. Neurovasc. Res.* **10**, 81–89 (2013).
244. Arnal, J.-F. *et al.* Lessons from the dissection of the activation functions (AF-1 and AF-2) of the estrogen receptor alpha in vivo. *Steroids* **78**, 576–582 (2013).
245. Fukai, T., Siegfried, M. R., Ushio-Fukai, M., Griendling, K. K. & Harrison, D. G. Modulation of extracellular superoxide dismutase expression by angiotensin II and hypertension. *Circ. Res.* **85**, 23–28 (1999).
246. Hagen, A. A., Barr, M. & Diczfalusy, E. METABOLISM OF 17 β -OESTRADIOL-4-14C IN EARLY INFANCY. *Acta Endocrinol. (Copenh.)* **49**, 207–220 (1965).
247. Montt-Guevara, M. M. *et al.* Estetrol Modulates Endothelial Nitric Oxide Synthesis in Human Endothelial Cells. *Front. Endocrinol.* **6**, (2015).
248. Coelingh Bennink, H. J. T., Skouby, S., Bouchard, P. & Holinka, C. F. Ovulation inhibition by estetrol in an in vivo model. *Contraception* **77**, 186–190 (2008).
249. Bennink, H. J. T. C., Holinka, C. F. & Diczfalusy, E. Estetrol review: profile and potential clinical applications. *Climacteric* **11**, 47–58 (2008).
250. Gilbert, S. F. *Aging: The Biology of Senescence.* (2000).

251. Weinstein, J. R. & Anderson, S. THE AGING KIDNEY: PHYSIOLOGICAL CHANGES. *Adv. Chronic Kidney Dis.* **17**, 302–307 (2010).
252. Klinge, C. M. Estrogenic Control of Mitochondrial Function and Biogenesis. *J. Cell. Biochem.* **105**, 1342–1351 (2008).
253. 2013 ACC/AHA Guideline on the Assessment of Cardiovascular Risk. *J. Am. Coll. Cardiol.* **63**, 2935–2959 (2014).
254. Weon, B. M. & Je, J. H. Theoretical estimation of maximum human lifespan. *Biogerontology* **10**, 65–71 (2009).
255. WRITING GROUP MEMBERS *et al.* Heart disease and stroke statistics--2010 update: a report from the American Heart Association. *Circulation* **121**, e46–e215 (2010).
256. Donato, A. J. *et al.* Direct Evidence of Endothelial Oxidative Stress With Aging in Humans Relation to Impaired Endothelium-Dependent Dilation and Upregulation of Nuclear Factor- κ B. *Circ. Res.* **100**, 1659–1666 (2007).
257. Kurz, D. J. *et al.* Chronic oxidative stress compromises telomere integrity and accelerates the onset of senescence in human endothelial cells. *J. Cell Sci.* **117**, 2417–2426 (2004).
258. Orr, W. C. & Sohal, R. S. Extension of life-span by overexpression of superoxide dismutase and catalase in *Drosophila melanogaster*. *Science* **263**, 1128–1130 (1994).
259. Parkes, T. L. *et al.* Extension of *Drosophila* lifespan by overexpression of human SOD1 in motorneurons. *Nat. Genet.* **19**, 171–174 (1998).
260. Vanfleteren, J. R. & De Vreese, A. Rate of aerobic metabolism and superoxide production rate potential in the nematode *Caenorhabditis elegans*. *J. Exp. Zool.* **274**, 93–100 (1996).
261. Larsen, P. L. Aging and resistance to oxidative damage in *Caenorhabditis elegans*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **90**, 8905–8909 (1993).

262. Ho, Y. S. *et al.* Mice deficient in cellular glutathione peroxidase develop normally and show no increased sensitivity to hyperoxia. *J. Biol. Chem.* **272**, 16644–16651 (1997).
263. Melov, S. *et al.* A novel neurological phenotype in mice lacking mitochondrial manganese superoxide dismutase. *Nat. Genet.* **18**, 159–163 (1998).
264. Sohal, R. S., Ku, H.-H., Agarwal, S., Forster, M. J. & Lal, H. Oxidative damage, mitochondrial oxidant generation and antioxidant defenses during aging and in response to food restriction in the mouse. *Mech. Ageing Dev.* **74**, 121–133 (1994).
265. Lee, C. K., Klopp, R. G., Weindruch, R. & Prolla, T. A. Gene expression profile of aging and its retardation by caloric restriction. *Science* **285**, 1390–1393 (1999).
266. Szilard, L. ON THE NATURE OF THE AGING PROCESS. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **45**, 30–45 (1959).
267. Orgel, L. E. The maintenance of the accuracy of protein synthesis and its relevance to ageing. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **49**, 517–521 (1963).
268. Boffetta, P. & Hashibe, M. Alcohol and cancer. *Lancet Oncol.* **7**, 149–156 (2006).
269. Narayanan, D. L., Saladi, R. N. & Fox, J. L. Ultraviolet radiation and skin cancer. *Int. J. Dermatol.* **49**, 978–986 (2010).
270. Sieri, S. *et al.* Dietary fat and breast cancer risk in the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition. *Am. J. Clin. Nutr.* **88**, 1304–1312 (2008).
271. Murray, V. & Holliday, R. Increased error frequency of DNA polymerases from senescent human fibroblasts. *J. Mol. Biol.* **146**, 55–76 (1981).
272. Yu, C. E. *et al.* Positional cloning of the Werner's syndrome gene. *Science* **272**, 258–262 (1996).
273. Sun, H., Karow, J. K., Hickson, I. D. & Maizels, N. The Bloom's syndrome helicase unwinds G4 DNA. *J. Biol. Chem.* **273**, 27587–27592 (1998).

