HAL
open science

Rôle de la dysfonction endothéliale dans les complications cardiovasculaires et rénales de la polykystose rénale autosomique dominante : intérêt d'une modulation pharmacologique par des agonistes dopaminergiques.

Mouad Hamzaoui

To cite this version:

Mouad Hamzaoui. Rôle de la dysfonction endothéliale dans les complications cardiovasculaires et rénales de la polykystose rénale autosomique dominante : intérêt d'une modulation pharmacologique par des agonistes dopaminergiques.. Médecine humaine et pathologie. Normandie Université, 2019. Français. NNT : 2019NORMR152 . tel-04043911

HAL Id: tel-04043911

https://theses.hal.science/tel-04043911

Submitted on 24 Mar 2023

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.

Normandie Université

THÈSE

Pour obtenir le diplôme de Doctorat

Spécialité Sciences de la Vie et de la Santé

Préparée au sein de l'Université de Rouen Normandie

Rôle de la dysfonction endothéliale dans les complications cardiovasculaires et rénales de la polykystose rénale autosomique dominante: intérêt d'une modulation pharmacologique par agonistes dopaminergiques

Présentée et soutenue par
Mouad HAMZAOUI

Thèse soutenue publiquement le 26 novembre 2019 à 14h00, dans la salle des Thèses du bâtiment Stewart, devant le Jury composé de		
Mme. le Dr. Emilie CORNEC-LE GALL	MCU-PH / Université de Bretagne Occidentale	Rapporteure
M. le Pr. Daniel HENRION	PU / Université d'Angers	Rapporteur
Mme. le Pr. Hélène FRANCOIS-PRADIER	PU-PH / Université de Paris Sorbonne	Examinatrice
M. le Pr. Pierre-Louis THARAUX	PU / Université de Paris Descartes	Examinateur
M. le Pr. Jérémy BELLIEN	PU-PH / Université de Rouen Normandie	Examinateur
M. le Pr. Dominique GUERROT	PU-PH / Université de Rouen Normandie	Directeur de thèse

Thèse dirigée par le Pr Dominique GUERROT, Laboratoire INSERM U1096 Endothélium, Valvulopathie et Insuffisance cardiaque.

UNIVERSITÉ DE ROUEN NORMANDIE

ED 497 NBISE
Normande de Biologie Intégrative, Santé, Environnement

Instituts thématiques
U1096
Inserm
Institut national de la santé et de la recherche médicale

A Madame le Docteur CORNEC-LEGALL,

Vous me faites l'honneur d'accepter le travail de rapporteur de cette thèse,

Veuillez trouver l'expression de ma profonde considération.

A Monsieur le Professeur HENRION,

Vous me faites l'honneur d'accepter le travail de rapporteur de cette thèse,

Veuillez trouvez l'expression de ma recpectueuse considération.

A Madame le Professeur FRANCOIS-PRADIER,

Vous me faites l'honneur de juger cette thèse,

Veuillez trouver l'expression de ma profonde gratitude.

A Monsieur le Professeur THARAUX,

Vous me faites l'honneur de juger cette thèse,

Veuillez trouver l'expression de mon profond respect.

A Monsieur le Professeur BELLIEN,

Vous me faites l'honneur de juger cette thèse,

Veuillez trouver l'expression de ma profonde gratitude et de mon respect.

Veuillez recevoir mes sincères remerciements pour votre disponibilité.

A Monsieur le Professeur GUERROT,

Vous me faite l'honneur de diriger cette thèse,

Veuillez recevoir mes sincères et respectueux remerciements pour m'avoir fait confiances, encadrer et encourager durant ce travail.

Pour vos qualités humaines.

A Monsieur le Professeur RICHARD,

Pour m'avoir acceulli dans votre laboratoire,

Votre soutien pendant mon cursus m'a profendement touché,

Veuillez trouver l'expression de ma profonde gratitude et de mon respect.

A Monsieur le Professeur GODIN,

Pour m'avoir acceuilli dans votre service,

Votre accueil et votre bienveillance au sein du service de néphrologie m'ont touché énormément,

Veuillez trouver l'expression de ma profonde gratitude et de mon respect.

TABLE DES MATIERES

TABLE DES FIGURES 7

LISTE DES ABREVIATIONS 9

INTRODUCTION 13

1. Epidémiologie : 15

2. Génétique 16

2.1. Gène *PKD1* 16
2.2. Gène *PKD2* 16
2.3. Gène *GANAB* 17
2.4. Gène *DNAJB11* 18
2.5. Corrélation génotype-phénotype 18
3. Polycystines 21

3.1. Polycystine-1 21
4.1.1 Structure 21

4.1.2 Localisation 21

4.2 Polycystine-2 23
4.2.1 Structure 23

4.2.2 Localisation 23

4.3 Complexe polycystines-1 et -2 24
5 Manifestations rénales 27

5.1 Kystes rénaux, physiopathologie et génétique 27
5.2 La progression de la maladie rénale chronique 29
5.3 Infection des kystes 31
5.4 Hémorragie intra kystiques 32
5.5 Douleurs 32
6 Manifestations extrarénales 34

6.1 Kystes hépatiques 34
6.2 Kystes pancréatiques 34
6.3 Kystes des vésicules séminales et kystes prostatiques 35
6.4 Diverticulose colique 35
6.5 Hernies abdominales 36
6.6 Manifestations cardio-vasculaires 37

MANUSCRIT 1 37

ATTEINTES CARDIOVASCULAIRES DE LA POLYKYSTOSE RENALE AUTOSOMIQUE DOMINANTE : MISE AU POINT 37

7 Diagnostic 77

8 Traitement 81

9 Dopamine, système cardio-vasculaire et PKRAD 84

RESULTATS 87

MANUSCRIT 2 89

5/6 NEPHRECTOMY INDUCES DIFFERENT RENAL, CARDIAC AND VASCULAR CONSEQUENCES IN 129/SV AND C57BL/6JRJ MICE 89

MANUSCRIT 3 119

DEFECTIVE ENDOTHELIAL EXPRESSION OF *Pkd1* INDUCES HYPERTENSION AND CONTRIBUTES TO THE CARDIOVASCULAR PHENOTYPE OF ADPKD 119

ETUDE DU ROLE DU SYSTEME DOPAMINERGIQUE DANS LA PKRAD 153

ETUDE DES ANOMALIES D'ADAPTATION A L'EFFORT DANS LA PKRAD, ROLE DE LA POLYCYSTIN-1 ENDOTHELIALE 163

PRODUCTION SCIENTIFIQUE ANNEXE 177

BIBLIOGRAPHIE: 215

TABLE DES FIGURES

Figure 1 **:** Gènes et transcrits de PKD1 et PKD2 17

Figure 2 : Survie rénale et type de mutation 20

Figure 3 : Structure de la polycystine-1 23

Figure 4 : Structure de la polycystine-2 24

Figure 5 **:** Canaux cationiques de polycystines 25

Figure 6 : Voies de signalisation cellulaire mises en jeu dans la PKRAD 26

Figure 7 **:** Mutations génétiques et cystogènese 28

Figure 8 **:** Classification de la Mayo Clinic 29

Figure 9 **:** Profils évolutifs de PKRAD 30

Figure 10 **:** Mutation *Pkd1* et stimulation dopaminergique 85

LISTE DES ABREVIATIONS

3D-TOF	3 dimension-Time of flight
Ach	Acétylcholine
ADMA	Asymetric dimethylarginine
AINS	Anti inflammatoire non stéroidien
AMPc	Adénosine monophosphate cyclique
CRP	C reactive proteine
CV	Cardiovasculaire
DC	Dissection des coronaires
DDD	Dilatation débit dépendante
DFG	Débit de filtration glomérulaire
ECG	Electrocardiogramme
EE	Epreuve d'effort
EEC	Epreuve d'effort courte
EEL	Epreuve d'effort longue
EIM	Epaisseur intima-média
eNOS-p	Endotheliale monoxyde d'azote synthase phosphorylée
FA	Fibrillation auriculaire
FAV	Fistule artério-veineuse
FC	Fréquence cardiaque
GC	Guanylate cyclase
GMPc	Guanylate monophosphate cyclique

GPS	Site protéolytique de la protéine G
GTP	Guanylate triphosphate
HTA	Hypertension artérielle
HVG	Hypertrophie du ventricule gauche
IEC	Inhibiteur de l'enzyme de conversion
IL-6	Interleukines-6
IMVG	Indice de masse du ventricule gauche
IP	Intrapéritonéale
IRC	Insuffisance rénale chronique
IRCT	Insuffisance rénale chronique terminale
IRM	Imagerie par résonnance magnétique
IRT	Insuffisance rénale terminale
KDIGO	Kidney disease improving global outcomes
L-arg	L-arginine
l-NA	l-nitroarginie
MAPA	Mesure de pression artérielle autonome
MMP-1	Metalloproteinase matricielle-1
mTOR	Mammalian target of rapamycin
ND	Non déterminé
NO	monoxyde d'azote
OR	Odds ratio
PA	Pression artérielle
PC-1	Polycystine-1
PC-2	Polycystine-2

PET	tomographie par émission de positrons
Phe	Phénylephrine
PKRAD	Polykystose rénale autosomique dominante
RE	Réticulum endoplasmique
SEM	Ecart-type
SEN	Sensibilité
SNP	Nitroprussiate de sodium
SRAA	Système rénine angiotensine aldostérone
TDM	tomodensitométrie
TNFα	Tumor necrosis factor
TRPP	Transient receptor potenial polycystin
VCAM-1	Vascular cell adhesion molecule 1
VEGF	vacsular endothelial growth factor
VOP	Vitesse d’onde de pouls
VPP	Valeur prédictive positive

INTRODUCTION

La polykystose rénale autosomique dominante (PKRAD) est la maladie rénale héréditaire la plus fréquente. Elle se caractérise principalement par le développement progressif de multiples kystes rénaux, altérant le parenchyme rénal et conduisant le plus souvent à l'insuffisance rénale chronique terminale (IRCT). La maladie se manifeste dès le jeune âge et la durée d'évolution vers l'IRCT est variable, dépendant de plusieurs facteurs, dont le gène présentant la variation pathogène, le type de variant génétique et les antécédents familiaux. La PKRAD représente un enjeu médical considérable par ses conséquences rénales, mais aussi extra rénales. Parmi les atteintes extrarénales de la PKRAD, l'atteinte cardio-vasculaire est au premier plan.

La physiopathologie de l'hypertension (HTA) et de l'atteinte cardio-vasculaire de la PKRAD reste mal comprise. Classiquement attribuée aux conséquences des lésions kystiques rénales et à l'activation secondaire du système rénine angiotensine aldostérone (SRAA), la genèse de l'HTA pourrait reposer sur une altération de l'endothélium vasculaire, qui joue un role important dans la régulation du tonus vasomoteur. En effet, les cellules endothéliales expriment le complexe des polycystines et une dysfonction endothéliale précoce a été rapportée dans la PKRAD, avant que l'IRC ne se développe.

La prise en charge de la PKRAD, notamment de son atteinte rénale, a évolué au fil des années. A ce jour, seul un traitement antagoniste des récepteurs V2 de la vasopressine permet de diminuer le volume rénal et de ralentir la progression vers l'IRC terminale. Hormis les mesures hygiéno-diététiques et le traitement de l'hypertension artérielle par inhibiteur du SRAA, la prise en charge des complications cardiovasculaires reste actuellement limitée et non spécifique.

Ainsi, ce travail de thèse est organisé en plusieurs parties :

- Dans un premier temps nous avons réalisé une revue de la littérature des atteintes cardiovasculaires liées à la PKRAD.

- Dans un deuxième temps, nous avons comparé dans un modèle murin d'IRC induit par néphrectomie des 5/6 ème, les conséquences CV et rénales dans 2 fonds génétiques de souris.

- Dans un troisième temps, nous avons étudié l'impact d'une délétion endothélium-spécifique de la *Pkd1* sur le système CV et sur les reins, puis la modulation des conséquences CV et rénales de l'IRC par cette délétion endothéliale de *Pkd1*.

- Dans un quatrième temps, nous avons étudié l'impact d'une stimulation dopaminergique des récepteurs DR5 sur les atteintes CV et rénales associées à la délétion endothéliale de *Pkd1*.

- Enfin, nous avons étudié le rôle de la polycystine 1 endothéliale dans l'adaptation à l'effort.

1. Epidémiologie :

La polykystose rénale autosomique dominante (PKRAD) est la maladie rénale héréditaire la plus fréquente. Sa prévalence dans les anciennes études varie entre 1 sur 400 et 1 sur 1000 (1). Cependant, l'accès limité au diagnostic génétique rend l'estimation de sa prévalence compliquée. Une étude réalisée en Allemagne a estimé la prévalence à 3.27 sur 10 000 (2). Dans une étude européenne plus récente se basant sur le registre ERA-EDTA, la prévalence de la maladie est estimée en Europe à 3.96 sur 10 000 (3). Aux Etats Unis, la prévalence est estimée à 4.3 sur 10 000 (4).

Lorsque l'on s'intéresse à la prévalence des patients atteints de PKRAD au stade d'insuffisance rénale terminale (IRT), celle-ci est estimée en Europe à 5.38 sur 100 000 habitants (5).

En France, la prévalence de la PKRAD dans la population générale est légèrement plus élevée que la moyenne européenne. Elle est estimée à 4.59 sur 10 000 (3). En 2017, en se basant sur le registre français REIN qui recense les patients aux stade d'IRCT, sur les 87 275 patients ayant débuté un traitement de suppléance rénale (dialyse ou greffe), 5 409 étaient atteints de la PKRAD. L'incidence de la maladie au stade d'IRCT est restée stable en France, durant les 10 dernières années (6.2 *vs.* 6.5 *vs.* 6.2% en 2011, 2013 et 2017 respectivement).

Ces nouvelles données de prévalence pourront avoir un impact important sur la prise en charge de la maladie. En effet, la PKRAD pourrait appartenir au groupe des Maladies Rares dont la prévalence est inférieure à 5 sur 10 000 habitants selon la législation européenne. Elle pourrait ainsi bénéficier d'un budget de recherche spécifique dédiée à ce type de maladie orpheline.

2. Génétique

La PKRAD est une maladie génétique autosomique dominante. Elle est généralement due à un variant pathogène des gènes *PKD1* ou *PKD2*, codant respectivement pour les protéines polycystines 1 (PC1) et 2 (PC2). Plus rarement, un phénotype de PKRAD moins caractéristique peut être dû à des mutations de *GANAB* ou *DNAJB11*, codant respectivement pour la sous unité α de la glucosidase II et une glycoprotéine chaperonne du réticulum endoplasmique.

2.1. Gène *PKD1*

Découvert en 1994, le gène *PKD1* est localisé sur le région chromosomique 16p13.3 et code pour la polycystine 1. Il représente le gène le plus muté (environs 78% des patients). En 2014, en France, sur les 1 228 mutations identifiées chez les patients avec PKRAD, 83% touchaient le gène PKD1. Actuellement, 1273 mutations pathologiques sont référencées sur le registre PKRAD de la Mayo Clinic (http://pkdb.mayo.edu/ ; accès le 08/10/2019). Les études menées par l'équipe brestoise sur la cohorte Genkyst ont montré que la pathogénicité de ces mutations est étroitement liée à leur caractère tronquant (induisant soit une absence de l'expression de la protéine d'intérêt, soit l'expression de protéine tronquée dont l'activité est nulle ou très réduite) ou non tronquant.

2.2. Gène *PKD2*

Découvert en 1996, le gène *PKD2* est localisé sur la région chromosomique 4q21 et code pour la polycystine 2. Il est impliqué dans la genèse de la PKRAD chez environ 15% des patients. Il est moins long que *PKD1* et code pour seulement 15 exons. Dans la même étude de 2014 citée précédemment, 17% des mutations identifiées concernaient le gène *PKD2*. Actuellement, 202

variants pathogènes sont référencés sur le registre PKRAD de la Mayo Clinic (http://pkdb.mayo.edu/ ; accès le 08/10/2019).

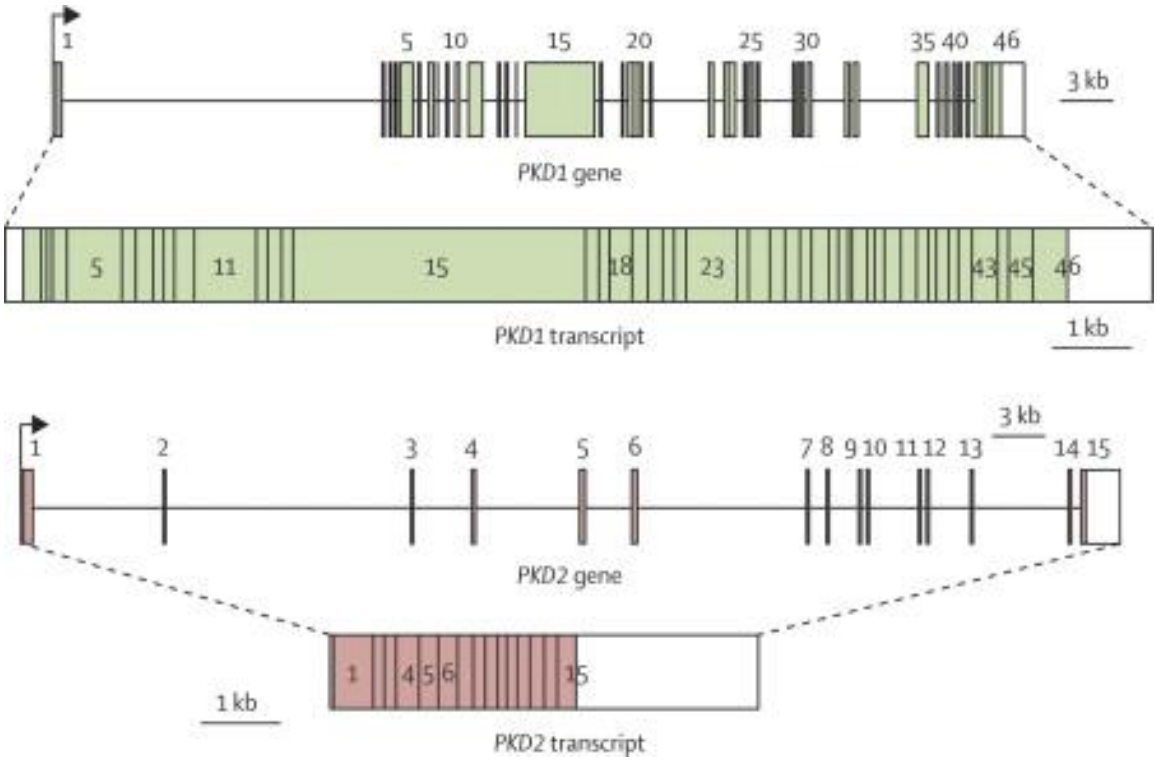


Figure 1 : Gènes et transcrits de PKD1 *et* PKD2*, d'après Torres et* al *(6)*

2.3. Gène *GANAB*

De découverte récente, la mutation de ce gène est responsable d'un tableau de PKRAD avec une forme rénale moins sévère et une expression hépatique plus importante (7). Situé sur la région chromosomique 11q12.3, il comporte 25 exons. Il code pour une enzyme (107 *kDa*) présente dans le réticulum endoplasmique dont l'activité catalytique est nécessaire pour la maturation de la PC1 au niveau du réticulum endoplasmique et la formation du complexe PC1-PC2 au niveau de la membrane cellulaire (8).

2.4. Gène *DNAJB11*

Découverte en 2018 (9), la néphropathie associée à des mutations de *DNAJB11* est caractérisée par la présence de petits kystes rénaux, sans augmentation significative de la taille des reins, et une insuffisance rénale conduisant généralement à l'IRCT après l'âge de 60 ans. Le spectre clinique ressemble à celui des néphropathies tubulo-interstitielles chroniques autosomiques dominantes. Le gène *DNAJB11* est situé sur la région chromosomique 3q27.3 et code pour un cofacteur de BiP, une protéine chaperone du réticulum endoplasmique impliquée dans la maturation cellulaire des polycystines.

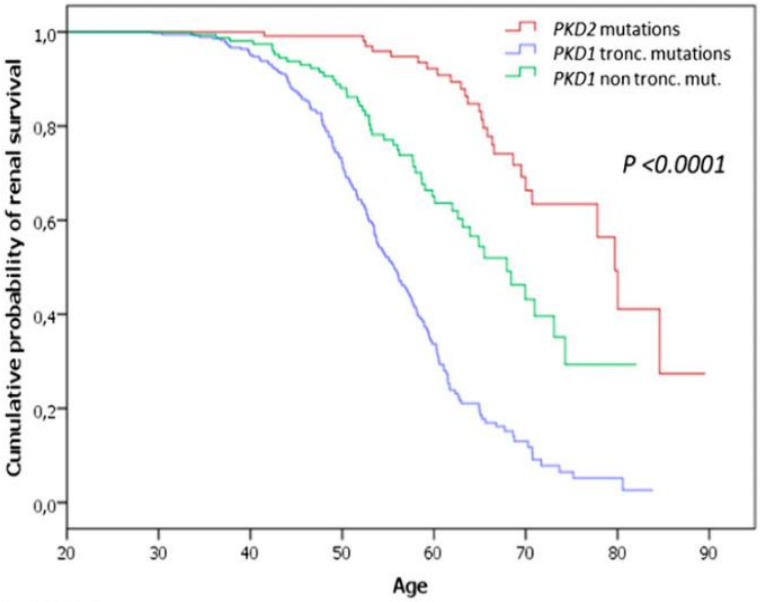
2.5. Corrélation génotype-phénotype

La sévérité de la maladie est principalement évaluée par l'arrivée en IRT. Il existe actuellement une variabilité de cette évolution entre les différentes familles, mais aussi au sein des mêmes familles. L'atteinte de *PKD1* est plus sévère que celle du *PKD2* avec une arrivée moyenne en IRT à l'âge de 58.1 et 79.9 ans respectivement (10). Une étude plus ancienne (11) a objectivé des arrivées en IRT à l'âge de 54.3 et 74 ans pour *PKD1* et *PKD2* respectivement. La différence d'âge entre ces deux études pourrait s'expliquer d'une part, par la différence de population étudiée (population française vs européenne), par la nature des mutations dans les 2 études (simplement supposées dans l'étude européenne, affirmées dans l'étude française) et enfin, par l'amélioration de la prise en charge néphrologique des patients atteints de la PKRAD au cours du temps.

Selon la nature de la mutation, le phénotype de la maladie peut varier. Ainsi, concernant le gène *PKD1*, les mutations dites « tronquantes » évoluent plus rapidement vers l'IRT que les autres mutations dites « non-tronquantes ». La plus faible population atteinte de mutations de *PKD2* ne permet pas, pour le moment, de mettre en évidence une différence de survie rénale entre les

différents types de mutations (10). Concernant la variabilité intra-familiale, d'autres mécanismes sont probablement responsables de cette variabilité, notamment le rôle de variants dans d'autres gènes régulateurs de la cystogenèse et de modifications post transcriptionnelles.

La PKRAD est une maladie autosomique dominante, l'atteinte d'un seul allèle suffit donc à induire la maladie. Une mutation homozygote de *PKD1* ou *PKD2* est non viable. Ainsi, chez les souris invalidées de façon homozygote pour le gène *Pkd1* ou *Pkd2* (12–14), les auteurs ont observé une mort intra-utérine/périnatale des embryons/fœtus secondaire à un développement embryologique kystique important, un hydramnios et une hémorragie importante. De plus, chez l'Homme, deux études ont montré des fausses couches spontanées chez des parents consanguins avec mutation *PKD1* ainsi que des parents non-consanguins connus mais porteurs de mutations de *PKD1* (15,16) renforçant l'idée du développement embryologique léthal des fœtus avec atteinte homozygotes. Plus récemment, 4 familles avec atteintes homozygotes de *PKD1* ou *PKD2* ont été découvertes. L'analyse génétique a révélé des mutations hypomorphes réduisant l'activité des polycystines, non responsables de la maladie chez les parents à l'état hétérozygote (ou avec un phénotype très peu marqué), se manifestant chez leurs enfants à l'état homozygote (17–19).



Patients at risk :

PKD1 truncating mutations (n=387)	356	296	175	53	11	2
PKD1 non truncating mutations (n=184)	172	144	134	48	15	1
PKD2 Mutations (n=133)	127	116	99	63	23	5

Figure 2 : Survie rénale et type de mutation. Evolution selon les différents types de mutations. D'après Cornec-Le Gall E et al *(10).*

3. Polycystines

3.1. Polycystine-1

4.1.1 Structure

La polycystine-1 (460 *kDa*) est une protéine transmembranaire contenant 4303 acides aminés. Elle contient un domaine C-terminal intracellulaire, 11 domaines transmembranaires et un grand domaine N-terminal extracellulaire. Parmi les domaines transmembranaires, 6 ont une homologie avec les domaines transmembranaires de la polycystine-2 et joue un rôle important dans la formation du complexe polycystines

4.1.2 Localisation

La polycystine-1 est localisée principalement dans les cellules épithéliales, au niveau des cils primaires sous forme d'un complexe hétérotétramérique, 1 molécule de PC-1 avec trois molécules de PC-2, ou bien seul au niveau des membranes plasmiques, formant des jonctions cellulaires serrées ou adhérentes : cellule-cellule ou cellule-matrice extracellulaire (20,21). Au niveau rénal, elle est localisée au niveau du cil primaire des cellules épithéliales tubulaires. Enfin, au niveau vasculaire, la polycystine-1 est située au niveau du cil primaire des cellules endothéliales mais aussi au niveau des cellules musculaires lisses.

La polystine-1 lors de sa maturation, subit plusieurs clivages à des sites différents. Un des clivages importants est réalisé au niveau du site protéolytique de la protéine G (GPS) (22,23). Au niveau cellulaire, les deux formes de polycystine-1 (clivée et non clivée) sont présentes. Ce clivage est nécessaire à l'externalisation de la protéine au niveau membranaire ainsi qu'au cil primaire. En effet, plusieurs modèles de modification génétique du site GPS par *knock-in* ont montré l'absence d'externalisation de la polycystine-1. Ceci a pour conséquence une apparition

décalée dans la vie de kyste rénaux (22,24). Ainsi, les modèles de souris *knock-in* contrairement aux modèles de *knock-out* survivent à la naissance, mais développent des kystes en période post-natale et meurent à 21 jours de vie avec des kystes principalement au niveau des tubes contournés distaux et des canaux collecteurs, mais pas au niveau des tubes proximaux (25). Ces données suggèrent que la PC-1 non clivée est nécessaire à l'embryogenèse mais que la PC-1 clivée est importante dans la méchano-transduction et le développement rénal des tubes distaux en post-natal.

La PC-2 amplifie l'auto-clivage de la PC-1 au niveau du site GPS (26), et ceci avant l'arrivée de la PC-1 à la membrane plasmique puisque toutes les PC-1 détectées à la surface cellulaire des cellules tubulaires proximales en culture étaient clivées (27). Une étude plus récente suggère que la partie C-terminale est nécessaire au trafic de la PC-1 intra-ciliaire et que l'association à la PC-2 promeut celui-ci (28).

D'autre clivages ont un rôle important. Ainsi, en l'absence de stimuli mécaniques, la PC-1 subit un clivage au niveau du domaine C-terminal (29) libérant des fragments qui seront internalisés au niveau nucléaire et induiront ainsi une cascade de signalisations aboutissant à l'activation de la voie *mammalian target of rapamycin* (mTOR), à l'augmentation de l'adénosine monophosphate cyclique (AMPc) et ainsi à la prolifération cellulaire (30).

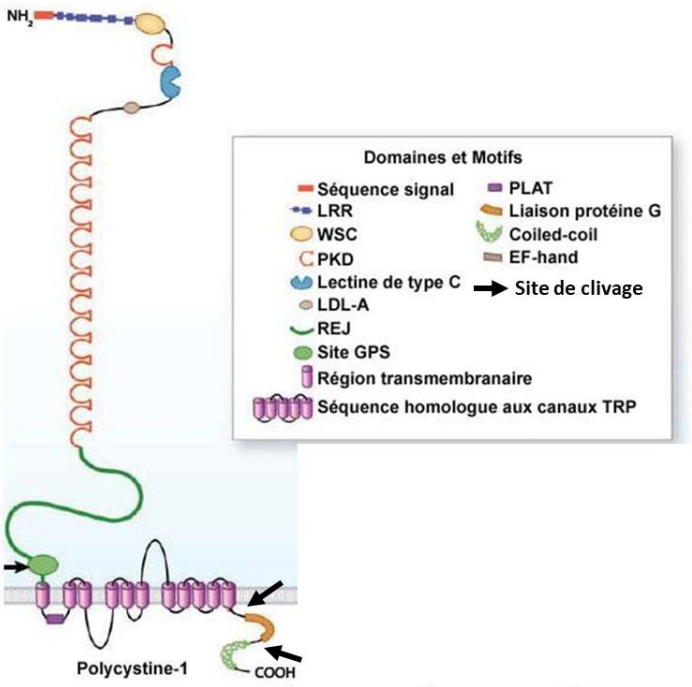


Figure 3 : Structure de la polycystine-1.mise en évidence des sites de clivage de la PC-1. Adapté de Harris et al *(2008) et Merrick D* et al *(2014) (31)*

4.2 Polycystine-2

4.2.1 Structure

La polycystine-2 (110 *kDa*) contient 968 acides aminés qui forment 6 domaines transmembranaires, un domaine N- et un domaine C-terminale, tous deux, intracellulaires. Elle appartient à la sous-famille TRPP des canaux Transient Receptor Potential (TRP).

4.2.2 Localisation

En plus d'être localisée au même endroit que la polycystine-1, la polycystine- 2 est largement située dans les réticulums endoplasmiques (32–34) . Sa localisation dans le cil primaire est importante. En effet, le blocage de son trafic au niveau de la base du cil primaire induit une cystogénèse (35).

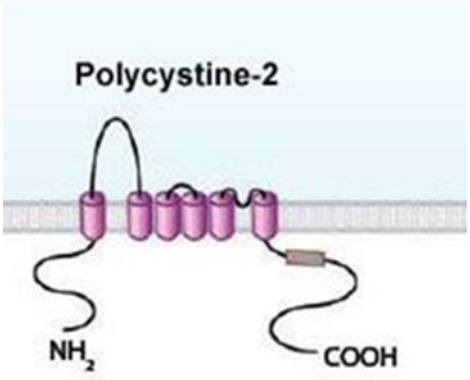


Figure 4 : Structure de la polycystine-2 . Adapté de Harris et al *(2008)*

4.3 Complexe polycystines-1 et -2

Il est communément admis que le complexe PC-1 et PC-2 par le biais de la PC-1 joue un rôle de méchano et chémo-sensor des stimuli extra-cellulaire et induit une réponse par un influx de calcium en intracellulaire conduit par la PC-2. Cette augmentation du calcium en intracellulaire permet d'activer différentes voies de signalisations (36). Cependant, des études récentes ont permis de mieux comprendre le fonctionnement de ce complexe.

Situé au niveau du cil primaire, la PC-1 et -2 forment un complexe hétérotétramèrique (37). Il est composé d'une unité de Polycystine-1 et trois unités de polycystine-2. Cette structure unique distingue le complexe des polycystines des autres homotétramères TRP symétriques classiques et questionne sur les mécanismes en jeu dans la fonction canal ionique suspectée. L'analyse du pore central réalisé par ce complexe montre une obstruction par trois résidus chargés positivement, appartenant à la polycystine-1. Ce pore apparaît donc, dans l'état analysé, peu propice à une perméabilité ionique. Ceci pourrait suggérer un mécanisme spécifique de régulation de l'entrée de cations, dépendant de modifications de la polycystine-1 (37). De plus, les PC-2 peuvent former un homotétramère en se liant entre-elles. Ce complexe forme un pore

central de petit calibre, peu propice au passage des cation bivalents contrairement aux cations monovalents (38).

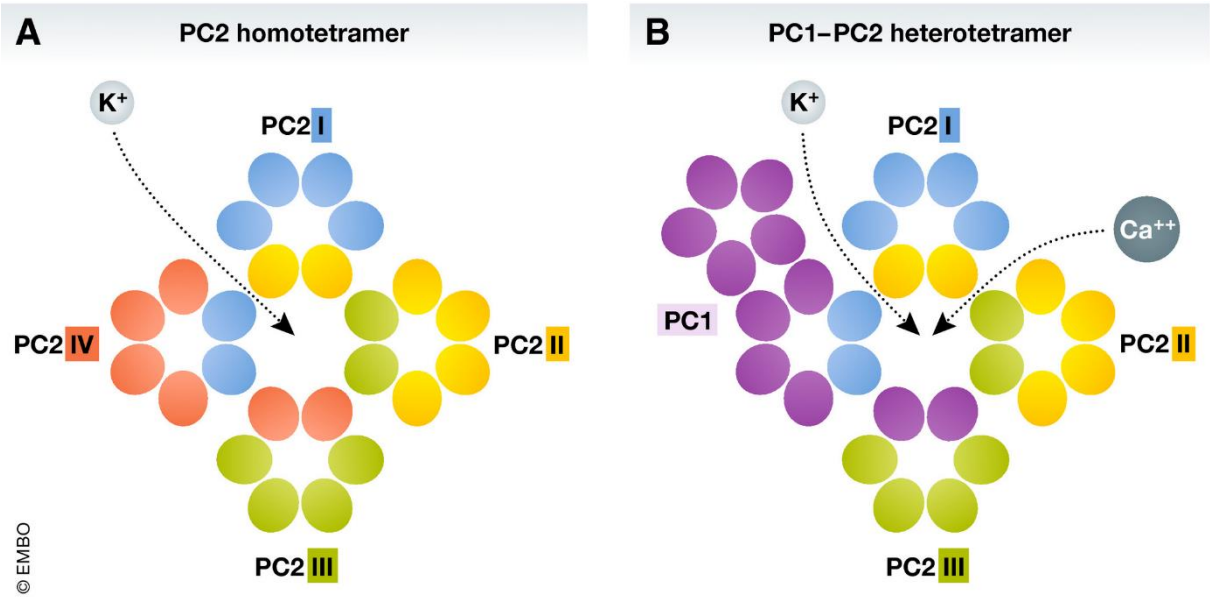


Figure 5 : Canaux cationiques de polycystines. Schèma des canaux homotetramère de PC-2 et heterotetramere de PC-1 PC-2. D'après Caplan M J et al *(2009) (39)*

Ce rôle de méchanotransduction est bien établi au niveau de l'épithélium rénal, au niveau des cellules endothéliales mais aussi au niveau des ostéoblastes. Dans ces dérnieres, la PC-1 intergait avec un coactivateur transcriptionnel TAZ pour induire un signal cellulaire aboutissant à l'ostéoblastogènese et une inhibition de l'adipogénèse (40).

Le rôle du complexe PC-1 et -2 dans l'influx du calcium intracelluliare est dépendant de la structure du cil primaire. Ainsi dans un modèle génétique d'invalidation du cil primaire, lors de la stimulation cellulaire par du flux, l'influx calcique est aboli (41). Cette entrée calcique dépendante du cil primaire a été récemment remise en question. Grâce à des nouvelles techniques d'imagerie, l'influx calcique peut être quantifié au niveau cellulaire. Ainsi Delling M *et al* (42) ont montré qu'en présence de stimuli mécaniques (flux), les cellules en cultures présentait un influx calcique cytoplasmique intial, qui se propageait secondairement au niveau

du cil primaire. Une des critique majeure de l'étude est la fréquence des prises des images. En effet, l'entrée précoce du calcium au niveau du cil primaire pourrait ne pas être prise en concidération par cette technique (43).

Au niveau de l'épithélium rénal, l'entrée du calcium au niveau cellulaire induit une modulation de certaines voies de signalisations, telles que l'AMPc, la voie des mTOR, la vioe de WNT et la voie du v*acsular endothelial growth factor* (VEGF) aboutissant à une multiplication planaire orientée dans l'espace et une division cellulaire contrôlée des cellules épithéliales tubulaires.

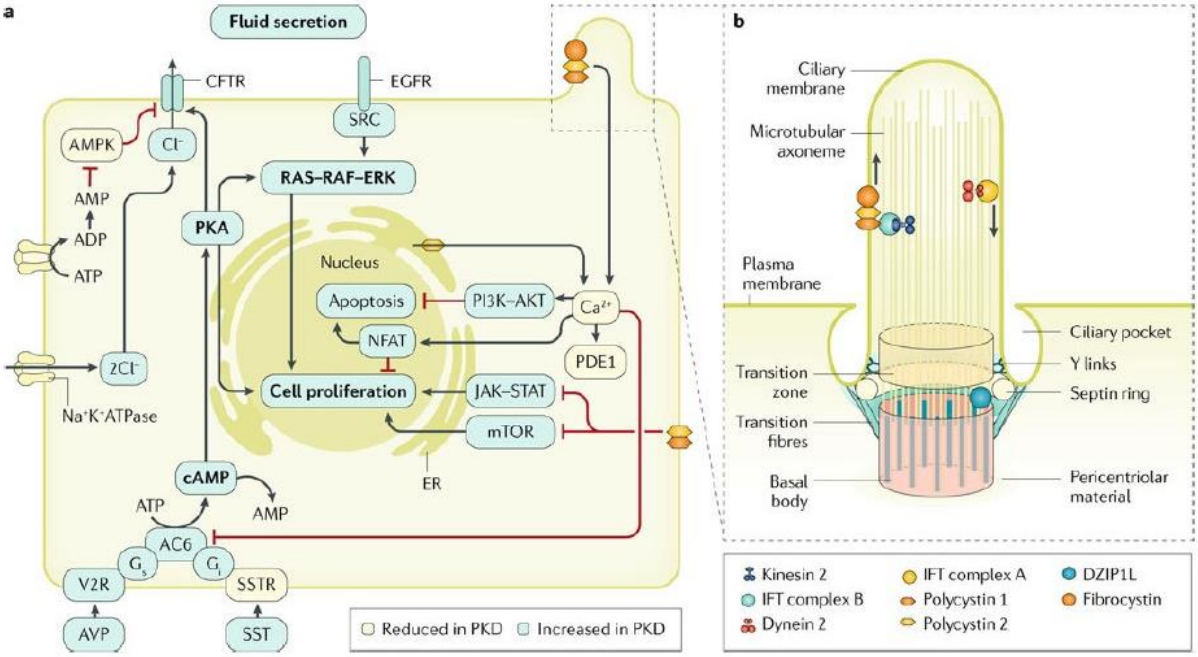


Figure 6 : Voies de signalisation cellulaire mises en jeu dans la PKRAD. D'après Bergmann et al *(2018)*

5 Manifestations rénales

5.1 Kystes rénaux, physiopathologie et génétique

La PKRAD est caractérisée par le développement de kystes rénaux au dépend des segments tubulaires des néphrons. Certaines études ont montré des kystes rénaux lors du développement embryologique. La mutation de *PKD1* est responsable d'apparition de kystes rénaux de façon plus précoce que *PKD2*.

La physiopathologie de la cystogénèse est complexe. Dans la PKRAD, la signalisation calcique décrite précédemment est altérée. Ainsi, des modifications de la signalisation cellulaire en réponse au flux sont observées, une altération dans la polarité baso-apicale au niveau cellulaire, une altération de la division planaire, une augmentation de la production de la matrice extracellulaire et une augmentation des secrétions de fluides et de chlore. Ceci aboutit à une division cellulaire anarchique et la formation ainsi des kystes (44,45).

Même si la PKRAD est une maladie génétique dont la transmission est autosomique dominante, celle-ci apparait récessive sur le plan cellulaire. La mutation germinale reçu par l'un des parents ne permet pas à l'échelle cellulaire d'induire des kystes. En effet, l'allèle sain restant permet de produire une quantité de protéines suffisante pour assurer l'influx calcique et les signalisations décrites précédemment. Cette hypothèse découle du fait que dans la PKRAD, toutes les cellules épithéliales rénales ne développent pas de kystes.

La cystogènese s'initie lorsque le nombre de polycystines fonctionnelles dans la cellule épithéliale est effondré. En effet, l'acquisition d'une deuxième mutation sur l'allèle sain semble être un élément majeur dans cette physiopathologie. Cette deuxième mutation est dite « mutation somatique » et permet de réduire la production de polycystine fonctionnelle (de 50%

à 100%) et altérer ainsi la fonction de cette protéine. Chez l'Homme, avec l'âge, ces mutations somatiques sont plus fréquentes au niveau de l'épithélium rénal et surviennent sur le gène *PKD1* du fait de sa grande séquence génomique avec de un domaine dupliqué de multiples fois (46). Ainsi, conceptuellement, cette deuxième mutation représente un « second hit ».

D'autre facteurs environnementaux peuvent induire une perte de fonction des polycystines saines et participer ainsi à la perte des taux de polycystines.