274. Parsa, N. Environmental Factors Inducing Human Cancers. *Iran. J. Public Health* **41**, 1–9 (2012).
275. Pham-Huy, L. A., He, H. & Pham-Huy, C. Free Radicals, Antioxidants in Disease and Health. *Int. J. Biomed. Sci. IJBS* **4**, 89–96 (2008).
276. Hiyama, E. & Hiyama, K. Telomere and telomerase in stem cells. *Br. J. Cancer* **96**, 1020–1024 (2007).
277. Zhang, X., Mar, V., Zhou, W., Harrington, L. & Robinson, M. O. Telomere shortening and apoptosis in telomerase-inhibited human tumor cells. *Genes Dev.* **13**, 2388–2399 (1999).
278. Bodnar, A. G. *et al.* Extension of life-span by introduction of telomerase into normal human cells. *Science* **279**, 349–352 (1998).
279. Vaziri, H. & Benchimol, S. Reconstitution of telomerase activity in normal human cells leads to elongation of telomeres and extended replicative life span. *Curr. Biol. CB* **8**, 279–282 (1998).
280. Cen, J. *et al.* Anti-aging effect of estrogen on telomerase activity in ovariectomised rats-- animal model for menopause. *Gynecol. Endocrinol. Off. J. Int. Soc. Gynecol. Endocrinol.* **31**, 582–585 (2015).
281. Johnson, F. B., Sinclair, D. A. & Guarente, L. Molecular biology of aging. *Cell* **96**, 291–302 (1999).
282. Boffoli, D. *et al.* Decline with age of the respiratory chain activity in human skeletal muscle. *Biochim. Biophys. Acta* **1226**, 73–82 (1994).
283. Michikawa, Y., Mazzucchelli, F., Bresolin, N., Scarlato, G. & Attardi, G. Aging-dependent large accumulation of point mutations in the human mtDNA control region for replication. *Science* **286**, 774–779 (1999).

284. Wei, Y.-H. & Lee, H.-C. Oxidative stress, mitochondrial DNA mutation, and impairment of antioxidant enzymes in aging. *Exp. Biol. Med. Maywood NJ* **227**, 671–682 (2002).
285. Saretzki, G. Telomerase, mitochondria and oxidative stress. *Exp. Gerontol.* **44**, 485–492 (2009).
286. Wiley, C. D. *et al.* Mitochondrial Dysfunction Induces Senescence with a Distinct Secretory Phenotype. *Cell Metab.* **23**, 303–314 (2016).
287. Hakim, F. T., Flomerfelt, F. A., Boyiadzis, M. & Gress, R. E. Aging, immunity and cancer. *Curr. Opin. Immunol.* **16**, 151–156 (2004).
288. Najjar, S. S., Scuteri, A. & Lakatta, E. G. Arterial Aging: Is It an Immutable Cardiovascular Risk Factor? *Hypertension* **46**, 454–462 (2005).
289. Migliaccio, E. *et al.* The p66shc adaptor protein controls oxidative stress response and life span in mammals. *Nature* **402**, 309–313 (1999).
290. Ahmed, S. B. M. & Prigent, S. A. Insights into the Shc Family of Adaptor Proteins. *J. Mol. Signal.* **12**, (2017).
291. Galimov, E. R. The Role of p66shc in Oxidative Stress and Apoptosis. *Acta Naturae* **2**, 44–51 (2010).
292. Stevenson, L. E. & Frackelton, A. R. Constitutively tyrosine phosphorylated p52 Shc in breast cancer cells: correlation with ErbB2 and p66 Shc expression. *Breast Cancer Res. Treat.* **49**, 119–128 (1998).
293. Francia, P. *et al.* p66(Shc) protein, oxidative stress, and cardiovascular complications of diabetes: the missing link. *J. Mol. Med. Berl. Ger.* **87**, 885–891 (2009).
294. Derungs, R. *et al.* Genetic ablation of the p66(Shc) adaptor protein reverses cognitive deficits and improves mitochondrial function in an APP transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *Mol. Psychiatry* **22**, 605–614 (2017).

295. Koch, O. R. *et al.* Role of the life span determinant P66(shcA) in ethanol-induced liver damage. *Lab. Investig. J. Tech. Methods Pathol.* **88**, 750–760 (2008).
296. Cosentino, F. *et al.* Final common molecular pathways of aging and cardiovascular disease: role of the p66Shc protein. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **28**, 622–628 (2008).
297. Spescha, R. D. *et al.* Deletion of the ageing gene p66(Shc) reduces early stroke size following ischaemia/reperfusion brain injury. *Eur. Heart J.* **34**, 96–103 (2013).
298. Paneni, F. *et al.* Gene silencing of the mitochondrial adaptor p66(Shc) suppresses vascular hyperglycemic memory in diabetes. *Circ. Res.* **111**, 278–289 (2012).
299. Kinnally, K. W., Peixoto, P. M., Ryu, S.-Y. & Dejean, L. M. Is mPTP the gatekeeper for necrosis, apoptosis, or both? *Biochim. Biophys. Acta* **1813**, 616–622 (2011).
300. Savino, C., Pelicci, P. & Giorgio, M. The P66Shc/mitochondrial permeability transition pore pathway determines neurodegeneration. *Oxid. Med. Cell. Longev.* **2013**, 719407 (2013).
301. Bereiter-Hahn, J. & Vöth, M. Dynamics of mitochondria in living cells: Shape changes, dislocations, fusion, and fission of mitochondria. *Microsc. Res. Tech.* **27**, 198–219 (1994).
302. Bossy-Wetzel, E., Barsoum, M. J., Godzik, A., Schwarzenbacher, R. & Lipton, S. A. Mitochondrial fission in apoptosis, neurodegeneration and aging. *Curr. Opin. Cell Biol.* **15**, 706–716 (2003).
303. Mandemakers, W., Morais, V. A. & Strooper, B. D. A cell biological perspective on mitochondrial dysfunction in Parkinson disease and other neurodegenerative diseases. *J. Cell Sci.* **120**, 1707–1716 (2007).
304. Skulachev, V. P. Mitochondrial filaments and clusters as intracellular power-transmitting cables. *Trends Biochem. Sci.* **26**, 23–29 (2001).