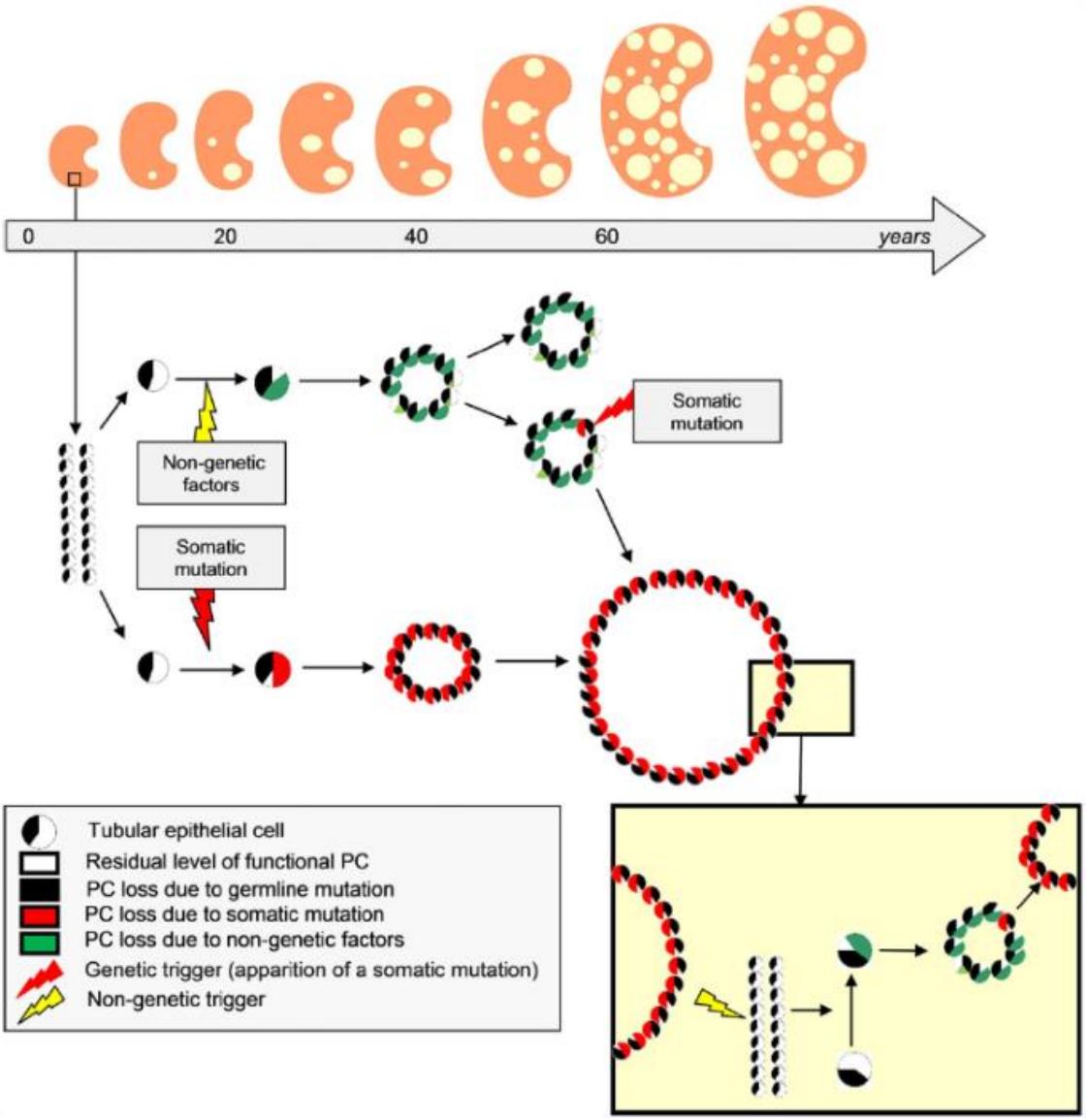


Figure 7 : Mutations génétiques et cystogènese. D'après Cornec Le-Gall et al *(46)*

5.2 La progression de la maladie rénale chronique

L'insuffisance rénale est la complication la plus sévère de la PKRAD. Elle évolue progressivement, le plus souvent vers une insuffisance rénale terminale. Une fois le déclin du DFG initié (entre 30 et 50 ans en général), il se fait de façon linéaire avec une vitesse estimée de 4 à 6 ml/min/an (47). Des facteurs de risques de progression de l'IRC ont été identifiés : le gène muté, le sexe masculin, des complications urologiques dont une hématurie avant l'âge de 30 ans, une HTA apparue avant l'âge 35 ans, un petit poids de naissance.

Irazabal *et al* (48) ont pu classifier les patients en 5 classes selon la vitesse de progression du volume rénal (A-B-C-D-E) en se basant sur des mesures radiologiques de la taille des reins et en prenant l'âge du patient en considération. Elle permet actuellement de classer les patients de non progresseur (classe A) vers les progresseurs rapide (classe E) et d'inclure ainsi les patients dans la prise en charge thérapeutique.

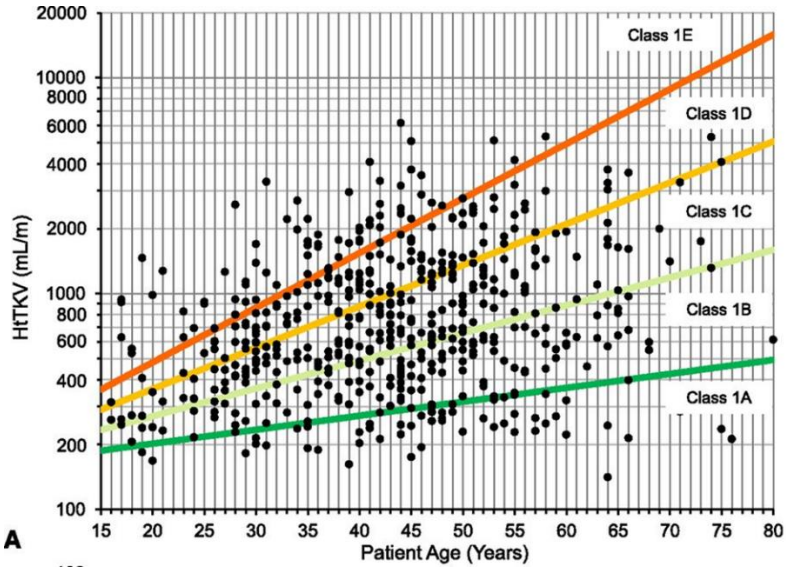


Figure 8 : Classification de la Mayo Clinic. D'après Irazabal et al *(48)*

Une étude récente de Yu *et al* (49) a permis pour la première fois de modéliser l'évolution du DFG dans la PKRAD. Ce modèle a été développé en se basant sur la population issue de la cohorte CRISP et en le validant sur la cohorte HALT-PKD. Les auteurs ont pu d'une part, confirmer que les mutations du gène *PKD1* induisent un déclin moyen du DFG plus rapide comparativement aux mutations de *PKD2* et aux mutations non identifiées, que la décroissance du DFG n'était pas linéaire, et enfin que ce déclin pouvait être prédit à partir d'une seule mesure du volume rénal associée à l'âge du patient selon le modèle d'Irazabal. Ce nouveau modèle pourrait permettre de mieux concevoir les études concernant les patients atteints de PKRAD et de mieux sélectionner les patients selon leur profil évolutif attendu.

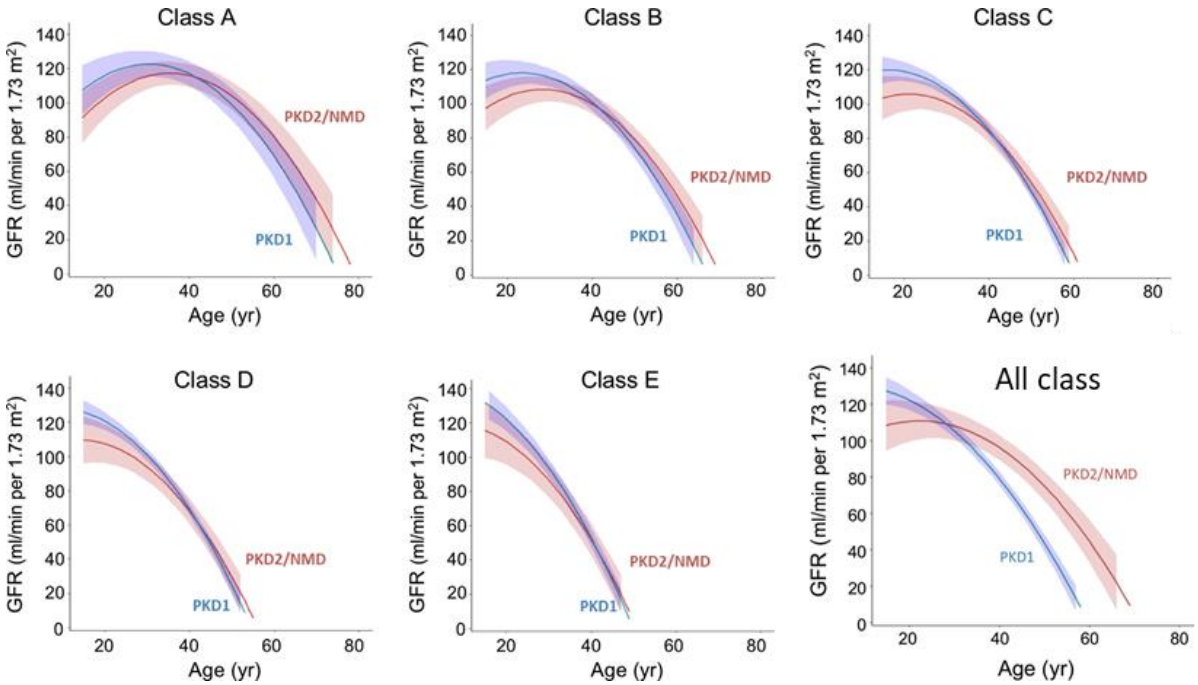


Figure 9 : Profils évolutifs de PKRAD, d'après Yu et al *(49).*

5.3 Infection des kystes

Les infections des kystes se manifestent principalement par des douleurs lombaires accompagnées de fièvre., précédées quelques jours avant de signes fonctionnels urinaires. Son diagnostic reste compliqué. En effet, le diagnostic différentiel le plus fréquent est l'hémorragie intra kystique qui ne nécessite pas de traitement antibiotique. Ainsi, la nécessité de réaliser des examens complémentaires afin de faire le diagnostic est important. Le recours au TDM dans un premier temps permet selon la densité du signal d'orienter vers l'hémorragie. Si celle-ci n'est pas informative, un PET-TDM est indiqué et permet lors de la fixation d'affirmer le diagnostic de l'infection urinaire (50).

Les infection urinaires sont décrites dans 60% des patients avec PKRAD avec une prévalence plus importante chez les femmes (51). L'étude française de l'hôpital Necker (52) a estimé l'incidence des infections kystiques rénale et hépatiques à 0.01 épisode/patient/an. Ces infections représentaient 11% des hospitalisations dans cette étude. De plus, une étude chinoise plus récente (53) a estimé le pourcentage de patients PKRAD ayant été hospitalisés entre 2012 et 2016 pour infection urinaire à 24.55%.

Une revue de la littérature du traitement des infections kystiques rénales dans la PKRAD (54) a observé que dans la majorité des cas, le traitement par antibiotiques seuls suffisait (79%), qu'un drainage percutané supplémentaire était requis dans 7% des cas et un traitement chirurgical dans 14% des cas. Le traitement antibiotique initial s'était soldé par un échec dans 61% des cas et devait soit être changé soit complété par une technique diagnostique et/ou thérapeutique invasive.

5.4 Hémorragie intra kystiques

Complication fréquente de la PKRAD, l'hémorragie kystique se caractérise par des douleurs lombaires intenses. Une fièvre peut accompagner le tableau et conduire à un faux diagnostic d'infection kystique. L'hématurie macroscopique n'est pas systématiquement associée. Le TDM sans injection de produit de contraste permet d'affirmer le diagnostic si la densité intra kystique est corrélée au saignement, mais la précision diagnostique et la valeur localisatrice de cet examen sont souvent limités par la présence de multiples kystes de contenu différent dans le rein douloureux.

5.5 Douleurs

La douleur est une complication fréquente de la PKRAD. Son incidence annuelle est de 7% (55). Elle est classiquement divisée en aiguë (inférieure à 4 semaines), souvent secondaire à une hémorragie intra-kystique, une rupture de kyste, une infection kystique ou une formation de lithiase urinaire, et chronique (sup à 4-6 semaines) secondaire à la croissance des kystes rénaux ou hépatiques avec une distension douloureuse de la capsule ou une compression extrinsèque des organes abdominaux par le foie ou les reins polykystiques.

La prévalence de la douleur chronique varie selon les études mais reste supérieure à 50% (56) et peut avoir un retentissement physique mais aussi social sur les patients. Lorsque le DFG est sup à 60 ml/min/1.73 m², la douleur n'est pas corrélée au volume des reins totaux (55,56).

Le traitement consiste à traiter la cause de la douleur (sus-citées). Le traitement symptomatique consiste aux antalgiques de paliers I, II voire III avec une contre-indication aux AINS lorsque le DGF est bas. Les traitements invasifs peuvent être proposées mais sont souvent laissés en derniers recours. Dans l'étude TEMPO 3:4, le tolvaptan a permis une réduction significative

des douleurs comparées aux patients traités avec du placebo (10.1% *vs.* 16.7% respectivement) (55). Cette réduction est corrélée avec la baisse des infections urinaires, la baisse des lithiases urinaires et la diminution de l'hématurie macroscopique.

6 Manifestations extrarénales

6.1 Kystes hépatiques

C'est la manifestation kystique la plus fréquente après les kystes rénaux. Elle est présente dans 90% des patients PKRAD âgés de plus de 40 ans (57). Les kystes sont plus présents et plus volumineux chez la femme du fait de la stimulation de la prolifération des cholangiocytes par les œstrogènes. Certaines complications des kystes hépatiques sont liées à la compression des organes de voisinage : reflux gastro-oesophagien, compression gastrique pouvant conduire à une restriction alimentaire sévère, dyspnée, syndrome de Bud Chiari, compression de la veine cave inferieure. Elle peut être responsable de douleurs abdominales et peut se compliquer de rupture de kystes, hémorragie intra-kystique ou d'infection kystiques. Le traitement dépend du type de complication et peut dans de rares cas nécessiter une chirurgie et une transplantation hépatique. Le traitement médical par tolvaptan est inefficace (absence d'expression hépatique de de V2R). Les analogues de la somatostatine ont montré une réduction du volume kystique hépatique après 6 et 12 mois de traitement (58).

6.2 Kystes pancréatiques

Une récente étude en 2016 a montré une prévalence de 36% des kystes pancréatiques chez les patients PKRAD contre 23% dans la population générale, avec une différence significative après ajustement sur l'âge et le sexe (59). Dans cette étude la prévalence des kystes chez les patients avec une mutation de *PKD2* était plus importante comparé aux mutations de *PKD1*. Une étude plus récente (60) sur 271 patients PKRAD n'a pas montré de différence entre *PKD1* et *PKD2*. Cependant, les patients *PKD2* avaient tendance à avoir des kystes plus volumineux.

6.3 Kystes des vésicules séminales et kystes prostatiques

Les dilatations kystiques des vésicules séminales supérieures à 10mm sont associées à la PKRAD. Une étude de 2002 (61) a montré une prévalence de 32% chez les patients PKRAD vs 2% dans la population générale. Une étude de 2019 (62) a montré une prévalence de 25% de vésicules séminales dilatées chez les patients PKRAD alors que celle-ci était de 2% chez la population générales. Dans cette même étude les kystes prostatiques médians (situés à l'abouchement de l'urètre) étaient plus importants comparativement à la population générale : 18 vs. 7% alors qu'il n'y avait pas de différence des kystes non-médians (8% dans les deux groupes).

Des cas d'infertilité chez les hommes atteints de PKRAD ont été décrits. Leur prévalence varie selon les études de 5% à 28.5% (61,63). Hormis les facteurs de risque d'infertilité chez ces patients les toxines urémiques, trouble de la motilité des spermatozoïdes, les dilatations des vésicules séminales pourrait expliquer cette infertilité (64).

6.4 Diverticulose colique

Des études anciennes ont montré une prévalence de diverticules coliques de l'ordre de 40% chez les patients PKRAD. Une étude de 1999 (65) n' a pas montré cette association. Cependant, dans une étude rétrospective de registre anglais de 1967 à 2015, en comparaison à une population hospitalisée, le risque de développer une complication diverticulaire colique était 2.12 fois plus importante dans la PKRAD (66).

6.5 Hernies abdominales

Dans la même étude de registre, le risque relatif de hernie abdominale était de 1.35 dans la PKRAD (66). Dans une étude ancienne (67), la prévalence de hernie abdominale était de 45% chez les patient PKRAD avec IRT, plus importante que la population en IRT non PKRAD 8% et la population générale 4%. La localisation des hernies abdominales était : 65% inguinal, 17% sur cicatrice de laparotomie et 18% para-ombilical. Ce risque de hernie abdominale fait craindre la dialyse péritonéale (DP) chez ces patients. Cependant une étude française récente (68) n'a pas montré plus de complication chez ces patients, avec un survie de la technique de DP similaire à la population en DP non PKRAD.

6.6 Manifestations cardio-vasculaires

MANUSCRIT 1

Cette partie du travail a fait l'objet d'un manuscrit dédié, dans lequel nous avons développé, après une revue de la littérature, les différentes atteintes cardio-vasculaires, structurelles et fonctionnelles, observées dans la PKRAD, ainsi que les différents mécanismes physiopathologiques possiblement impliqués.

ATTEINTES CARDIOVASCULAIRES DE LA POLYKYSTOSE RENALE AUTOSOMIQUE DOMINANTE : MISE AU POINT

Atteintes cardio-vasculaires associées à la polykystose rénale autosomique dominante : mise au point.

Auteurs :

Mouad Hamzaoui[1,2], Gaspard Lamy[1,2], Jérémy Bellien[1,3], Dominique Guerrot[1,2]

Affiliations :

1.Normandie Univ, UNIROUEN, INSERM U1096, FHU REMOD-VHF, 76000 Rouen, France

2.Service de Néphrologie, CHU de Rouen, Rouen, France

3.Service de Pharmacologie clinique, CHU de Rouen, Rouen, France

Introduction

La polykystose rénale autosomique dominante (PKRAD) est la maladie rénale héréditaire la plus fréquente. Elle est généralement due à la mutation des gènes *PKD1* ou *PKD2* codant respectivement pour les polycystines 1 et 2, plus rarement à des mutations de *GANAB* ou *DNAJB11*. Sa prévalence est difficile à évaluer du fait d'un accès variable au diagnostic génétique (1). En Europe, elle est estimée à 3,96 personnes sur 10 000 et en France à 4,59 sur 10 000 (2). En se basant sur le registre français REIN 2017, 5 409 patients sont atteints de la PKRAD sur 87 275 patients en insuffisance rénale chronique terminale (IRCT) (6,2%). L'incidence de la maladie dans la population avec IRCT est restée stable durant les 10 dernières années en France (Figure 1). La morbi-mortalité cardio-vasculaire des patients atteints de PKRAD est très importante. Celle-ci est à la fois liée à l'insuffisance rénale chronique et au phénotype cardio-vasculaire particulier de ces patients qui se caractérise par une prévalence accrue, par rapport à la population générale, d'hypertension artérielle (HTA), d'hypertrophie du ventricule gauche (HVG), de fibrillation auriculaire, d'anévrysmes cérébraux, de valvulopathie et de dissection vasculaire. Les patients présentent également des facteurs de risque cardio-vasculaire de façon précoce tels qu'une dysfonction endothéliale, un épaississement intima-média carotidien/hypertrophie artérielle pariétale, une rigidité vasculaire augmentée, et une mauvaise adaptation cardiaque à l'effort. Cette morbi-mortalité tend à diminuer depuis l'amélioration des connaissances physiopathologiques et de la prise en charge globale de ces patients (3). Dans cette revue, nous proposons une mise au point des connaissances actuelles sur les atteintes cardio-vasculaires spécifiques de la PKRAD.

1. Hypertension artérielle

L'HTA représente chez les patients atteints de PKRAD un facteur de risque cardio-vasculaire modifiable majeur. En règle générale elle se développe tôt dans l'histoire naturelle de la maladie, souvent dès l'enfance, car les mécanismes physiopathologiques mis en jeu dans la PKRAD ne dépendent que partiellement de l'altération progressive du débit de filtration glomérulaire (DFG) induite par la maladie kystique rénale.

1.1. Epidémiologie de l'HTA

1.1.1. Chez l'adulte

Dans la PKRAD, l'HTA atteint autant les hommes que les femmes mais le diagnostic d'HTA est posé à un âge moyen plus précoce chez les hommes (32 vs. 34 ans), et nettement plus précocement en comparaison aux patients atteints d'HTA essentielle (45 ans et 55 ans chez les hommes et les femmes respectivement) (4) (5). La précocité de l'HTA se traduit par le fait que 50 à 70% des patients PKRAD qui ne présentent pas encore d'altération du DFG sont déjà hypertendus (6) (7). Avec les biais méthodologiques inhérents à ce type de données, dans une étude de registre américain de 2004 portant sur 516 patients avec PKRAD suivis de 1985 à 2000, 37% présentaient une HTA (5). La prévalence de l'HTA était de 49% chez les PKRAD âgés de 20 à 34 ans vs. 7% dans la population générale issue du registre NHANES. Dans l'étude de cohorte CRISP (8) où la prévalence de l'HTA était de 62%, les patients hypertendus étaient plus âgés, leurs DFG plus bas et leur albuminurie plus importante comparativement aux patients non hypertendus. Dans l'étude TEMPO (9), sur les 1445 patients de l'étude, 79% avaient une HTA. Chez les patients avec une IRC et/ou une néphromégalie évoluée, l'HTA est plus fréquente (10). De même, l'HTA est plus fréquente chez les patients ayant une mutation de *PKD1* par rapport à ceux ayant une mutation de *PKD2* et, parmi les patients ayant une mutation

PKD1, le type de variant génétique influence le risque d'HTA (mutation tronquant la polycystine 1 vs. Mutation non-tronquante : 73% vs. 52%) (11).

1.1.2. En pédiatrie

Selon l'âge étudié, la prévalence moyenne de l'HTA en pédiatrie oscille entre 20 et 40% (12,13). Dans une méta-analyse de 2016 (14) regroupant 14 études s'intéressant à l'HTA chez les enfants avec PKRAD, la prévalence de celle-ci était estimée à 20% [15-27%]. L'HTA était corrélée à l'âge et aux nombres de kystes rénaux (14,15). Dans une étude européenne multicentrique de 2018 (16), 310 patients pédiatriques de (11,5±4,1 ans) atteints de PKRAD avec un DFG normal supérieur à 60 ml/min/1.73m², ont bénéficié d'une mesure de pression artérielle (PA) par MAPA. Trente-et-un % des patients avaient une HTA diurne, 42% une HTA nocturne et 35% avaient une HTA objectivée sur 24h. D'autres anomalies de la pression artérielle ont été objectivées dans l'étude. En effet, les variations nycthémérales physiologiques de la PA étaient altérées chez 52% des patients. Dans la population de patients hypertendus, une altération de la baisse nocturne de la PA (profil « non-dipper ») est associée à un risque cardiovasculaire accru, suggérant l'importance particulière d'une prise en charge précoce dans la PKRAD.

1.2. Physiopathologie

La physiopathologie de l'HTA dans la PKRAD met en jeu plusieurs facteurs. Lorsque la maladie évolue, une IRC apparait et s'aggrave progressivement. A ce stade évolué de la maladie, l'IRC et ses complications indirectes sont considérés comme étant les causes prédominantes de l'HTA. A un stade plus précoce de la maladie, la physiopathologie de l'HTA met en jeu des mécanismes spécifiques à la PKRAD, en premier lieu l'activation rénale du système Rénine-Angiotensine-Aldostérone (SRAA), conséquence de la cystogenèse, et les

altérations fonctionnelles induites par l'anomalie du complexe des polycystines au niveau vasculaire.

1.2.1. Système rénine angiotensine aldostérone

L'importance particulière d'une activation du SRAA dans la physiopathologie de l'HTA de la PKRAD a été suggérée et étudiée depuis longtemps. En effet, le développement des kystes au niveau rénal induit une compression tissulaire locale conduisant à une ischémie rénale, provoquant la libération de la rénine et l'activation du SRAA. De plus une sécrétion de rénine intra-kystique par l'épithélium tubulaire rénale pourrait être mise en jeu.

Les résultats des études explorant le SRAA dans la PKRAD sont contradictoires. Plusieurs études n'ont pas montré d'augmentation de l'aldostérone plasmatique ni de l'activité de la rénine plasmatique, à la fois en comparant des patients PKRAD hypertendus avec des patients PKRAD normotendus (17,18) et en comparant des patients PKRAD avec leur fratrie non atteinte de PKRAD (19,20). Cependant, d'autres études ont montré une augmentation de l'activité de la rénine plasmatique ainsi que la concentration d'aldostérone plasmatique en comparant des patients PKRAD hypertendus avec des patients PKRAD normotendus (21) et avec leur fratrie non atteinte de PKRAD (22). Néanmoins, ces études étaient limitées par la taille de l'effectif et l'absence d'appariement à la fonction rénale ou au volume rénal total. De plus, elles se sont intéressées uniquement aux dosages plasmatiques, reflet incomplet de l'activation du SRAA. En effet une sécrétion modérée de rénine par les kystes, l'activation du SRAA tissulaire et l'élimination urinaire des composants et métabolites du SRAA sont très imparfaitement reflétées par les dosages plasmatiques rapportés. Des études plus récentes de plus grand effectif avec appariement aux paramètres rénaux ont été réalisées. Ainsi Kocyigit et al (23) ont montré une augmentation de l'angiotensinogène urinaire chez les patients PKRAD

hypertendus par rapport à un groupe de patients PKRAD normotendus et à un groupe de sujets sains. Park et al (24) ont montré sur 223 patients PKRAD que le taux d'angiotensinogène urinaire était plus élevé chez les hypertendus par rapport aux patients normotendus. Celui-ci était corrélé positivement au volume rénal total. Le taux plasmatique de la rénine n'était pas modifié entre les deux groupes. Enfin dans une étude de 2017 (25), en comparant 69 patients PKRAD à 58 patients IRC non PKRAD appariés sur la fonction rénale et la pression artérielle, les taux urinaires de l'angiotensinogène et de rénine étaient plus élevés chez les patients présentant une PKRAD. De plus, ces deux paramètres étaient corrélés à l'albuminurie, suggérant un lien entre l'atteinte rénale et le SRAA. Il n y'avait pas de modification des taux plasmatiques de rénine ni d'angiotensinogène. Ainsi malgré la difficulté de mettre en évidence l'activation plasmatique du SRAA, ces données suggèrent fortement le rôle spécifique de ce système dans l'HTA des patients atteints de PKRAD.

1.2.2. Complexe des Polycystines vasculaires

Les polycystines-1 et -2 sont exprimées au niveau vasculaire par les cellules endothéliales et musculaires lisses. Par leur localisation transmembranaire elles jouent un rôle dans les interactions inter-cellulaires. Leur expression principale sur les cellules endothéliales est sur les cils primaires, où le complexe des polycystines est considéré comme un mécano-transducteur. Il permet de percevoir et d'intégrer les contraintes mécaniques de cisaillement exercées par le flux sanguin sur l'endothélium, modulant des cascades de signalisation cellulaire qui aboutissant notamment à la variation du diamètre vasculaire en réponse au flux (26). Leur présence au niveau des cellules musculaires lisses participe à la régulation du tonus myogénique (27). Du fait de ces différentes fonctions au niveau vasculaire, l'HTA dans la PKRAD pourrait donc également liée à l'altération de fonction du complexe des polycystines endothéliales et musculaire lisses, indépendamment de l'atteinte rénale. Des modèles murins d'invalidation

tissu-spécifiques de *Pkd1* et *Pkd2* représentent les meilleurs outils pour explorer ces hypothèses. A ce jour, une seule étude sur un modèle d'invalidation du gène *Pkd1* dans les cellules musculaires lisses (27) s'est intéressé à la pression artérielle. Les auteurs n'ont pas objectivé d'HTA chez les souris spécifiquement invalidées pour le gène *Pkd1*, cependant, les artères mésentériques avaient une réponse contractile à la phényléphrine (agoniste des récepteurs α1-adrénergiques) plus importante que les souris sauvages. Ceci peut suggérer un tonus musculaire des artères plus important chez les souris invalidés pour le gène *Pkd1*.

1.2.3. Endothéline-1

L'endothéline-1 (ET-1) est un peptide impliqué dans le maintien du tonus vasculaire, la balance hydrosodée et l'angiogenèse (28). L'ET-1 et ses récepteurs sont particulièrement exprimés dans le rein, à la fois au niveau vasculaire et tubulaire. L'exploration de ce système chez les patients PKRAD a été réalisée pour la première fois au début des années 2000. Merta et al (29) ont montré une élévation de la concentration d'ET-1 plasmatique chez les patients atteints de PKRAD par rapport à un groupe de sujets sains. Cette étude ne retrouvait pas de différence entre les patients hypertendus et normotendus. L'élévation de l'ET-1, déterminée par immunomarquage dans les kystes rénaux, les cellules musculaires lisses des artérioles rénales et les cellules mésangiales ainsi que l'augmentation de l'expression des récepteurs ETA ont été observées sur des pièces de néphrectomie issues des patients avec PKRAD (30). Dans une étude récente de 138 patients avec PKRAD (31), les auteurs ont montré une élévation des taux plasmatiques d'ET-1. Comme c'est le cas dans la plupart des néphropathies, les concentrations d'ET-1 augmentent avec l'évolution de la MRC et sont associées en analyse multivariée à la présence d'HTA. Ces études suggèrent le rôle de l'ET-1 dans l'HTA chez les patients PKRAD, par son effet vasoconstricteur local et systémique.

1.2.4. Système sympathique

L'activation du système sympathique dans la PKRAD a été étudiée pour la première fois en 1988 par Bell et al (21). Les dosages de noradrénaline plasmatique couché-debout réalisés dans cette étude n'ont pas montré de différence entre les patients avec PKRAD normotendus vs. hypertendus. Cependant, par la suite, des études ont montré une activation du système sympathique chez les patients avec PKRAD sans IRC par rapport à des patients présentant une HTA essentielle, et ce par les dosages plasmatiques d'adrénaline et de noradrénaline (33), ainsi que l'enregistrement de l'activité sympathique du nerf péronier. Celle-ci était encore plus élevée chez les patients PKRAD hypertendus comparativement aux patients PKRAD normotendus (35). Enfin, Rovella et al (36) se sont intéressés à l'anatomie de l'innervation sympathique rénale chez les patients avec PKRAD. Les auteurs ont étudié histologiquement l'adventice des artères rénales de 29 patients avec PKRAD ayant subi une néphrectomie. Les résultats des analyses ont été comparées à celles de 20 patients contrôles ayant subi une néphrectomie pour d'autre raisons. La densité totale des terminaisons nerveuses dans l'artère rénale était plus importante dans la PKRAD que le groupe contrôle. Lorsque les auteurs ont comparé les sujets hypertendus dans les deux groupes, la densité totale des terminaisons nerveuses dans l'artère rénale était plus importante dans le groupe de patients avec PKRAD hypertendus vs. patients contrôles hypertendus. Ainsi, ces observations suggèrent que l'activation du système sympathique pourrait jouer un rôle dans l'HTA de la PKRAD. Des approches thérapeutiques pharmacologiques ou invasives (dénervation rénale, barostimulation carotidienne) ciblant le système sympathique pourraient avoir un intérêt particulier dans la gestion dans des situations d'HTA résistante dans cette pathologie.

1.3. Traitement

Parallèlement à l'évolution des connaissances physiopathologiques de l'HTA dans la PKRAD, les premiers traitements antihypertenseurs étudiés ciblaient le SRAA. Ecder et al ont étudié l'impact d'un inhibiteur de l'enzyme de conversion (IEC) (énalapril), sur la pression artérielle et l'hypertrophie du ventricule gauche (HVG) (37). Sur les 14 patients inclus dans l'étude avec un suivi de 7 ans, une baisse significative de la pression artérielle moyenne a été observée à 1 et à 7 ans (37). Elle était associée à une baisse de l'indice de masse du ventricule gauche (IMVG) mesuré par échocardiographie. Par la suite, Schrier et al (38) ont comparé l'évolution de l'IMVG chez des patients atteints de PKRAD hypertendus randomisés dans un groupe standard (cible de pression artérielle : de 135 à 140/85 à 90 mmHg) ou un groupe avec contrôle strict (cible de pression artérielle inférieure à 120/80 mmHg). Les traitements anti-HTA utilisés étaient soit un IEC (énalapril), soit un inhibiteur calcique (amlodipine). Sur un suivi de 7 ans, le contrôle strict de l'HTA permettait une réduction plus importante de l'IMVG. La réduction du DFG dans l'étude était identique dans les deux groupes. En comparant l'énalapril vs. amlodipine, la baisse de l'IMVG était plus importante dans le groupe énalapril. En 2005, Nutahara et al (39) ont comparé l'amlodipine au candesartan et leur impact à 3 ans sur la fonction rénale chez 49 patients avec PKRAD (cible tensionnelle inférieure à 130/85 mmHg). Les deux traitements ont permis d'atteindre la cible tensionnelle. Cependant, le traitement par amlodipine a été associé à une dégradation plus importante de la fonction rénale (–20.9 ± 13.1 vs. –4.8 ± 13.8 ml/min, $p < 0.01$) ainsi qu'une excrétion urinaire d'albumine plus importante (287 ± 238 vs. 49 ± 37 mg/24h, $p=0.001$). En 2008, Zeltner et al (40) a comparé un traitement par IEC (ramipril) vs. un bétabloquant (métoprolol) sur un suivi de 3 ans. Les auteurs n'ont pas observé de différence sur le déclin de la fonction rénale, sur la baisse de la pression artérielle, sur l'excrétion urinaire d'albumine ni sur l'évolution de l'IMVG. L'analyse post-hoc a mis en

évidence un IMVG moins important chez les patients dont la pression artérielle était plus basse, et ce dans les deux groupes. Enfin, les deux études les plus importantes ces dernières années dans le traitement de l'HTA chez les patients PKRAD sont l'étude HALT-PKD A et HALT-PKD B. L'étude HALT-PKD A (41) s'est intéressée aux patients avec un DFG supérieur à 60 ml/min/1.73m². 558 patients ont été randomisés dans un groupe avec un contrôle tensionnel normal (cible 120/70 à 130/80 mm Hg) ou un groupe avec un contrôle tensionnel strict (cible 95/60 à 110/75 mm Hg). Dans chaque groupe, deux sous-groupes ont été randomisés en monothérapie par IEC (lisinopril+placebo) ou bithérapie par IEC et ARAII (lisinopril+telmisartan). Concernant le contrôle tensionnel normal vs strict, les auteurs ont observé une baisse significative de l'excrétion urinaire d'albumine, une diminution de l'IMVG et une croissance moins importante du volume total des reins dans le groupe contrôle strict. Cependant, il n'y a pas eu de différence concernant l'évolution du DFG. Concernant la mono vs. bithérapie, les auteurs n'ont pas observé de différence sur les paramètres sus cités. Les auteurs concluent à l'intérêt d'un contrôle tensionnel strict chez les patients avec PKRAD et un DFG normal, sans recours au double blocage du SRAA. Concernant l'étude HALT-PKD B (42), les auteurs se sont intéressés aux patients avec un DFG altéré (de 25 à 60 ml/min/1.73m²). Les patients ont été randomisés en deux groupes : monothérapie par IEC (lisinopril+placebo) ou bithérapie par IEC et ARAII (lisinopril+telmisartan). L'objectif tensionnel était de 110/70 à 130/80 mm Hg. Les auteurs n'ont pas observé de différence concernant la décroissance du DFG ni l'excrétion urinaire d'albumine et les deux groupes ont présenté les mêmes effets secondaires. En conclusion, un contrôle tensionnel strict des patients avec PKRAD semble être l'objectif à atteindre. Celui-ci permet la baisse de l'IMVG, la réduction de l'excrétion urinaire d'albumine et la limitation de la progression du volume rénal total. L'utilisation des bloqueurs du SRAA semble être la thérapeutique de première intention, mais le double blocage n'apporte pas de bénéfice supplémentaire. Enfin, l'adjonction de nouvelles thérapeutiques dans le

traitement de l'HTA pourrait voir le jour, en ciblant les autres mécanismes impliqués : la dénervation rénale, les antagonistes des récepteurs à l'endothéline-1, ou à plus long terme des thérapeutiques ciblant plus spécifiquement les conséquences vasculaires de l'altération du complexe des polycystines.

2. Hypertrophie du ventricule gauche

Dans la population générale l'HVG est associée à la morbi-mortalité cardio-vasculaire. Elle est associée à une augmentation des arythmies cardiaques, à la mort subite, à la dysfonction cardiaque systolique et diastolique et favorise le développement de l'insuffisance cardiaque (43). Plusieurs études ont montré une augmentation de la masse du ventricule gauche chez les patients avec PKRAD. Dans une étude de 116 patients avec PKRAD (44), 41% des patients avaient une HVG échographique. Lorsque les auteurs se sont intéressés à la différence entre PKRAD avec et sans HVG, ceux présentant une HVG avaient un diagnostic d'HTA plus ancien. La sévérité de l'HTA était associée à l'HVG. Plusieurs études ont montré la réduction significative de l'IMVG chez les patients avec PKRAD hypertendus après un traitement antihypertenseur (37,38,40). Dans l'étude issue de la cohorte HALT-PKD (45) incluant 543 patients PKRAD âgés de moins de 50 ans avec un DFG normal et une HTA d'une durée de moins de 6 ans sous traitement antihypertenseur, la taille du VG a été évaluée par IRM (méthode de référence). La prévalence de l'HVG était de 3,9%. Cette faible prévalence dans cette étude récente de 2011 suggère une amélioration de la prise en charge de ces patients et ce par l'initiation précoce des traitements anti-hypertenseurs.

3. Fibrillation auriculaire

La PKRAD est associée à une activation du système sympathique et du SRAA ainsi qu'à un remodelage cardiaque, qui sont des déterminants importants de la survenue de troubles du

rythme cardiaque. A ce jour, une seule étude s'est intéressée à analyser la prévalence de troubles du rythme chez les patients PKRAD. Cette étude rétrospective de registre taiwanais (46) a observé une augmentation du risque de fibrillation auriculaire (FA) chez 7203 patients avec PKRAD en comparaison à 28 739 patients contrôles appariés notamment à l'âge, l'HTA, et la fonction rénale (1.31; IC95%=1.14–1.51). L'augmentation de ce risque était plus importante chez les hommes ainsi que chez les patients âgés de plus de 50 ans. Une étude d'un modèle murin invalidé pour le gène *Pkd1* au niveau des cardiomyocytes (47) a montré une réduction des potentiels d'action des cardiomyocytes et une dysrégulation de canaux potassiques impliqués dans la repolarisation du cardiomyocyte. Ceci s'est traduit dans l'étude par une dysfonction cardiaque systolique et diastolique. La survenue d'éventuels troubles du rythme cardiaque n'a pas été rapportée. D'autres études semblent nécessaires afin de confirmer l'association entre FA et PKRAD.

4. Dysfonction endothéliale

L'endothélium joue un rôle important dans la fonction vasculaire. Il permet la régulation du diamètre vasculaire par le biais de sécrétion de facteurs vasoactifs en réponse à des stimuli de nature chimique ou physique. Les contraintes mécaniques sur l'endothélium générées par les forces de cisaillement suite aux modifications du flux sanguin représentent le stimulus physique majeur. L'endothélium est impliqué aussi dans les processus d'hémostase et d'homéostasie de l'inflammation. La dysfonction endothéliale correspond à la perturbation de tout ou une partie des fonctions normales de l'endothélium, se caractérisant par un état pro-vasoconstricteur, pro-inflammatoire et/ou pro-thrombotique. Dans la PKRAD, la dysfonction endothéliale est caractérisée principalement par une altération de la vaso-réactivité. La première observation remonte à 1999. Wang et al (48) ont observé chez les rats SPRD, qui développent spontanément une maladie kystique rénale, une altération de la relaxation endothélium-dépendante des artères

mésentériques en réponse à un stimulus chimique : l'acétylcholine. La même équipe (49) a réalisé des expériences similaires sur des artérioles isolées de la graisse sous-cutanée, rapportant la première évidence d'une dysfonction endothéliale en réponse à un stimulus chimique chez les patients atteints de PKRAD. Par la suite, en 2003, Wang et al (50) ont montré que cette dysfonction était induite par une baisse de l'activité de la NO-synthase constitutive, suggérant ainsi la baisse de la biodisponibilité du monoxyde d'azote (NO). En 2014, Kocaman et al (51) ont montré une altération de la réponse dilatatrice débit-dépendante de l'artères brachiale chez les sujets avec PKRAD, montrant ainsi pour la première fois une mauvaise adaptation endothéliale en réponse à l'élévation des forces de cisaillement. Plusieurs équipes ont par la suite confirmé cette altération de la dilatation débit-dépendante (DDD) de l'artère brachiale chez les patients avec PKRAD et ce avant l'apparition d'HTA et avant le déclin du DFG (52–54). Deux études n'ont pas pu montrer la présence de cette altération de la DDD (55,56) mais une augmentation des concentrations circulantes de marqueurs de dysfonction endothéliale a été observée notamment une élévation des concentrations plasmatiques de vascular cell adhesion molecule 1 (VCAM-1) associée à une diminution de la biodisponibilité de métabolites du NO. La dysfonction endothéliale dans la PKRAD apparait précocement dans la vie des sujets atteints de PKRAD. En effet, Nowak et al (57) ont montré une altération de la DDD dans une population pédiatrique et de jeunes adultes âgés de 6 à 22 ans. Par la suite, la dysfonction endothéliale a été observée dans d'autres territoires vasculaires. Ainsi, l'analyse de la réserve coronaire (capacité des artères coronaires à se dilater après une augmentation des besoins en oxygène ou un stimulus pharmacologique) mesurée par écho doppler transthoracique, a montré une diminution de celle-ci chez les patients PKRAD (58–60).

Les mécanismes expliquant la dysfonction endothéliale dans la PKRAD sont à ce jour non élucidés. L'angiotensine II ainsi que l'aldostérone sont connues pour leurs actions sur le

remodelage cardiaque et vasculaire, la prolifération des cellules musculaires lisses, la vasoconstriction et l'augmentation du stress oxydant. Ce dernier pourrait diminuer la biodisponibilité du NO en augmentant la biodisponibilité de l'inhibiteur endogène de la NO-synthase, l'asymetric dimethylarginine (ADMA), diminuant ainsi la réponse vasodilatatrice. Cependant, les études des thérapeutiques visant à bloquer le SRAA afin d'améliorer la fonction endothéliale sont contradictoires à ce jour. Ainsi, Alisir et al (59) a montré une amélioration de la réserve coronaire après 6 mois et 1 an d'utilisation du telmisartan chez des patients avec PKRAD, alors que Nowak et al (61) n'ont pas montré d'amélioration de la DDD de l'artère brachiale après 24 semaines de traitement par spironolactone chez 60 patients avec PKRAD. Outre l'activation du SRAA, les polycystines 1 et 2 au niveau endothélial semblent avoir un rôle direct important qui pourrait notamment expliquer l'altération de la DDD. Localisé sur le cil primaire, le complexe polycystine-1 et 2 joue un rôle de mécano-transduction. La stimulation des cellules endothéliales par le flux permet l'augmentation du calcium intracellulaire et l'induction de cascade de signalisations permettant la libération du NO. Nauli SM et al (26) ont montré, sur des cultures de cellules endothéliale isolées de souris invalidées pour le gène *Pkd1* et stimulées par de faibles augmentations des forces de cisaillement, une diminution de la libération du calcium intracellulaire et une baisse de la production du NO comparativement aux cellules endothéliales isolées de souris sauvages. Lors de l'exposition à des forces de cisaillement plus importantes, les cellules endothéliales isolées de souris sauvages ont une diminution de la libération du calcium intracellulaire et de la production du NO, se rapprochant des cellules invalidées pour *Pkd1*. Les auteurs ont pu démontrer que ces forts niveaux de stimulation entraînaient la troncature de la polycystine-1 qui ne pouvait alors plus assurer son rôle dans la mécano-transduction du signal. Des observations similaires ont été rapportées sur les cellules endothéliales isolées de souris invalidées pour le gène *Ift88* codant pour une protéine de transport intra-flagellaire nécessaire au maintien du cil primaire (62). A ce jour, il n'y a pas

eu d'étude s'intéressant à la fonction endothéliale concernant un modèle murin invalidé pour *Pkd1* spécifiquement au niveau endothélial.

5. Epaississement intima-média

L'augmentation de l'épaisseur intima-média (EIM) des artères carotides communes notamment est reconnue comme un facteur prédictif indépendant d'événements cardio-vasculaires (63,64). Mesurée par échographie, elle constitue un outil de recherche clinique simple et validé. A ce jour, il est établi que l'augmentation de l'EIM précède l'apparition de plaques d'athérome (65). Elle a été mesurée chez les patients atteints de la PKRAD dans de multiples études avec des résultats contradictoires. Une étude de 2008 (58) comparant 30 patients PKRAD sans HTA ni IRC et 30 sujets sains a montré un épaississement de l'EIM carotidienne chez les patients atteints de PKRAD. Une étude de 2009 (66) portant sur le remodelage vasculaire de la carotide au stade précoce de la PKRAD en présence d'un DFG normal, a montré que les patients avec PKRAD normotendus ont une EIM plus élevée que les sujets sains, et que les patients avec PKRAD hypertendus ont une EIM plus élevée que les PKRAD normotendus et les patients hypertendus non PKRAD. Cette étude a montré que l'augmentation de l'EIM dans les stades évolués de la maladie est due à l'HTA mais que dans la phase précoce de la maladie, cet épaississement est indépendant de l'HTA. Cependant les dernières études réalisées en 2017 n'ont pas montré de différence en terme d'EIM en comparant 15 enfants PKRAD et 15 enfants sains (67) et chez 26 patients avec PKRAD et 24 patients contrôles avec un DFG normal alors qu'il y'avait la présence d'une dysfonction vasculaire avec altération de la DDD chez les patients avec PKRAD. Enfin deux études (56,69) ont montré une augmentation de l'EIM uniquement chez les patients présentant un rapport albumine/créatinine urinaire positif. La présence d'HTA n'induisait pas de modification de l'EIM.

Un des mécanismes impliqués dans l'épaississement de l'EIM est l'augmentation des contraintes pariétales liées à l'HTA. En effet, leur augmentation associée généralement à un état inflammatoire chronique dans ce contexte induis un remodelage de la paroi vasculaire avec une prolifération des cellules msuculaires lisses conduisant à l'augmentation de l'EIM. Cependant les études récentes concernant les patients avec PKRAD ont montré que d'autres facteurs pouvaient influencer l'EIM dans la PKRAD indépendamment de l'HTA. La présence d'une microalbuminurie (58,69) apparait comme l'un des facteurs associés à une augmentation de l'EIM.

6. Rigidité vasculaire

La rigidité vasculaire est un facteur prédictif indépendant de mortalité cardio-vasculaire, d'accident vasculaire cérébral et de mortalité toute cause confondue, notamment dans la population de patients présentant une HTA ou une IRC (70–75). Plusieurs facteurs sont impliqués dans l'augmentation de la rigidité vasculaire tel que le vieillissement, le tabagisme, l'obésité, l'inflammation, l'HTA et l'IRC. Les traitements antihypertenseurs tel que la spironolactone préviennent cette rigidité (76). A ce jour, la mesure de la vitesse d'onde de pouls (VOP) carotido-fémorale est l'outil non-invasif le plus simple pour apprécier la rigidité vasculaire (72). Dans la PKRAD, plusieurs études ont montré une accélération de la VOP, témoignant d'une augmentation de la rigidité vasculaire (77–79). Elle apparait très tôt dans l'histoire de la maladie. Deux études ont montré une accélération de la VOP dans des populations pédiatriques (57,69) avec un DFG normal. De plus, Kocyigit et al (77) ont montré une accélération de la VOP isolée chez les patients PKRAD dont la pression artérielle était normale, en l'absence de remodelage cardiaque échographique. Ces résultats témoignent de la précocité de cette atteinte vis-à-vis des autres atteintes cardio-vasculaires. Enfin, il a été montré que la rigidité vasculaire est un marqueur prédictif de l'évolution de la maladie rénale chronique

chez les patients présentant une PKRAD (80). Plusieurs études se sont intéressées aux mécanismes impliqués dans cette augmentation de la rigidité vasculaire. Une élévation des marqueurs d'inflammation (CRP, pentraxin-3, TNFα et IL-6) (77,78,81) et une augmentation du stress oxydatif (79) sont associées au niveau de rigidité vasculaire chez les patients avec PKRAD. Enfin, une étude interventionnelle de 2019 (61) s'est intéressée à l'impact d'un traitement par spironolactone, antagoniste du récepteur minéralocorticoïde, sur la rigidité vasculaire chez 60 patients PKRAD. Après 24 semaines de traitement, il n'y pas eu de baisse de la VOP malgré une baisse significative de la pression artérielle. Cette étude suggère la nécessité d'un contrôle tensionnel plus prolongé et/ou l'implication de voies physiopathologiques particulières dans l'augmentation de la rigidité vasculaire associée à la PKRAD.

7. Anévrysmes cérébraux

La fréquence des anévrysmes artériels dans la PKRAD est plus importante par rapport à la population générale. Les anévrysmes des artères à destinée cérébrale sont de loin les plus fréquents, mais une prévalence accrue d'anévrysmes dans d'autres territoires vasculaires a également été rapportée (82). Nous détaillons dans ce chapitre les anévrysmes cérébraux.

7.1. Epidémiologie et description des anévrysmes cérébraux :

La prévalence des anévrysmes cérébraux dans la PKRAD varie entre 5 et 12% alors qu'elle ne dépasse pas 3% dans la population générale (83,84). Dans une étude chinoise prospective de 2011, un dépistage par angio-IRM incluant 355 patients PKRAD (85) a mis en évidence une prévalence des anévrysmes cérébraux de 12,4% touchant autant les hommes que les femmes. Cette prévalence augmentait avec l'âge (23,3% pour la population PKRAD âgée de 60-69 ans). Dans cette étude, les anévrysmes cérébraux étaient tous sacciformes à l'exception d'un

anévrysme fusiforme et avaient un diamètre moyen de 3,8 ± 3,25 mm. Les anévrysmes cérébraux étaient localisés exclusivement dans la circulation antérieure : 49% dans la carotide interne, 26% dans l'artère cérébrale moyenne, 23% dans l'artère communicante antérieure et 2% dans l'artère cérébrale antérieure. Enfin, une association significative entre la durée de l'HTA et les anévrysmes a été mise en évidence dans cette étude. Il n'y avait pas d'association avec, l'âge, la fonction rénale et les kystes hépatiques. Sanchis IM et al (86) ont repris les patients atteints de PKRAD issus la cohorte américaine de la Mayo clinique au Rochester de 1989 à 2017. Les patients ayants bénéficiés d'une IRM cérébrale pour : antécédents familiaux d'hémorragies méningés ou d'anévrysme cérébraux, bilan préopératoire et métiers à risque ont été retenus. Les patients avec des antécédents d'anévrysme ou d'hémorragie méningée ont été exclus. Sur 812 patients retenus, 75 patients (9%) avaient un anévrysme cérébral supérieur à 2 mm. Sur les 75 patients, 37% avaient un antécédent familial d'anévrysme cérébral. Quatorze patients avaient plusieurs anévrysmes. Quatre-vingt-trois anévrysmes étaient situés dans la circulation antérieure et 11 dans la circulation postérieure. Les diamètres fluctuaient entre 2 et 12 mm. Sur 61 patients ayant déjà au moins un anévrysme, 5 patients ont présenté des anévrysmes *de novo* lors de ce suivi de 7 ans. Sur135 patients n'ayant pas d'anévrysme au début du suivi, 3 ont présenté des anévrysmes *de novo*.

Les études plus récentes rapportent une prévalence moindre par rapport aux séries plus anciennes, traduisant possiblement une meilleure prise en charge des patients, notamment de l'HTA. La prévalence des anévrismes augmente lorsqu'il y a un antécédent familial d'anévrysme cérébral ou d'hémorragie intracrânienne (21 à 22%) (85,87). Classiquement, on considérait que cette complication touchait autant les patients porteurs de mutations de *PKD1* que de *PKD2*, avec une prévalence plus importante chez les patients avec mutation *PKD1* en 5' (88). Récemment, l'équipe brestoise a rapporté une prévalence plus élevée chez les patients

présentant des mutations de *PKD1* (6,4%) par rapport aux patients *PKD2* (3,2%), sans que l'on ne puisse conclure sur le rôle direct de la mutation dans le remodelage artériel ou sur son implication indirecte, par la sévérité de l'HTA et de l'IRC associées. Contrairement à l'étude chinoise, la localisation de la mutation *PKD1* n'avait pas d'impact sur la présence d'anévrysme cérébral dans cette étude (84). Le risque majeur de l'anévrysme est la rupture. L'âge moyen de rupture est estimé à 41 ans vs. 51 ans dans la population générale (84,89).

7.2. Dépistage

L'examen de référence pour le dépistage des anévrysmes cérébraux est l'angio-IRM, sans injection de gadolinium, et ce avec la séquence 3D-Time-of-flight (3D-TOF). Il permet de détecter les anévrysmes à partir d'une taille de 2 mm. Le dépistage ne se fait pas avant l'âge de 18 ans.

Il est actuellement indiqué par les KDIGO (2014) lorsqu'il y'a un antécédent familial d'anévrysme cérébral ou d'hémorragie cérébrale, lorsque le patient exerce une profession à risque, ou bien chez les patients avec une anxiété persistante malgré une information éclairée. Lorsqu'il est négatif, il n'y pas de consensus sur la surveillance. Les KDIGO (90) proposent une surveillance tous les 5 à 10 ans. Si un anévrysme est diagnostiqué, la conduite à tenir est codifiée, soit une surveillance radiologique, soit un traitement endovasculaire, soit un traitement chirurgical. Lorsque le suivi radiologique est indiqué, la fréquence de surveillance varie de 6 à 24 mois, avec un contrôle strict des facteurs de risque cardio-vasculaires. Cependant les études apparues après ces recommandations remettent cette démarche en question. Une étude française de 2018 (83) portant sur 508 patients atteint de PKRAD suivis de 2008 à 2015 a montré que le taux de rupture d'anévrysme était équivalent dans le groupe avec histoire familiale et celui sans histoire familiale : 2,0(0,5-10,9)/1000 patients-années vs. 2,0(0,8-

5,1)/1000 patients-années. De plus, les auteurs ont réalisé une étude pharmaco-économique à partir de leur cohorte montrant la supériorité d'un dépistage systématique des anévrysmes chez les patients avec PKRAD. Dans une étude américaine (90) parue en 2019, les auteurs ont également conclu à la nécessité d'un dépistage systématique sans tenir compte des facteurs de risque. En effet, en se basant sur un modèle statistique complexe comprenant une prévalence de 11,5% d'anévrysme chez les patients atteints de PKRAD, avec 23% de ces patients présentant des anévrysmes multiples ; le risque de rupture à 0.4%, probabilité d'anévrysme de novo est de 1,4% par an. La croissance annuelle est de 0.4% avec un risque de rupture 31 fois supérieurs concernant les anévrysmes croissants. L'étude conclue à un rapport cout/efficience en faveur d'un dépistage systématique. Si absence d'anévrysme, répéter l'IRM tous les cinq ans avec un cout de 19 839 $ américain et une efficience de 25.86 qualités de vie-ans. En présence d'un anévrysme ne nécessitant pas de traitement, une surveillance annuelle est recommandée. Ces résultats sont applicables si le patient a une espérance de vie supérieure à 6 ans.

Enfin, Flahault A et al (91) ont suggéré que le dépistage des anévrysme a un bénéfice maximal à l'âge de 20 ans. Ce bénéfice diminue avec l'âge du patient et devient nul après l'âge de 60 ans.

L'impact potentiellement anxiogène du dépistage d'une lésion significative conduisant à une indication de surveillance seule ne devrait pas être négligé et justifie, à notre sens, une information détaillée et une réflexion préalable de la balance avantages/inconvénients du dépistage pour chaque patient.

7.3. Physiopathologie

La présence des polycystines-1 et -2 dans les cellules endothéliales et les cellules musculaires lisses rendent leur implication directe dans la physiopathologie de l'anévrysme très probable.

L'HTA joue probablement un rôle important dans la croissance et la rupture de celui-ci. Cette hypothèse est renforcée par la baisse de la prévalence des anévrismes sur les dernières études épidémiologiques rapportées. Récemment, une étude japonaise (92) portant sur 354 patients avec PKRAD a montré une élévation de la concentration plasmatique de matrix metalloproteinase-1 (MMP-1) chez les patients avec un anévrysme cérébral, une métalloprotéinase matricielle impliquée dans la dégradation de la matrice extra-cellulaire. Une concentration de MMP-1 élevée (MMP-1 ≥ 15ng/ml) était le deuxième paramètre associé significativement au risque de développer un anévrysme après la présence d'un antécédent familial. Ces résultats suggèrent le rôle des métalloprotéinases dans la destruction de la matrice extracellulaire, la fragilisation de la paroi vasculaire et la constitution d'anévrysme. Leurs activations pourraient dépendre de la perte de fonction des polycystines au niveau vasculaire dans la PKRAD.

8. Dissections artérielles

Les dissections artérielles spontanées sont associées à la PKRAD. Elles touchent principalement l'aorte et les coronaires. Le facteur de risque principal des dissection aortiques (DA) est l'HTA (93). Silverio et al (94) a comparé sur une méta-analyse de 25 cas de DA chez les patients atteints de PKRAD à une population générale avec DA. Les patients avec PKRAD étaient plus jeunes (49 ± 12 vs. 62 ± 14 ans, $P < 0.001$). La mortalité était strictement identique entre ces deux population (27%). Dans la méta-analyse, 90% des patients avec PKRAD présentaient une HTA et 35% des patients étaient au stade V de la MRC. Si l'on s'intéresse au coronaires, dans une étude de registre américain de 2004 à 2015 (95) sur les dissections spontanées des coronaires, 0,09% des patients étaient atteints de la PKRAD. Une méta-analyse (82) regroupant les patients PKRAD avec dissection coronarienne a montré une médiane d'âge de 41 ans. D'autres territoires vasculaires peuvent être touchés. Kuroki et al (96) ont rapporté

deux cas de dissection des artères vertébrales chez les patients PKRAD. Bouleti C et al se sont intéressé aux anomalies morphologiques de l'aorte ascendante chez les patients atteints de la PKRAD (97). Les auteurs ont analysé les résultats d'échographies cardiaques de 61 patients présentant une PKRAD comparés à ceux de 61 patients contrôles, suivis en néphrologie et appariés sur l'âge, le sexe, la pression artérielle et la présence d'un traitement bêtabloquant. Les diamètres mesurés au niveau des sinus de Valsalva (situés à la jonction entre le cœur et l'aorte) étaient significativement plus importants chez les patients atteints de PKRAD par rapport aux sujets contrôles (36,4 ± 4,1 mm vs 34,0 ± 3,7 mm). 25% des patients PKRAD présentaient des anévrismes des sinus de Valsalva contre 7% des patients du groupe contrôle (p = 0,01). La mesure du diamètre au niveau de l'aorte ascendante a montré une augmentation chez les patients PKRAD par rapport aux patients contrôles (33,9 ± 4,7 mm vs 32,4 ± 3,9 mm ; p = 0,05). Il n'existait pas de différence statistiquement significative entre le pourcentage d'anévrisme de l'aorte ascendante chez les patients PKRAD par rapport aux patients contrôles (26% vs 12% ; p = 0,45). Sur l'ensemble de la population de l'étude, le principal facteur associé, après ajustement, à la présence d'un anévrisme de l'aorte ascendante ou des sinus de Valsalva était la présence d'une PKRAD (OR = 5,04 ; p = 0,001). Bien qu'il s'agisse ici d'un travail monocentrique sur un effectif de patients relativement réduit, cette étude représente à ce jour la principale publication démontrant l'impact direct de la PKRAD sur la genèse d'anévrismes de l'aorte ascendante. Parmi la population de l'étude, un patient avait un antécédent de dissection aortique, qui est le principal risque encouru dans le contexte. Cependant, les résultats de ce travail ne permettent pas d'affirmer l'intérêt d'un dépistage systématique des lésions aortiques dans la population générale de patients PKRAD, dépistage qui n'est pas recommandé par les KDIGO PKRAD de 2015.

9. Valvulopathies

La PKRAD est associée aux valvulopathies. Dans une étude de 2012 (98), 14,4% des patients avec PKRAD étudiés présentaient une valvulopathie. Dans une étude de 130 patients avec PKRAD, une échocardiographie a été réalisée. Les calcifications mitrales ont été retrouvées dans 28% des cas et les calcifications aortiques dans 38% des cas (99). Dans une autre étude, la prévalence du prolapsus mitral dans une population de 109 patients avec uniquement les mutations de *PKD1* était de 26% et l'insuffisance mitrale était de 13% (100). Les mécanismes physiopathologiques expliquant cette association sont à ce jour indéterminés. Les polycystines ont un rôle important dans la fonction du cil primaire des cellules endothéliales. Ainsi, leurs mutations peuvent induire un phénotype mimant une ciliopathie. Katelynn A et al 2019 ont démontré qu'un modèle murin de ciliopathie par mutation du gène Ift88, codant pour la protéine de transport intra-flagellaire 88, induit un prolapsus mitral. Les auteurs ont par la suite comparé le génome de 1412 patients présentant un prolapsus de la valve mitral avec 2439 patients contrôles. En se focalisant sur les gènes du cil primaire, une association de certaines mutations avec le prolapsus de la valve mitral a été retrouvé (101).

10. Fistule artérioveineuse

La fistule artérioveineuse (FAV) est l'abord vasculaire recommandée chez le patient atteint d'IRCT en hémodialyse. Il consiste en une anastomose termino-latérale entre une veine et une artère. Il est caractérisé par un moindre coût et de moindre complications notamment infectieuse et thrombotique comparé au reste des abords tel que le cathéter central ou la prothèse (102). Peu d'études se sont intéressées aux complications de la FAV chez les patients atteints de PKRAD. Jankovic A et al ont montré que les patients PKRAD développaient plus d'anévrysmes au niveau de la FAV comparativement aux autres patients en IRCT (103). Hadimeri H et al ont

observé un diamètre de la veine artérialisé plus important compararativement aux patients en hémodialyse appariés à l'âge, le sexe la durée de la fistule, l'hémoglobine et la pression artérielle. Cette différence était indépendante des ponctions des FAV puisque le diamètre de la veine mesuré au niveau des points de ponction était comparable entre les deux groupe (104). Enfin, Weyde W et al ont montré des difficultés de création de FAV distale au niveau des poignets chez les patients PKRAD du fait d'un diamètre artériel faible. La prévalence de veine de petit calibre, non souhaitable à la création de la FAV, était plus important chez les patients PKRAD comparés aux patients en hémodialyse (14 vs. 2,17 % respectivement) (105). La physiopathologie de ces complications est à ce jour non élucidée. Le développement d'anévrysme pourrait rejoindre la physiopathologie des anévrysme cérébraux même si le territoire vasculaire est différent (Artère vs veine artérialisée). La dysfonction endothéliale chez les patients atteints de PKRAD pourrait avoir un rôle important. Des études observationnelles sont nécessaires afin d'étayer ces observations, ainsi que des études expérimentales, qui pourront explorer les mécanismes physiopathologiques mises en jeu.

11. Adaptation à l'effort

Durant l'effort physique, une adaptation du système cardio-vasculaire est nécessaire afin de délivrer plus d'oxygène aux tissus musculaires. La libération de NO en réponse à l'augmentation des contraintes mécaniques sur la paroi vasculaire (élévation du débit sanguin et de la pression artérielle) permet une vasodilatation et ainsi une baisse des résistances vasculaires périphériques. Chez le patient avec PKRAD, l'adaptation à l'effort a été peu étudiée. Trois études se sont intéressées à ce sujet. La première, en 2004, a comparé 18 patients polykystiques normo-tendus à des sujets sains et montré une pression artérielle (PA) diastolique plus élevée pendant et au décours de l'effort chez les sujets polykystiques, suggérant une moindre vasodilatation (106). La seconde, en 2012, a évalué la récupération de la fréquence

cardiaque (FC) au décours d'un effort chez 30 sujets polykystiques normo-tendus et montré un index de récupération altéré par rapport aux sujets sains (107). Enfin, en 2014, une nouvelle étude a confirmé cette mauvaise adaptation cardiovasculaire (hausse plus importante de la PA pendant et au décours d'une épreuve d'effort) à l'effort chez 26 patients polykystiques normo-tendus. Elle a également montré une moindre production de NO associée à une absence de baisse de concentration d'ADMA (108) par rapport à 30 sujets sains. L'ADMA est un inhibiteur endogène de synthèse de NO dont la production est inhibée lors d'un effort chez les sujets sains. Cet élément suggère que la dysfonction endothéliale est au moins partiellement responsable de de la mauvaise adaptation cardiovasculaire à l'effort chez les patients polykystiques. En particulier, l'absence de Polycystines au niveau endothélial diminue la production de NO et ce par la perte de la mécano-transduction.

Conclusion

Les atteintes cardio-vasculaires liées à la PKRAD sont multiples et apparaissent dans les phases précoces de la maladie. Ils conditionnent ainsi son pronostic. La baisse de la morbi-mortalité observée ces dernières années est probablement liée à l'amélioration de la prise en charge globale avec le dépistage et le traitement précoce de ces complications. En effet, une part de ces complications était reliée à l'atteinte rénale avec tout d'abord l'apparition des lésions kystiques conduisant à une activation du SRAA et une inflammation chronique puis le déclin de la fonction rénale. Cependant l'identification récente de l'expression et de la fonction des polycystines au niveau cardiaque et vasculaire et la persistance d'un risque cardio-vasculaire plus élevé que dans la population générale suggère un rôle direct de ces protéines dans la physiopathologie de ces atteintes. Ainsi, des thérapeutiques complémentaires permettant de restaurer les fonctions des polycystines ou de pallier à leur déficit constituent des pistes prometteuses dans la prise en charge du risque cardio-vasculaire des patients atteints de PKRAD.

Tableau 1 | Anomalies vasculaires structurelles liées à la PKRAD			
Anomalies	Fréquence	Dépistage	Référence(s)
Anévrysmes cérébraux	5-12,4%	IRM cérébral TOF 3D, systématique	(83–85)
Epaississement intima-média	% ND	Echographie carotide interne, non exploré systématiquement	(56,58,66,69)
FAV anévrysmes	60%	Surveillance	(103)
Dilatation veineuse	12 *vs.* 8 mm	Clinique et	(104)
Veines non utilisables	14%	Échographique de la FAV	(105)
Dissection aortique	49 *vs.*62 ans	Non systématique	(94)
Dissection des coronaires (DC)	Médiane d'âge 41 ans. Sur une cohorte de DC, 0.009% atteint de PKRAD		(82,95)
Dissection des artères vertébrales	2 cas rapportées		(96)
Anomalie de l'aorte ascendante	Diamètre 33.9 *vs.* 32.4 mm		(97)

Tableau 2 | Anomalies vasculaires fonctionnelles liées à la PKRAD			
Anomalies	Fréquence	Dépistage	Référence(s)
Dysfonction endothéliale	% ND	Dilatation débit	(51,53)
	Pédiatrie	Dépendante	(67)
Rigidité vasculaire	% ND	VOP carotido-fémorale	(77,79)
HTA	50-70% avec DFG normal	Automesure de PA,	(6–8)
	Pédiatrie : 20-40%	Systématique en pédiatrie	(12–14)

Tableau 3 | Anomalies cardiaques liées à la PKRAD			
Anomalies	Fréquence	Dépistage	Référence(s)
HVG	41% (1997)	Echographie	(44)
	3.9% (2011)	IRM (méthode de référence)	(45)
Valvulopathie	14.4%		(98)
Prolapsus mitral	26%	Echographie cardiaque transthoracique	(99)
Insuffisance mitrale	13%		(99)
Sinus valsava	Diamètre 36.4 *vs.* 34 mm	Echographie cardiaque	(97)
	25% anévrysme	Trans thoracique	
Adaptation à l'effort	% ND	Epreuve d'effort	(107,108)
Fibrillation auriculaire	RR : 1.31 *vs.* Pop gle	ECG	(46)

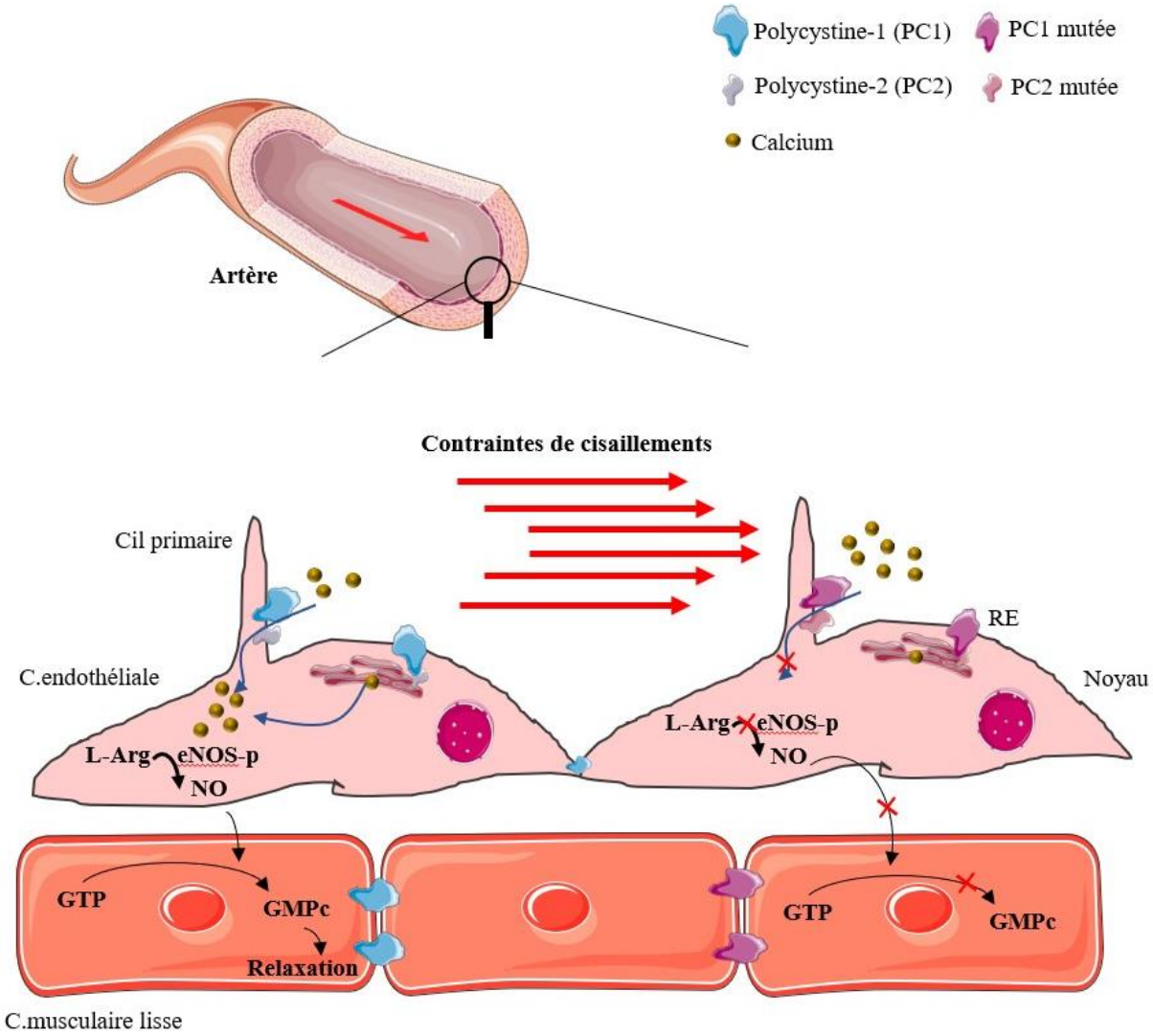


Figure 1 : Rôle des polycystines au niveau vasculaire. Au niveau endothélial : production du NO après l'augmentation du calcium intra –cellulaire et induction de vaso-relaxation des cellules musculaires lisses par production du GMPc. Au niveau des cellules musculaires lisses : rôle de senseur de pression ? L-Arg : L-arginine. eNOS-p : endothéliale monoxyde d'azote synthase phosphorylée. RE : Réticulum endoplasmique. GTP : Guanylate tri-phosphates. GMPc : Guanylate mono-phosphate cyclique. GC : guanylate cyclase.

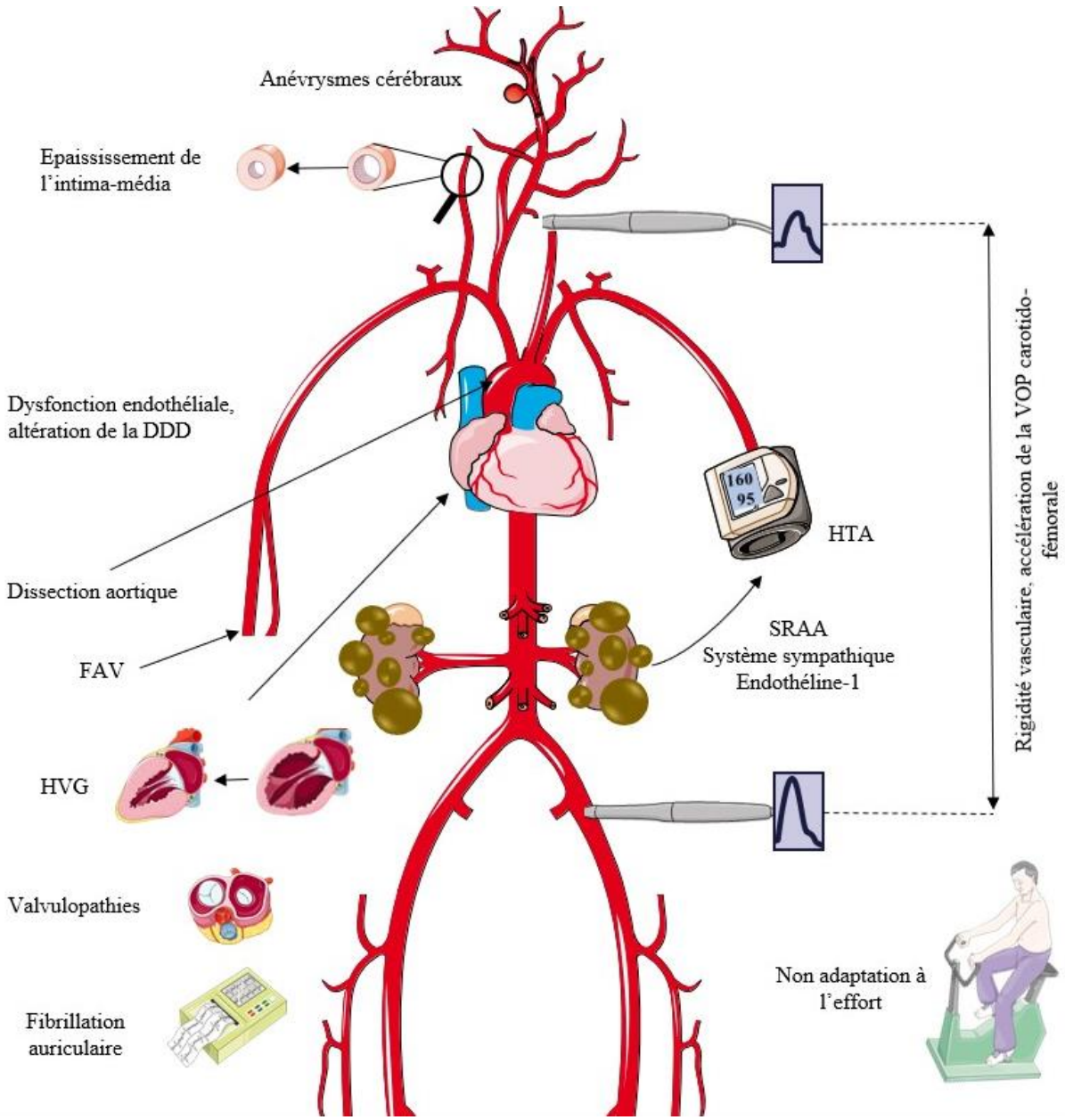


Figure 2 : Schéma résumant les manifestations cardio-vasculaires liées à la PKRAD.

Bibliographie :

1. Iglesias CG, Torres VE, Offord KP, Holley KE, Beard CM, Kurland LT. Epidemiology of adult polycystic kidney disease, Olmsted County, Minnesota: 1935-1980. Am J Kidney Dis. mai 1983;2(6):630-9.

2. Willey CJ, Blais JD, Hall AK, Krasa HB, Makin AJ, Czerwiec FS. Prevalence of autosomal dominant polycystic kidney disease in the European Union. Nephrol Dial Transplant. 1 août 2017;32(8):1356-63.

3. Spithoven EM, Kramer A, Meijer E, Orskov B, Wanner C, Abad JM, et al. Renal replacement therapy for autosomal dominant polycystic kidney disease (ADPKD) in Europe: prevalence and survival--an analysis of data from the ERA-EDTA Registry. Nephrology Dialysis Transplantation. 1 sept 2014;29(suppl 4):iv15-25.

4. Kocyigit I, Eroglu E, Gungor O. Clinical problems in hemodialysis patients with autosomal dominant polycystic kidney disease. Semin Dial. 2018;31(3):268-77.

5. Kelleher CL, McFann KK, Johnson AM, Schrier RW. Characteristics of hypertension in young adults with autosomal dominant polycystic kidney disease compared with the general U.S. population. Am J Hypertens. nov 2004;17(11 Pt 1):1029-34.

6. Chapman AB, Johnson A, Gabow PA, Schrier RW. The renin-angiotensin-aldosterone system and autosomal dominant polycystic kidney disease. N Engl J Med. 18 oct 1990;323(16):1091-6.

7. Lanktree MB, Chapman AB. New treatment paradigms for ADPKD: moving towards precision medicine. Nat Rev Nephrol. déc 2017;13(12):750-68.

8. Chapman AB, Guay-Woodford LM, Grantham JJ, Torres VE, Bae KT, Baumgarten DA, et al. Renal structure in early autosomal-dominant polycystic kidney disease (ADPKD): The Consortium for Radiologic Imaging Studies of Polycystic Kidney Disease (CRISP) cohort. Kidney Int. sept 2003;64(3):1035-45.

9. Torres VE, Chapman AB, Devuyst O, Gansevoort RT, Grantham JJ, Higashihara E, et al. Tolvaptan in Patients with Autosomal Dominant Polycystic Kidney Disease. New England Journal of Medicine. 20 déc 2012;367(25):2407-18.

10. Meijer E, Visser FW, van Aerts RMM, Blijdorp CJ, Casteleijn NF, D'Agnolo HMA, et al. Effect of Lanreotide on Kidney Function in Patients With Autosomal Dominant Polycystic Kidney Disease. JAMA. 20 nov 2018;320(19):2010-9.

11. Kocyigit I, Ozturk F, Eroglu E, Karaca Z, Kaynar AS, Cetin M, et al. Dysmetabolic markers predict outcomes in autosomal dominant polycystic kidney disease. Clin Exp Nephrol. 27 mai 2019;

12. Cadnapaphornchai MA, McFann K, Strain JD, Masoumi A, Schrier RW. Prospective change in renal volume and function in children with ADPKD. Clin J Am Soc Nephrol. avr 2009;4(4):820-9.

13. Fick GM, Duley IT, Johnson AM, Strain JD, Manco-Johnson ML, Gabow PA. The spectrum of autosomal dominant polycystic kidney disease in children. J Am Soc Nephrol. mars 1994;4(9):1654-60.

14. Marlais M, Cuthell O, Langan D, Dudley J, Sinha MD, Winyard PJD. Hypertension in autosomal dominant polycystic kidney disease: a meta-analysis. Archives of Disease in Childhood. 1 déc 2016;101(12):1142-7.

15. Seeman T, Dusek J, Vondrichová H, Kyncl M, John U, Misselwitz J, et al. Ambulatory blood pressure correlates with renal volume and number of renal cysts in children with autosomal dominant polycystic kidney disease. Blood Press Monit. juin 2003;8(3):107-10.

16. Massella L, Mekahli D, Paripović D, Prikhodina L, Godefroid N, Niemirska A, et al. Prevalence of Hypertension in Children with Early-Stage ADPKD. Clin J Am Soc Nephrol. 7 juin 2018;13(6):874-83.

17. Valvo E, Gammaro L, Tessitore N, Panzetta G, Lupo A, Loschiavo C, et al. Hypertension of polycystic kidney disease: mechanisms and hemodynamic alterations. Am J Nephrol. 1985;5(3):176-81.

18. Ramunni A, Saracino A, Esposito T, Saliani MT, Coratelli P. Renal vascular resistance and renin-angiotensin system in the pathogenesis of early hypertension in autosomal dominant polycystic kidney disease. Hypertens Res. avr 2004;27(4):221-5.

19. Watson ML, Macnicol AM, Allan PL, Wright AF. Effects of angiotensin converting enzyme inhibition in adult polycystic kidney disease. Kidney Int. janv 1992;41(1):206-10.

20. Barrett BJ, Foley R, Morgan J, Hefferton D, Parfrey P. Differences in hormonal and renal vascular responses between normotensive patients with autosomal dominant polycystic kidney disease and unaffected family members. Kidney Int. oct 1994;46(4):1118-23.

21. Bell PE, Hossack KF, Gabow PA, Durr JA, Johnson AM, Schrier RW. Hypertension in autosomal dominant polycystic kidney disease. Kidney Int. nov 1988;34(5):683-90.

22. Harrap SB, Davies DL, Macnicol AM, Dominiczak AF, Fraser R, Wright AF, et al. Renal, cardiovascular and hormonal characteristics of young adults with autosomal dominant polycystic kidney disease. Kidney Int. sept 1991;40(3):501-8.