305. Civiletto, G. *et al.* Opa1 overexpression ameliorates the phenotype of two mitochondrial disease mouse models. *Cell Metab.* **21**, 845–854 (2015).
306. Arnoult, D., Grodet, A., Lee, Y.-J., Estaquier, J. & Blackstone, C. Release of OPA1 during apoptosis participates in the rapid and complete release of cytochrome c and subsequent mitochondrial fragmentation. *J. Biol. Chem.* **280**, 35742–35750 (2005).
307. Rahn, J. J., Stackley, K. D. & Chan, S. S. L. Opa1 is required for proper mitochondrial metabolism in early development. *PloS One* **8**, e59218 (2013).
308. Lenaers, G. *et al.* Dominant optic atrophy. *Orphanet J. Rare Dis.* **7**, 46 (2012).
309. Yaffe, M. P. The machinery of mitochondrial inheritance and behavior. *Science* **283**, 1493–1497 (1999).
310. Le Page, S. *et al.* Increase in Cardiac Ischemia-Reperfusion Injuries in Opa1+/- Mouse Model. *PloS One* **11**, e0164066 (2016).
311. Chang, C.-R. & Blackstone, C. Dynamic regulation of mitochondrial fission through modification of the dynamin-related protein Drp1. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1201**, 34–39 (2010).
312. Frank, S. *et al.* The role of dynamin-related protein 1, a mediator of mitochondrial fission, in apoptosis. *Dev. Cell* **1**, 515–525 (2001).
313. Givvimani, S., Pushpakumar, S., Veeranki, S. & Tyagi, S. C. Dysregulation of Mfn2 and Drp-1 proteins in heart failure. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* **92**, 583–591 (2014).
314. Wang, J. *et al.* Mdivi-1 prevents apoptosis induced by ischemia-reperfusion injury in primary hippocampal cells via inhibition of reactive oxygen species-activated mitochondrial pathway. *J. Stroke Cerebrovasc. Dis. Off. J. Natl. Stroke Assoc.* **23**, 1491–1499 (2014).
315. Serviddio, G. *et al.* Bioenergetics in aging: mitochondrial proton leak in aging rat liver, kidney and heart. *Redox Rep. Commun. Free Radic. Res.* **12**, 91–95 (2007).

316. Epstein, M. Aging and the kidney. *J. Am. Soc. Nephrol. JASN* **7**, 1106–1122 (1996).
317. Glasscock, R. J. & Rule, A. D. The implications of anatomical and functional changes of the aging kidney: with an emphasis on the glomeruli. *Kidney Int.* **82**, 270–277 (2012).
318. Denic, A., Glasscock, R. J. & Rule, A. D. Structural and Functional Changes With the Aging Kidney. *Adv. Chronic Kidney Dis.* **23**, 19–28 (2016).
319. Fleg, J. L. & Strait, J. Age-associated changes in cardiovascular structure and function: a fertile milieu for future disease. *Heart Fail. Rev.* **17**, 545–554 (2012).
320. Gerstenblith, G. *et al.* Echocardiographic assessment of a normal adult aging population. *Circulation* **56**, 273–278 (1977).
321. Ferrari, A. U., Radaelli, A. & Centola, M. Invited Review: Aging and the cardiovascular system. *J. Appl. Physiol.* **95**, 2591–2597 (2003).
322. Faconti, L., M. Bruno, R., Ghiadoni, L., Taddei, S. & Virdis, A. Ventricular and Vascular Stiffening in Aging and Hypertension. *Curr. Hypertens. Rev.* **11**, 100–109 (2015).
323. Miller, T. R. *et al.* Left ventricular diastolic filling and its association with age. *Am. J. Cardiol.* **58**, 531–535 (1986).
324. Fleg, J. L. *et al.* Impact of age on the cardiovascular response to dynamic upright exercise in healthy men and women. *J. Appl. Physiol.* **78**, 890–900 (1995).
325. Lakatta, E. G. Arterial and Cardiac Aging: Major Shareholders in Cardiovascular Disease Enterprises: Part III: Cellular and Molecular Clues to Heart and Arterial Aging. *Circulation* **107**, 490–497 (2003).
326. Virmani, R. *et al.* Effect of aging on aortic morphology in populations with high and low prevalence of hypertension and atherosclerosis. Comparison between occidental and Chinese communities. *Am. J. Pathol.* **139**, 1119–1129 (1991).