23. Kocyigit I, Yilmaz MI, Unal A, Ozturk F, Eroglu E, Yazici C, et al. A Link between the Intrarenal Renin Angiotensin System and Hypertension in Autosomal Dominant Polycystic Kidney Disease. American Journal of Nephrology. 2013;38(3):218-25.

24. Park HC, Kang A-Y, Jang JY, Kim H, Han M, Oh K-H, et al. Increased urinary Angiotensinogen/Creatinine (AGT/Cr) ratio may be associated with reduced renal function in autosomal dominant polycystic kidney disease patients. BMC Nephrol. 20 juin 2015;16:86.

25. Salih M, Bovée DM, Roksnoer LCW, Casteleijn NF, Bakker SJL, Gansevoort RT, et al. Urinary renin-angiotensin markers in polycystic kidney disease. Am J Physiol Renal Physiol. 1 oct 2017;313(4):F874-81.

26. Nauli SM, Kawanabe Y, Kaminski JJ, Pearce WJ, Ingber DE, Zhou J. Endothelial Cilia Are Fluid Shear Sensors That Regulate Calcium Signaling and Nitric Oxide Production Through Polycystin-1. Circulation. 4 mars 2008;117(9):1161-71.

27. Hassane S, Claij N, Jodar M, Dedman A, Lauritzen I, Duprat F, et al. Pkd1-inactivation in vascular smooth muscle cells and adaptation to hypertension. Laboratory Investigation. janv 2011;91(1):24-32.

28. Davenport AP, Hyndman KA, Dhaun N, Southan C, Kohan DE, Pollock JS, et al. Endothelin. Pharmacol Rev. avr 2016;68(2):357-418.

29. Merta M, Reiterová J, Rysavá R, Tesar V, Závada J, Jáchymová M, et al. Role of endothelin and nitric oxide in the pathogenesis of arterial hypertension in autosomal dominant polycystic kidney disease. Physiol Res. 2003;52(4):433-7.

30. Ong ACM, Newby LJ, Dashwood MR. Expression and cellular localisation of renal endothelin-1 and endothelin receptor subtypes in autosomal-dominant polycystic kidney disease. Nephron Exp Nephrol. 2003;93(2):e80.

31. Kocyigit I, Eroglu E, Kaynar AS, Kocer D, Kargi S, Zararsiz G, et al. The association of endothelin-1 levels with renal survival in polycystic kidney disease patients. J Nephrol. févr 2019;32(1):83-91.

32. al VK et. Insulin resistance in adult polycystic kidney disease. - PubMed - NCBI [Internet]. [cité 21 juin 2019]. Disponible sur: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Insulin+resistance+in+adult+polycystic+kidney+disease.+Kidney+Int+1997%3B+52+%3A+503%E2%80%938

33. Esen B, Gokmen ES, Kaya M, Ozkan B, Atay AE. The relation of anthropometric measurements and insulin resistance in patients with polycystic kidney disease. J Transl Int Med. 1 sept 2016;4(3):127-34.

34. Cerasola G, Vecchi M, Mulè G, Cottone S, Mangano MT, Andronico G, et al. Sympathetic activity and blood pressure pattern in autosomal dominant polycystic kidney disease hypertensives. Am J Nephrol. 1998;18(5):391-8.

35. Klein IHHT, Ligtenberg G, Oey PL, Koomans HA, Blankestijn PJ. Sympathetic Activity Is Increased in Polycystic Kidney Disease and Is Associated with Hypertension. JASN. 1 nov 2001;12(11):2427-33.

36. Rovella V, Scimeca M, Giannini E, D'Ercole A, Giacobbi E, Noce A, et al. Morphological evaluation of sympathetic renal innervation in patients with autosomal dominant polycystic kidney disease. J Nephrol. 25 avr 2019;

37. Ecder T, Edelstein CL, Chapman AB, Johnson AM, Tison L, Gill EA, et al. Reversal of left ventricular hypertrophy with angiotensin converting enzyme inhibition in hypertensive patients with autosomal dominant polycystic kidney disease. Nephrol Dial Transplant. mai 1999;14(5):1113-6.

38. Schrier R, McFann K, Johnson A, Chapman A, Edelstein C, Brosnahan G, et al. Cardiac and renal effects of standard versus rigorous blood pressure control in autosomal-dominant polycystic kidney disease: results of a seven-year prospective randomized study. J Am Soc Nephrol. juill 2002;13(7):1733-9.

39. Nutahara K, Higashihara E, Horie S, Kamura K, Tsuchiya K, Mochizuki T, et al. Calcium channel blocker versus angiotensin II receptor blocker in autosomal dominant polycystic kidney disease. Nephron Clin Pract. 2005;99(1):c18-23.

40. Zeltner R, Poliak R, Stiasny B, Schmieder RE, Schulze BD. Renal and cardiac effects of antihypertensive treatment with ramipril vs metoprolol in autosomal dominant polycystic kidney disease. Nephrol Dial Transplant. févr 2008;23(2):573-9.

41. Schrier RW, Abebe KZ, Perrone RD, Torres VE, Braun WE, Steinman TI, et al. Blood Pressure in Early Autosomal Dominant Polycystic Kidney Disease. New England Journal of Medicine. 11 déc 2014;371(24):2255-66.

42. Torres VE, Abebe KZ, Chapman AB, Schrier RW, Braun WE, Steinman TI, et al. Angiotensin blockade in late autosomal dominant polycystic kidney disease. N Engl J Med. 11 déc 2014;371(24):2267-76.

43. Levy D, Garrison RJ, Savage DD, Kannel WB, Castelli WP. Prognostic implications of echocardiographically determined left ventricular mass in the Framingham Heart Study. N Engl J Med. 31 mai 1990;322(22):1561-6.

44. Chapman AB, Johnson AM, Rainguet S, Hossack K, Gabow P, Schrier RW. Left ventricular hypertrophy in autosomal dominant polycystic kidney disease. JASN. 1 août 1997;8(8):1292-7.

45. Perrone RD, Abebe KZ, Schrier RW, Chapman AB, Torres VE, Bost J, et al. Cardiac Magnetic Resonance Assessment of Left Ventricular Mass in Autosomal Dominant Polycystic Kidney Disease. Clin J Am Soc Nephrol. oct 2011;6(10):2508-15.

46. Yu T-M, Chuang Y-W, Yu M-C, Huang S-T, Chou C-Y, Lin C-L, et al. New-onset Atrial Fibrillation is Associated With Polycystic Kidney Disease: A Nationwide Population-based Cohort Study. Medicine (Baltimore). janv 2016;95(4):e2623.

47. Altamirano F, Schiattarella GG, French KM, Kim SY, Engelberger F, Kyrychenko S, et al. Polycystin-1 Assembles with Kv Channels to Govern Cardiomyocyte Repolarization and Contractility. Circulation. 21 juin 2019;

48. Wang D, Iversen J, Strandgaard S. Contractility and endothelium-dependent relaxation of resistance vessels in polycystic kidney disease rats. J Vasc Res. déc 1999;36(6):502-9.

49. Wang D, Iversen J, Strandgaard S. Endothelium-Dependent Relaxation of Small Resistance Vessels Is Impaired in Patients with Autosomal Dominant Polycystic Kidney Disease. JASN. 1 août 2000;11(8):1371-6.

50. Wang D, Iversen J, Wilcox CS, Strandgaard S. Endothelial dysfunction and reduced nitric oxide in resistance arteries in autosomal-dominant polycystic kidney disease. Kidney Int. oct 2003;64(4):1381-8.

51. Kocaman O, Oflaz H, Yekeler E, Dursun M, Erdogan D, Demirel S, et al. Endothelial dysfunction and increased carotid intima-media thickness in patients with autosomal dominant polycystic kidney disease. Am J Kidney Dis. mai 2004;43(5):854-60.

52. Kocyigit I, Eroglu E, Orscelik O, Unal A, Gungor O, Ozturk F, et al. Pentraxin 3 as a novel bio-marker of inflammation and endothelial dysfunction in autosomal dominant polycystic kidney disease. J Nephrol. avr 2014;27(2):181-6.

53. Lorthioir A, Joannidès R, Rémy-Jouet I, Fréguin-Bouilland C, Iacob M, Roche C, et al. Polycystin deficiency induces dopamine-reversible alterations in flow-mediated dilatation and vascular nitric oxide release in humans. Kidney International. févr 2015;87(2):465-72.

54. Kocyigit I, Yilmaz MI, Orscelik O, Sipahioglu MH, Unal A, Eroglu E, et al. Serum uric acid levels and endothelial dysfunction in patients with autosomal dominant polycystic kidney disease. Nephron Clin Pract. 2013;123(3-4):157-64.

55. Clausen P, Feldt-Rasmussen B, Iversen J, Lange M, Eidemak I, Strandgaard S. Flow-associated dilatory capacity of the brachial artery is intact in early autosomal dominant polycystic kidney disease. Am J Nephrol. 2006;26(4):335-9.

56. Azurmendi PJ, Fraga AR, Galan FM, Kotliar C, Arrizurieta EE, Valdez MG, et al. Early renal and vascular changes in ADPKD patients with low-grade albumin excretion and normal renal function. Nephrology Dialysis Transplantation. 1 août 2009;24(8):2458-63.

57. Nowak KL, Farmer H, Cadnapaphornchai MA, Gitomer B, Chonchol M. Vascular dysfunction in children and young adults with autosomal dominant polycystic kidney disease. Nephrol Dial Transplant. févr 2017;32(2):342-7.

58. Turkmen K, Oflaz H, Uslu B, Cimen AO, Elitok A, Kasikcioglu E, et al. Coronary Flow Velocity Reserve and Carotid Intima Media Thickness in Patients with Autosomal Dominant Polycystic Kidney Disease: From Impaired Tubules to Impaired Carotid and Coronary Arteries. Clinical Journal of the American Society of Nephrology. juill 2008;3(4):986-91.

59. Alisir S, Turkmen K, Alpay N, Elitok A, Oflaz H, Uslu B, et al. Improvement of coronary flow velocity reserve with telmisartan in patients with autosomal-dominant polycystic kidney disease. South Med J. mai 2010;103(5):409-13.

60. Turkmen K, Tufan F, Alpay N, Kasıkcioglu E, Oflaz H, Ecder SA, et al. Insulin resistance and coronary flow velocity reserve in patients with autosomal dominant polycystic kidney disease. Intern Med J. févr 2012;42(2):146-53.

61. Nowak KL, Gitomer B, Farmer-Bailey H, Wang W, Malaczewski M, Klawitter J, et al. Mineralocorticoid Antagonism and Vascular Function in Early Autosomal Dominant Polycystic Kidney Disease: A Randomized Controlled Trial. Am J Kidney Dis. 22 févr 2019;

62. Abdul-Majeed S, Nauli SM. Dopamine receptor type 5 in the primary cilia has dual chemo- and mechano-sensory roles. Hypertension. août 2011;58(2):325-31.

63. Wu T-W, Hung C-L, Liu C-C, Wu Y-J, Wang L-Y, Yeh H-I. Associations of Cardiovascular Risk Factors with Carotid Intima-Media Thickness in Middle-Age Adults and Elders. J Atheroscler Thromb. 1 juill 2017;24(7):677-86.

64. Baldassarre D, Veglia F, Hamsten A, Humphries SE, Rauramaa R, de Faire U, et al. Progression of carotid intima-media thickness as predictor of vascular events: results from the IMPROVE study. Arterioscler Thromb Vasc Biol. sept 2013;33(9):2273-9.

65. Finn AV, Kolodgie FD, Virmani R. Correlation between carotid intimal/medial thickness and atherosclerosis: a point of view from pathology. Arterioscler Thromb Vasc Biol. févr 2010;30(2):177-81.

66. Rong S, Jin X, Ye C, Chen J, Mei C. Carotid vascular remodelling in patients with autosomal dominant polycystic kidney disease. Nephrology. févr 2009;14(1):113-7.

67. Nowak KL, Farmer H, Cadnapaphornchai MA, Gitomer B, Chonchol M. Vascular dysfunction in children and young adults with autosomal dominant polycystic kidney disease. Nephrology Dialysis Transplantation. 1 févr 2017;32(2):342-7.

68. Lai S, Mastroluca D, Matino S, Panebianco V, Vitarelli A, Capotosto L, et al. Early Markers of Cardiovascular Risk in Autosomal Dominant Polycystic Kidney Disease. Kidney and Blood Pressure Research. 2017;42(6):1290-302.

69. Karava V, Benzouid C, Hogan J, Dossier C, Denjean AP, Deschênes G. Early cardiovascular manifestations in children and adolescents with autosomal dominant polycystic kidney disease: a single center study. Pediatr Nephrol. 2018;33(9):1513-21.

70. Beaussier H, Masson I, Collin C, Bozec E, Laloux B, Calvet D, et al. Carotid Plaque, Arterial Stiffness Gradient, and Remodeling in Hypertension. Hypertension. oct 2008;52(4):729-36.

71. Townsend RR. Arterial Stiffness in CKD: A Review. Am J Kidney Dis. févr 2019;73(2):240-7.

72. Safar ME. Arterial stiffness as a risk factor for clinical hypertension. Nat Rev Cardiol. févr 2018;15(2):97-105.

73. Vlachopoulos C, Aznaouridis K, Stefanadis C. Prediction of cardiovascular events and all-cause mortality with arterial stiffness: a systematic review and meta-analysis. J Am Coll Cardiol. 30 mars 2010;55(13):1318-27.

74. van Sloten TT, Sedaghat S, Laurent S, London GM, Pannier B, Ikram MA, et al. Carotid stiffness is associated with incident stroke: a systematic review and individual participant data meta-analysis. J Am Coll Cardiol. 10 nov 2015;66(19):2116-25.

75. Laurent S, Boutouyrie P, Asmar R, Gautier I, Laloux B, Guize L, et al. Aortic stiffness is an independent predictor of all-cause and cardiovascular mortality in hypertensive patients. Hypertension. mai 2001;37(5):1236-41.

76. Kithas PA, Supiano MA. Spironolactone and Hydocholorothiazide Decrease Vascular Stiffness and Blood Pressure in Geriatric Hypertension. J Am Geriatr Soc. juill 2010;58(7):1327-32.

77. Kocyigit I, Kaya MG, Orscelik O, Kaya C, Akpek M, Zengin H, et al. Early arterial stiffness and inflammatory bio-markers in normotensive polycystic kidney disease patients. Am J Nephrol. 2012;36(1):11-8.

78. Orscelik O, Kocyigit I, Akpek M, Dogdu O, Kaya C, Unal A, et al. Mean platelet volume and its relation with arterial stiffness in patients with normotensive polycystic kidney disease. J Investig Med. mars 2013;61(3):597-603.

79. Nowak KL, Wang W, Farmer-Bailey H, Gitomer B, Malaczewski M, Klawitter J, et al. Vascular Dysfunction, Oxidative Stress, and Inflammation in Autosomal Dominant Polycystic Kidney Disease. CJASN. 8 oct 2018;13(10):1493-501.

80. Sági B, Késői I, Késői B, Vas T, Csiky B, Kovács T, et al. Arterial stiffness may predict renal and cardiovascular prognosis in autosomal-dominant polycystic kidney disease. Physiol Int. 1 juin 2018;105(2):145-56.

81. Gul CB, Yildiz A, Ersoy A, Kahvecioglu S, Asiltas B, Yildirim F, et al. Correlation between arterial stiffness and inflammatory markers in autosomal dominant polycystic kidney disease patients with preserved renal function. International Urology and Nephrology. juill 2015;47(7):1187-94.

82. Neves JB, Rodrigues FB, Lopes JA. Autosomal dominant polycystic kidney disease and coronary artery dissection or aneurysm: a systematic review. Renal Failure. 20 avr 2016;38(4):493-502.

83. Flahault A, Trystram D, Nataf F, Fouchard M, Knebelmann B, Grünfeld J-P, et al. Screening for intracranial aneurysms in autosomal dominant polycystic kidney disease is cost-effective. Kidney International. mars 2018;93(3):716-26.

84. SaO006 - PREVALENCE OF DETECTED INTRACRANIAL ANEURYSMS IN AUTOSOMAL DOMINANT POLYCYSTIC KIDNEY DISEASE (ADPKD) IN 2796 PATIENTS FROM THE GENKYST COHORT [Internet]. [cité 28 août 2019]. Disponible sur: http://mediatheque.cyim.com/mediatheque/media.aspx?mediaId=64989&channel=60398

85. Xu HW, Yu SQ, Mei CL, Li MH. Screening for intracranial aneurysm in 355 patients with autosomal-dominant polycystic kidney disease. Stroke. janv 2011;42(1):204-6.

86. Sanchis IM, Shukoor S, Irazabal MV, Madsen CD, Chebib FT, Hogan MC, et al. Presymptomatic Screening for Intracranial Aneurysms in Patients with Autosomal Dominant Polycystic Kidney Disease. CJASN. 7 août 2019;14(8):1151-60.

87. Irazabal MV, Huston J, Kubly V, Rossetti S, Sundsbak JL, Hogan MC, et al. Extended Follow-Up of Unruptured Intracranial Aneurysms Detected by Presymptomatic Screening in Patients with Autosomal Dominant Polycystic Kidney Disease. CJASN. 1 juin 2011;6(6):1274-85.

88. Rossetti S, Chauveau D, Kubly V, Slezak JM, Saggar-Malik AK, Pei Y, et al. Association of mutation position in polycystic kidney disease 1 (PKD1) gene and development of a vascular phenotype. The Lancet. juin 2003;361(9376):2196-201.

89. Flahault A, Knebelmann B, Nataf F, Trystram D, Grünfeld J-P, Joly D. [Screening and management of intracranial aneurisms in patients with autosomal dominant polycystic kidney disease]. Nephrol Ther. avr 2017;13 Suppl 1:S147-53.

90. Chapman AB, Devuyst O, Eckardt K-U, Gansevoort RT, Harris T, Horie S, et al. Autosomal-dominant polycystic kidney disease (ADPKD): executive summary from a Kidney Disease: Improving Global Outcomes (KDIGO) Controversies Conference. Kidney International. juill 2015;88(1):17-27.

91. Flahault A, Joly D. Screening for Intracranial Aneurysms in Patients with Autosomal Dominant Polycystic Kidney Disease. CJASN. 7 août 2019;14(8):1242-4.

92. Ameku T, Taura D, Sone M, Numata T, Nakamura M, Shiota F, et al. Identification of MMP1 as a novel risk factor for intracranial aneurysms in ADPKD using iPSC models. Scientific Reports [Internet]. sept 2016 [cité 14 mai 2019];6(1). Disponible sur: http://www.nature.com/articles/srep30013

93. Hagan PG, Nienaber CA, Isselbacher EM, Bruckman D, Karavite DJ, Russman PL, et al. The International Registry of Acute Aortic Dissection (IRAD): new insights into an old disease. JAMA. 16 févr 2000;283(7):897-903.

94. Silverio A, Prota C, Maio MD, Polito MV, Cogliani FM, Citro R, et al. Aortic dissection in patients with autosomal dominant polycystic kidney disease: A series of two cases and a review of the Literature. Nephrology. 2015;20(4):229-35.

95. Krittanawong C, Kumar A, Johnson KW, Luo Y, Yue B, Wang Z, et al. Conditions and Factors Associated With Spontaneous Coronary Artery Dissection (from a National Population-Based Cohort Study). American Journal of Cardiology. 15 janv 2019;123(2):249-53.

96. Kuroki T, Yamashiro K, Tanaka R, Hirano K, Shimada Y, Hattori N. Vertebral Artery Dissection in Patients with Autosomal Dominant Polycystic Kidney Disease. Journal of Stroke and Cerebrovascular Diseases. 1 nov 2014;23(10):e441-3.

97. Bouleti C, Flamant M, Escoubet B, Arnoult F, Milleron O, Vidal-Petiot E, et al. Risk of Ascending Aortic Aneurysm in Patients With Autosomal Dominant Polycystic Kidney Disease. The American Journal of Cardiology. févr 2019;123(3):482-8.

98. Helal I, Reed B, Mettler P, Fann KM, Tkachenko O, Yan X-D, et al. Prevalence of Cardiovascular Events in Patients with Autosomal Dominant Polycystic Kidney Disease. Am J Nephrol. 2012;36(4):362-70.

99. Bardají A, Martinez-Vea A, Valero A, Gutierrez C, Garcia C, Ridao C, et al. Cardiac involvement in autosomal-dominant polycystic kidney disease: a hypertensive heart disease. Clin Nephrol. sept 2001;56(3):211-20.

100. Lumiaho A, Ikäheimo R, Miettinen R, Niemitukia L, Laitinen T, Rantala A, et al. Mitral valve prolapse and mitral regurgitation are common in patients with polycystic kidney disease type 1. Am J Kidney Dis. déc 2001;38(6):1208-16.

101. Toomer KA, Yu M, Fulmer D, Guo L, Moore KS, Moore R, et al. Primary cilia defects causing mitral valve prolapse. Sci Transl Med. 22 mai 2019;11(493).

102. Karydis N, Bevis P, Beckitt T, Silverberg D, Halak M, Calder F. An Implanted Blood Vessel Support Device for Arteriovenous Fistulas: A Randomized Controlled Trial. American Journal of Kidney Diseases [Internet]. 22 août 2019 [cité 28 août 2019];0(0). Disponible sur: https://www.ajkd.org/article/S0272-6386(19)30845-5/abstract

103. Jankovic A, Donfrid B, Adam J, Ilic M, Djuric Z, Damjanovic T, et al. Arteriovenous fistula aneurysm in patients on regular hemodialysis: prevalence and risk factors. Nephron Clin Pract. 2013;124(1-2):94-8.

104. Hadimeri H, Hadimeri U, Attman PO, Nyberg G. Dimensions of arteriovenous fistulas in patients with autosomal dominant polycystic kidney disease. Nephron. mai 2000;85(1):50-3.

105. Weyde W, Krajewska M, Penar J, Bartosik H, Klinger M. Vascular abnormalities in patients with autosomal dominant polycystic kidney disease--the influence on arteriovenous fistula creation. Clin Nephrol. mai 2004;61(5):344-6.

106. Martinez-Vea A, Bardají A, Gutierrez C, García C, Peralta C, Marcas L, et al. Exercise blood pressure, cardiac structure, and diastolic function in young normotensive patients with polycystic kidney disease: A prehypertensive state. American Journal of Kidney Diseases. août 2004;44(2):216-23.

107. Orscelik O, Kocyigit I, Baran O, Kaya C, Dogdu O, Zengin H, et al. Impairment of heart rate recovery index in autosomal-dominant polycystic kidney disease patients without hypertension. Blood Press. oct 2012;21(5):300-5.

108. Reinecke NL, Cunha TM, Heilberg IP, Higa EMS, Nishiura JL, Neder JA, et al. Exercise capacity in polycystic kidney disease. Am J Kidney Dis. août 2014;64(2):239-46.

7 Diagnostic

Chez les patients avec un antécédent familial de PKRAD, le diagnostic est réalisé de façon non-invasive par imagerie médicale. Pei *et al* (69) ont pu étudier une cohorte multicentrique regroupant 577 cas de suspicion de PKRAD issus de 58 familles où l'un des parents avait une mutation de *PKD1* et 371 cas de suspicion de PKRAD issus de 39 familles où l'un des parents était porteur d'une mutation du gène *PKD2*. Une échographie rénale a été réalisée chez tous les participants ainsi qu'une étude génétique afin de rechercher la mutation des parents. Ainsi des critères échographiques diagnostiques ont été élaborés afin d'affirmer le diagnostic de la PKRAD chez les suspects. L'échographie, permettant de détecter les kystes supérieurs à 10 mm, est utilisé comme le gold standard dans le diagnostic (70). Ces critères ont été révisés en 2011 (71) et sont précisés sur la tableau suivant.

Age (ans)	Critère	VPP (%)		SEN (%)	
		PKD1	*PKD2*	*PKD1*	*PKD2*
15-29	≥ 3 kystes uni ou bilatéraux	100	100	94.3	69.5
30-39	≥ 3 kystes uni ou bilatéraux	100	100	96.6	94.9
40-59	≥ 2 kystes dans chaque rein	100	100	92.6	88.8
≥ 60	≥ 4 kystes dans chaque rein	100	100	100	100

Tableau 1 : Critères diagnostiques échographiques révisés d'après Pei et al. *VPP : valeur prédictive positive, SEN : sensibilité*

Par la suite, l'imagerie médicale s'est développée et l'IRM à ce jour permet de diagnostiquer les kystes rénaux dont le diamètre et supérieur à 2.6 mm. Utilisée comme gold standard pour l'évaluation et le suivi des volumes rénaux dans la PKRAD, elle a été comparée aux critères échographiques sus-développés sur une population de plus faible échantillon (72). Elles sont précisées dans le tableau suivant.

Age (ans)	Critère	VPP (%)	SEN (%)
15-29	≥ 10 kystes uni ou bilatéraux	100	100
30-39	≥ 5 kystes uni ou bilatéraux	100	100

Tableau 2 : Critères diagnostiques à l'IRM révisés d'après Pei et al *(72). VPP : valeur prédictive positive, SEN : sensibilité.*

En l'absence d'antécédent familial (10-25% des patients atteints de la PKRAD (73)), l'analyse génétique permet d'établir le diagnostic. La recherche de ces mutations reste difficile et ce pour plusieurs raisons. La grande taille du gène *PKD1* (comprend 46 exons avec une séquence codant à 12 912 pb) ainsi que la présence dans la région 5' de l'exon 1 à l'exon 33 d'une séquence d'homologie dupliquée six fois dans le chromosome 16 et codant pour des pseudogènes ayant une grande ressemblance au *PKD1* rendent le séquençage compliqué. De plus, une mutation d'un acide aminé trouvée sur le gène peut être neutre et n'est pas forcément synonyme de mutation pathologique rendant la protéine non/hypo fonctionnelle. Malgré ces difficultés, l'analyse génétique peut être primordiale notamment sur le plan thérapeutique. En effet, la nature de la mutation permet de préciser la catégorie dans lequel le patient se situe. S'il est « progresseur rapide », il pourra bénéficier de thérapeutique adéquate. Les nouvelles

techniques, tel que la Next Generation Sequencing, ont la particularité d'être plus rapides et moins couteuses que les anciennes techniques, et ne se limitent à l'analyse de *PKD1* +/- *PKD2*. En effet dans des panels néphropathies kystiques / ciliopathies des gènes tels que *HNF1B*, *DNAJB11*, *GANAB*, *UMOD*, *DZIP1L* ou *NPHP* peuvent être capturés en parallèle, augmentant le rendement diagnostique de l'analyse (70). L'analyse génétique dans certains cas particuliers, quand les critères radiologiques en présence d'antécédent familial ne permettent pas d'affirmer/infirmer le diagnostic, apporte la réponse au patient. Elle permet de réduire l'anxiété que peut générer l'incertitude diagnostique. Elle permet lorsqu'elle est réalisée tôt dans la vie de diagnostiquer et prendre en charge les complications liées à la maladie. Elle aide aux décisions concernant son mode de vie, activité sportive et sa vie de famille. Enfin, cet outil permet d'identifier les donneurs vivants de greffons rénaux possibles au sein de la même famille. Cependant le diagnostic génétique n'est pas dénué d'inconvénients. Porter un diagnostic de PKRAD peut contribuer à une discrimination dans la vie professionnelle, économique (liée aux assurances), un impact au sein de la famille et un impact psychologique qui nécessitent d'être pris en considération et être discutés avec le patient avant la réalisation de ce test (74).

Enfin, le diagnostic prénatal peut être suspecté lors des échographies fœtales avec des reins hyperéchogène et un hydramnios. Dans d'autre cas, lorsque le phénotype de la maladie chez l'un des parents est sévère le diagnostic génétique prénatal peut être proposé aux familles après un conseil génétique. Dans certaines situations, un comité pluridisciplinaire de diagnostic prénatal peut proposer une interruption médicale de grossesse. (75)

Enfin, un diagnostic préimplantatoire avec fécondation in vitro peut être discuté dans la PKRAD. A ce jour quelques procédures de DPI ont été réalisées en France pour des couples dont l'un des parents était porteur d'une PKRAD, exclusivement dans l'un des établissements

autorisés à cet effet par l'Agence de la biomédecine (Nantes, Strasbourg, Montpellier, Necker, Clamart et Grenoble). Plusieurs aspects spécifiques peuvent être discutés dans le cadre de l'accès au DPI dans la PKRAD, notamment celui du gène et du type de mutation impliqués et celui des antériorités familiales sur le plan rénal et vasculaire. Une question centrale est la place donnée à la perception du couple quant à la gravité de la situation, elle-même souvent dépendante de l'histoire familiale. La loi actuelle pose le critère de la « particulière gravité » de la pathologie. Elle précise que c'est un centre pluridisciplinaire de diagnostic prénatal, dont un praticien doit être sollicité en amont d'une procédure de DPI, qui apprécie ce critère. Cela signifie que la société décide des limites, et ce, à travers le discernement des seuls praticiens. Cependant l'opinion publique pourrait vouloir une plus grande ouverture du DPI dans la PKRAD, en laissant une plus grande liberté aux familles de choisir dans les certains cas.

8 Traitement

La gestion des complications rénales kystiques et la progression de la maladie rénale vers l'IRT représentent un enjeu majeur dans la prise en charge de la PKRAD. De ce fait, les critères majeurs utilisés dans les études afin d'investiguer l'efficacité d'un traitement dans la PKRAD sont la réduction des volumes des reins et la préservation du débit de filtration glomérulaire. Ainsi, en se basant sur les connaissances physiopathologiques de la cystgenèse, plusieurs médicaments ont été étudiés. A ce jour, seul le TOLVAPTAN, un antagoniste des récepteurs V2 de la vasopressine a démontré son efficacité sur les critères sus-cités. En effet, l'étude TEMPO 3 :4 (76) réalisée sur 1 445 patients atteints de la PKRAD dont la clairance rénale est supérieure à 60 ml/min et un volume rénal total supérieur à 750 ml. Sur un suivi de 3 ans et en comparant au PLACEBO, le TOLVAPTAN a permis la diminution de la croissance des volume rénaux (2.8% *vs.* 5.5% par an, $p<0.001$) et la baisse de la décroissance du débit de filtration glomérulaire (-2.72 *vs.* -3.70 ml/min/1.73m² par an, $p<0.001$). De plus les patients recevant le TOLVAPTAN ont présenté significativement moins de douleurs rénales, moins d'infections urinaires et moins d'épisode d'hématurie. Cependant, les patients ont présenté une soif plus importante, une polyurie, une polydipsie et une cytolyse hépatique résolutive à l'arrêt du traitement impliquant la surveillance étroite du bilan hépatique lors de la prise du TOLVAPTAN. Les analyses *post-hoc* de l'étude TEMPO 3:4 ont montré que chez les patients recevant le TOLVAPTAN, l'osmolarité urinaire baissait de 200 à 300 mOsm/kg et que le bénéfice du traitement était plus marqué chez les patients dont l'osmolarité urinaire baissait le plus (77). L'effet bénéfique du TOLVAPTAN est identique entre les différents stades de la MRC de 1 à 3 (78). Par la suite et afin de s'assurer de l'efficacité et de la sécurité du TOLVAPTAN, l'étude TEMPO 3:4 a été poursuivie pendant 2 ans supplémentaire avec une conversion des patients ayant eu un PLACEBO vers du TOLVAPTAN. Nommée TEMPO 4:4,

l'étude a montré non seulement que l'effet bénéfique concernant le DFG été maintenu mais aussi que la progression des volumes rénaux était moins importante chez les patients ayant bénéficié du traitement dans l'étude TEMPO 3:4 comparé à ceux l'ayant débuté dans TEMPO 4:4 (79). Enfin l'étude REPRISE menée par la suite avec cependant un suivi sur 1 an, a confirmé l'effet bénéfique sur la fonction rénale (-2.34 *vs.* -3.61 ml/min/1.73m² par an, p<0.001). L'effet du TOLVAPTAN sur les atteintes cardiovasculaires liées à la PKRAD n'a pas été étudié.

Les résultats des principales études des autres médicaments sont mentionnés sur le tableau suivant.

Traitement	Etude	Nombre de participants	Effet sur le volume total rénal et le déclin du DFG
Inhibiteurs d système Rénine Angiotensine Aldostérone			
Lisinopril et telmisartan *vs.* lisinopril seul	HALT-PKD (80)	558	5.6 *vs.* 6.6% par an p=0.006 Pas de différence sur le DFG
Analogues de la Somatostatine			
Octreotide	ALADIN (81)	75	46.2 *vs.* 143.7 ml par an p=0.02 Pas de différence sur le DFG
	ALADIN 2 (82)	100	377.6 *vs.* 551.3 ml en 3 ans p=0.02 Pas de différence sur le DFG
Lanreotide	DIPAK (83)	309	4.15 *vs.* 5.56 % par an p=0.02 Pas de différence sur le DFG
Inhibiteurs de mTOR			

Sirolimus	SUISSE (84)	100	Pas de différence sur le volume rénal ni sur le DFG
Everolimus	Walz *et al* (85)	433	230 *vs.* 301 ml en 2 ans p=0.06 Pas de différence sur le DFG
Statines			
Pravastatine (pédiatrie)	Cadnapaphornachi *et al* (86)	110	23 *vs.* 31% en 3 ans p=0.02 Pas de différence dans le DFG
Inhibiteur de la Tyrosine kinase			
Bosutinib	Tesar *et al* (87)	172	Croissance des volume rénaux : 0.84% *vs.* 4.74%, p<0.001. Pas de différence sur le DFG.

Tableau 3 : principales études randomisées concernant le traitement de la PKRAD

9 Dopamine, système cardio-vasculaire et PKRAD

La dopamine appartient à la famille des catécholamines, étant le précurseur de l'adrénaline et de la noradrénaline. Elle est aussi considérée comme un neurotransmetteur. Produite au niveau cytoplasmique des terminaisons nerveuses puis stockées dans des vésicules, elle active les récepteurs pré et post synaptiques et joue un rôle cruciale dans le système récompense-renforcement (88). Son action passe par les récepteurs dopaminergiques.

Les récepteurs dopaminergiques appartiennent à la famille des récepteurs couplés au protéines G (89). Ils contiennent sept domaines trans membranaires. Ils sont divisés en deux sous-familles : les récepteurs D1-like ; incluant les récepteurs D1 et D5 et les récepteurs D2-like qui incluent les récepteurs D2, D3 et D4. Les récepteurs dopaminergiques sont exprimés au niveau système nerveux central et périphérique, rénal, intestinal, cardiaque et vasculaire (90). Sur le plan vasculaire, on retrouve uniquement les récepteurs D1-like, avec une présence des récepteurs D1 au niveau des cellules musculaires lisses (90), et des récepteurs D5 au niveau endothélial (91). La stimulation dopaminergique des artères mésentériques de rats induit une vaso-relaxation endothélium-indépendante (92). En culture cellulaire, la stimulation des DR1 induit une inhibition de la prolifération des cellules musculaires lisses et une diminution du stress oxydatif (89). Au niveau endothélial, les récepteurs D5 sont localisés au niveau du cil primaire. Dans la PKRAD, l'expression des récepteurs D5 est conservée au niveau du cil primaire. Leurs stimulations chronique (>6h) a montré une augmentation de la libération du calcium intracellulaire des cellules endothéliales invalidé pour la polycytsine-1 en culture, après exposition au flux (41).

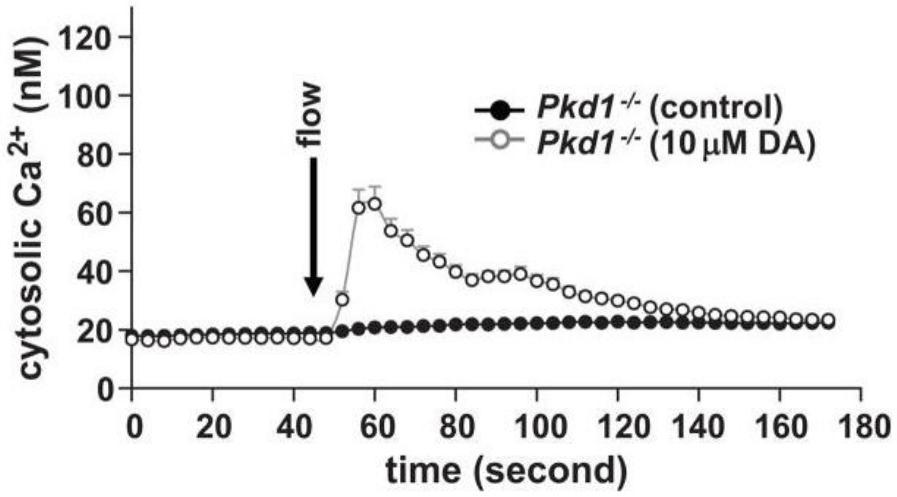


Figure 10 **:** *Mutation Pkd1 et stimulation dopaminergique***.** *Correction de la libération du Calcium intracellulaire après la stimulation dopaminergique des cellulles endothéliales invalidées pour* Pkd1. *D'après Nauli SM* et al *(41)*

RESULTATS

MANUSCRIT 2

En début de Thèse nous avons réalisé une étude sur l'impact de l'inhibition de l'époxyde hydrolase soluble dans les atteintes cardiovasculaires de la maladie rénale chronique (syndrome cardio-rénal de type 4) chez la souris issue de fond génétique 129/Sv (ANNEXE 2). Ce modèle expérimental est également d'intérêt pour analyser l'impact CV et rénal de l'invalidation endothéliale de Pkd1 au cours de la progression de la maladie rénale chronique. Compte tenu de la différence de fond génétique entre les souris de ces 2 études et de données parcellaires dans la littérature, nous avons souhaité réaliser une étude intermédiaire afin de savoir si les atteintes rénales, cardiaques et vasculaires observées dans le modèle de réduction néphronique par néphrectomie des 5/6èmes chez les 129/Sv étaient ou non comparables à celles de la souris C57BL/6JRj. Cette étude est actuellement soumise pour publication (Révision 1 soumise à Scientific Reports en septembre 2019).

5/6 NEPHRECTOMY INDUCES DIFFERENT RENAL, CARDIAC AND VASCULAR CONSEQUENCES IN 129/SV AND C57BL/6JRJ MICE

5/6 nephrectomy induces different renal, cardiac and vascular consequences in 129/Sv and C57BL/6JRj mice

AUTHORS:
Mouad Hamzaoui 1,2, MD, MSc, Zoubir Djerada 1,3, PharmaD, PhD, Valery Brunel 4, PharmD, Paul Mulder 1, PharmD, PhD, Vincent Richard 1, PhD, Jérémy Bellien 1,5, PharmD, PhD, Dominique Guerrot 1,2, MD, PhD.

AFFILIATIONS:
1. Normandie Univ, UNIROUEN, INSERM U1096, FHU REMOD-VHF, 76000 Rouen, France
2. Nephrology Department, Rouen University Hospital, Rouen, France
3. Pharmacology Department, Reims University Hospital, Reims, France
4. Biochemistry Department, Rouen University Hospital, Rouen, France
5. Pharmacology Department, Rouen University Hospital, Rouen, France

WORD COUNT: 3040

CORRESPONDING AUTHOR:
Prof. Dominique Guerrot
Nephrology Department, Rouen University Hospital, Rouen, France
1 rue de Germont, 76031 Rouen, France
dominique.guerrot@chu-rouen.fr
ORCID: 0000-0002-5953-5785
Tel: +33 2 32 88 90 02
Fax: +33 2 32 88 91 15

KEYWORDS:
Hypertension, cardiorenal syndrome, heart failure, endothelial dysfunction, genetic background, chronic kidney disease, renal insufficiency

ABSTRACT

Experimental models of cardiovascular diseases largely depend on the genetic background. Subtotal 5/6 nephrectomy (5/6 Nx) is the most frequently used model of chronic kidney disease (CKD) in rodents. However, in mice, cardiovascular consequences of 5/6 Nx are rarely reported in details and comparative results between strains are scarce. The present study detailed and compared the outcomes of 5/6 Nx in the 2 main strains of mice used in cardiovascular and kidney research, 129/Sv and C57BL/6JRj. Twelve weeks after 5/6 Nx, CKD was demonstrated by a significant increase in plasma creatinine in both 129/Sv and C57BL/6JRj male mice. Polyuria and kidney histological lesions were more pronounced in 129/Sv than in C57BL/6JRj mice. Increase in albuminuria was significant in 129/Sv but not in C57BL/6JRj mice. Both strains exhibited an increase in systolic blood pressure after 8 weeks associated with decreases in cardiac systolic and diastolic function. Heart weight increased significantly only in 129/Sv mice. Endothelium-dependent mesenteric artery relaxation to acetylcholine was altered after 5/6 Nx in C57BL/6JRj mice. Marked reduction of endothelium-dependent vasodilation to increased intraluminal flow was demonstrated in both strains after 5/6 Nx. Cardiovascular and kidney consequences of 5/6 Nx were more pronounced in 129/Sv than in C57BL/6JRj mice.