327. Li, Z., Froehlich, J., Galis, Z. S. & Lakatta, E. G. Increased Expression of Matrix Metalloproteinase-2 in the Thickened Intima of Aged Rats. *Hypertension* **33**, 116–123 (1999).
328. Challah, M. *et al.* Circulating and cellular markers of endothelial dysfunction with aging in rats. *Am. J. Physiol. - Heart Circ. Physiol.* **273**, H1941–H1948 (1997).
329. Vasavada, N. & Agarwal, R. Role of excess volume in the pathophysiology of hypertension in chronic kidney disease. *Kidney Int.* **64**, 1772–1779 (2003).
330. Davies, D. F. & Shock, N. W. Age changes in glomerular filtration rate, effective renal plasma flow, and tubular excretory capacity in adult males. *J. Clin. Invest.* **29**, 496–507 (1950).
331. Rowe, J. W., Andres, R., Tobin, J. D., Norris, A. H. & Shock, N. W. The effect of age on creatinine clearance in men: a cross-sectional and longitudinal study. *J. Gerontol.* **31**, 155–163 (1976).
332. Lindeman, R. D., Tobin, J. D. & Shock, N. W. Association between blood pressure and the rate of decline in renal function with age. *Kidney Int.* **26**, 861–868 (1984).
333. Fox, C. S. *et al.* Predictors of new-onset kidney disease in a community-based population. *JAMA* **291**, 844–850 (2004).
334. Kim, R. *et al.* A longitudinal study of low-level lead exposure and impairment of renal function. The Normative Aging Study. *JAMA* **275**, 1177–1181 (1996).
335. Bleyer, A. J., Shemanski, L. R., Burke, G. L., Hansen, K. J. & Appel, R. G. Tobacco, hypertension, and vascular disease: risk factors for renal functional decline in an older population. *Kidney Int.* **57**, 2072–2079 (2000).
336. Fried, L. *et al.* Inflammatory and prothrombotic markers and the progression of renal disease in elderly individuals. *J. Am. Soc. Nephrol. JASN* **15**, 3184–3191 (2004).

337. Vlassara, H. *et al.* Role of oxidants/inflammation in declining renal function in chronic kidney disease and normal aging. *Kidney Int. Suppl.* S3-11 (2009). doi:10.1038/ki.2009.401
338. Foster, M. C. *et al.* Overweight, obesity, and the development of stage 3 CKD: the Framingham Heart Study. *Am. J. Kidney Dis. Off. J. Natl. Kidney Found.* **52**, 39–48 (2008).
339. de Boer, I. H. *et al.* Obesity and change in estimated GFR among older adults. *Am. J. Kidney Dis. Off. J. Natl. Kidney Found.* **54**, 1043–1051 (2009).
340. Baylis, C. Sexual dimorphism in the aging kidney: differences in the nitric oxide system. *Nat. Rev. Nephrol.* **5**, 384–396 (2009).
341. Ishani, A. *et al.* Acute kidney injury increases risk of ESRD among elderly. *J. Am. Soc. Nephrol. JASN* **20**, 223–228 (2009).
342. Lavin, P. J., Gbadegesin, R., Damodaran, T. V. & Winn, M. P. Therapeutic targets in focal and segmental glomerulosclerosis. *Curr. Opin. Nephrol. Hypertens.* **17**, 386–392 (2008).
343. Kaplan, C., Pasternack, B., Shah, H. & Gallo, G. Age-related incidence of sclerotic glomeruli in human kidneys. *Am. J. Pathol.* **80**, 227–234 (1975).
344. Neugarten, J., Gallo, G., Silbiger, S. & Kasiske, B. Glomerulosclerosis in aging humans is not influenced by gender. *Am. J. Kidney Dis. Off. J. Natl. Kidney Found.* **34**, 884–888 (1999).
345. Esposito, C. *et al.* Renal function and functional reserve in healthy elderly individuals. *J. Nephrol.* **20**, 617–625 (2007).
346. Lan, H. Y. Diverse roles of TGF- β /Smads in renal fibrosis and inflammation. *Int. J. Biol. Sci.* **7**, 1056–1067 (2011).

347. Ke, Y. *et al.* Role and Association of Inflammatory and Apoptotic Caspases in Renal Tubulointerstitial Fibrosis. *Kidney Blood Press. Res.* **41**, 643–653 (2016).
348. Tank, J. E., Vora, J. P., Houghton, D. C. & Anderson, S. Altered renal vascular responses in the aging rat kidney. *Am. J. Physiol.* **266**, F942-948 (1994).
349. Castellani, S. *et al.* Excessive vasoconstriction after stress by the aging kidney: inadequate prostaglandin modulation of increased endothelin activity. *J. Lab. Clin. Med.* **132**, 186–194 (1998).
350. Fuiano, G. *et al.* Renal hemodynamic response to maximal vasodilating stimulus in healthy older subjects. *Kidney Int.* **59**, 1052–1058 (2001).
351. Anderson, S., Rennke, H. G. & Zatz, R. Glomerular adaptations with normal aging and with long-term converting enzyme inhibition in rats. *Am. J. Physiol.* **267**, F35-43 (1994).
352. Ferder, L., Inserra, F., Romano, L., Ercole, L. & Pszeny, V. Effects of angiotensin-converting enzyme inhibition on mitochondrial number in the aging mouse. *Am. J. Physiol.* **265**, C15-18 (1993).
353. Yoon, H. E. & Choi, B. S. The renin-angiotensin system and aging in the kidney. *Korean J. Intern. Med.* **29**, 291–295 (2014).
354. Bolignano, D., Mattace-Raso, F., Sijbrands, E. J. G. & Zoccali, C. The aging kidney revisited: A systematic review. *Ageing Res. Rev.* **14**, 65–80 (2014).
355. Jung, F. F., Kennefick, T. M., Ingelfinger, J. R., Vora, J. P. & Anderson, S. Down-regulation of the intrarenal renin-angiotensin system in the aging rat. *J. Am. Soc. Nephrol. JASN* **5**, 1573–1580 (1995).
356. Anderson, S. Ageing and the renin-angiotensin system. *Nephrol. Dial. Transplant. Off. Publ. Eur. Dial. Transpl. Assoc. - Eur. Ren. Assoc.* **12**, 1093–1094 (1997).
357. Sun, D. *et al.* Effects of nitric oxide on renal interstitial fibrosis in rats with unilateral ureteral obstruction. *Life Sci.* **90**, 900–909 (2012).