INTRODUCTION

Chronic kidney disease (CKD) is a major health problem, with a worldwide prevalence of 13% 1. A strong association has been demonstrated between the decrease in glomerular filtration rate (GFR), the risk of developing functional and structural disorders of the heart and cardiovascular (CV) events 2–4. Accordingly, CV disease represents the leading cause of mortality in this population. Multiple mechanisms lead to the CV consequences of CKD, and endothelial dysfunction is considered as a cornerstone in this setting 5,6. Due to limited pathophysiological understanding, a large amount of research is currently dedicated to the deleterious reciprocal interactions of heart and kidney diseases, within the 5 types of cardiorenal syndrome 7. Different models of CKD have been developed in rodents, including kidney mass reduction by 5/6 nephrectomy (5/6 Nx), DOCA salt nephropathy, unilateral ureteral obstruction, oxalate-induced CKD, adenine-induced CKD and genetic mutation of Col4A3 8–12, but these models do not fully reproduce the CV consequences of CKD observed in humans, including coronary heart disease. 5/6 Nx has been widely used in rats 13,14 because of the persistent decrease in GFR, proteinuria, glomerular sclerosis and hypertension induced, contributing to the major interest of this model 15. To date, several factors, including surgical difficulties, have limited the use of 5/6 Nx in mice 16. This is of critical importance in particular because transgenic mice, most commonly developed on a C57BL/6JRj background, currently represent a key experimental tool. In the literature reporting results of 5/6 Nx in mice, strain-dependent differences appear regarding hypertension, albuminuria, kidney function, and kidney histological lesions 17. Irrespective of the genetic background, renal, cardiac and vascular consequences of 5/6 Nx in mice are generally the subject of focused studies, and their occurrence and severity are therefore poorly characterized together.

In this context, the aim of this study is to comparatively describe the consequences of 5/6 Nx in the two commonly used mouse strains C57BL/6JRj and 129/Sv, with a specific focus on structural and functional disorders of the cardiovascular system.

METHODS

Animal models

All experiments were carried out in C57BL/6JRj and 129/Sv mice (n=20 per strain), aged 8 weeks and weighing between 20 and 26 g (directly bought from Janvier laboratory, Le Genest Ste Isle, France without breeding within our facility), in accordance with the standards and ethical rules, and with approval by the national animal ethics committee (CENOMEXA C2EA-54). To limit the number of animals used, and variability related to hormonal issues which play an important role in CV disorders beyond the scope of strain-dependent differences, only male mice were studied. The surgical procedures were performed by a single experienced operator in order to ensure reproducibility. Briefly, mice were anaesthetized by intraperitoneal injection of ketamine (100 mg/kg) (Ketamine® 1000, Virbac France) + Xylazine (10 mg/kg) (Rompun® 2%, Bayer France). After shaving and disinfection with povidone (10% Betadine® dermal, Meda), a left laparotomy was performed to expose the left kidney. First, in order to preserve the adrenal gland, it was separated from the left kidney without harming its vascularization, followed by dissection of the perihilar adipose tissue. After detecting the bifurcation of the kidney artery at the hilum, using a non-absorbable polypropylene 8-0 thread, 6.5-mm needle (Prolene® 8-0, Ethicon), the upper limb of the kidney artery was ligated and verified by the subsequent homogeneous discoloration of the upper half of the left kidney. The identification and ligation of the upper branch of the kidney artery was easier in C56BL/6JRj than in 129/Sv

mice, since the division of the artery was more proximal in C56BL/6JRj as shown in Suppl Fig 1.

Then, using a cauterizer (Thermal Cautery Unit®, Geiger), the lower kidney pole was cauterized with an estimated depth of 1 mm, avoiding the hilum (Fig 1), and then sutured using a non-absorbable 4-0 polyamide thread (Ethilon® 4-0, Ethicon). The entire surgical procedure was performed under a binocular magnifying glass (magnification x2). One week after the left partial nephrectomy, a total right nephrectomy was performed following the same steps described above, excepted that the hilum which was fully ligated and the right kidney removed. Control groups were subjected to a sham operation, undergoing a simple laparotomy. The animals received post-operative analgesia consisting in a subcutaneous injection of buprenorphine (0.05 mg/kg) (Buprecare®, Axience). Mice were sacrificed 12 weeks (W12) after total right nephrectomy.

Blood pressure

Non-invasive measurements of systolic blood pressure (SBP) were performed by tail cuff plethysmography (CODA, Kent Scientific Corporation), before (W0), 4 (W4) and 8 (W0) weeks after surgery. These measurements were performed in conscious and trained mice, and consisted in 2 series of 10 cycles of measurements.

Urine parameters

Urine was collected over 24 hours in metabolic cages at W0, W4 and W8 for evaluation of urine output. In addition, urine albumin was determined at W8 using an ELISA kit (Albuwell M, Exocell). Furthermore, urine aldosterone concentration was evaluated at W8 by ELISA (Aldosterone ELISA Kit, Enzo) and expressed as pg/g body weight/24h.

Plasma creatinine

At W12, mice were anesthetized (Xylazine + Ketamine as described previously), blood samples were collected and centrifuged. Plasma creatinine concentration was monitored by enzymatic method (CREP2, Roche Diagnostics).

Cardiac function and dimensions

In mice anesthetized with isoflurane (1 to 2%), LV dimensions and function were assessed 10 weeks after the right nephrectomy, using a Vivid 7 ultrasound device (GE medical) 18. The heart was imaged in the two-dimensional mode in the parasternal short-axis view. Ejection fraction (EF) was calculated from the LV cross-sectional area as EF (%) = ((LVDA – LVSA)/LVDA) x 100 where LVDA and LVSA are LV diastolic and systolic area, estimated from end-diastolic and end-systolic diameter (EDD and ESD). In addition, a pulsed Doppler of the LV outflow was performed to obtain heart rate (HR). Doppler measurements were also made at the tip of the mitral leaflets for diastolic filling profiles in the apical four-chamber view, allowing to determine peak early (E) and late (A) mitral inflow velocities, and calculation of the E/A ratio, as index of LV diastolic function.

Vascular function

Endothelial function was first assessed on small vessel myographs and arteriographs as described previously 19,20. After blood sampling, the mesentery was removed and placed in cold oxygenated Krebs buffer. A 1.5-2.0 mm segment of first order of mesenteric resistance artery segment was mounted on a myograph (DMT, Aarhus, Denmark). After normalization, endothelium-dependent relaxation to acetylcholine (10-9 to 3.10-5 mol/L) and endothelium-independent relaxation to sodium nitroprusside (SNP) (10-9 to 3.10-5 mol/L) were performed in segments pre-contracted with Phenylephrine (Phe: 10-5 mol/L). A 2-3 mm segment of third

mesenteric resistance artery segment was mounted on an arteriograph (DMT, Denmark). The dilatory response to stepwise increases in intraluminal flow (from 3 to 100 L/min) was assessed in vessels pre-constricted with Phe (10-5 mol/L). Only vessels which increased their constriction by more than 40% with Phe were included in the experiments.

Kidney and cardiac histology

In 5/6 Nx mice, the remnant kidney was removed at sacrifice. Kidneys were harvested and decapsulated. Kidney histological lesions were analyzed after Masson's staining. Briefly, the kidneys were fixed for 24 hours in 4% formalin and embedded in paraffin after conventional processing. Three-µm slices were thereafter stained with Masson's trichrome solution. The slides were independently examined on a blinded basis, using a 0 to 4 injury scale for the level of interstitial inflammation, interstitial fibrosis and glomerulosclerosis at magnification x20 (0: no damage; 1: <25% of kidney damaged; 2: 25-50% of kidney damaged; 3: 50-75% of kidney damaged; 4: 75-100% of kidney damaged). Tubular lesions were analyzed at magnification x10. Vascular thickening and vascular fibrosis were analyzed at magnification x40. The upper half of the kidney was not analyzed since it was ischemic in 5/6 Nx mice. The heart was harvested, weighed and a standardized section of the left ventricle was snap-frozen for subsequent determination of LV fibrosis, using 8-µm thick histological slices stained with Sirius Red. For each heart, 12-15 consecutive images were taken at x10 magnification. Fibrosis area was determined by blinded automated morphometric analysis and expressed as a mean percentage of the total area analyzed (Image J software).

Statistical analyses

Statistical analysis was performed with Prism software (GraphPad Prism 5.00.288). Data were expressed as mean values ± SEM. The normality of the data and homogeneity of variances were respectively assessed by Shapiro-Wilk and Bartlett tests. Differences between groups were analyzed by one-way ANOVA test, followed by Bonferroni correction, or Kruskal-Wallis test, followed by a Dunn multiple comparison post-test, as appropriate. Differences between groups for quantitative variables measured over time were analyzed by two-way ANOVA test with group and time as factors. Bonferroni correction was applied to post-hoc t-tests when ANOVA was significant. Survival curves were analyzed using Log-rank (Mantel-Cox) test. All p values were two-tailed with statistical significance indicated by a value of $p < 0.05$.

RESULTS

Body weight and survival

Body weight increased with time in sham-operated mice (Fig 1A and 1B) but this increase was higher in C57BL/6JRj mice compared to 129/Sv (□W0-W12: 7.9±0.9 vs 6.1±1.1 g, $p<0.01$). After 5/6 Nx, body weight gradually increased in C57BL/6JRj mice but not in 129/Sv mice (□W0-W12: 4.7±0.9 vs -1.9±0.8 g, $p<0.001$) (Supplementary Figure 1). After 12 weeks, survival was not significantly affected by 5/6 Nx neither in C57BL/6JRj nor in 129/Sv mice.

Kidney parameters

The onset of CKD was confirmed by the significant increase in plasma creatinine 12 weeks after 5/6 Nx in both strains. There was no significant interstrain difference regarding the increase in C57BL/6JRj vs 129/Sv mice (ΔW0-W12: +14 vs +28 µmol/L) (Fig 1E). To further describe the kidney consequences of 5/6 Nx, we analyzed urine collections. As opposed to C57BL/6JRJRj mice, 129/Sv mice presented significant 2.3 and 2.8-fold increases in urine

volume at week 4 and week 8 respectively (Fig 1C and 1D). An increase in urinary aldosterone was observed in 129/Sv and C57BL/6JRj mice after 5/6 Nx, without difference between strains (Fig 1F). In addition, urinary albumin/creatinine ratio was markedly increased in 129/Sv mice (4588±821 vs 219±52 mg/g, $p<0.001$) but not in C57BL/6JRj mice (121±29 vs 153±14 mg/g, p=NS). Kidney histology analyses showed the development of glomerulosclerosis, tubular injury, interstitial fibrosis and inflammation, perivascular fibrosis and vascular thickening in 129/Sv and C57BL/6JRj mice after 5/6 Nx (Fig 2A-F). All these lesions were significantly higher in 129/Sv compared to C57BL/6JRj mice.

Blood pressure

Systolic blood pressure was significantly increased in 129/Sv and C57BL/6JRj mice 8 weeks after surgery (Fig 3A and 3B).

Cardiac parameters

Echocardiographic measurements are presented in Table 1. There was no significant difference between sham-operated and 5/6 Nx mice in both C57BL/6JRj and 129/Sv strains regarding heart rate, LV end-diastolic diameter and wall thicknesses. However, 5/6 Nx induced a similar decrease in fractional shortening and LVEF in both strains, showing a decrease in systolic function. In addition, the E/A ratio similarly decreased after 5/6 Nx in C57BL/6JRj and 129/Sv, indicating the development of diastolic dysfunction. At sacrifice, no difference in cardiac weight was observed between 5/6 Nx and sham-operated mice in the C57BL/6JRj strain, while a slight but significant increase was noticed in 129/Sv 5/6 Nx mice (Fig 3A). In addition, there was an increase in heart fibrosis after 5/6 Nx in 129/Sv mice, but not in C57BL/6JRj (Fig 3B).

Vascular function

Relative to baseline values, there was a decrease of mesenteric artery relaxation to acetylcholine in C57BL/6JRj mice compared to sham-operated mice at week 12, without change in the relaxation response to sodium nitroprusside (SNP), demonstrating endothelial dysfunction (Fig 4A and 4C). No difference was shown regarding mesenteric artery relaxation to acetylcholine and SNP in 129/Sv mice compared to sham-operated mice (Fig 4B and 4D). Importantly, the relaxation to acetylcholine was altered in sham-operated 129/Sv mice (Fig 4B), demonstrating that 129/Sv mice do not present the "normal" response to acetylcholine (acetylcholine concentration-dependent relaxation of the artery related to the release of endothelium-derived vasodilators).

Regarding arteriography, basal external diameter of the mesenteric artery increased after 5/6 Nx in C57BL/6JRj (Sham-5/6 Nx: 301±10 vs 348±4 µm, p=0.001) but not in 129/Sv mice (Sham-5/6 Nx: 277±14 vs 291±13 µm, p=NS). Wall thickness increased significantly after 5/6 Nx in both C57BL/6JRj (Sham-5/6 Nx: 21±1 vs 32±2 µm, p<0.001) and 129/Sv (Sham-5/6 Nx: 22±1 vs 31±1µm, p<0.001) strains. In addition, in precontracted mesenteric arteries we observed a marked decrease of the endothelium-dependent vasodilation in response to a gradual increase in intraluminal flow in both C57BL/6JRj (Fig 7A) and 129/Sv (Fig 7B) mice, demonstrating severe endothelial dysfunction in both strains.

DISCUSSION

The precise cardiovascular consequences of the 5/6 Nx model are poorly defined in mice, because of methodological differences between studies (Table 2). The present study demonstrates that 5/6 Nx is a relevant tool to study the cardiovascular consequences of CKD in both C57BL/6JRj and 129/Sv mice. Importantly, it highlights striking differences in terms of

kidney, cardiac and vascular consequences of this model between strains, with important implications for the design and interpretation of experimental procedures.

In line with results of the present study, Leelahavanichkul et al previously reported that C57BL/6JRj mice presented milder CKD than 129/Sv and CD-1 mice after subtotal nephrectomy 17. Accordingly, we found that in the remnant kidney of C57BL/6JRj mice tubular damage, interstitial fibrosis and inflammation were less severe compared to 129/Sv mice. C57BL/6JRj did not develop albuminuria while 129/Sv did, which is consistent with previous findings by Ma LJ et al 21. This was associated with increased glomerulosclerosis in 129/Sv mice in both studies.

Concerning cardiac consequences of CKD, in our study both strains presented diastolic dysfunction with a mild decrease in systolic function. This can be related to cardiac hypertrophy and remodelling, leading to heart wall stiffness, impairing relaxation. As opposed to C57BL/6JRj, 129/Sv exhibited hypertrophy, and presented increased cardiac fibrosis. Siedlecki et al 22 observed cardiac hypertrophy in 129/Sv mice with modified nephrectomy (induced by cauterization of one kidney and total nephrectomy of the other one). To our knowledge, no cardiac hypertrophy after 5/6 Nx has been reported in C57BL/6JRj to date. In C57BL/6JRj, 8 weeks after 5/6 Nx Han et al 23 showed diastolic dysfunction and cardiac fibrosis, and 12 weeks after 5/6 Nx Li et al 24 described systolic and diastolic dysfunction, with increased cardiac fibrosis. In 129/Sv, 16 weeks after 5/6 Nx Winterberg et al 25 showed cardiac fibrosis, diastolic dysfunction without systolic dysfunction.

The pathophysiology of the cardiac consequences of CKD involves multiple factors, including hypertension, uremic toxins, FGF-23, and activation of the renin angiotensin aldosterone system 26–28. We found an increase of urinary aldosterone excretion after 5/6 Nx, which was similar between strains. Kobayashi et al 29 compared 5/6 Nx in C57BL/6JRj and 129/Sv mice and found no difference in plasma aldosterone between strains after 5/6 Nx. Differential

expression of angiotensin II type 1 receptor-associated protein may explain the differential activity of the renin angiotensin aldosterone system, independently of plasma and urine aldosterone concentration. As is frequently the case in human, cardiac hypertrophy was associated with albuminuria in 129/Sv mice, while no albuminuria was observed in C57BL/6JRj 2,30,31.

Hypertension is frequently encountered in kidney diseases. As is also the case in experimental models of diabetes, strain differences have an impact in murine models of hypertension 32. Although the gold standard method to measure blood pressure in mice is telemetry, controversy exists and the tail-cuff method, which we report here, provides valuable information within normal to high-normal values of blood pressure 33,34. Previous studies have reported hypertension in 129/Sv after 5/6 Nx, both by plethysmography with tail cuff 35 and by telemetry 17, contrasting with the C57BL/6JRj strain in which blood pressure most frequently does not increase after 5/6 Nx 21. The increase in SBP we describe in C57BL/6JRj with our model of 5/6 Nx therefore contrasts with existing literature. Wei et al compared two models of 5/6 Nx in C57BL/6JRj mice, one with subtotal surgical removal and the other, as in our study, using the ligature of the upper branch of kidney artery, without removing the ischemic kidney parenchyma 36. Hypertension was described only in the latter model. Wei et al found that this model upregulates kidney and systemic inflammatory response, which likely promotes the development of hypertension.

Impaired endothelial function has been extensively studied in patients with CKD, and is considered as a major player in the detrimental interactions between the kidney and the cardiovascular system in CKD 37. Endothelial dysfunction after 5/6 Nx has previously been shown in rat models of CKD 38. In mice models of CKD impaired flow-mediated vasodilation in a resistance vessel had not been reported previously, while this is generally considered as a gold-standard method to demonstrate and study endothelial dysfunction. We demonstrated

endothelial dysfunction after 5/6 Nx in both strains. Previous studies have shown features of impaired endothelial function in CKD models by means of dysregulated biomarkers. D'Apolito et al 39 have shown impaired dilation of the thoracic aorta to acetylcholine in C57BL/6JRj mice after 5/6 Nx, with a myograph-based analysis.

129/Sv mice are more prone to CV consequences of CKD than C57BL/6JRj mice. It is therefore important to highlight that in 129/Sv mice the ex vivo analysis of resistance arteries can only be performed by arteriograph evaluation of flow-mediated dilatation and not myograph evaluation of the response to acetylcholine, since this response was incomplete in control 129/Sv mice when compared to other strains. Although data in the literature are scarce, Liu et al 40 had already showed incomplete relaxation to acetylcholine in mesenteric artery in 129/Sv mice. Ryan et al 41 found similar results on aorta in 129/Sv mice but complete relaxation to acetylcholine when testing carotid artery. One of the explanations is a possible decrease of acetylcholine receptor in abdominal arteries, especially since the use of other endothelium-dependent agonists on the aorta induced similar relaxation as compared to C57BL/6JRj. No smooth muscle cell dysfunction was found after 5/6 Nx in our study, contrasting with increased wall thickness in both strains. The increase in wall thickness is mainly due to media remodeling, with hypertrophy and increased fibrogenesis of smooth muscle cells. Results in our study suggest that the remodeling in this model is not sufficient not to alter smooth muscle cell reactivity (precontraction and response to SNP).

The genome and the genetic differences between C57BL/6J and 129/Sv mice are available in large databases (http://bioit2.irc.ugent.be/prx/mousepost/Home.php), (http://www.informatics.jax.org/home/strain) 42. Over 8800 significant genetic differences (insertions, deletions, mutations, SNPs) with a potential effect on protein function exist between the 2 strains compared in our study. The database published by Timmermans et al identifies several candidate genes playing a role in vascular physiology (Ren1, Angpt4, Notch1) or

inflammation and fibrogenesis (Ddr1, Mmp9, Col6A5, Smad7) which may contribute to the differences observed in the present study 42. Further studies on candidate genes responsible for the variable susceptibility of these 2 strains to 5/6 Nx could suggest targets to limit the CV consequences of CKD.

In conclusion this study comparatively details kidney and cardiovascular consequences of the 5/6 Nx model of CKD in two of the most frequently studied strains: C57BL/6JRj and 129/Sv male mice. 5/6 Nx induced higher kidney injury, albuminuria, hypertension, cardiac hypertrophy and fibrosis, diastolic and systolic dysfunction and endothelial dysfunction in 129/Sv. In C57BL/6JRj while mild kidney injury was observed, no albuminuria, cardiac hypertrophy or fibrosis were present. These results are of importance when comparing conclusions of the literature in different strains. They will also be particularly useful for scientists to provide arguments defining whether C57BL/6JRj or 129/Sv mice should be used to investigate specific research issues on the CV and kidney consequences of CKD.

Table 1. Echocardiographic measurements in sham-operated and 5/6 Nx C57BL/6JRj and 129/Sv mice.

	C57BL/6JRj		Sham *vs* 5/6 Nx	129/Sv		Sham *vs* 5/6 Nx
Mice / Parameters	Sham	5/6 Nx	p	Sham	5/6 Nx	p
HR (bpm)	404±15	437±12	NS	434±9	429±8	NS
LVEDD (mm)	4.0±0.1	3.8±0.1	NS	3.6±0.1	3.8±0.2	NS
FS (%)	39±4	27±3	<0.05	44±3	31±3	<0.05
LVEF (%)	75±4	59±5	<0.05	80±3	64±4	<0.05
E/A	1.29±0.04	0.95±0.03	<0.0001	1.35±0.04	0.95±0.03	<0.0001

Values are expressed as mean ± SEM. (n=8-9 per group). E/A: early to late mitral inflow peak ratio, LVEF: left ventricular ejection fraction, FS: fractional shortening, LVEDD: Left ventricular end-diastolic diameter, HR: Heart rate, NS: non significant.

Table 2: Studies investigating kidney, cardiac and vascular consequences of 5/6 Nx in C57BL/6JRj and 129/Sv mice.

	Studies	Methods	Polyuria	Urine albumin	Plasma aldosterone	HTN	Cardiac hypertrophy	Cardiac fibrosis	Systolic function	Diastolic function	Endothelia function
C57BL/6JRj	Leelahavanichkul A *et al* 2010	surgical removal	ND	-	ND	-	ND	-	ND	ND	ND
	Ma L-J *et al* 2003	surgical removal	ND	-	ND	-	ND	ND	ND	ND	ND
	Li Y *et al* 2009	surgical removal	ND	ND	ND	+	+	+	+	+	ND
	Kobayashi R *et al* 2017	surgical removal	+	ND	-	-	ND	ND	ND	ND	ND
	Wei J *et al* 2018	surgical removal	ND	-	-	-	ND	ND	ND	ND	ND
	Wei J *et al* 2018	artery ligation	ND	+	-	+	ND	ND	ND	ND	ND
	Gava AL *et al* 2012	surgical removal	+	+ (proteinuria)	ND	+	ND	ND	ND	ND	ND
	Lehners A *et al* 2014	surgical removal	ND	+	ND	-	-	ND	ND	ND	ND
	Jin J *et al* 2017	surgical removal	ND	ND	ND	-	ND	ND	ND	ND	+ kidney art
	Thomsen MB *et al* 2018	surgical removal	ND	ND	ND	ND	+	ND	ND	ND	ND
	Madsen M *et al* 2017	surgical removal	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	- aortic rin
129/Sv	Leelahavanichkul A *et al* 2010	surgical removal	ND	+	ND	+	ND	+	ND	ND	ND
	Ma L-J *et al* 2003	surgical removal	ND	+	ND	+	ND	ND	ND	ND	ND
	Winterberg PD *et al* 2016	surgical removal	ND	ND	ND	+	+	+	-	+	ND
	Kobayashi R *et al* 2017	surgical removal	+	ND	ND	+	ND	ND	ND	ND	ND
	Jung O *et al* 2010	artery ligation	ND	+	ND	+	ND	ND	ND	ND	ND

(-) no significant difference or (+) significant difference between 5/6 Nx and control mice; (ND) not determined.

FIGURES and LEGENDS

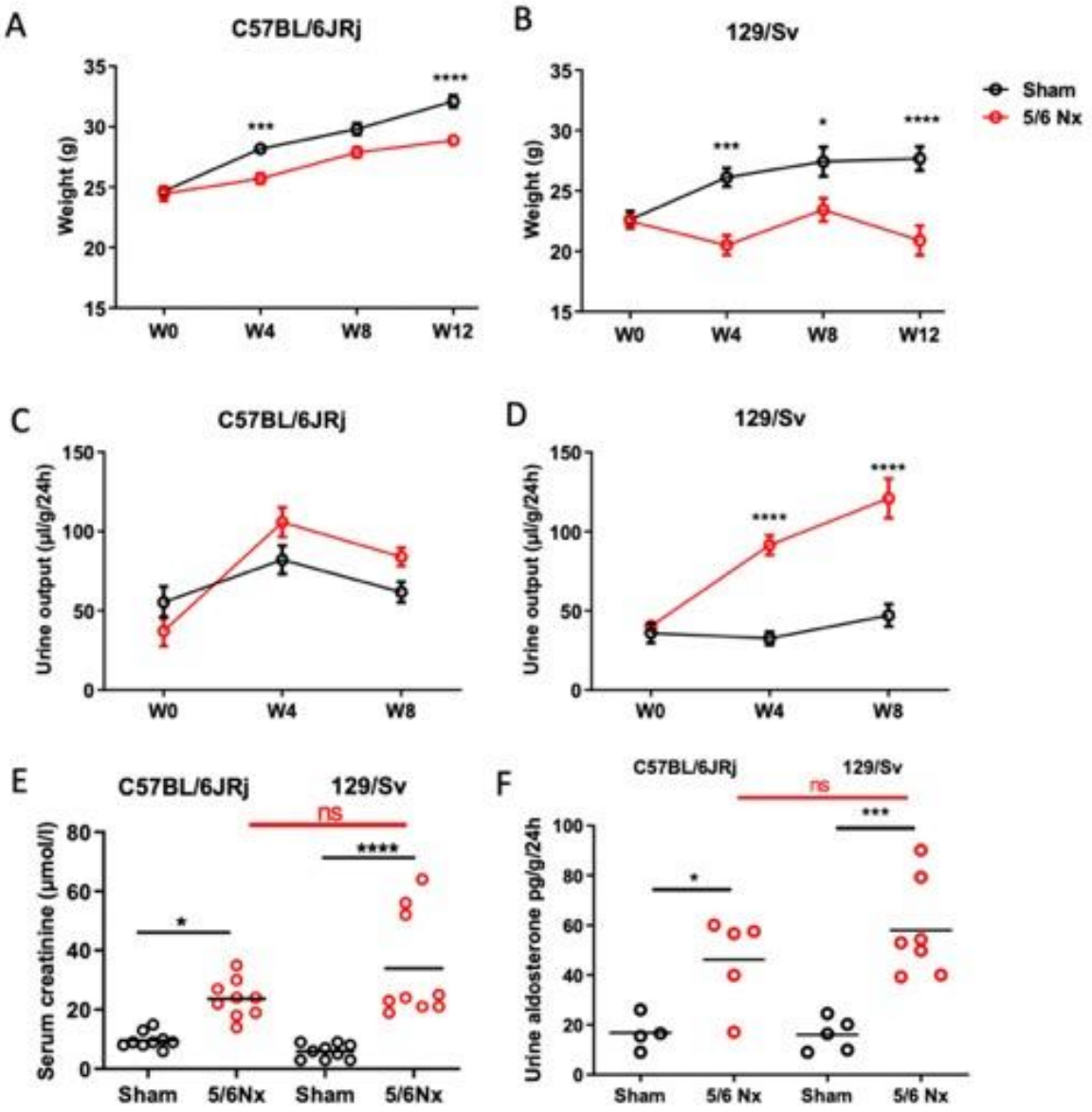


Figure 1. Evolution of body weight (A, B) and urine output (C, D) from week 0 (W0; 5/6 Nx) to W12 (sacrifice) in sham-operated and 5/6 Nx C57BL/6JRj (A, C) and 129/Sv (B, D) mice (n= 10 per group). *p<0.05: sham *vs.* 5/6 Nx, **p<0.01: sham *vs.* 5/6 Nx , ***p<0.001 : *vs.* 5/6 Nx. Plasma creatinine at week 12 (E) and aldosteronuria (F) in sham-operated and 5/6 Nx C57BL/6JRj and 129/SV mice (n=8-9 per group). *p<0.05: sham *vs* 5/6 Nx, ***p<0.001: sham *vs* 5/6 Nx.

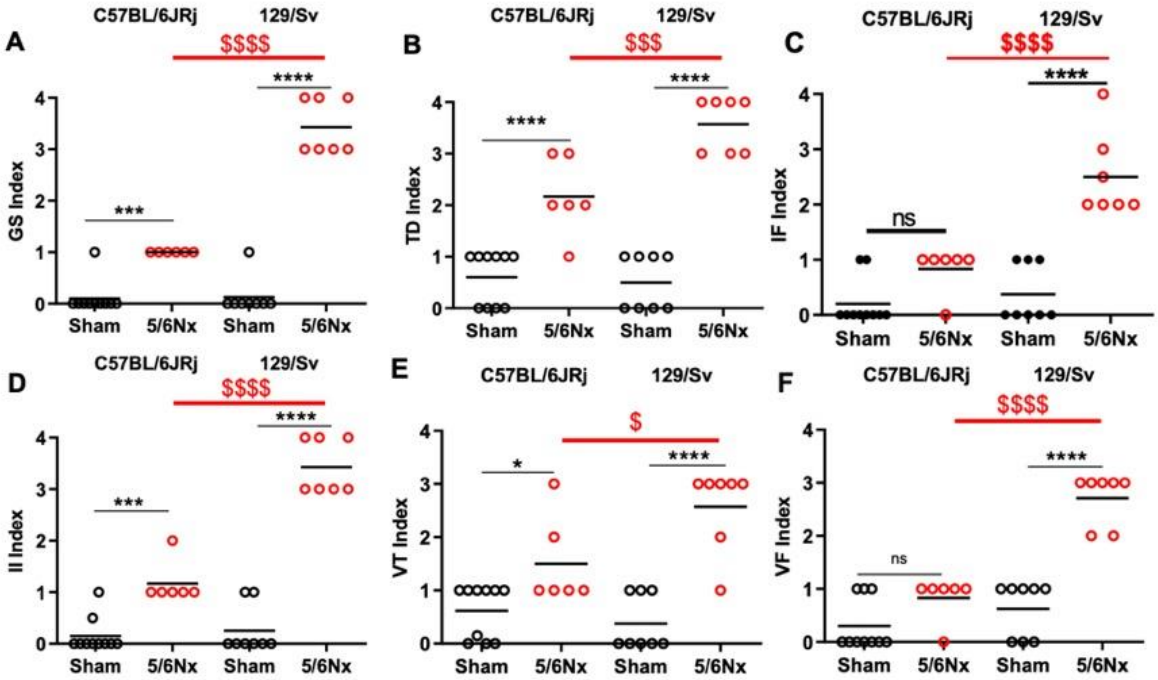


Figure 2. Scoring of kidney lesions 12 weeks after surgery in sham-operated and 5/6 Nx C57BL/6JRj and 129/Sv mice (n=6-10 per group) . (A) Glomerular sclerosis (GS) lesions, (B) Tubular damage (TD) lesions, (C) Interstitial fibrosis (IF) lesions, (D) Interstitial inflammation (II) lesions, (E) Vascular thickening (VT) lesions, (F) Vascular fibrosis (VF) lesions. *** $p<0.001$: sham *vs* 5/6 Nx, $^{\$}p<0.05$: 5/6 Nx (129/Sv) *vs.* 5/6 Nx (C57BL/6JRj), $^{\$\$\$}p<0.001$: 5/6 Nx (129/Sv) *vs.* 5/6 Nx (C57BL/6JRj).

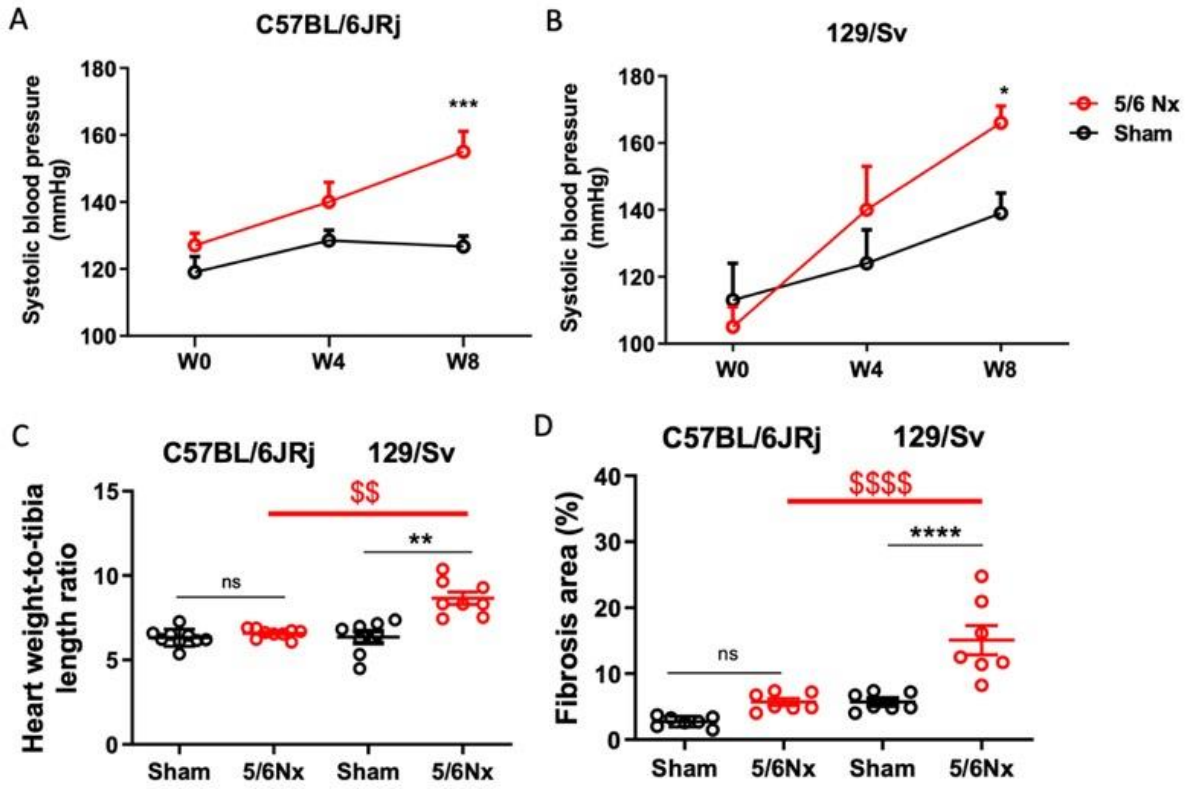


Figure 3. Evolution of systolic blood pressure from week 0 (W0; 5/6 Nx) to W12 (sacrifice) in sham-operated and 5/6 Nx C57BL/6JRj (A) and 129/SV (B) mice (n=10 per group). *p<0.05: sham *vs.* 5/6 Nx, ***p<0.001: *vs.* 5/6 Nx. Heart weight (w) to tibia length ratio (C) and morphometric quantification of left ventricular cardiac fibrosis determined 12 weeks after surgery (D) in sham-operated and 5/6 Nx C57BL/6JRj and 129/SV mice (B) (n=7-9 per group). **p<0.01: sham *vs.* 5/6 Nx, $^{\$\$}$p<0.01: 5/6 Nx (129/Sv) *vs.* 5/6 Nx (C57BL/6JRj), ***p<0.001: sham *vs.* 5/6 Nx, $^{\$\$\$}$p<0.001: 5/6 Nx (129/Sv) *vs.* 5/6 Nx (C57BL/6JRj).

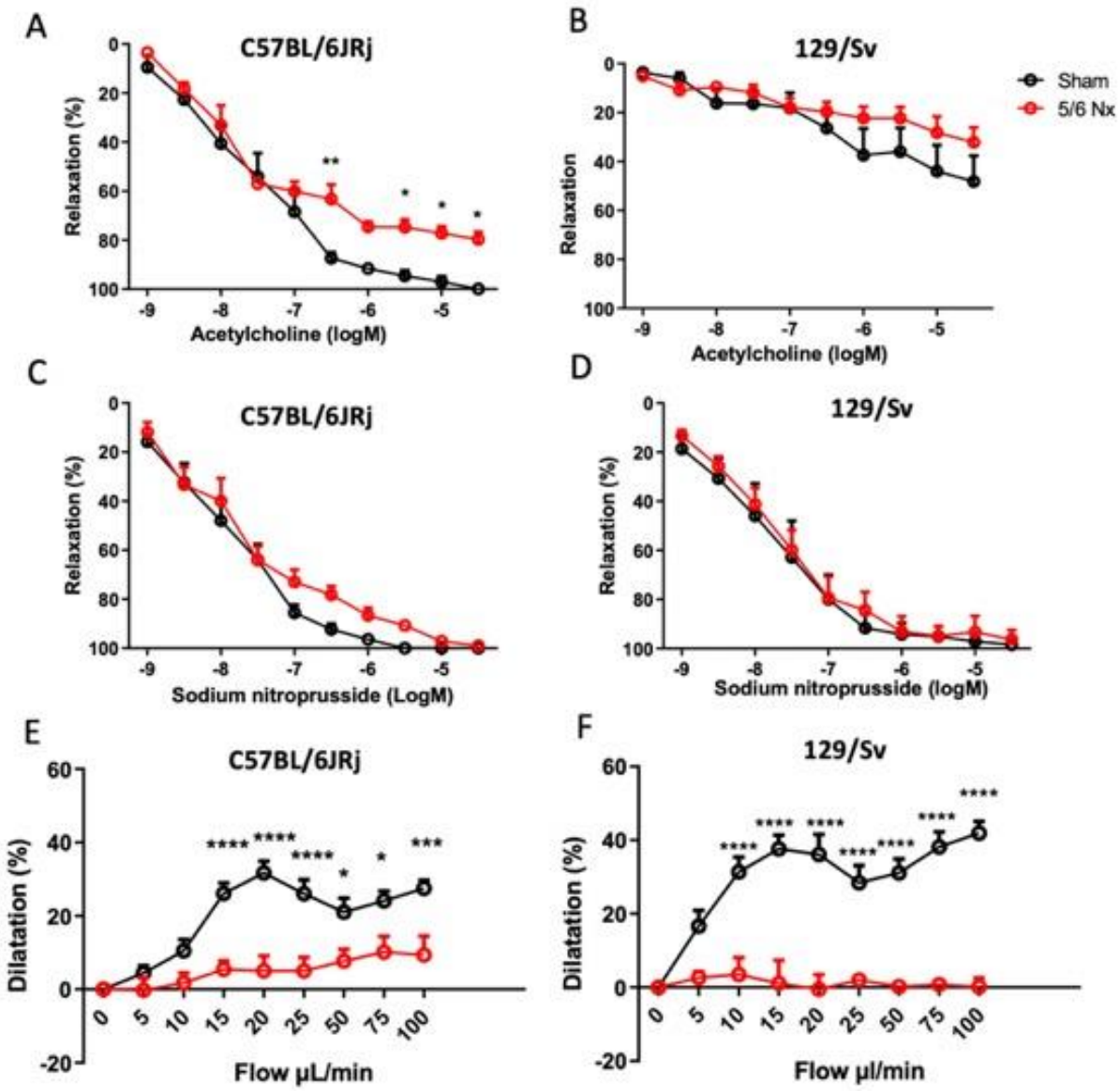
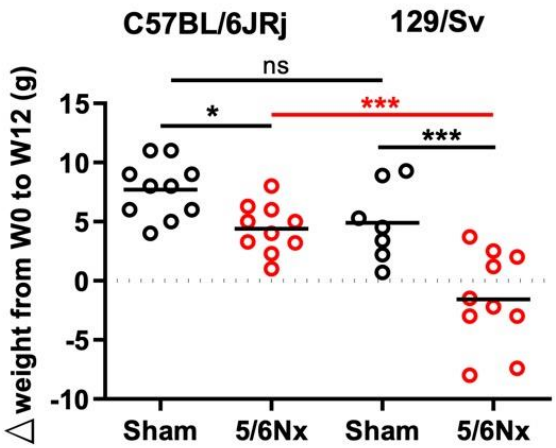
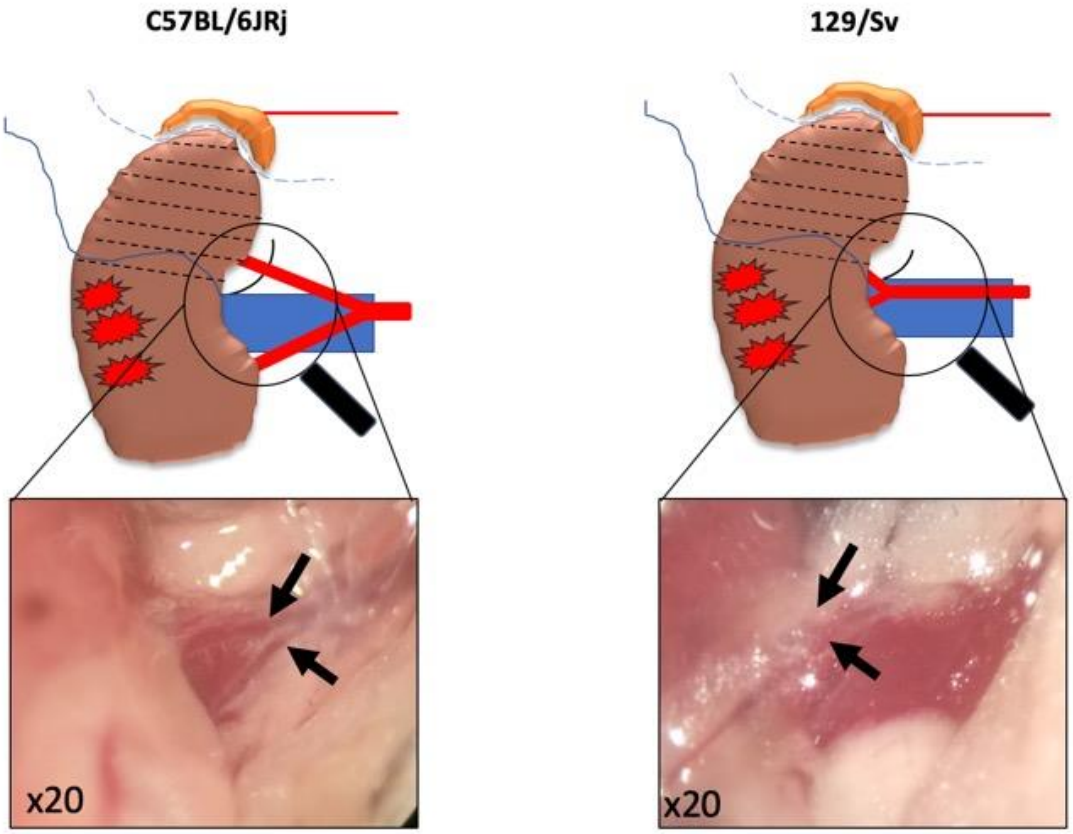


Figure 4. Relaxing responses of pre-contracted mesenteric arteries in response to acetylcholine (A, B) and sodium nitroprusside (C, D) in sham-operated and 5/6 Nx C57BL/6JRj (A, C) and 129/Sv (B, D) mice (n=7-8 per group). Dilatory responses of pre-constricted mesenteric arteries in response to stepwise increase in intraluminal flow in sham-operated and 5/6 Nx C57BL/6JRj (E) and 129/Sv (F) mice (n=7-8 per group). *p<0.05: sham *vs.* 5/6 Nx, **p<0.01: sham *vs.* 5/6 Nx, ***p<0.001: sham *vs.* 5/6 Nx.