358. Wani, J., Carl, M., Henger, A., Nelson, P. J. & Rupprecht, H. Nitric oxide modulates expression of extracellular matrix genes linked to fibrosis in kidney mesangial cells. *Biol. Chem.* **388**, 497–506 (2007).
359. Ferder, L. F., Inserra, F. & Basso, N. Effects of renin-angiotensin system blockade in the aging kidney. *Exp. Gerontol.* **38**, 237–244 (2003).
360. Neugarten, J. & Golestaneh, L. Gender and the prevalence and progression of renal disease. *Adv. Chronic Kidney Dis.* **20**, 390–395 (2013).
361. Pereira, T. M. C. *et al.* Cardiac and vascular changes in elderly atherosclerotic mice: the influence of gender. *Lipids Health Dis.* **9**, 87 (2010).
362. Maric, C., Sandberg, K. & Hinojosa-Laborde, C. Glomerulosclerosis and tubulointerstitial fibrosis are attenuated with 17beta-estradiol in the aging Dahl salt sensitive rat. *J. Am. Soc. Nephrol. JASN* **15**, 1546–1556 (2004).
363. Iseki, K., Iseki, C., Ikemiya, Y. & Fukiyama, K. Risk of developing end-stage renal disease in a cohort of mass screening. *Kidney Int.* **49**, 800–805 (1996).
364. Almkhatar, S. E., Abbas, A. A., Muhealdeen, D. N. & Hughson, M. D. Acute kidney injury associated with androgenic steroids and nutritional supplements in bodybuilders. *Clin. Kidney J.* **8**, 415–419 (2015).
365. Tanaka, A., Kyokuwa, M., Mori, T. & Kawashima, S. Acceleration of renal dysfunction with ageing by the use of androgen in Wistar/Tw rats. *Vivo Athens Greece* **9**, 495–502 (1995).
366. Fortepiani, L. A., Yanes, L., Zhang, H., Racusen, L. C. & Reckelhoff, J. F. Role of androgens in mediating renal injury in aging SHR. *Hypertens. Dallas Tex 1979* **42**, 952–955 (2003).
367. Schulze, F. *et al.* Determination of a reference value for N(G), N(G)-dimethyl-L-arginine in 500 subjects. *Eur. J. Clin. Invest.* **35**, 622–626 (2005).

368. Gavrilova-Jordan, L. P. & Price, T. M. Actions of steroids in mitochondria. *Semin. Reprod. Med.* **25**, 154–164 (2007).
369. Chen, J.-Q., Yager, J. D. & Russo, J. Regulation of mitochondrial respiratory chain structure and function by estrogens/estrogen receptors and potential physiological/pathophysiological implications. *Biochim. Biophys. Acta* **1746**, 1–17 (2005).
370. Schmidt, S., Strub, A. & Voos, W. Protein translocation into mitochondria. *Biol. Signals Recept.* **10**, 14–25 (2001).
371. Chen, J.-Q., Brown, T. R. & Yager, J. D. Mechanisms of hormone carcinogenesis: evolution of views, role of mitochondria. *Adv. Exp. Med. Biol.* **630**, 1–18 (2008).
372. Stirone, C., Duckles, S. P., Krause, D. N. & Procaccio, V. Estrogen increases mitochondrial efficiency and reduces oxidative stress in cerebral blood vessels. *Mol. Pharmacol.* **68**, 959–965 (2005).
373. Mattingly, K. A. *et al.* Estradiol stimulates transcription of nuclear respiratory factor-1 and increases mitochondrial biogenesis. *Mol. Endocrinol. Baltim. Md* **22**, 609–622 (2008).
374. Jornayvaz, F. R. & Shulman, G. I. Regulation of mitochondrial biogenesis. *Essays Biochem.* **47**, (2010).
375. Larsson, N. G. *et al.* Mitochondrial transcription factor A is necessary for mtDNA maintenance and embryogenesis in mice. *Nat. Genet.* **18**, 231–236 (1998).
376. Pedram, A., Razandi, M., Wallace, D. C. & Levin, E. R. Functional Estrogen Receptors in the Mitochondria of Breast Cancer Cells. *Mol. Biol. Cell* **17**, 2125–2137 (2006).
377. Rodríguez-Cuenca, S., Monjo, M., Gianotti, M., Proenza, A. M. & Roca, P. Expression of mitochondrial biogenesis-signaling factors in brown adipocytes is influenced