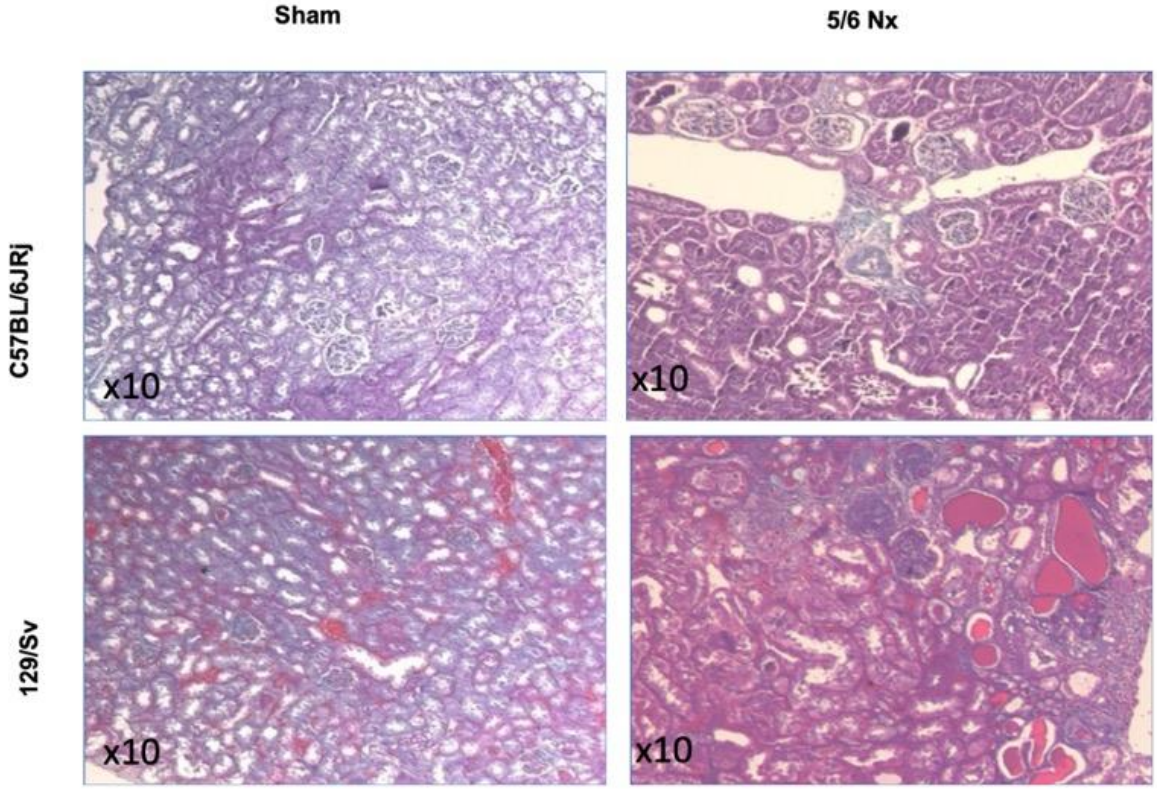
SUPPLEMENTARY FIGURES



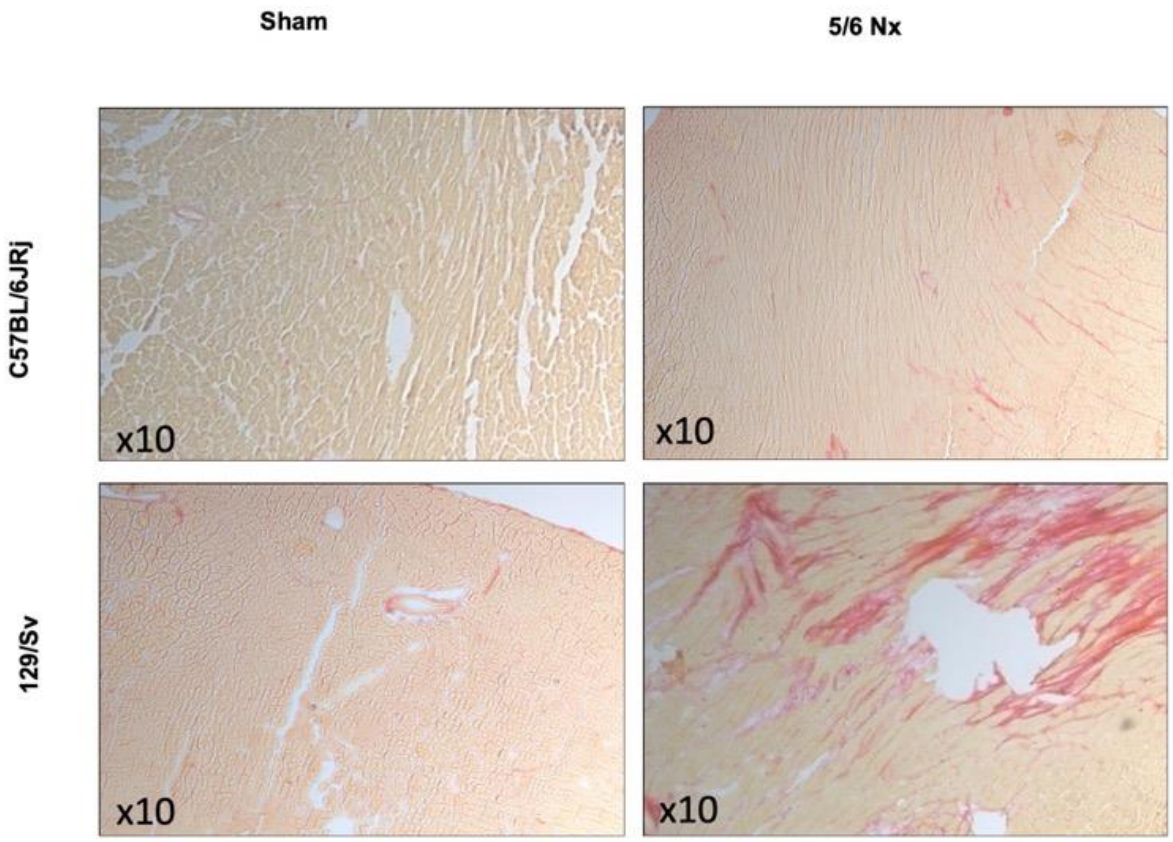
Supplementary Figure 1. Weight evolution between week 0 and week 12 in C57BL/6JRj and 129/Sv mice (n=7-10 per group). *p<0.05: sham vs. 5/6 Nx, ***p<0.001: sham vs. 5/6 Nx, ***p<0.001: 5/6 Nx C57BL/6JRj vs. 5/6 Nx 129/Sv.



Supplementary Figure 2. Schematic view and representative photography of the characteristic division of the kidney artery at the hilum in C57BL/6JRj(left) and 129/Sv (right) mice.



Supplementary Figure 3. Representative views of kidney histology after Masson staining at magnification X10 12 weeks after surgery in sham-operated and 5/6 Nx C57BL/6JRj and 129/Sv mice.



Supplementary Figure 4. Representative views of heart section after red Sirius staining at magnificence x10 12 weeks after surgery in sham-operated and 5/6 Nx C57BL/6JRj and 129/Sv mice

REFERENCES

1. Hill, N. R. et al. Global Prevalence of Chronic Kidney Disease – A Systematic Review and Meta-Analysis. PLOS ONE 11, e0158765 (2016).
2. Gori, M. et al. Association between renal function and cardiovascular structure and function in heart failure with preserved ejection fraction. Eur. Heart J. 35, 3442–3451 (2014).
3. Go, A. S., Chertow, G. M., Fan, D., McCulloch, C. E. & Hsu, C. Chronic kidney disease and the risks of death, cardiovascular events, and hospitalization. N. Engl. J. Med. 351, 1296–1305 (2004).
4. Park, M. et al. Associations between kidney function and subclinical cardiac abnormalities in CKD. J. Am. Soc. Nephrol. JASN 23, 1725–1734 (2012).
5. Yilmaz, M. I. et al. Vascular health, systemic inflammation and progressive reduction in kidney function; clinical determinants and impact on cardiovascular outcomes. Nephrol. Dial. Transplant. Off. Publ. Eur. Dial. Transpl. Assoc. - Eur. Ren. Assoc. 26, 3537–3543 (2011).
6. Kopel, T. et al. Endothelium-Dependent and -Independent Vascular Function in Advanced Chronic Kidney Disease. Clin. J. Am. Soc. Nephrol. CJASN 12, 1588–1594 (2017).
7. Schefold, J. C., Filippatos, G., Hasenfuss, G., Anker, S. D. & von Haehling, S. Heart failure and kidney dysfunction: epidemiology, mechanisms and management. Nat. Rev. Nephrol. 12, 610–623 (2016).
8. Yoshida, T., Yamashita, M., Horimai, C. & Hayashi, M. Smooth Muscle–Selective Nuclear Factor-κB Inhibition Reduces Phosphate-Induced Arterial Medial Calcification in Mice With Chronic Kidney Disease. J. Am. Heart Assoc. Cardiovasc. Cerebrovasc. Dis. 6, (2017).
9. Erdely, A., Freshour, G., Tain, Y.-L., Engels, K. & Baylis, C. DOCA/NaCl-induced chronic kidney disease: a comparison of renal nitric oxide production in resistant and susceptible rat strains. Am. J. Physiol. Renal Physiol. 292, F192-196 (2007).
10. Mulay, S. R. et al. Oxalate-induced chronic kidney disease with its uremic and cardiovascular complications in C57BL/6 mice. Am. J. Physiol. Renal Physiol. 310, F785–F795 (2016).
11. Masum, M. A., Ichii, O., Elewa, Y. H. A., Nakamura, T. & Kon, Y. Local CD34-positive capillaries decrease in mouse models of kidney disease associating with the severity of glomerular and tubulointerstitial lesions. BMC Nephrol. 18, 280 (2017).

12. Neuburg, S. et al. Genetic background influences cardiac phenotype in murine chronic kidney disease. Nephrol. Dial. Transplant. 33, 1129–1137 (2018).

13. Landau, D., London, L., Bandach, I. & Segev, Y. The hypoxia inducible factor/erythropoietin (EPO)/EPO receptor pathway is disturbed in a rat model of chronic kidney disease related anemia. PloS One 13, e0196684 (2018).

14. Gravesen, E. et al. Exogenous BMP7 in aortae of rats with chronic uremia ameliorates expression of profibrotic genes, but does not reverse established vascular calcification. PloS One 13, e0190820 (2018).

15. Yin, J. et al. Renalase attenuates hypertension, renal injury and cardiac remodelling in rats with subtotal nephrectomy. J. Cell. Mol. Med. 20, 1106–1117 (2016).

16. Yang, H.-C., Zuo, Y. & Fogo, A. B. Models of chronic kidney disease. Drug Discov. Today Dis. Models 7, 13–19 (2010).

17. Leelahavanichkul, A. et al. Angiotensin II overcomes strain-dependent resistance of rapid CKD progression in a new remnant kidney mouse model. Kidney Int. 78, 1136–1153 (2010).

18. Maupoint, J. et al. Selective Vascular Endothelial Protection Reduces Cardiac Dysfunction in Chronic Heart Failure. Circ. Heart Fail. 9, e002895 (2016).

19. Gomez, E. et al. Reduction of heart failure by pharmacological inhibition or gene deletion of protein tyrosine phosphatase 1B. J. Mol. Cell. Cardiol. 52, 1257–1264 (2012).

20. Vercauteren, M. et al. Improvement of peripheral endothelial dysfunction by protein tyrosine phosphatase inhibitors in heart failure. Circulation 114, 2498–2507 (2006).

21. Ma, L.-J. & Fogo, A. B. Model of robust induction of glomerulosclerosis in mice: importance of genetic background. Kidney Int. 64, 350–355 (2003).

22. Siedlecki, A. M., Jin, X. & Muslin, A. J. Uremic cardiac hypertrophy is reversed by rapamycin but not by lowering of blood pressure. Kidney Int. 75, 800–808 (2009).

23. Han, H. et al. p-Cresyl sulfate aggravates cardiac dysfunction associated with chronic kidney disease by enhancing apoptosis of cardiomyocytes. J. Am. Heart Assoc. 4, e001852 (2015).

24. Li, Y. et al. Angiotensin (1-7) prevent heart dysfunction and left ventricular remodeling caused by renal dysfunction in 5/6 nephrectomy mice. Hypertens. Res. Off. J. Jpn. Soc. Hypertens. 32, 369–374 (2009).

25. Winterberg, P. D., Jiang, R., Maxwell, J. T., Wang, B. & Wagner, M. B. Myocardial dysfunction occurs prior to changes in ventricular geometry in mice with chronic kidney disease (CKD). Physiol. Rep. 4, (2016).

26. Wanner, C., Amann, K. & Shoji, T. The heart and vascular system in dialysis. Lancet Lond. Engl. 388, 276–284 (2016).

27. Sato, B. et al. Relation of plasma indoxyl sulfate levels and estimated glomerular filtration rate to left ventricular diastolic dysfunction. Am. J. Cardiol. 111, 712–716 (2013).

28. Gueret, A. et al. Vascular Smooth Muscle Mineralocorticoid Receptor Contributes to Coronary and Left Ventricular Dysfunction After Myocardial Infarction. Hypertens. Dallas Tex 1979 67, 717–723 (2016).

29. Kobayashi, R. et al. An angiotensin II type 1 receptor binding molecule has a critical role in hypertension in a chronic kidney disease model. Kidney Int. 91, 1115–1125 (2017).

30. Wachtell, K. et al. Urine albumin/creatinine ratio and echocardiographic left ventricular structure and function in hypertensive patients with electrocardiographic left ventricular hypertrophy: the LIFE study. Losartan Intervention for Endpoint Reduction. Am. Heart J. 143, 319–326 (2002).

31. Chong, J., Fotheringham, J., Tomson, C. & Ellam, T. Renal albumin excretion in healthy young adults and its association with mortality risk in the US population. Nephrol. Dial. Transplant. Off. Publ. Eur. Dial. Transpl. Assoc. - Eur. Ren. Assoc. (2018). doi:10.1093/ndt/gfy242

32. Gurley, S. B. et al. Influence of genetic background on albuminuria and kidney injury in Ins2(+/C96Y) (Akita) mice. Am. J. Physiol. Renal Physiol. 298, F788-795 (2010).

33. Lerman, L. O. et al. Animal Models of Hypertension: A Scientific Statement From the American Heart Association. Hypertens. Dallas Tex 1979 73, e87–e120 (2019).

34. Luther, J. M. & Fogo, A. B. Under pressure-how to assess blood pressure in rodents: tail-cuff? Kidney Int. 96, 34–36 (2019).

35. Jung, O. et al. Inhibition of the soluble epoxide hydrolase promotes albuminuria in mice with progressive renal disease. PloS One 5, e11979 (2010).

36. Wei, J. et al. A new low-nephron CKD model with hypertension, progressive decline of renal function, and enhanced inflammation in C57BL/6 mice. Am. J. Physiol. Renal Physiol. 314, F1008–F1019 (2018).

37. Stam, F. et al. Endothelial dysfunction contributes to renal function-associated cardiovascular mortality in a population with mild renal insufficiency: the Hoorn study. J. Am. Soc. Nephrol. JASN 17, 537–545 (2006).

38. Li, T., Gua, C., Wu, B. & Chen, Y. Increased circulating trimethylamine N-oxide contributes to endothelial dysfunction in a rat model of chronic kidney disease. Biochem. Biophys. Res. Commun. 495, 2071–2077 (2018).

39. D'Apolito, M. et al. Urea-induced ROS cause endothelial dysfunction in chronic renal failure. Atherosclerosis 239, 393–400 (2015).

40. Liu, K. L. et al. Vascular function of the mesenteric artery isolated from thyroid hormone receptor-α knockout mice. J. Vasc. Res. 51, 350–359 (2014).

41. Ryan, M. J., Didion, S. P., Davis, D. R., Faraci, F. M. & Sigmund, C. D. Endothelial dysfunction and blood pressure variability in selected inbred mouse strains. Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. 22, 42–48 (2002).

42. Timmermans, S., Van Montagu, M. & Libert, C. Complete overview of protein-inactivating sequence variations in 36 sequenced mouse inbred strains. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 114, 9158–9163 (2017).

AUTHOR CONTRIBUTIONS STATEMENT

M.H., D.G. and J.B. developed the idea, conducted the research and interpreted the finding. Z.D. investigate cardiac echography. V.B. conducted biochemical analysis. P.M. and V.R. helped to interpreted the finding. All authors have reviewed the manuscript.

COMPETING INTEREST

The authors declare no competing interests.

MANUSCRIT 3

Après cette deuxième étude, nous avons par la suite étudié l'impact de l'invalidation du gène Pkd1 au niveau endothélial dans un modèle de souris génétiquement modifié, puis l'impact de l'induction d'une IRC dans ce modèle sur les conséquences cardiaques, vasculaires et rénales. Ce manuscrit préliminaire sera implémenté de données complémentaires en vue d'une soumission au premier trimestre 2020.

DEFECTIVE ENDOTHELIAL EXPRESSION OF *Pkd1* INDUCES HYPERTENSION AND CONTRIBUTES TO THE CARDIOVASCULAR PHENOTYPE OF ADPKD

DEFECTIVE ENDOTHELIAL EXPRESSION OF *Pkd1* INDUCES HYPERTENSION AND CONTRIBUTES TO THE CARDIOVASCULAR PHENOTYPE OF ADPKD

INTRODUCTION

Autosomal dominant polycystic kidney disease (ADPKD) is the most common renal genetic disease. ADPKD is generally caused by the mutation of *PKD1* or *PKD2,* encoding polycystin 1 and 2, respectively, and more rarely to the mutation of *GANAB* or *DNAJB11*. The prevalence of ADPKD is around 4 in 10 000 subjects in the general population [1,2] and ADPKD accounts for approximately 10 % of patients with end-stage renal disease. ADPKD is characterized by the onset and growth of multiple renal cysts, which progressively impair kidney function. Extra renal involvement of ADPKD is dominated by hepatic and cardiovascular (CV) manifestations. In patients with ADPKD, CV morbidity and mortality are related both to the non-specific CV consequences of chronic kidney disease (CKD), and to disorders of the heart and vasculature

specifically induced by the genetic disorder. The CV phenotype of patients with ADPKD is mainly characterized by an increased prevalence of arterial hypertension, left ventricular hypertrophy (LVH), arterial aneurysms and heart valvular anomalies [3]. Patients with ADPKD also present in the early stages of the disease endothelial dysfunction, intima-media thickening, vascular stiffening, and mildly impaired CV adaptation to exercise [3–5]. CV morbidity and mortality in ADPKD has tended to decrease as the result of the improvement in the overall management of these patients [6]. However, the pathophysiology of the CV manifestations of ADPKD remains poorly understood and targeted therapeutic approaches are lacking. Similar to tubular epithelial cells, endothelial cells express polycystin 1 and 2. The polycystin complex is particularly expressed at the base of the primary cilium, where it is believed to play a central role in the mechanotransduction of extracellular urinary/hemodynamic stimuli. To determine whether the endothelial consequences of polycystin deficiency play a central role in the CV manifestations of ADPKD we studied the CV and renal impact of endothelial-specific deletion of *Pkd1* both at baseline and in a model of CKD induced by subtotal nephrectomy.

MATERIAL AND METHODS

Mice

Endothelial-specific knock-out of *Pkd1* was generated using an inducible cre-loxP recombination system, on a C57BL/6J genetic background. *Pkd1* transgenic mice (*Pkd1*$^{lox/lox}$) were provided by Prof. Dorien JM Peters (Leiden University, Leiden, The Netherlands)[7]. The *Pkd1*$^{lox2-11}$ allele contains 2 *LoxP* sites inserted in introns 1 and 11. Tamoxifen inducible *cre/ERT2* driven by the *Cdh5* promoter (*iCdh5-cre/ERT2*) were provided by Prof. Stephane Germain (College de France, Paris, France)[8]. We crossed *iCdh5-cre/ERT2* mice with the *Pkd1*$^{lox/lox}$ mice to obtain *iCdh5-cre/ERT2-Pkd1*$^{lox/lox}$. Genotype was determined by PCR on tail DNA. The following primers were used: forward *Pkd1*^{lox} 5' ACCCTTCCCTGAGCCTCCAC 3', forward *Pkd1*^{del} 5' CACTGTGGTGCGGGGTTATC 3' and reverse *Pkd1*$^{lox\ and\ del}$ 5' CCACAGGGGAAGCCATCATA 3'. We obtained 3 bands: 250bp (*Pkd1* wild-type allele), 296bp (*Pkd1*^{lox} allele) and 366 bp (*Pkd1*^{del} allele). The following primers were used for the detection of *iCdh5-cre/ERT2* transgene: forward *iCdh5-cre/ERT2* 5' AACAGCATTGCTGTCACTTGGTC 3', reverse *iCdh5-cre/ERT2* 5' ATTACCGGTCGATGCAACGAGTG 3'.

Cre recombinase activity was induced at 7 days of birth by intraperitoneal injection of nursing mice with 1 mg of tamoxifen for 5 days [9,10] (Tamoxifen solution: 10mg/ml dissolved in 90% of corn oil and 10% of ethanol (Sigma Aldrich)). In addition, all mice were injected intraperitoneally with a booster dose of 1 mg of tamoxifen on days 45 and 47 after birth.

To identify the expression of the *cre* recombinase we used *Rosa 26-tomato* mice provided by Dr. Nicolas Guerrout (Rouen University, Rouen, France). Genotyping was performed with the following probes: forward *R26R-tomato* 5' CTG TTC CTG TAC GGC ATG G 3', reverse *R26R-tomato* 5' GGC ATT AAA GCA GCG TAT CC 3', forward *R26R-wild-type* 5' AAG

GGA GCT GCA GTG GAG TA 3', reverse *R26R-wild-type* 5' CCG AAA ATC TGT GGG AAG TC 3'. *iCdh5-cre/ERT2* mice were crossed with *26R-tomato* mice. To investigate endothelial *cre* activation, we sacrificed *iCdh5-cre/ERT2-26R-tomato* mice 6 months after birth. Heart, kidney and thoracic aorta were harvested, fixed for 24 hours in 4% formaldehyde and embedded in paraffin. Three-µm slices were stained with anti-podocalyxin antibody (AF-1556, R&D systems).

We studied homozygous *iCdh5-cre/ERT2-Pkd1*$^{del/del}$ and *Pkd1*$^{lox/lox}$ male mice. All animals studied were identically exposed to tamoxifen. Experiments were performed in accordance with the standards and ethical rules, and with approval by the national animal ethics committee (CENOMEXA C2EA-54).

Experimental chronic kidney disease

Subtotal nephrectomy (5/6 Nx) was performed by a single experienced operator in order to ensure reproducibility. Briefly, mice were anaesthetized by intraperitoneal injection of ketamine (100 mg/kg) (Ketamine® 1000, Virbac France) + Xylazine (10 mg/kg) (Rompun® 2%, Bayer France). After shaving and disinfection with povidone (10% Betadine® dermal, Meda), a left laparotomy was performed to expose the left kidney. First, in order to preserve the adrenal gland, it was separated from the left kidney without harming its vascularization, followed by dissection of the perihilar adipose tissue. After detecting the bifurcation of the kidney artery at the hilum, using a non-absorbable polypropylene 8-0 thread, 6.5-mm needle (Prolene® 8-0, Ethicon), the upper limb of the kidney artery was ligated and verified by the subsequent homogeneous discoloration of the upper half of the left kidney. Then, using a cauterizer (Thermal Cautery Unit®, Geiger), the lower kidney pole was cauterized with an estimated depth of 1 mm, avoiding the hilum, and then sutured using a non-absorbable 4-0 polyamide thread (Ethilon® 4-0, Ethicon). The entire surgical procedure was performed under

a binocular magnifying glass (magnification x2). One week after the left partial nephrectomy, a total right nephrectomy was performed following the same steps described above, excepted that the hilum which was fully ligated and the right kidney removed. Control groups were subjected to a sham operation, undergoing a simple laparotomy. The animals received post-operative analgesia consisting in a subcutaneous injection of buprenorphine (0.05 mg/kg) (Buprecare®, Axience).

Blood pressure

Invasive and non-invasive measurements of systolic blood pressure (SBP) were performed. For invasive measurements, mice were anaesthetized with 2% isoflurane and the right carotid artery was cannulated with a micromanometer-tipped catheter (SPR 407, Millar Instruments, USA). Arterial blood pressure was recorded for 30 min after mice awakening. Non-invasive measurements of systolic blood pressure were performed by tail-cuff plethysmography (CODA, Kent Scientific Corporation) in conscious and trained mice, and consisted in 2 series of 10 cycles of measurements. All measurements were performed in the 4th month after birth.

Blood and urine parameters

Urine was collected over 24 hours in metabolic cages in the 4th month after birth. Urinary albumin and aldosterone were measured by ELISA (ab108791 and ab 136933 respectively, Abcam). Sodium, potassium and urea excretion were quantified using standard procedures and osmolarity was calculated as urea + [(sodium + potassium) x 2].

At sacrifice blood samples were collected and centrifuged. Plasma creatinine concentration was monitored by enzymatic method (CREP2, Roche Diagnostics).

Cardiac function and dimensions

In mice anesthetized with isoflurane (1 to 2%), LV dimensions and function were assessed at 5th month of birth, using a Vivid 7 ultrasound device (GE medical). The heart was imaged in the two-dimensional mode in the parasternal short-axis view. Ejection fraction (EF) was calculated from the LV cross-sectional area as EF (%) = ((LVDA – LVSA)/LVDA) x 100 where LVDA and LVSA are LV diastolic and systolic area, estimated from end-diastolic and end-systolic diameter (EDD and ESD). In addition, a pulsed Doppler of the LV outflow was performed to obtain heart rate (HR). Doppler measurements were also made at the tip of the mitral leaflets for diastolic filling profiles in the apical four-chamber view, allowing to determine peak early (E) and late (A) mitral inflow velocities, and calculation of the E/A ratio, as index of LV diastolic function.

Vascular function

Endothelial function was first assessed on small vessel myograph and arteriograph, as described previously[12,13]. After blood sampling, the mesentery was removed and placed in cold oxygenated Krebs buffer. A 1.5-2.0 mm segment of first order of mesenteric resistance artery segment was mounted on a myograph (DMT, Aarhus, Denmark). After normalization, endothelium-dependent relaxation to acetylcholine (Ach: 10^{-9} to 3.10^{-5} mol/L) and endothelium-independent relaxation to sodium nitroprusside (SNP: 10^{-9} to 3.10^{-5} mol/L) were performed in segments pre-contracted with phenylephrine (Phe: 10^{-5} mol/L). A 2-3 mm segment of third mesenteric resistance artery segment was mounted on an arteriograph (DMT, Denmark). The dilatory response to stepwise increases in intraluminal flow (from 3 to 100 μL/min) was assessed in vessels pre-constricted with Phe (10^{-5} mol/L). Only vessels which increased their constriction by more than 40% with Phe were included in the experiments.

Kidney and heart histology

The left kidney was removed at sacrifice. Kidneys were harvested and decapsulated. Briefly, the kidneys were fixed for 24 hours in 4% formalin and embedded in paraffin after conventional processing. Three-µm slices were thereafter stained with Masson's trichrome solution. The slides were independently examined on a blinded basis, using a 0 to 4 injury scale for interstitial inflammation, interstitial fibrosis, vascular thickening and glomerulosclerosis at magnification x20 (0: no damage; 1: <25% of kidney damaged; 2: 25-50% of kidney damaged; 3: 50-75% of kidney damaged; 4: 75-100% of kidney damaged). Tubular lesions were analyzed at magnification x10. Vascular lesions were analyzed at magnification x40. In 5/6 Nx mice, the upper half of the kidney was not analyzed since it was ischemic. The heart was harvested, weighed and a standardized section of the left ventricle was snap-frozen for subsequent determination of LV fibrosis, using 8-µm thick histological slices stained with Sirius Red. For each heart, 12-15 consecutive images were taken at x10 magnification. Fibrosis area was determined by blinded automated morphometric analysis and expressed as a mean percentage of the total area analyzed (Image J software).

Real time quantitative Polymerase Chain Reaction (RTqPCR)

Total mRNA was extracted from left ventricule (LV) tissue with TRIzol reagent (Gibco Life Science). RTqPCR was assessed with a light cycler (Roche, Basel, Switzerland) using SYBR green I. Primer sequences were described in table 1:

Statistical analyses

Statistical analyses were performed with Prism software (GraphPad Prism 8.0.2.263). Data were expressed as mean values ± SEM. The normality of the data and homogeneity of variances were respectively assessed by Shapiro-Wilk and Bartlett tests. Differences between groups were analyzed by one-way ANOVA test, followed by Bonferroni multiple comparison post-test, or Kruskal-Wallis test followed by a Dunn multiple comparison post-test, as appropriate. Differences between groups for quantitative variables measured over time were analyzed by two-way ANOVA test with group and time as factors, followed by Bonferroni multiple comparison post-test. Survival curves were analyzed using Log-rank (Mantel-Cox) test. All p values were two-tailed with statistical significance indicated by a value of $p < 0.05$.

RESULTS

Characterization of endothelium-specific deletion of *Pkd1* in iCdh5-cre-*Pkd1*$^{del/del}$ mice

Genotyping for *Cdh5*-cre, *Pkd1* wild-type, *Pkd1*lox and *Pkd1*del alleles showed expression of *Cdh5*-cre in KO mice, while no expression was observed in control mice. Two bands (*Pkd1*lox and *Pkd1*del alleles) were present in iCdh5-cre-*Pkd1*$^{del/del}$ mice while only 1 band (*Pkd1*lox) was observed in control mice (Fig 1A). Confocal imaging of the heart, kidney and arteries showed Tomato expression in the endothelium (colocalization with Podocalyxin) in *iCdh5*-cre*/ERT2-26R-tomato* mice (Fig 1B). No Tomato expression was observed in non-endothelial cells confirming endothelium-specific Cre expression. RT-qPCR of *Pkd1* in endothelial cells isolated from the heart by magnetic labelling confirmed the absence of significant *Pkd1* mRNA in CD31+ cells in *iCdh5*-cre-*Pkd1*$^{del/del}$ mice (Fig 1C).

No difference of survival, tibia length at sacrifice or body weight evolution was observed between *Pkd1*$^{lox/lox}$ and iCdh5-cre-*Pkd1*$^{del/del}$ (at 2 months: 22±1 *vs.* 22±1 g, p=ns, and at sacrifice: 27±1 *vs.* 27±1 g, p=ns) (Fig S1).

Deletion of *Pkd1* in endothelial cells induces arterial hypertension in the absence of significant kidney disease

Non-invasive systolic blood pressure was significantly increased in iCdh5-cre-*Pkd1*$^{del/del}$ (at 4 months: 129±4 in *Pkd1*$^{lox/lox}$ *vs.* 145±3 mmHg in iCdh5-cre-*Pkd1*$^{del/del}$, p=0.0054) (Fig 2A). Invasive systolic blood pressure confirmed these results (at 4 months: 58±4 in *Pkd1*$^{lox/lox}$ *vs.* 65±2 mmHg in iCdh5-cre-*Pkd1*$^{del/del}$, p=0.0095) (Fig 2B). No difference was observed in 24-h

urine aldosterone excretion between groups, suggesting that hypertension was independent of renin angiotensin aldosterone system activation (Fig 2C).

At sacrifice, plasma creatinine (9±1 *vs.* 8±1 µmol/l, p=ns), blood urea nitrogen and kidney weight were not significantly different between *Pkd1*$^{lox/lox}$ and iCdh5-cre-*Pkd1*$^{del/del}$ mice (Fig 3). In addition, no significant difference was shown in 24h urine volume (74±7 µl/g/24h in *Pkd1*$^{lox/lox}$ *vs.* 92±8 µl/g/24h in iCdh5-cre-*Pkd1*$^{del/del}$, p=ns), urine albumin excretion, urine osmolarity and plasma Na (Fig 4). Kidney histology revealed no significant difference between groups (Tab 1).

Deletion of endothelial *Pkd1* impairs vascular function in resistance arteries

To investigate whether hypertension in iCdh5-cre-*Pkd1*$^{del/del}$ may be related to primary functional alterations of the vasculature, *ex vivo* analyses were performed on resistance arteries. Impaired flow-mediated dilatation of mesenteric arteries was demonstrated in iCdh5-cre-*Pkd1*$^{del/del}$ compared to *Pkd1*$^{lox/lox}$ mice (Fig 5A). Vascular dysfunction of resistance arteries in iCdh5-cre-*Pkd1*$^{del/del}$ mice was further shown by the impaired vasorelaxation to acetylcholine (Fig 5B). A mildly decreased vasorelaxation to SNP was also observed in iCdh5-cre-*Pkd1*$^{del/del}$ mice (Fig 5C). Vascular wall thickness was increased in iCdh5-cre-*Pkd1*$^{del/del}$ mice (21±1 in *Pkd1*$^{lox/lox}$ *vs.* 25±1 µm, p=0.018) while external diameter was similar in both groups (286±11 in *Pkd1*$^{lox/lox}$ *vs.* 279±7 µm, in iCdh5-cre-*Pkd1*$^{del/del}$ p=ns) (Fig S2).

Deletion of endothelial *Pkd1* does not induce significant heart hypertrophy or dysfunction in the absence of kidney disease

At sacrifice, no difference was shown in heart weight (112±4 mg in *Pkd1*$^{lox/lox}$ *vs.* 111±3 mg in iCdh5-cre-*Pkd1*$^{del/del}$ mice, p=ns) (Fig 6). Echocardiographic investigation of systolic or diastolic heart function found no significant difference between *Pkd1*$^{lox/lox}$ and iCdh5-cre-*Pkd1*$^{del/del}$ mice (Tab 2). However, BNP mRNA expression presented a significant 2.25-fold increase in iCdh5-cre-*Pkd1*$^{del/del}$ mice compared to *Pkd1*$^{lox/lox}$ counterparts.

Deletion of *Pkd1* in endothelial cells impacts the consequences of 5/6 nephrectomy on kidney function and histology

After 5/6 Nx no difference of survival or body weight evolution was observed between *Pkd1*$^{lox/lox}$ and iCdh5-cre-*Pkd1*$^{del/del}$ mice (Fig S1C and D). At sacrifice, plasma creatinine and blood urea nitrogen were both significantly lower in iCdh5-cre-*Pkd1*$^{del/del}$ compared to *Pkd1*$^{lox/lox}$ mice (Fig 3A and B), while remnant kidney weight (Fig 3C), 24h urine volume, urine albumin excretion, urine osmolarity and plasma Na did not differ between 5/6 Nx groups (Fig 4). Histological analysis of the remnant kidney showed significantly more severe glomerulosclerosis and vascular thickening in iCdh5-cre-*Pkd1*$^{del/del}$, while tubular damage and interstitial fibrosis scores were significantly lower in iCdh5-cre-*Pkd1*$^{del/del}$ compared to *Pkd1*$^{lox/lox}$ mice (Tab 1).

Mice with endothelial deletion of *Pkd1* present an aggravated cardiovascular phenotype after 5/6 nephrectomy

Even though iCdh5-cre-*Pkd1*$^{del/del}$ mice presented a milder decrease in kidney function after 5/6 Nx, cardiac hypertrophy was aggravated in this group compared to *Pkd1*$^{lox/lox}$ counterparts (112±4 mg in *Pkd1*$^{lox/lox}$ *vs.* 137±11 mg in iCdh5-cre-*Pkd1*$^{del/del}$, p=0.022) (Fig 6).

Echocardiography showed similar diastolic and systolic dysfunctions in both groups after 5/6 Nx (Tab 2). Systolic blood pressure was not different between groups after 5/6 Nx (150±8 mmHg in *Pkd1*$^{lox/lox}$ *vs.* 145±4 mmHg in iCdh5-cre-*Pkd1*$^{del/del}$, p=ns) (Fig 1A). No difference was observed in urine aldosterone excretion (Fig 1C).

Analysis of mesenteric arteries on arteriography demonstrated a major impairment in flow-mediated dilatation induced by 5/6 Nx in both groups. This vascular dysfunction was significantly aggravated in iCdh5-cre-*Pkd1*$^{del/del}$ mice (Fig 5D). Accordingly, analysis on myograph showed impaired vasorelaxation to acetylcholine in both groups, aggravated in iCdh5-cre-*Pkd1*$^{del/del}$ mice (Fig 5E), while no difference was shown in vasorelaxation to SNP (fig 5F), external diameter and vascular wall thickness (Fig S2).

DISCUSSION

This study provides the demonstration that that specific deletion of *Pkd1* in endothelial cells induces vasomotor dysfunction, hypertension and resistance artery remodelling. Furthermore, it shows that in a model of CKD, the cardiovascular consequences associated with progressive kidney disease were aggravated by the endothelial deletion of *Pkd1*.

Endothelial cells constitute the inner lining of arteries, veins and lymphatic vessels, and are a cornerstone of vascular homeostasis [14,15]. ADPKD is characterized by a broad variety of cardiac and vascular disorders, independently of the onset of CKD [3,16]. We and others have shown that patients with ADPKD present endothelial dysfunction at an early stage of the disease, even in the absence of decreased kidney function and of classical cardiovascular risk factors[4,17]. However, definite demonstration of the mechanism of these vascular disorders is not possible in patients due to the systemic nature of the genetic disease which leads to multiple potential confounders, including kidney cysts, renin angiotensin system activation and increased oxidative stress.

To resolve this issue, we generated and analysed mice with a deletion of *Pkd1* inducible after birth specifically in endothelial cells. In such an approach, the specificity of the cre reporter gene is key. iCdh5-cre has been demonstrated to be a highly reliable transgenic model to specifically target endothelial cells, as compared to *Pdgfb*-cre or *Tie2*-cre, which lack specificity since they present a leaking of the cre recombinase outside of the endothelium, especially in hematopoietic cells[8,18,19]. In this study, we demonstrated an exclusive colocalization of the cre recombinase in endothelial cells, as shown by colocalization of *Rosa 26-tomato* and podocalyxin in *iCdh5-cre/ERT2-26R-tomato* mice. Furthermore, our results

show that *iCdh5*-cre-*Pkd1*$^{del/del}$ mice present a blunted expression of Pkd1 mRNA in CD31+ cells isolated by magnetic labelling of single cells harvested from the heart.