- specifically by 17beta-estradiol, testosterone, and progesterone. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* **292**, E340-346 (2007).
378. Hsieh, Y.-C. *et al.* Upregulation of mitochondrial respiratory complex IV by estrogen receptor-beta is critical for inhibiting mitochondrial apoptotic signaling and restoring cardiac functions following trauma-hemorrhage. *J. Mol. Cell. Cardiol.* **41**, 511–521 (2006).
379. Hsieh, Y.-C. *et al.* PGC-1 upregulation via estrogen receptors: a common mechanism of salutary effects of estrogen and flutamide on heart function after trauma-hemorrhage. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* **289**, H2665-2672 (2005).
380. Kuiper, G. G. *et al.* Comparison of the ligand binding specificity and transcript tissue distribution of estrogen receptors alpha and beta. *Endocrinology* **138**, 863–870 (1997).
381. Rasbach, K. A. & Schnellmann, R. G. Isoflavones promote mitochondrial biogenesis. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **325**, 536–543 (2008).
382. Borrás, C. *et al.* Genistein, a soy isoflavone, up-regulates expression of antioxidant genes: involvement of estrogen receptors, ERK1/2, and NFkappaB. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* **20**, 2136–2138 (2006).
383. Honda, H. M., Korge, P. & Weiss, J. N. Mitochondria and ischemia/reperfusion injury. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1047**, 248–258 (2005).
384. Zhai, P. *et al.* Effect of estrogen on global myocardial ischemia-reperfusion injury in female rats. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* **279**, H2766-2775 (2000).
385. Zhai, P., Eurell, T. E., Cooke, P. S., Lubahn, D. B. & Gross, D. R. Myocardial ischemia-reperfusion injury in estrogen receptor-alpha knockout and wild-type mice. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* **278**, H1640-1647 (2000).
386. Wend, K., Wend, P. & Krum, S. A. Tissue-specific effects of loss of estrogen during menopause and aging. *Endocrinol. Aging* **3**, 19 (2012).

387. Stice, J. P., Eiserich, J. P. & Knowlton, A. A. Role of Aging *Versus* the Loss of Estrogens in the Reduction in Vascular Function in Female Rats. *Endocrinology* **150**, 212–219 (2009).
388. Horstman, A. M., Dillon, E. L., Urban, R. J. & Sheffield-Moore, M. The Role of Androgens and Estrogens on Healthy Aging and Longevity. *J. Gerontol. A. Biol. Sci. Med. Sci.* **67**, 1140–1152 (2012).
389. Pinto, E. Blood pressure and ageing. *Postgrad. Med. J.* **83**, 109–114 (2007).
390. Dai, D.-F. & Rabinovitch, P. S. Cardiac Aging in Mice and Humans: the Role of Mitochondrial Oxidative Stress. *Trends Cardiovasc. Med.* **19**, 213–220 (2009).
391. Cheitlin, M. D. Cardiovascular physiology-changes with aging. *Am. J. Geriatr. Cardiol.* **12**, 9–13 (2003).
392. Egashira, K. *et al.* Effects of age on endothelium-dependent vasodilation of resistance coronary artery by acetylcholine in humans. *Circulation* **88**, 77–81 (1993).
393. Han, J. *et al.* Age-related changes in blood pressure in the senescence-accelerated mouse (SAM): aged SAMP1 mice manifest hypertensive vascular disease. *Lab. Anim. Sci.* **48**, 256–263 (1998).
394. Jennings, B. L. *et al.* Estrogen metabolism by cytochrome P450 1B1 modulates the hypertensive effect of angiotensin II in female mice. *Hypertension* **64**, 134–140 (2014).
395. Jennings, B. L. *et al.* Cytochrome P450 1B1 Contributes to Angiotensin II-Induced Hypertension and Associated Pathophysiology. *Hypertension* **56**, 667–674 (2010).
396. Bittner, V. Non-high-density lipoprotein cholesterol and cardiovascular disease. *Curr. Opin. Lipidol.* **14**, 367–371 (2003).
397. Kronmal, R. A., Cain, K. C., Ye, Z. & Omenn, G. S. Total serum cholesterol levels and mortality risk as a function of age. A report based on the Framingham data. *Arch. Intern. Med.* **153**, 1065–1073 (1993).

398. Félix-Redondo, F. J., Grau, M. & Fernández-Bergés, D. Cholesterol and Cardiovascular Disease in the Elderly. Facts and Gaps. *Aging Dis.* **4**, 154–169 (2013).
399. Ferrara, A., Barrett-Connor, E. & Shan, J. Total, LDL, and HDL cholesterol decrease with age in older men and women. The Rancho Bernardo Study 1984-1994. *Circulation* **96**, 37–43 (1997).
400. Wilson, P. W., Anderson, K. M., Harris, T., Kannel, W. B. & Castelli, W. P. Determinants of change in total cholesterol and HDL-C with age: the Framingham Study. *J. Gerontol.* **49**, M252-257 (1994).
401. Li, Y., Gilbert, T. R., Matsumoto, A. H. & Shi, W. Effect of Aging on Fatty Streak Formation in a Diet-Induced Mouse Model of Atherosclerosis. *J. Vasc. Res.* **45**, 205–210 (2008).
402. Tiao, J. Y.-H., Semmens, J. B., Masarei, J. R. L. & Lawrence-Brown, M. M. D. The effect of age on serum creatinine levels in an aging population: relevance to vascular surgery. *Cardiovasc. Surg. Lond. Engl.* **10**, 445–451 (2002).
403. Glasscock, R. J. & Winearls, C. Ageing and the Glomerular Filtration Rate: Truths and Consequences. *Trans. Am. Clin. Climatol. Assoc.* **120**, 419–428 (2009).
404. Hackbarth, H. & Harrison, D. E. Changes with age in renal function and morphology in C57BL/6, CBA/HT6, and B6CBAF1 mice. *J. Gerontol.* **37**, 540–547 (1982).
405. Gomes, P. *et al.* Aging increases oxidative stress and renal expression of oxidant and antioxidant enzymes that are associated with an increased trend in systolic blood pressure. *Oxid. Med. Cell. Longev.* **2**, 138–145 (2009).
406. Roeder, S. S. *et al.* Changes in glomerular parietal epithelial cells in mouse kidneys with advanced age. *Am. J. Physiol. - Ren. Physiol.* **309**, F164–F178 (2015).
407. Meng, X.-M., Tang, P. M.-K., Li, J. & Lan, H. Y. TGF- β /Smad signaling in renal fibrosis. *Front. Physiol.* **6**, (2015).

408. Jb, K. *et al.* Transgenic mice with increased plasma levels of TGF-beta 1 develop progressive renal disease. *Lab. Investig. J. Tech. Methods Pathol.* **74**, 991–1003 (1996).
409. Imig, J. D. & Ryan, M. J. Immune and Inflammatory Role in Renal Disease. *Compr. Physiol.* **3**, 957–976 (2013).
410. Lane, P. H. Estrogen receptors in the kidney: lessons from genetically altered mice. *Gend. Med.* **5 Suppl A**, S11-18 (2008).
411. Border, W. A. & Noble, N. A. TGF- β in kidney fibrosis: A target for gene therapy. *Kidney Int.* **51**, 1388–1396 (1997).
412. Xu, X. *et al.* p66Shc: A novel biomarker of tubular oxidative injury in patients with diabetic nephropathy. *Sci. Rep.* **6**, 29302 (2016).
413. Efstratiadis, G., Divani, M., Katsioulis, E. & Vergoulas, G. Renal fibrosis. *Hippokratia* **13**, 224–229 (2009).
414. Altin, J. G. & Sloan, E. K. The role of CD45 and CD45-associated molecules in T cell activation. *Immunol. Cell Biol.* **75**, 430–445 (1997).
415. Farris, A. B. & Alpers, C. E. What is the best way to measure renal fibrosis?: A pathologist's perspective. *Kidney Int. Suppl.* **4**, 9–15 (2014).
416. Sharma, P. K. & Thakur, M. K. Estrogen receptor alpha expression in mice kidney shows sex differences during aging. *Biogerontology* **5**, 375–381 (2004).
417. Bitzur, R., Cohen, H., Kamari, Y., Shaish, A. & Harats, D. Triglycerides and HDL Cholesterol. *Diabetes Care* **32**, S373–S377 (2009).
418. Lenaz, G. Role of mitochondria in oxidative stress and ageing. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Bioenerg.* **1366**, 53–67 (1998).
419. Suen, D.-F., Norris, K. L. & Youle, R. J. Mitochondrial dynamics and apoptosis. *Genes Dev.* **22**, 1577–1590 (2008).

420. Cree, L. M. *et al.* Age-related decline in mitochondrial DNA copy number in isolated human pancreatic islets. *Diabetologia* **51**, 1440–1443 (2008).
421. Welle, S. *et al.* Reduced amount of mitochondrial DNA in aged human muscle. *J. Appl. Physiol. Bethesda Md 1985* **94**, 1479–1484 (2003).
422. Barrientos, A. *et al.* Qualitative and quantitative changes in skeletal muscle mtDNA and expression of mitochondrial-encoded genes in the human aging process. *Biochem. Mol. Med.* **62**, 165–171 (1997).
423. Pesce, V. *et al.* Age-related mitochondrial genotypic and phenotypic alterations in human skeletal muscle. *Free Radic. Biol. Med.* **30**, 1223–1233 (2001).
424. Frahm, T. *et al.* Lack of age-related increase of mitochondrial DNA amount in brain, skeletal muscle and human heart. *Mech. Ageing Dev.* **126**, 1192–1200 (2005).
425. Mohamed, S. A. *et al.* Mitochondrial DNA deletions and the aging heart. *Exp. Gerontol.* **41**, 508–517 (2006).
426. Kazachkova, N., Ramos, A., Santos, C. & Lima, M. Mitochondrial DNA Damage Patterns and Aging: Revising the Evidences for Humans and Mice. *Aging Dis.* **4**, 337–350 (2013).
427. Kazachkova, N. *et al.* Patterns of mitochondrial DNA damage in blood and brain tissues of a transgenic mouse model of Machado-Joseph disease. *Neurodegener. Dis.* **11**, 206–214 (2013).
428. Dai, J. *et al.* The absence of mitochondrial DNA diversity among common laboratory inbred mouse strains. *J. Exp. Biol.* **208**, 4445–4450 (2005).
429. Takai, D., Inoue, K., Shisa, H., Kagawa, Y. & Hayashi, J. Age-associated changes of mitochondrial translation and respiratory function in mouse brain. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **217**, 668–674 (1995).