We found that after an early induction in life, *iCdh5*-cre-*Pkd1*$^{del/del}$ mice presented no significant alteration of growth and survival. Homozygous deletion of *Pkd1* in mice results in embryonic lethality, with cysts development in the kidney, polyhydramnios, oedema and haemorrhage [20,21]. Inactivation of *Pkd1* in the postnatal period or kidney specific epithelial cell deletion of *Pkd1* induces kidney cysts and renal dysfunction [22–24]. Hassane S *et al* have shown that a transgenic model targeting a deletion of *Pkd1* in vascular smooth muscle cells with the SM22 promotor presented renal and extrarenal cysts, but as the result of the extravascular expression of the cre, and without major structural abnormality of large arteries[7]. In the same study, the authors reported that *Tie2*-cre-*Pkd1*$^{del/del}$ mice did not present identifiable abnormalities of the aorta or kidneys, but no vascular functional evaluation were performed. Accordingly, in the present study we found that endothelial deletion of *Pkd1* in *iCdh5*-cre-*Pkd1*$^{del/del}$ mice did not affect kidney structure at baseline. No cyst was observed in the kidneys 6 months after tamoxifen induction and no difference of kidney weight was found compared to *Pkd1*$^{lox/lox}$ counterparts. In animal models of ADPKD, cyst development differs depending on the genetic variation, the hetero or homozygosity and time of the induction of *Pkd1* transgene. Kraus *et al* showed in kidney specific deletion of *Pkd1* that 8 weeks after induction, mice showed only few cysts and kidney function remained normal [25]. Rogers *et al* analysed differences in the timing and magnitude of *Pkd1* deletion on severity of ADPKD in mouse model[26]. The authors found that induction in the first 5 days after birth induced cyst formation after 30 days of life. In our study, we induced mice at 5 days after birth, and sacrifice was performed at 6 months of life. The results of our study and of the study by Hassane S *et al* exclude a significant indirect contribution of endothelial *Pkd1* deletion in renal cystogenesis[7]. Moreover, in our study no decrease of kidney function was found in *iCdh5*-cre-*Pkd1*$^{del/del}$ mice, since BUN and plasma

creatinine were comparable between groups. No difference was observed in plasma sodium, urine volume, and urine osmolarity, suggesting no significant impact of endothelial deletion of *Pkd1* on urine concentration/dilution capacity.

Hypertension is a common and early manifestation in ADPKD[27–30]. However, the pathophysiology of hypertension in ADPKD is still debated, and hemodynamic and neurohormonal modifications induced in the kidneys by the progressive growth of cysts are believed to play a major role [3,31]. In this study we demonstrate that endothelial deletion of *Pkd1* alone is sufficient to cause arterial hypertension, as shown by invasive and non-invasive measurements of blood pressure. Indeed, in *iCdh5*-cre-*Pkd1*$^{del/del}$ mice hypertension occurred independently of alterations in kidney function, kidney structure and of renin angiotensin aldosterone activation. Since the endothelium is a major regulator of vasomotor tone in resistance arteries, which in turn is a key determinant of blood pressure, we investigated whether the increase in blood pressure shown in *iCdh5*-cre-*Pkd1*$^{del/del}$ mice was associated with endothelial dysfunction. We demonstrated a decrease in flow-mediated dilatation in *iCdh5*-cre-*Pkd1*$^{del/del}$ mice, consistent with findings in patients with ADPKD [4,17]. In endothelial cells, polycystin 1 and polycystin 2 are largely expressed at the base of primary cilia, which are considered as fluid shear mechanosensors. Accordingly, Nauli SM *et al* have shown impaired NO synthesis by *Pkd1* deficient endothelial cells exposed to fluid shear stress *in vitro* [32]. Vascular dysfunction was further supported by the presence of an impaired vasorelaxation to acetylcholine in iCdh5-cre-*Pkd1*$^{del/del}$ mice. A mildly decreased vasorelaxation to sodium nitroprusside was also observed, which could be related to the remodelling of the media in resistance arteries, as a possible consequence of hypertension. Vascular wall thickness was increased in iCdh5-cre-*Pkd1*$^{del/del}$ mice as compared to *Pkd1*$^{lox/lox}$ mice. Intima-media thickening is increased in patients with ADPKD and is well recognized as an independent predictor of cardiovascular events [33,34]. Taken together, our results point endothelial

dysfunction specifically due to the endothelial deficiency in *Pkd1* as a central cause of hypertension in ADPKD.

In the majority of ADPKD patients, kidney function decreases progressively with age leading to end-stage kidney disease in the fifth or sixth decade. Since CKD is, *per se*, a major cause of CV disease, isolating the role of CKD and of the specific CV disorders due to ADPKD in this context is challenging. To address this issue, we studied the consequences of subtotal nephrectomy, a non-cystic model of CKD, in iCdh5-cre-*Pkd1*$^{del/del}$ and *Pkd1*$^{lox/lox}$ mice.

After 5/6 Nx, we found that kidney function was less impaired in iCdh5-cre-*Pkd1*$^{del/del}$ mice than in control mice, as shown by lesser increases in plasma creatinine and BUN. Kidney histology after 5/6 Nx also revealed reduced tubular lesions and less interstitial fibrosis in iCdh5-cre-*Pkd1*$^{del/del}$ mice. On the contrary, glomerular sclerosis and vascular thickening were increased in iCdh5-cre-*Pkd1*$^{del/del}$ compared to *Pkd1*$^{lox/lox}$ mice after 5/6 Nx. These results may suggest that the polycystin complex is differently implicated in the regulation of endothelial functions according to the vascular bed involved. Indeed, the kidney is a highly vascularized organ which harbours a wide heterogeneity of endothelial cells, related to the specialized functions of the endothelium which vary largely from the preglomerular arterioles to the glomerulus and the peritubular capillary bed [35,36]. Whether *Pkd1* deficiency may on the one hand play a deleterious role by impairing the hemodynamic adaptation and promoting endothelial-to-mesenchymal transition, and on the other hand be beneficial by limiting inflammation and/or thrombosis and their consequences remains to be studied.

Analysis of vascular function after 5/6 Nx showed strongly impaired vasomotor function in both groups. However, even though they presented a less severe decrease in kidney function, iCdh5-cre-*Pkd1*$^{del/del}$ mice presented a larger alteration of FMD and of relaxation to acetylcholine than *Pkd1*$^{lox/lox}$ mice after 5/6 Nx, while no difference was observed in this setting

regarding endothelium-independent relaxation to SNP. Endothelial deletion of *Pkd1* therefore aggravates the vascular dysfunction classically associated with CKD. In patients with ADPKD, left ventricular hypertrophy was observed in several studies, but its mechanism remains unclear and may, beside hypertension, involve disrupted expression of polycystins in the heart [37,38]. Although heart weight was comparable between groups at baseline, 5/6 Nx induced heart hypertrophy in iCdh5-cre-*Pkd1*$^{del/del}$ mice, but not in control mice. Considering the increased expression of BNP at baseline in iCdh5-cre-*Pkd1*$^{del/del}$ mice, these results suggest that endothelial deletion of *Pkd1* may be partially implicated in the pathophysiology of LVH in ADPKD, either indirectly through an early increase in blood pressure or directly, through functional alterations of the cardiac microvasculature.

CONCLUSION

The present study provides the first *in vivo* demonstration that endothelial deletion of *Pkd1* induces vasomotor dysfunction. The evidence of increased blood pressure in iCdh5-cre-*Pkd1*$^{del/del}$ mice strongly suggests that the endothelial alterations directly related to the genetic mutation are a major cause of hypertension in ADPKD patients. Furthermore, this study shows that the cardiovascular consequences associated with progressive CKD are aggravated by the endothelial deletion of *Pkd1*. Altogether, these results establish the endothelium as a significant contributor to CV disease in ADPKD, and as a potential target for innovative therapies in this setting.

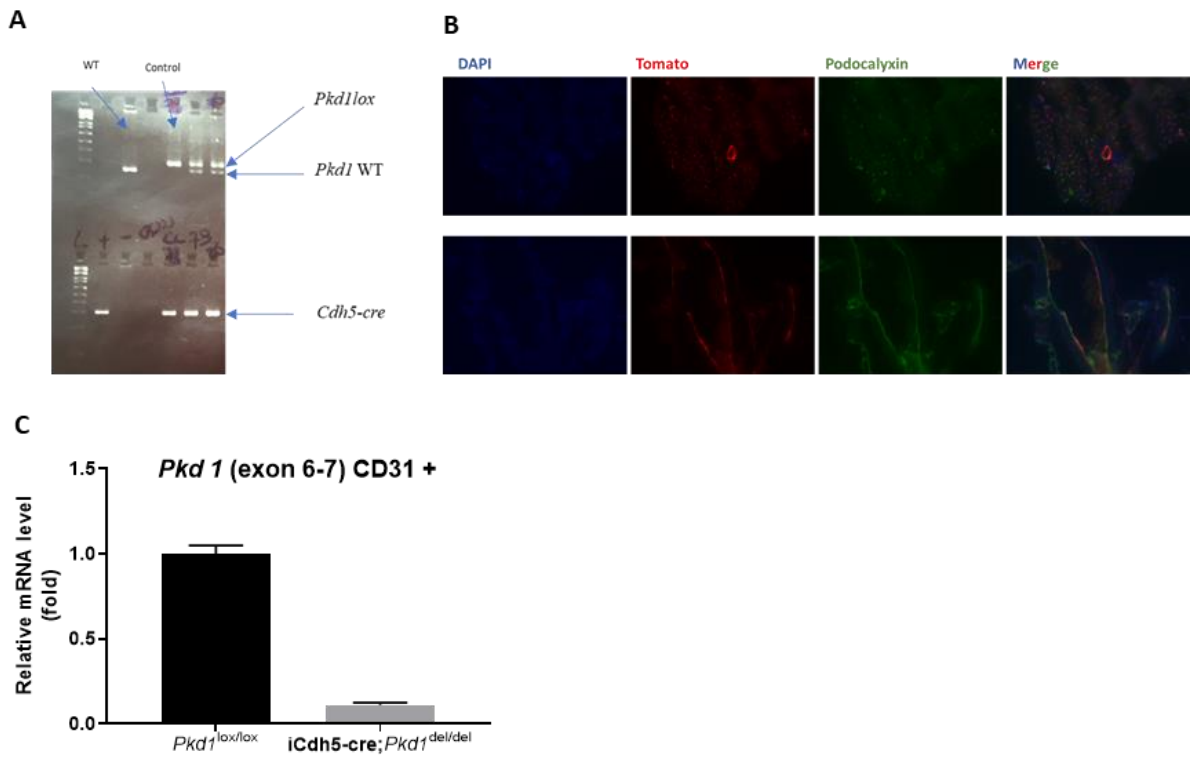


Figure 1 : Representative genotyping of alleles **(A)**. *Pkd1* WT 250 bp, *Pkd1lox* 296 bp, *Pkd1del* 366 bp, *Cdh5-cre* 300 bp. Immunohistological evidence of endothelial Rosa26*tomato* expression **(B)** colocalisation with podocalyxin in heart slice. Relative mRNA expression of *Pkd1* to mean *eEF2* and *Beta2microglobuline* ratio **(C)** in endothelial cells isolated from heart.

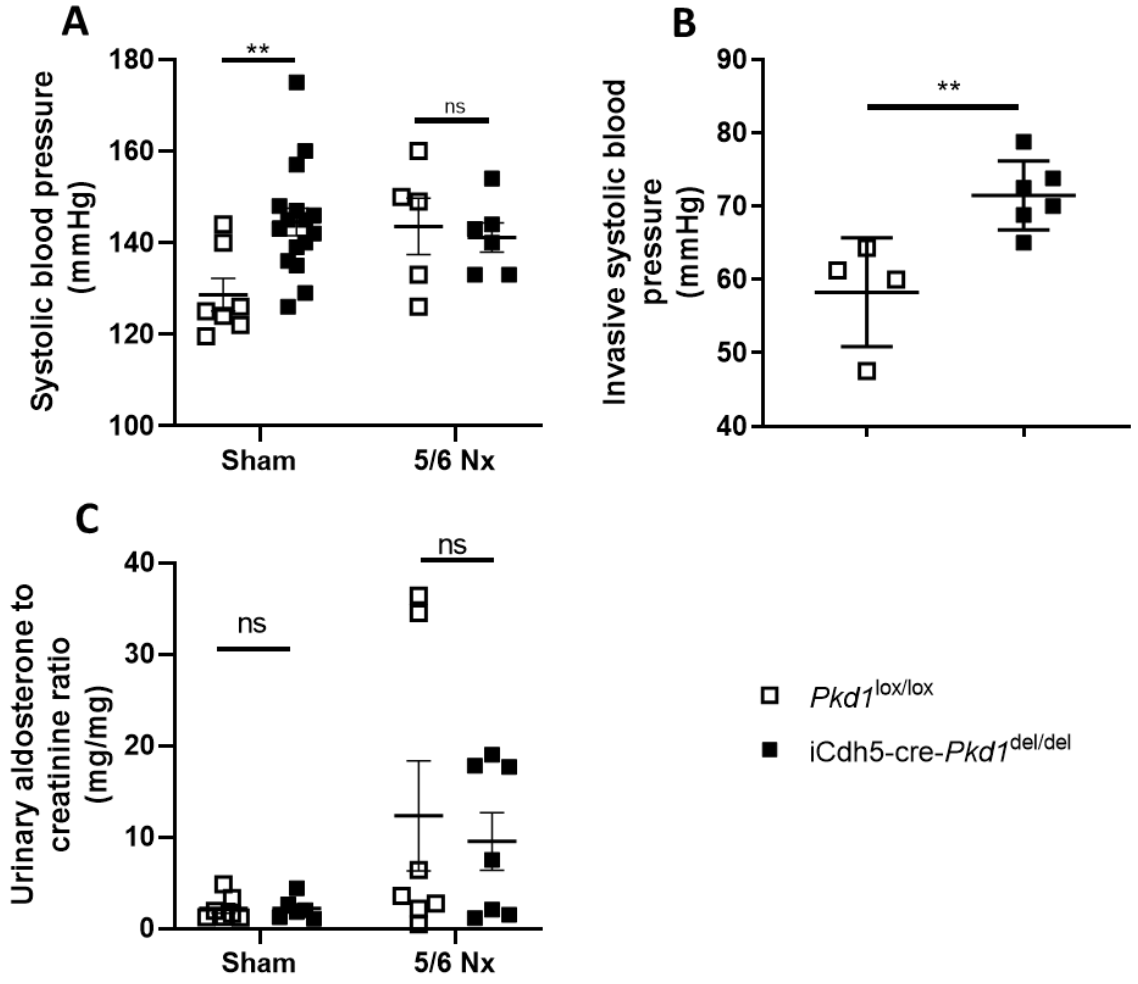


Figure 2 : Non invasive sytsolic blood pressure **(A)** in sham and 5/6 Nx mice (n= 5-15). ****<0.01** *iCdh5*-cre-*Pkd1*$^{del/del}$ *vs. Pkd1*$^{lox/lox}$. Invasive systolic blood pressure **(B)** in Sham mice (n=4-6 per group). ****<0.01** *iCdh5*-cre-*Pkd1*$^{del/del}$ *vs. Pkd1*$^{lox/lox}$. Urinary aldosterone to creatinine ratio **(C)** (n=5-7 per group). ns not significant.

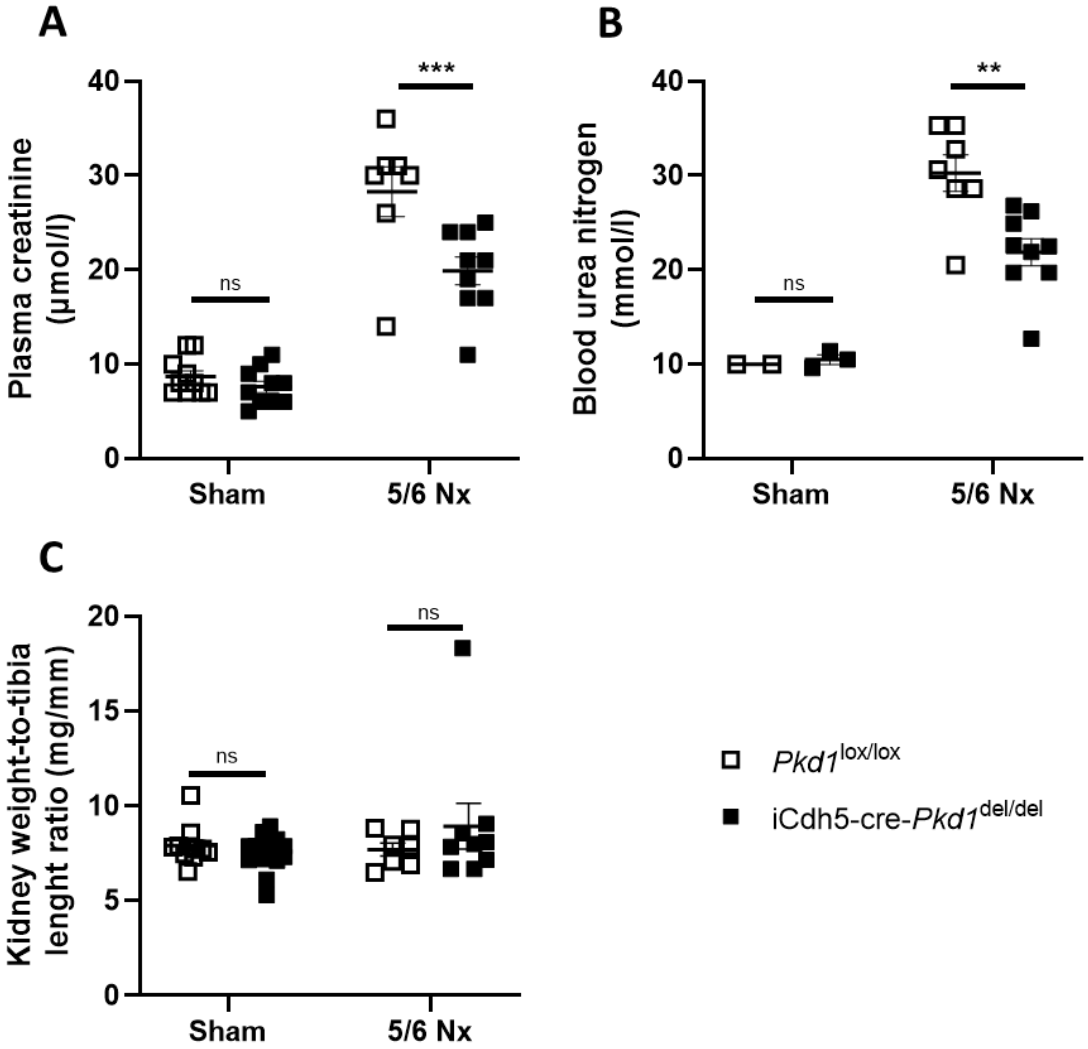


Figure 3 : Plasma creatinine at sacrifice **(A)** in sham and 5/6 Nx mice (n=7-10 per group). *** p<0.001 *iCdh5*-cre-*Pkd1*$^{del/del}$ *vs. Pkd1*$^{lox/lox}$. BUN at sacrifice **(B)** (n=2-9 per group) ****<0.01** *iCdh5*-cre-*Pkd1*$^{del/del}$ *vs. Pkd1*$^{lox/lox}$. Kidney weight to tibia length **(C)** at sacrifice (n=7-10 per group). ns not significant.

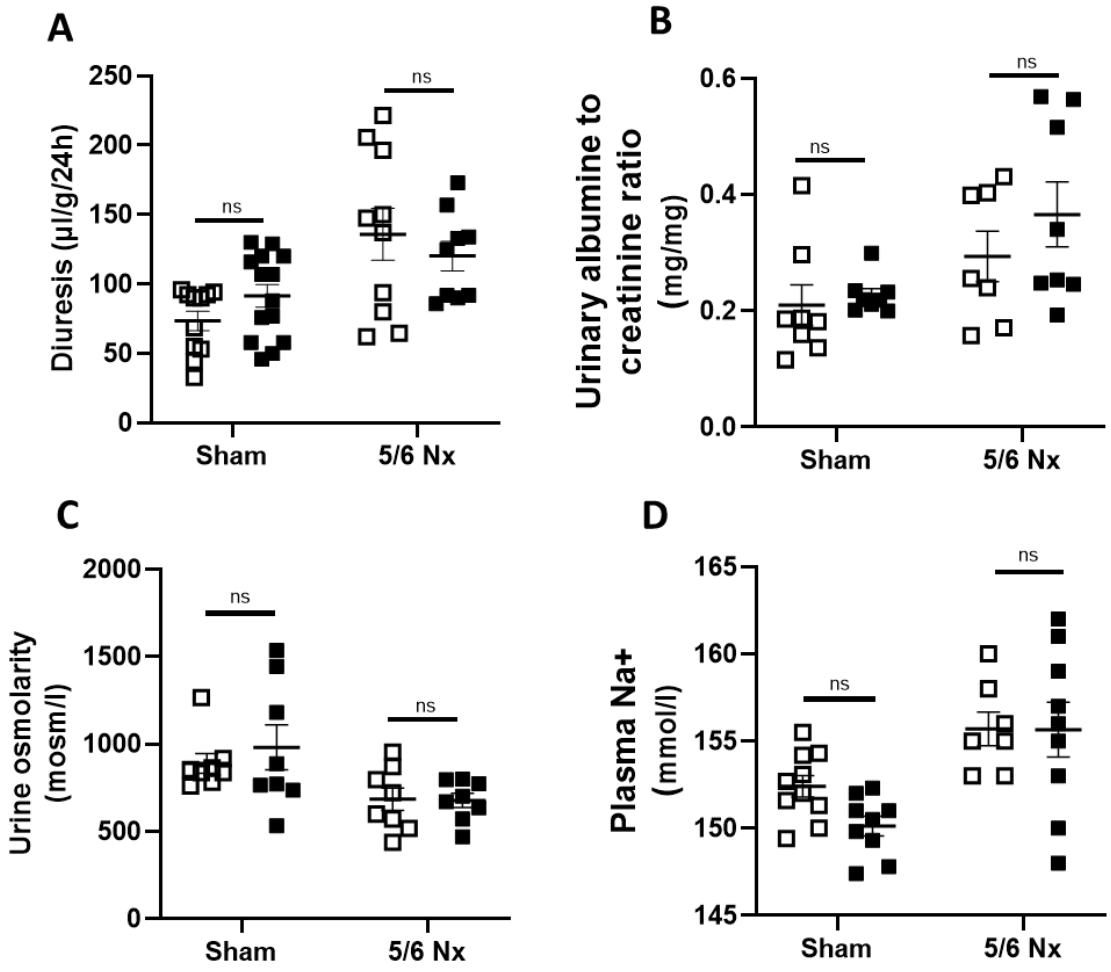


Figure 4 : Comparison of 24h diuresis (A), urinary albumin to creatinin ratio (B), urine osmolarity (C) and plasma Na^+(D) in sham and 5/6 Nx mice. (n=7-9 per group). ns not significant.

Table 1 : Scoring of kidney lesions at sacrifice in sham and 5/6 Nx mice (n=5 per group) *iCdh5*-cre-*Pkd1*$^{del/del}$ and *Pkd1*$^{lox/lox}$. ns not significant.

Renal histology		*Pkd1*$^{lox/lox}$	iCdh5-cre-*Pkd1*$^{del/del}$	p value
Glomerular sclerosis	Sham	0.3±0.1	0.3±0.1	ns
	5/6 Nx	1.8±0.2	3.2±0.2	<0.0001
Tubular damage	Sham	0.2±0.1	0.3±0.1	ns
	5/6 Nx	3.4±0.2	2.5±0.3	0.0144
Vascular thickening	Sham	0.3±0.1	0.3±0.1	ns
	5/6 Nx	1.6±0.2	2.7±0.5	0.0142
Interstitial fibrosis	Sham	0.2±0.1	0.3±0.1	ns
	5/6 Nx	2.8±0.2	1.7±0.2	0.0018
Interstitial inflammation	Sham	0.2±0.1	0.3±0.1	ns
	5/6 Nx	1.6±0.2	1.2±0.2	ns

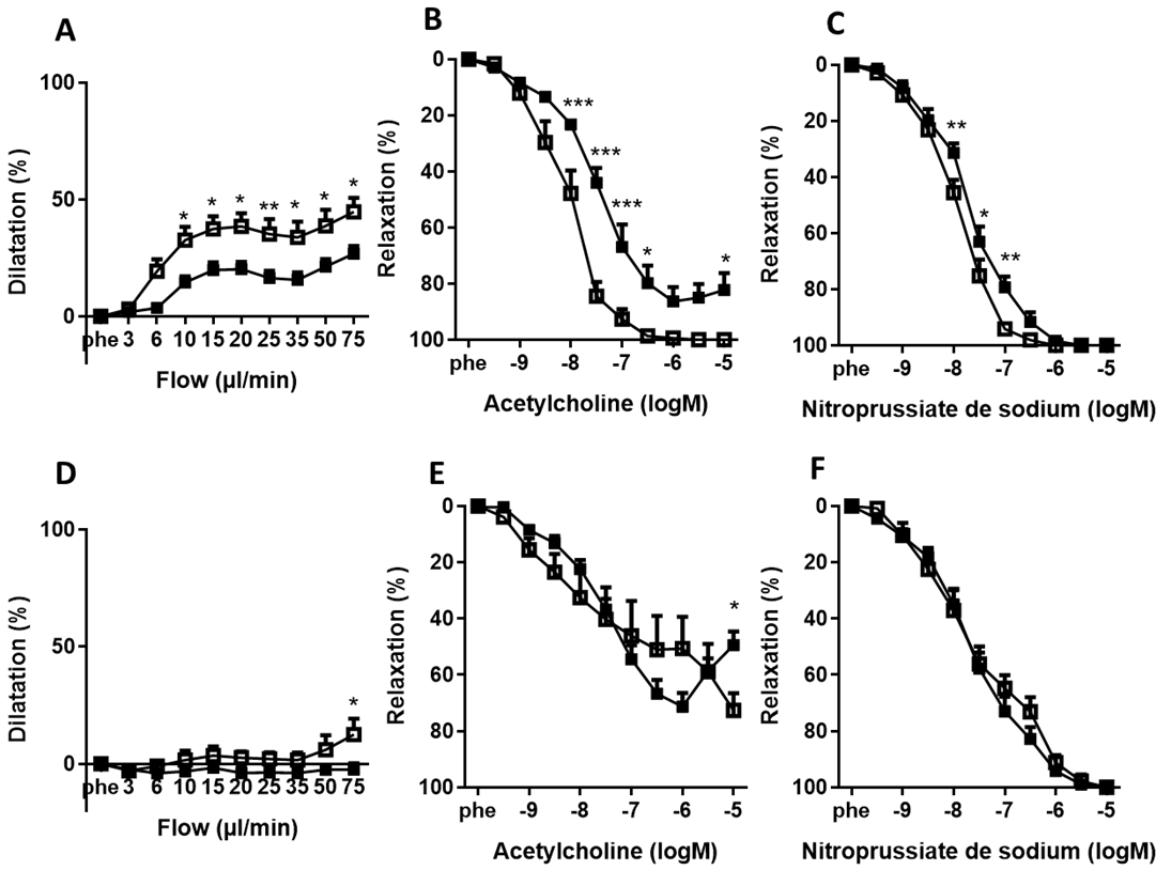


Figure 5 : FMD in mesenteric arteries of sham mice **(A)** and 5/6 Nx mice **(D).** Vasorelaxation in response to Ach in sham **(B)** and 5/6 Nx **(E)** mice. Vasorelaxation in response to SNP in sham **(C)** and 5/6 Nx mice **(F)** (n=6-11 per group). *** p<0.001 *iCdh5*-cre-*Pkd1*$^{del/del}$ *vs.* *Pkd1*$^{lox/lox}$. ** p<0.01 *iCdh5*-cre-*Pkd1*$^{del/del}$ *vs.* *Pkd1*$^{lox/lox}$. * p<0.05 *iCdh5*-cre-*Pkd1*$^{del/del}$ *vs.* *Pkd1*$^{lox/lox}$.

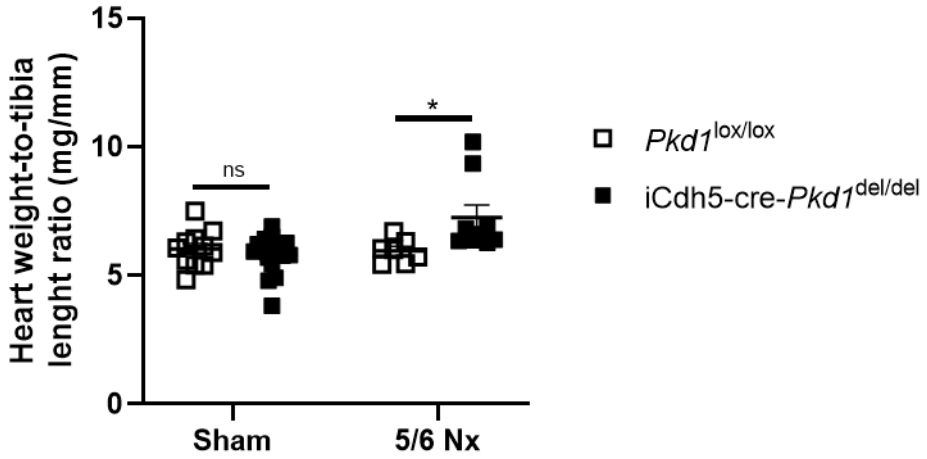
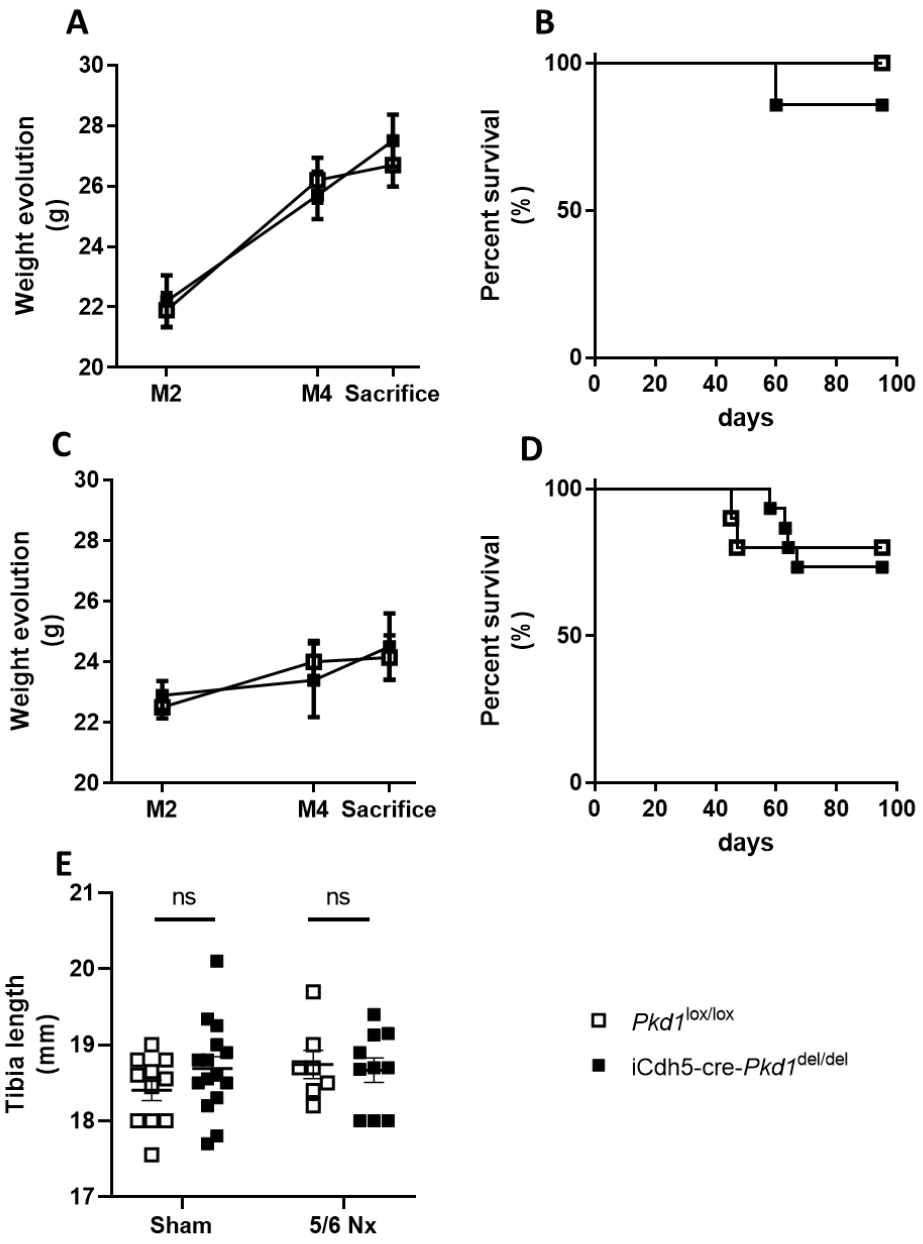


Figure 5 : Heart weight to tibia length ratio (n=7-9 per group) at sacrifice in both sham and 5/6 Nx mice. * $p<0.05$ *iCdh5*-cre-*Pkd1*$^{del/del}$ *vs. Pkd1*$^{lox/lox}$.

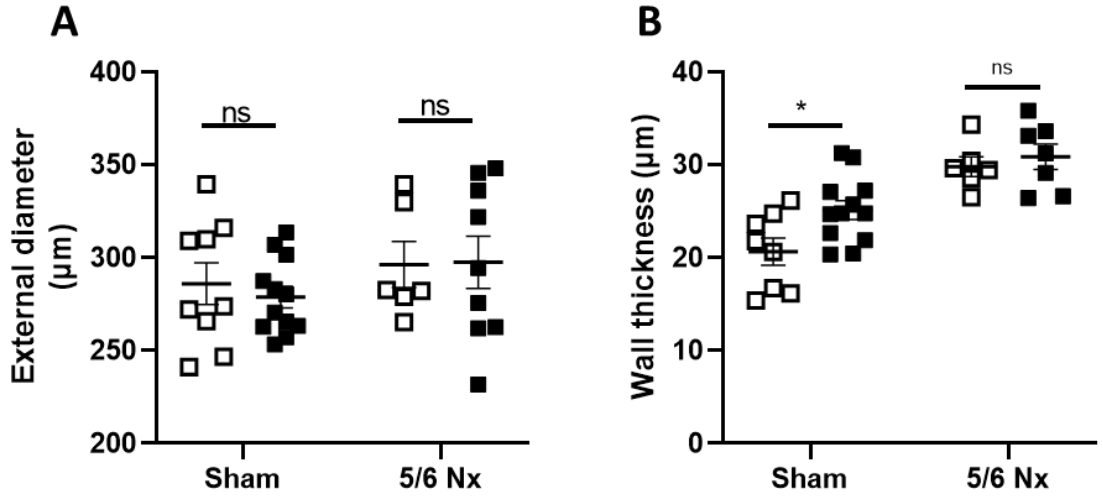
Table 2 : Echocardiography parameters at 6 months in sham and 5/6 Nx mice (n=7-9 per group). FS : fractionnal shortenning, LVEF : left ventricular ejection fraction, LVEDD : Left ventricular end diastolic diameter. ns: not significant.

Echocardiography parameters		*Pkd1*$^{lox/lox}$	iCdh5-cre-*Pkd1*$^{del/del}$	p value
FS (%)	Sham	36±1	36±1	ns
	5/6 Nx	25±2	25±2	ns
LVEF (%)	Sham	72±2	72±1	ns
	5/6 Nx	56±4	55±3	ns
Heart rate (bbm)	Sham	433±16	451±22	ns
	5/6 Nx	416±14	420±15	ns
LVEDD (mm)	Sham	3.5±0.2	3.8±0.1	ns
	5/6 Nx	3.9±0.1	4.0±0.1	ns
E/A	Sham	1.3±0.1	1.4±0.1	ns
	5/6 Nx	0.9±0.1	0.9±0.1	ns

SUPPLEMENTARY DATA



Supplementary figure 1 : Weight evolution in sham **(A)** and 5/6 Nx mice **(C).** Percent survival in sham **(B)** and 5/6 Nx **(D)** mice. Tibia length at sacrifice (E**)** (n=7-9 per group). ns : not significant



Supplementary figure 2 : External diameter **(A)** and wall thickness **(B)** of mesenteric arteries at sacrifice**.** (n=6-11 per group). * p<0.05 *iCdh5*-cre-*Pkd1*$^{del/del}$ *vs. Pkd1*$^{lox/lox}$.

Supplementary table 1: Primers sequences

gene	*5' forward 3'*	*5' reverse 3'*
Pkd1	CAGGAGCAATGTCGGACTTG	TGAGAAGCCGATCCACACAT
Pkd2	TCTACTCCGTCAGCAGTGAGGA	GCTCCACTGTACGACGCAATGA
BNP	GCCAGTCTCCAGAGCAATTC	CCTTGGTCCTTCAAGAGCTC
eEEF2	GCGAGGACAAAGACAAGGAG	GGATGCAGGGATGATGTTCT

BIBLIOGRAPHY :

1. Iglesias, C. G. *et al.* Epidemiology of adult polycystic kidney disease, Olmsted County, Minnesota: 1935-1980. *Am. J. Kidney Dis. Off. J. Natl. Kidney Found.* **2**, 630–639 (1983).

2. Willey, C. J. *et al.* Prevalence of autosomal dominant polycystic kidney disease in the European Union. *Nephrol. Dial. Transplant.* gfw240 (2016). doi:10.1093/ndt/gfw240

3. Perrone, R. D., Malek, A. M. & Watnick, T. Vascular complications in autosomal dominant polycystic kidney disease. *Nat. Rev. Nephrol.* **11**, 589–598 (2015).

4. Lorthioir, A. *et al.* Polycystin deficiency induces dopamine-reversible alterations in flow-mediated dilatation and vascular nitric oxide release in humans. *Kidney Int.* **87**, 465–472 (2015).

5. Martinez-Vea, A. *et al.* Exercise blood pressure, cardiac structure, and diastolic function in young normotensive patients with polycystic kidney disease: A prehypertensive state. *Am. J. Kidney Dis.* **44**, 216–223 (2004).

6. Spithoven, E. M. *et al.* Renal replacement therapy for autosomal dominant polycystic kidney disease (ADPKD) in Europe: prevalence and survival--an analysis of data from the ERA-EDTA Registry. *Nephrol. Dial. Transplant.* **29**, iv15–iv25 (2014).

7. Hassane, S. *et al.* Pkd1-inactivation in vascular smooth muscle cells and adaptation to hypertension. *Lab. Invest.* **91**, 24–32 (2011).

8. Pitulescu, M. E., Schmidt, I., Benedito, R. & Adams, R. H. Inducible gene targeting in the neonatal vasculature and analysis of retinal angiogenesis in mice. *Nat. Protoc.* **5**, 1518–1534 (2010).

9. Leone, D. P. *et al.* Tamoxifen-inducible glia-specific Cre mice for somatic mutagenesis in oligodendrocytes and Schwann cells. *Mol. Cell. Neurosci.* **22**, 430–440 (2003).

10. Feil, S., Valtcheva, N. & Feil, R. Inducible Cre mice. *Methods Mol. Biol. Clifton NJ* **530**, 343–363 (2009).

11. Maupoint, J. *et al.* Selective Vascular Endothelial Protection Reduces Cardiac Dysfunction in Chronic Heart Failure. *Circ. Heart Fail.* **9**, e002895 (2016).

12. Gomez, E. *et al.* Reduction of heart failure by pharmacological inhibition or gene deletion of protein tyrosine phosphatase 1B. *J. Mol. Cell. Cardiol.* **52**, 1257–1264 (2012).

13. Vercauteren, M. *et al.* Improvement of peripheral endothelial dysfunction by protein tyrosine phosphatase inhibitors in heart failure. *Circulation* **114**, 2498–2507 (2006).

14. Félétou, M. & Vanhoutte, P. M. Endothelial dysfunction: a multifaceted disorder (The Wiggers Award Lecture). *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* **291**, H985-1002 (2006).

15. Deanfield, J. E., Halcox, J. P. & Rabelink, T. J. Endothelial function and dysfunction: testing and clinical relevance. *Circulation* **115**, 1285–1295 (2007).

16. Cornec-Le Gall, E., Alam, A. & Perrone, R. D. Autosomal dominant polycystic kidney disease. *Lancet Lond. Engl.* **393**, 919–935 (2019).

17. Nowak, K. L. *et al.* Vascular Dysfunction, Oxidative Stress, and Inflammation in Autosomal Dominant Polycystic Kidney Disease. *Clin. J. Am. Soc. Nephrol. CJASN* (2018). doi:10.2215/CJN.05850518

18. Kilani, B. *et al.* Comparison of endothelial promoter efficiency and specificity in mice reveals a subset of Pdgfb-positive hematopoietic cells. *J. Thromb. Haemost.* **17**, 827–840 (2019).

19. Sörensen, I., Adams, R. H. & Gossler, A. DLL1-mediated Notch activation regulates endothelial identity in mouse fetal arteries. *Blood* **113**, 5680–5688 (2009).

20. Ahrabi, A. K. *et al.* Glomerular and proximal tubule cysts as early manifestations of Pkd1 deletion. *Nephrol. Dial. Transplant. Off. Publ. Eur. Dial. Transpl. Assoc. - Eur. Ren. Assoc.* **25**, 1067–1078 (2010).

21. Piontek, K. B. *et al.* A functional floxed allele of Pkd1 that can be conditionally inactivated in vivo. *J. Am. Soc. Nephrol. JASN* **15**, 3035–3043 (2004).