430. Ylikallio, E., Tyynismaa, H., Tsutsui, H., Ide, T. & Suomalainen, A. High mitochondrial DNA copy number has detrimental effects in mice. *Hum. Mol. Genet.* **19**, 2695–2705 (2010).
431. Herbener, G. H. A morphometric study of age-dependent changes in mitochondrial population of mouse liver and heart. *J. Gerontol.* **31**, 8–12 (1976).
432. Masuyama, M., Iida, R., Takatsuka, H., Yasuda, T. & Matsuki, T. Quantitative change in mitochondrial DNA content in various mouse tissues during aging. *Biochim. Biophys. Acta* **1723**, 302–308 (2005).
433. Chen, J.-Q., Cammarata, P. R., Baines, C. P. & Yager, J. D. Regulation of Mitochondrial Respiratory Chain Biogenesis by Estrogens/Estrogen Receptors and Physiological, Pathological and Pharmacological Implications. *Biochim. Biophys. Acta* **1793**, 1540–1570 (2009).
434. Capllonch-Amer, G. *et al.* Estradiol stimulates mitochondrial biogenesis and adiponectin expression in skeletal muscle. *J. Endocrinol.* **221**, 391–403 (2014).
435. Cortopassi, G. A., Shibata, D., Soong, N. W. & Arnheim, N. A pattern of accumulation of a somatic deletion of mitochondrial DNA in aging human tissues. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **89**, 7370–7374 (1992).
436. Tanhauser, S. M. & Laipis, P. J. Multiple deletions are detectable in mitochondrial DNA of aging mice. *J. Biol. Chem.* **270**, 24769–24775 (1995).
437. Brossas, J. Y., Barreau, E., Courtois, Y. & Tréton, J. Multiple deletions in mitochondrial DNA are present in senescent mouse brain. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **202**, 654–659 (1994).
438. Kujoth, G. C. *et al.* Mitochondrial DNA mutations, oxidative stress, and apoptosis in mammalian aging. *Science* **309**, 481–484 (2005).

439. Trifunovic, A. *et al.* Premature ageing in mice expressing defective mitochondrial DNA polymerase. *Nature* **429**, 417–423 (2004).
440. Williams, S. L. *et al.* The mtDNA mutation spectrum of the progeroid Polg mutator mouse includes abundant control region multimers. *Cell Metab.* **12**, 675–682 (2010).
441. Milenkovic, D. *et al.* TWINKLE is an essential mitochondrial helicase required for synthesis of nascent D-loop strands and complete mtDNA replication. *Hum. Mol. Genet.* **22**, 1983–1993 (2013).
442. Diaz Brinton, R. Minireview: Translational Animal Models of Human Menopause: Challenges and Emerging Opportunities. *Endocrinology* **153**, 3571–3578 (2012).

Thèse de Doctorat

Emmanuel Guivarc'h

Study of the estrogens protection against hypertension and aging in female mice

Abstract

Context

Estrogenic hormones have numerous beneficial effects in the cardiovascular and renal systems but the underlying mechanisms are extensively complex. Estrogen receptor ER α is described as the main effector of the positive actions of estrogens. This receptor acts in the cell using two different pathways. In the nucleus, ER α acts as a transcription factor with genomic effects, through its activating functions AF. At the membrane, it exerts non-genomic effects, called MISS.

First Study

In a first study, we have explored the protective mechanism of ER α in hypertension, a main risk factor in cardiovascular diseases. Using genetically modified mice, we have been able to highlight the involvement of AF-2 genomic actions against angiotensin II-induced hypertension. On the other hand, ER α -dependant MISS was not involved in ER α protection. Confirming our hypothesis, we found that AF-2 stimulation with estetrol was sufficient to completely prevent hypertension, thus providing a possible therapeutic perspective.

Second Study

In a second project, we have investigated the protective actions of ER α against aging-related cardiovascular and renal alterations. This work is still ongoing but we found that 16 months-old female mice presented no obvious vascular or renal dysfunctions. Those results are surprising considering past published data on the subject. Aging mice lacking ER α ^{-/-} did not exhibit any particular alterations either. However, we were able to find that estrogens and ERs were involved in the mitochondria biogenesis in a surprising manner. These results will be further investigated in the future.

Conclusion

To conclude, this work has allowed a better understanding of the estrogens receptors actions in the cardiovascular and renal systems

Mots clés

Œstrogènes	ER α	Hypertension	Vieillessement
Estérol	Angiotensine II	Mitochondrie	Rein

Résumé

Contexte

Les hormones œstrogéniques ont de nombreux effets protecteurs au niveau cardiovasculaire et rénal mais leurs mécanismes sont très complexes. Le récepteur aux œstrogènes ER α est le principal effecteur des effets bénéfiques de ces hormones. Il possède deux voies d'action. Dans le noyau, il a des effets génomiques via ses fonctions d'activation AF. A la membrane, il a des effets non-génomiques via une signalisation membranaire MISS.

Première étude

Dans une première étude, nous avons exploré le mécanisme protecteur d'ER α dans l'hypertension artérielle, un facteur de risque majeur de maladies cardiovasculaires. Nous avons mis en évidence le rôle protecteur des effets génomiques d'ER α via sa fonction AF-2 contre l'hypertension. Nous avons également observé que la stimulation de cette fonction par l'Estérol suffisait à reproduire les effets protecteurs des œstrogènes, ce qui ouvre une perspective thérapeutique potentielle.

Deuxième étude

Dans une deuxième partie, nous avons étudié un potentiel effet protecteur d'ER α dans le vieillissement cardiovasculaire et rénal. Cette étude, toujours en cours, a pu mettre en évidence que la souris femelle ne présentait pas d'altération majeure de la fonction vasculaire et rénale. Les résultats obtenus étaient globalement inverses à ce qui est suggéré dans la littérature concernant le vieillissement et la protection œstrogénique. Cette étude a toutefois permis de mettre en évidence que les œstrogènes agissaient sur la biogénèse mitochondriale, d'une manière inattendue. Ces résultats seront approfondis dans de prochaines expériences.

Conclusion

En conclusion, ce travail de thèse a permis de mieux cerner l'implication des hormones œstrogéniques et de leur récepteur ER α dans le système cardiovasculaire.