22. Yang, Y. *et al.* Interactions between Macrophages and Cyst-Lining Epithelial Cells Promote Kidney Cyst Growth in Pkd1-Deficient Mice. *J. Am. Soc. Nephrol. JASN* **29**, 2310–2325 (2018).

23. Shibazaki, S. *et al.* Cyst formation and activation of the extracellular regulated kinase pathway after kidney specific inactivation of Pkd1. *Hum. Mol. Genet.* **17**, 1505–1516 (2008).

24. Leuenroth, S. J., Bencivenga, N., Igarashi, P., Somlo, S. & Crews, C. M. Triptolide Reduces Cystogenesis in a Model of ADPKD. *J. Am. Soc. Nephrol. JASN* **19**, 1659–1662 (2008).

25. Kraus, A. *et al.* HIF-1α promotes cyst progression in a mouse model of autosomal dominant polycystic kidney disease. *Kidney Int.* **94**, 887–899 (2018).

26. Rogers, K. A. *et al.* Differences in the timing and magnitude of Pkd1 gene deletion determine the severity of polycystic kidney disease in an orthologous mouse model of ADPKD. *Physiol. Rep.* **4**, (2016).

27. Kelleher, C. L., McFann, K. K., Johnson, A. M. & Schrier, R. W. Characteristics of hypertension in young adults with autosomal dominant polycystic kidney disease compared with the general U.S. population. *Am. J. Hypertens.* **17**, 1029–1034 (2004).

28. Cadnapaphornchai, M. A., McFann, K., Strain, J. D., Masoumi, A. & Schrier, R. W. Prospective change in renal volume and function in children with ADPKD. *Clin. J. Am. Soc. Nephrol. CJASN* **4**, 820–829 (2009).

29. Massella, L. *et al.* Prevalence of Hypertension in Children with Early-Stage ADPKD. *Clin. J. Am. Soc. Nephrol. CJASN* **13**, 874–883 (2018).

30. Fick, G. M. *et al.* The spectrum of autosomal dominant polycystic kidney disease in children. *J. Am. Soc. Nephrol. JASN* **4**, 1654–1660 (1994).

31. Ecder, T. & Schrier, R. W. Cardiovascular abnormalities in autosomal-dominant polycystic kidney disease. *Nat. Rev. Nephrol.* **5**, 221–228 (2009).

32. Nauli, S. M. *et al.* Endothelial Cilia Are Fluid Shear Sensors That Regulate Calcium Signaling and Nitric Oxide Production Through Polycystin-1. *Circulation* **117**, 1161–1171 (2008).

33. Wu, T.-W. *et al.* Associations of Cardiovascular Risk Factors with Carotid Intima-Media Thickness in Middle-Age Adults and Elders. *J. Atheroscler. Thromb.* **24**, 677–686 (2017).

34. Baldassarre, D. *et al.* Progression of carotid intima-media thickness as predictor of vascular events: results from the IMPROVE study. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **33**, 2273–2279 (2013).

35. Jourde-Chiche, N. *et al.* Endothelium structure and function in kidney health and disease. *Nat. Rev. Nephrol.* **15**, 87–108 (2019).

36. Guerrot, D. *et al.* Progression of renal fibrosis: the underestimated role of endothelial alterations. *Fibrogenesis Tissue Repair* **5**, S15 (2012).

37. Chapman, A. B. *et al.* Left ventricular hypertrophy in autosomal dominant polycystic kidney disease. *J. Am. Soc. Nephrol.* **8**, 1292–1297 (1997).

38. Perrone, R. D. *et al.* Cardiac Magnetic Resonance Assessment of Left Ventricular Mass in Autosomal Dominant Polycystic Kidney Disease. *Clin. J. Am. Soc. Nephrol. CJASN* **6**, 2508–2515 (2011).

ETUDE DU ROLE DU SYSTEME DOPAMINERGIQUE DANS LA PKRAD

Par la suite, nous nous sommes intéressés à la stimulation dopaminergique dans la polykystose rénale autosomique dominante. La première étude s'intéressant à ce sujet remonte à 1995. Barendregt JN *et al* ont comparé 8 patients atteintes de la PKRAD à 7 sujets sains contrôles (93). Les auteurs ont montré d'une part, une excrétion urinaire de dopamine et des résistances au niveau de l'artère rénale significativement plus élevée chez les patients avec PKRAD. D'autre part, l'injection de Dopa (précurseur de la dopamine) permettait de normaliser l'hémodynamique rénale chez ces patients alors qu'un traitement par IEC (Enalaprilate) ne le permettait pas. Ce fut la première étude montrant le lien entre dopamine et PKRAD. Bien après, Nauli SM *et al* ont montré la localisation des récepteurs dopaminergiques de type 5 (DR5) au niveau du cil primaire des cellules endothéliales. En étudiant des cellules endothéliales issues de souris invalidées pour le gène *Pkd1*, ils ont démontré la persistance des récepteurs DR5 au niveau du cil primaire. La stimulation par la dopamine des cellules endothéliales permettait de rétablir la réponse libératrice du calcium intracellulaire. Enfin, l'invalidation du récepteur DR5 chez des cellules endothéliales issues de souris infectée par un siRNA, permettait de diminuer significativement la réponse calcique lors de la stimulation par le flux (41).

Notre équipe a déjà montré que l'injection de la dopamine permettait chez les patients atteints de PKRAD d'améliorer la réponse vasculaire ; initialement altérée, liée la dilatation débit dépendante. Cette amélioration impliquait notamment la libération de NO (94).

Nous avons ainsi souhaité étudier l'impact d'une stimulation dopaminergique des récepteurs DR5 sur les conséquences cardiovasculaires observées dans notre modèle de délétion endothéliale de *Pkd1*.

Dans un premier temps, nous avons étudié la réponse vasculaire à la stimulation aiguë par du fenoldopam (Sigma SM20198) ; un agoniste dopaminergique des récepteurs DR-1 like chez les souris sauvage sur fond génétique de C57BL/6JRj. Des artères mésentériques de 1er ordre ont été isolées et montées sur un myographe (Myographe de Mulvany), suivi d'une normalisation puis une période de repos. Une stimulation par des doses croissantes de fenoldopam (10^{-9}, 10^{-8}, 10^{-7}, 10^{-6} et 10^{-5} M) a été réalisée après une pré-contraction par la phéyléphrine 10^{-5} M. Les résultats obtenus (figure 1) montrent une vasorelaxation complète des artères mésentériques induite par la stimulation dopaminergique des récepteurs DR-1 like à 10^{-5} M. Les mécanismes impliqués dans cette vasorelaxation passent en partie par la libération du NO. En effet, l'inhibition de NO-synthase constitutive par du l-NA réduit la réponse vasculaire au fenoldopam de 50%. Enfin, afin de quantifier le rôle du récepteur DR5 dans cette vasorelaxation, nous avons inhiber ces derniers par un antagoniste spécifique (LE-PM-436 données gracieusement par le Dr Hans-Dieter Arndt, université de Chimie, Allemagne) en incubant les vaisseaux pendant 30 min avec une concentration de 10^{-9} M dans un premier temps, puis 10^{-8} M. Les résultats obtenus montrent une diminution significative de la vasorelaxation à 10^{-8} M. Ces observations démontrent pour la première fois, le rôle du récepteur DR5 dans la vasorelaxation des artères mésentériques.

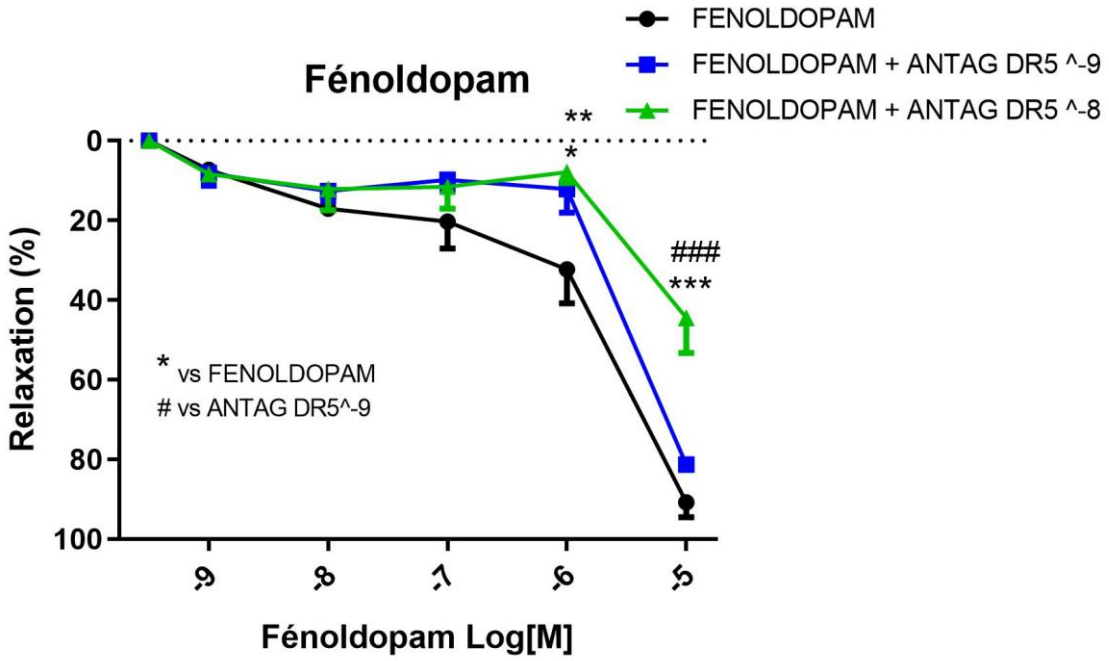


Figure 1 : Vasorelaxation de l'artère mésentérique de 1er ordre issu de souris sauvage, précontractée par la phényléphrine 10^{-5}M, en réponse à la fenoldopam à l'état de base et après incubation pendant 30 min avec LE-PM-436 10^{-9}M et 10^{-8}M. n=4 par groupe. * $p<0.05$, ** $p<0.01$, *** $p<0.001$, ### $p<0.001$.

Dans un deuxième temps, nous avons réalisé ces expériences sur des artères mésentériques issues de notre étude, à savoir *Pkd1*$^{lox/lox}$ et iCdh5-cre-*Pkd1*$^{del/del}$. Nous avons obtenu les mêmes résultats décrits précédemment (Figure 2). Ces observations indiquent que l'invalidation endothéliale du gène *Pkd1* n'altère pas la réponse vasculaire après la stimulation des récepteurs DR5.

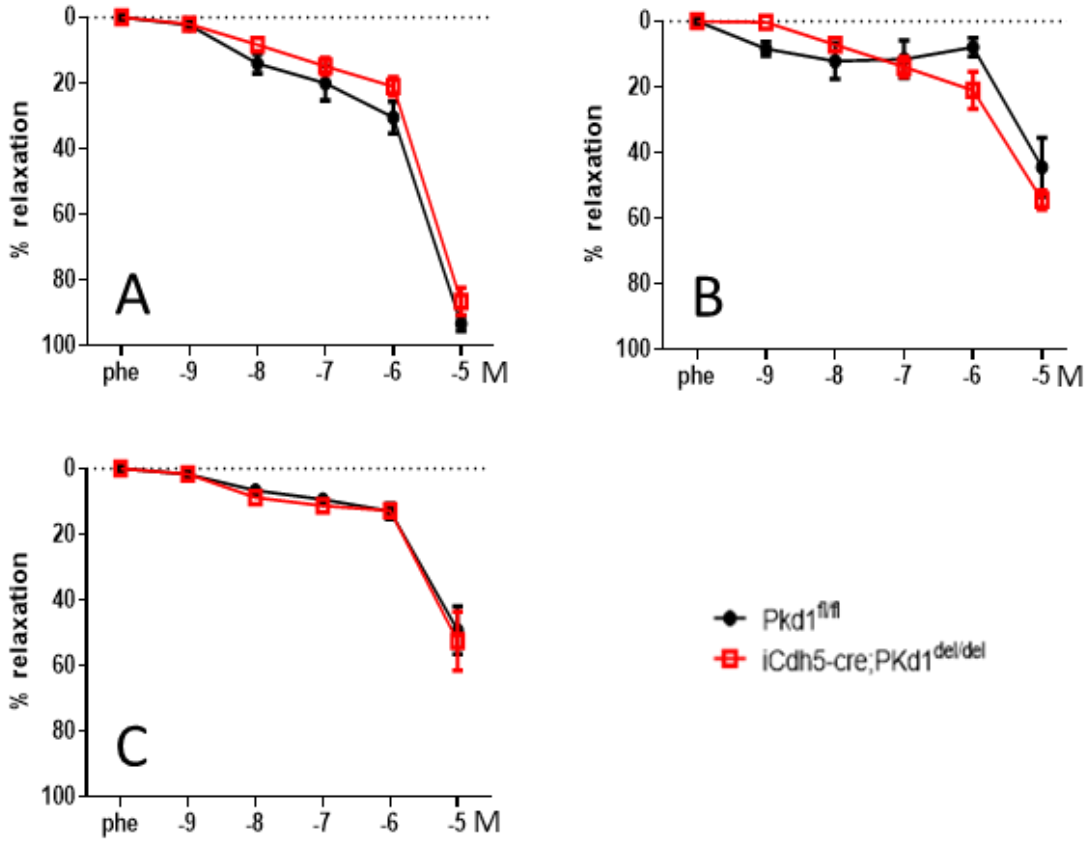


Figure 2 : Vasorelaxation de l'artère mésentérique de 1er ordre issues de souris *Pkd1*$^{fl/fl}$ et iCdh5-cre;*Pkd1*$^{del/del}$. n=4-8 par groupe. **A :** vasorelaxation en réponse aux fenoldopam. **B** : Vasorelaxation en réponse au fenoldopam après incubation de 30 min avec LE-PM-436 10^{-8} M. **C** : Vasorelaxation en réponse au fenoldopam après incubation de 30 min avec l-NA 10^{-5} M.

Dans un troisième temps, nous avons souhaité savoir si l'IRC modifie la réactivité vasculaire lors de la stimulation dopaminergique. Pour cela, nous avons étudié, comme décrit précédemment, les artères mésentériques issues de souris *Pkd1*$^{lox/lox}$ et iCdh5-cre-*Pkd1*$^{del/del}$ ayant toutes subit une Nx 5/6ème. Les résultats obtenus montrent une absence d'altération de cette réponse dans les 2 groupes (figure 3). Cette observation indique l'absence d'altération du système dopaminergique lors de l'IRC.

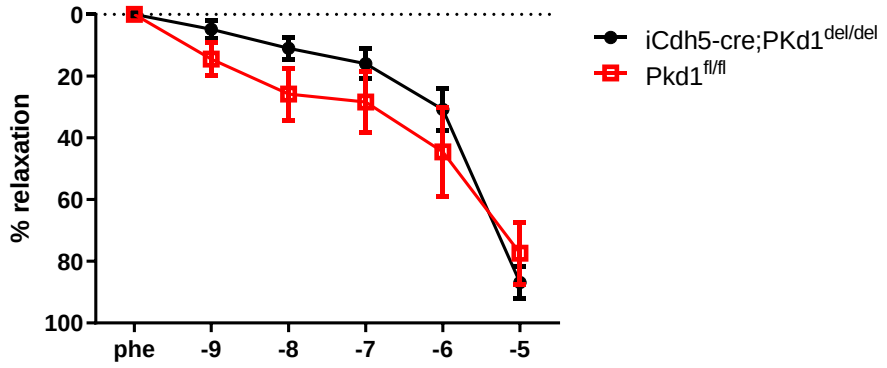


Figure 3 : Vasorelaxation de l'artère mésentérique de 1er ordre issues de souris *Pkd1*$^{fl/fl}$ et iCdh5-cre;*Pkd1*$^{del/del}$ ayant subi une néphrectomie des 5/6 ^{ème} n=6 par groupe.

Dans un quatrième temps, nous avons étudié la dilatation débit dépendante (DDD) des artères mésentériques après une incubation avec du fenoldopam à 10^{-6} M pendant 30 min. Les résultats confirment l'altération de la DDD chez les souris iCdh5-cre;*Pkd1*$^{del/del}$ comparés au souris *Pkd1*$^{lox/lox}$. Cependant la stimulation brève (30 min) par le fenoldopam à 10^{-6} M n'impacte pas cette DDD dans les 2 groupes (Figure 4). Enfin, nous avons étudié l'impact de cette stimulation brève sur la vasoréactivté lors de l'IRC. Nous n'avons pas montré de différence en comparant avant et après l'incubation à la fenoldopam.

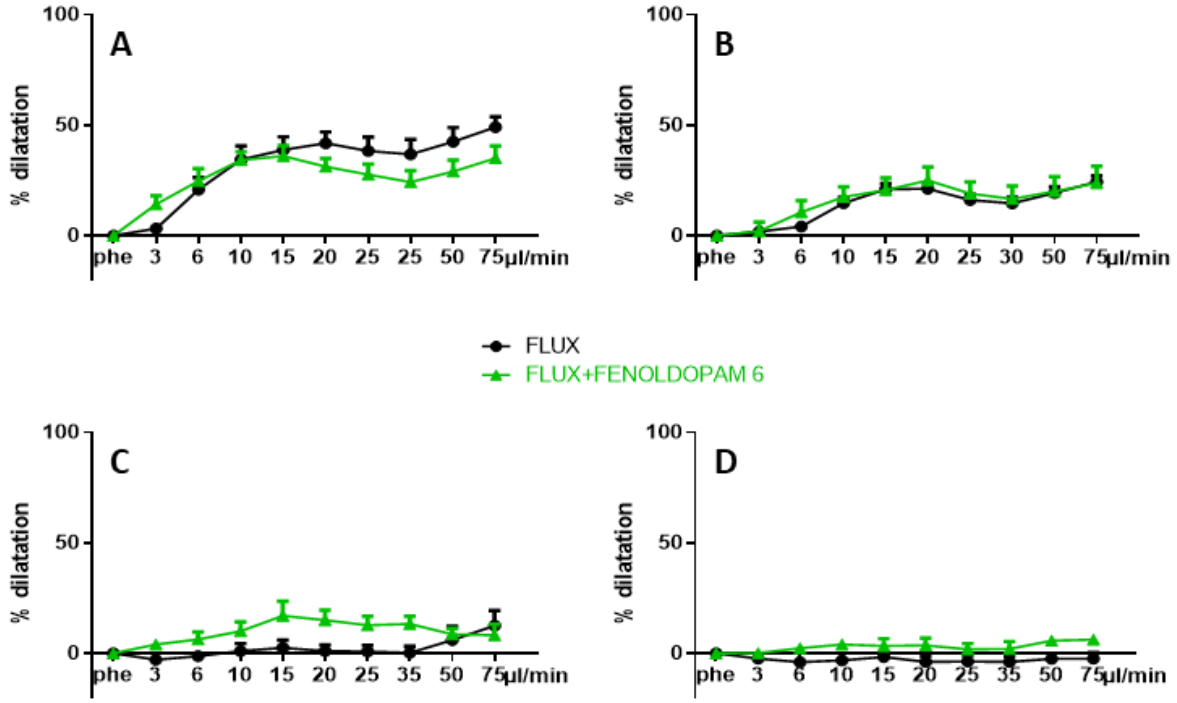


Figure 3 : Dilatation des artères mésentérique de 2ème ordre en réponse au flux. *Pkd1*$^{fl/fl}$ et iCdh5-cre;*Pkd1*$^{del/del}$. n=4-6 par groupe. **A :** Dilatation chez les souris *Pkd1*$^{fl/f}$ avant et après incubation pendant 30min avec du fenoldopam à 10^{-6} M. **B** : Dilatation chez les souris iCdh5-cre;*Pkd1*$^{del/del}$ avant et après incubation pendant 30min avec du fenoldopam à 10^{-6} M. **C** : Dilatation chez les souris *Pkd1*$^{fl/f}$ ayant subi la Nx 5/6, avant et après incubation pendant 30min avec du fenoldopam à 10^{-6} M. **D :** Dilatation chez les souris iCdh5-cre;*Pkd1*$^{del/del}$ ayant subi la Nx 5/6, avant et après incubation pendant 30min avec du fenoldopam à 10^{-6} M.

STIMULATION CHRONIQUE PAR LA DOPAMINE

Dans cette dernière partie, nous avons étudié l'impact d'un stimulation chronique par des agonistes dopaminergiques sur les souris invalidées pour le gène *Pkd1* au niveau endothélial. Nous avons comparé 5 souris iCdh5-cre;*Pkd1*$^{del/del}$ ayant bénéficié d'injection chronique de fenoldopam à raison de 13,3 µmol/kg/24h par minipompe en sous cutanée (Alzet 2004 : 200µl débit 0.25 µl/h durée 4 semaines) installé au 4ème puis au 5ème mois. Les souris ont bénéficié de mesure de la PA et de la diurèse au 5ème mois puis sacrifiées au 6ème mois. Les résultats sont décrits ci-dessous.

Résultats :

Les souris iCdh5-cre;*Pkd1*$^{del/del}$ présentent une hypertension artérielle systolique. Le traitement par fenoldopam prévient significativement cette HTA. La mesure de la diurèse n'a pas objectivé de différence du volume urinaire des 24h. Au sacrifice, la pesée des cœurs n'a pas montré de différence entres les différents groupes (Figure 4).

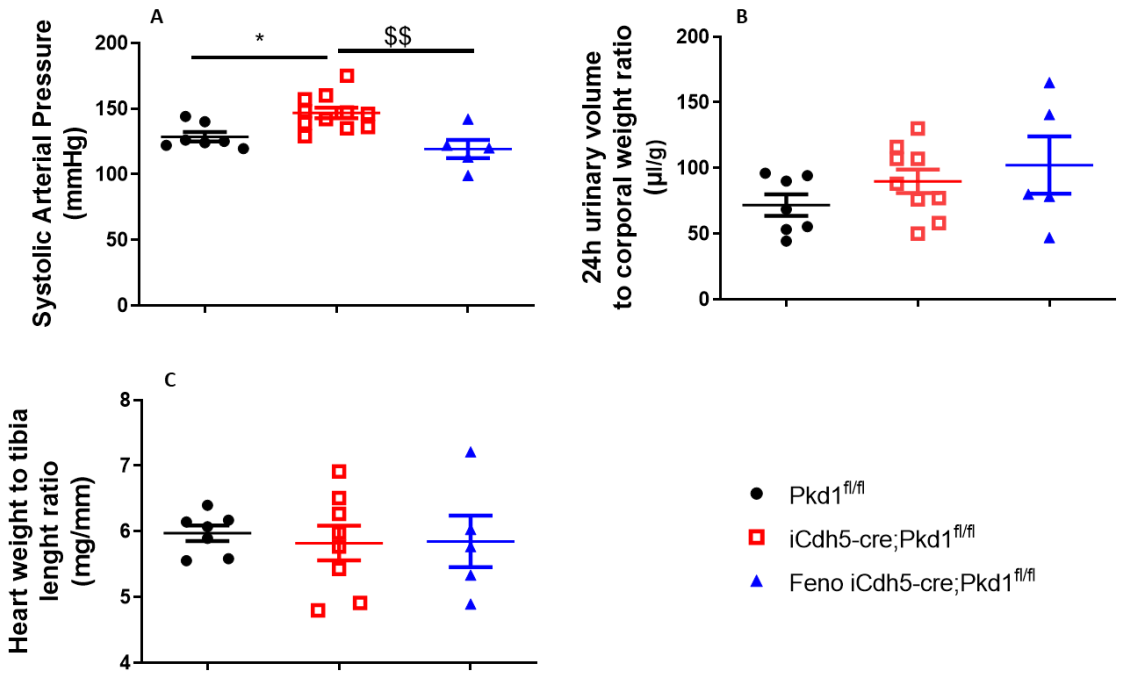


Figure 4 : n=5-9 par groupe**. A** : Mesure de la pression artérielle par pléthysmographie. *p<0.05 *vs. Pkd1*$^{fl/fl}$. $$ <0.01 *vs.* iCdh5-cre;*Pkd1*$^{del/del}$. **B :** Diurèse des 24h mesurée par les cages métaboliques. **C** : Poids des cœurs.

L'analyse de la dilatation débit dépendante des artères mésentériques du 2ème ordre a montré une altération chez les souris iCdh5-cre;*Pkd1*$^{del/del}$. Le traitement par fenoldopam prévient cette altération. L'analyse de la relaxation par l'acétylcholine a montré une altération de celle-ci chez les souris iCdh5-cre;*Pkd1*$^{del/del}$. Le traitement par fenoldpam prévient partiellement cette altération. L'analyse de la relaxation par le nitroprussiate de sodium a montré une légère altération chez les souris iCdh5-cre;*Pkd1*$^{del/del}$. Le traitement par fenoldopam ne modifie pas cette réponse. Enfin, nous avons objectivé un épaississement pariétal des artères mésentériques chez les souris iCdh5-cre;*Pkd1*$^{del/del}$, non prévenue par le fenoldopam (Figure 5).

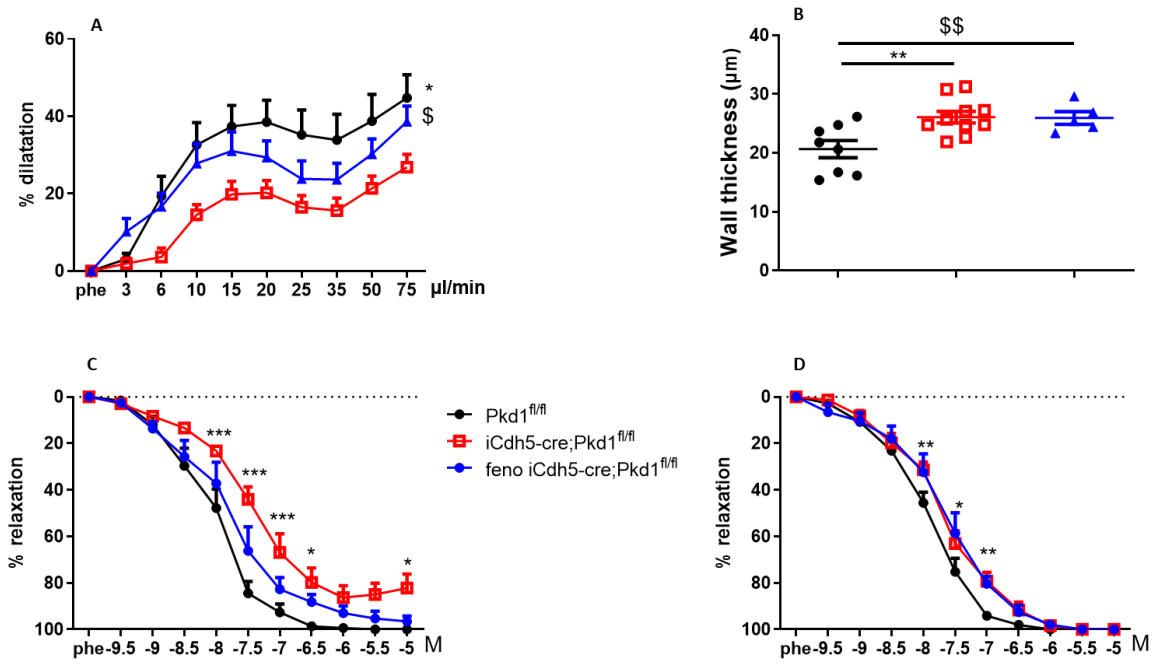


Figure 5 : n=5-9 par groupe**. A** : Mesure de la DDD sur les artères mésentériques, pré-constricté à la phénylephrine 10^{-5}M. *p<0.05 *vs.* iCdh5-cre;*Pkd1*$^{del/del}$. $ <0.05 *vs.* iCdh5-cre;*Pkd1*$^{del/del}$. **B :** Epaisseur pariétal des artères mésentériques. **p<0.01 *vs. Pkd1*$^{fl/fl}$. $$ <0.01 *vs. Pkd1*$^{fl/fl}$. **C :** Vasorelaxation des artères mésentériques en réponse à l'Ach. **D :** Vasorelaxation en réponse à la SNP.

Discussion :

Dans cette étude, nous avons montré pour la première fois qu'un traitement par un agoniste dopaminergique administré pendant 2 mois à des souris invalidées pour le gène *Pkd1* au niveau endothélial a permis une prévention de la dysfonction endothéliale observée dans ce modèle.

Nous avons montré que la stimulation brève des artères mésentériques par le fenoldopam chez les souris invalidées pour le gène *Pkd1* au niveau endothélial n'a pas montré une amélioration de la fonction endothéliale. Ce résultat était attendu puisque Abdul-Majeed *et al* (Hypertension 2011) ont démontré une amélioration de la réponse des cellules endothéliales au flux après une

incubation de 16h à la dopamine à 10^{-5}M. Notre incubation brève de 30 min n'a été qu'avec du fenoldopam 10^{-6}M. Nous avons montré que la stimulation dopaminergique induisait une vasodilatation médiée partiellement par du NO, et que celle-ci passait par la stimulation des récepteurs DR5 puisque le blocage de ces récepteurs réduisait cette vaso-relaxation de 50%. Nous avons montré que ni l'invalidation du gène *Pkd1* au niveau endothélial ni l'induction de l'insuffisance rénale chronique ne modifiaient la réponse vasculaire à la stimulation dopaminergique. Ce résultat est intéressant puisque nos patients atteints de la PKRAD présentent dans la majorité des cas une IRC. Nous devions ainsi s'assurer de la préservation de cette réponse chez eux.

La stimulation dopaminergique chronique par injection en pompe sous cutanée a permis de prévenir la dysfonction endothéliale observée lors de l'invalidation du gène *Pkd1* au niveau endothélial. Le traitement a permis une diminution de la pression artérielle chez les souris invalidées pour le gène *Pkd1* au niveau endothélial. Ce dernier résultat était attendu puisque le fenoldopam est utilisé aux USA comme un traitement antihypertenseur lors des crises aiguës hypertensives. Ceci, sans prévenir l'épaississement pariétal des artères de conductances. Cela suggère un mécanisme de remodelage vasculaire indépendant de l'HTA.

Ces résultats suggèrent que la stimulation dopaminergique des récepteurs DR5 pourrait prévenir la dysfonction endothéliale observée chez les patients atteints de la PKRAD. Ceci permetterait de prévenir certaines complications CV liées à cette pathologie, ciblant l'endothélium et complétant ainsi les thérapeutiques visant à limiter l'atteinte rénale.

ETUDE DES ANOMALIES D'ADAPTATION A L'EFFORT DANS LA PKRAD, ROLE DE LA POLYCYSTIN-1 ENDOTHELIALE

Enfin, nous avons étudié le rôle de la PC-1 endothéliale dans l'adaptation cardiovasculaire à l'effort dans notre modèle.

Introduction :

Durant l'effort physique, une adaptation du système cardio-vasculaire est nécessaire afin de délivrer plus d'oxygène aux tissus musculaires. La libération de NO en réponse à l'augmentation des contraintes mécaniques sur la paroi vasculaire (élévation du débit sanguin et de la pression artérielle) permet une vasodilatation et ainsi une baisse des résistances vasculaires périphériques. Chez le patient avec PKRAD, l'adaptation à l'effort a été peu étudiée. Trois études se sont intéressées à l'adaptation cardiovasculaire à l'effort chez des patients atteints de PKRAD. La première, en 2004, a comparé 18 patients polykystiques normotendus à des sujets sains et montré une pression artérielle (PA) diastolique plus élevée pendant et au décours de l'effort chez les sujets polykystiques, suggérant une moindre vasodilatation (1). La seconde, en 2012, a évalué la récupération de la fréquence cardiaque (FC) au décours d'un effort chez 30 sujets polykystiques normotendus et montré un index de récupération altéré par rapport aux sujets sains (2). Enfin, en 2014, une nouvelle étude a confirmé cette inadaptation cardiovasculaire (hausse plus importante de la PA pendant et au décours d'une EE) à l'effort chez 26 patients polykystiques normotendus. Elle a également montré une moindre production de NO associée à une absence de baisse de concentration d'ADMA (3) par rapport à 30 sujets sains. L'ADMA est un inhibiteur endogène de synthèse de NO dont la production est inhibée lors d'un effort chez les sujets sains. Cet élément suggère que la dysfonction endothéliale est au moins partiellement responsable de l'inadaptation cardiovasculaire à l'effort chez les patients polykystiques.

Ainsi, nous avons exploré l'adaptation cardiovasculaire à l'effort et le métabolisme du NO chez nos souris transgéniques exprimant spécifiquement une mutation de *Pkd1* dans les cellules endothéliales.

Matériels et Méthodes :

Souris :

Dans ce travail préliminaire, pour des raisons de disponibilité et de timing, les souris contrôles utilisées à ce stade étaient des souris C57BL/6J sauvages de même âge (WT) et non des souris *Pkd1*$^{lox/lox}$ ayant subi le même traitement par Tamoxifène, qui seront étudiées dans un second temps.

Télémétrie :

Les données hémodynamiques étaient recueillies par télémétrie grâce à un capteur aortique. L'intervention était réalisée sous anesthésie générale (injection IP de Xylazine 5 µg/g et de Kétamine 100µg/g), accompagnée d'une analgésie (Buprénorphine 0,1µg/g IP en préopératoire). La souris était rasée au niveau cervical. On réalisait une incision médio-cervicale permettant d'accéder au tronc commun de l'artère carotide gauche (Figure 1a). Celle-ci était ligaturée puis cathétérisée et le capteur (PA-C10 Implant, Data Science International) était placé par voie rétrograde dans la crosse aortique (Figure 1b). Le boitier était ensuite tunnélisé en sous-cutané et placé dans le flanc droit de la souris (Figure 1c). Le signal de télémétrie était capté par une plateforme placée à proximité du tapis de course (PhysioTel Receiver, Model RLA1020, Data Science International). On recueillait la PA et la FC durant l'épreuve d'effort et 30 minutes avant et après celle-ci.

Figure 1a : incision médio-cervicale, exposition de l'artère carotide commune

Figure 1b : cathéter intra-carotidien

Figure 1c : boitier sous-cutané.

Épreuves d'effort :

Plusieurs épreuves d'effort (EE) standardisées ont été réalisées, sur un tapis de course (Treadmill Model LE8700TS, BioSeb). Pour l'EE courte, la vitesse initiale était de 5m/min, puis elle était progressivement augmentée par palier de 4m/min toutes les 3 minutes. Pour l'EE longue, les modalités étaient identiques mais les paliers étaient de 10 minutes (Tableau I). La pente était de 0°. Les souris étaient incitées à courir par un stimulus électrique déclenché par l'animal lorsqu'il se trouvait en bout de tapis. Les EE étaient menées jusqu'à épuisement de la souris, qui était défini par l'administration de 20 stimuli en moins d'une minute. On recueillait la distance totale parcourue et la durée de l'EE.

Vitesse (en m/min)	5	9	13	17	21	25	29	33	37
Paliers EE courte (en min)	3	6	9	12	15	18	21	24	27
Paliers EE longue (en min)	10	20	30	40	50	60	70	80	90

Tableau I : protocoles d'épreuves d'effort courte et longue

Les souris étaient habituées au tapis de course à J0. Une EE courte était réalisée à J1, puis une EE longue à J2, au décours de laquelle on posait le capteur de télémétrie. A J7, on pratiquait une nouvelle EE courte, puis une longue à J8, au décours de laquelle la souris était sacrifiée (Figure 2).

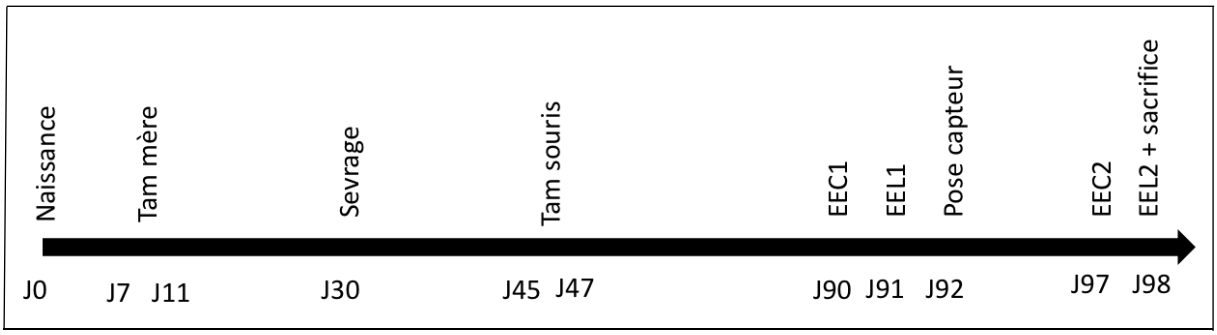


Figure 2 **:** schéma de l'étude. Tam mère : injections IP de Tamoxifène chez la mère. Tam souris : injections IP de Tamoxifène chez la souris. EEC1 : Épreuve d'effort courte avant pose du capteur. EEL1 : Épreuve d'effort longue avant pose du capteur. EEC2 : Épreuve d'effort courte après pose du capteur. EEL2 : Épreuve d'effort longue après pose du capteur.

Statistiques :

Les performances (durée et distance) réalisées par les deux groupes sur les EE courte et longue sont exprimées en moyenne ± SEM. Elles ont été comparées par *t* test, après vérification de la normalité de la distribution des performances par les tests de normalité de d'Agostino & Pearson, de Shapiro-Wilk et de Kolmogorov-Smirnov.

Nous n'avons, à ce stade des résultats, pas réalisé de test statistique pour comparer les données hémodynamiques recueillies lors des EE du fait de la petite taille des effectifs préliminaires présentés.

Résultats :

Souris :

Nous avons soumis 14 souris CL et 9 WT à une EE courte et 13 souris CL et 7 WT à une EE longue. Le poids moyen des souris CL était de 23,1± 0,3g (n=14), et celui des WT de 26,2± 0,8g (n=9), soit une différence de 3,1 grammes entre les deux groupes (*p*=0,0008, IC95%=1,4-4,7g).

Performance à l'effort :

- ***EE courte (Figure 3) :***

La durée de l'EE courte était de 20min39s±41s (n=9) pour les souris WT et de 22min±41s (n=14) pour les souris CL, soit une différence de 1min21sec, non significative (*p*=0,20, IC95%= -47 - 210sec).

La distance parcourue pendant l'EE courte était de 343±20m (n=9) pour les souris WT, et de 385±21m (n=14) pour les souris CL, soit une différence de 42m, non significative (*p*= 0,19, IC95%= -23 - 108m).

- ***EE longue (Figure 4) :***

La durée de l'EE longue était de 53min42±2min50s (n=7) pour les souris WT et de 51min27± 2min49s (n=13) pour les souris CL, soit une différence de 2min15sec, non significative (*p*=0,61, IC95%= -11min30s - 6min58s).

La distance parcourue pendant l'EE longue était de 745±67m (n=7) pour les souris WT, et de 689m±66m (n=13) pour les souris CL, soit une différence de 55m, non significative (*p*= 0,59, IC95%= -220,4 - 402,2m).

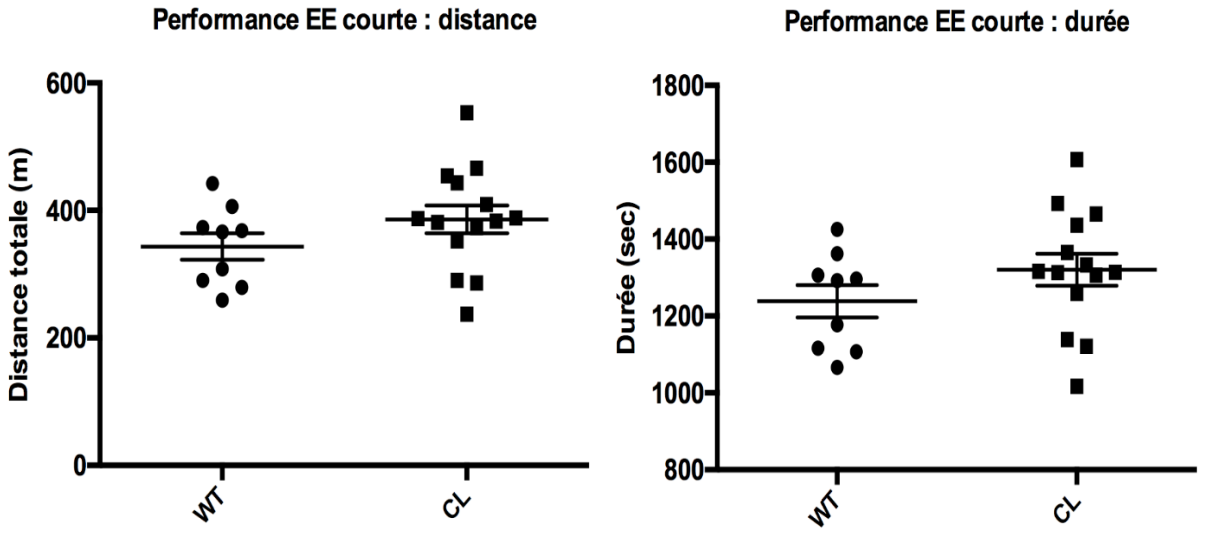


Figure 3 : Distance et durée d'EE courte chez les souris WT et CL

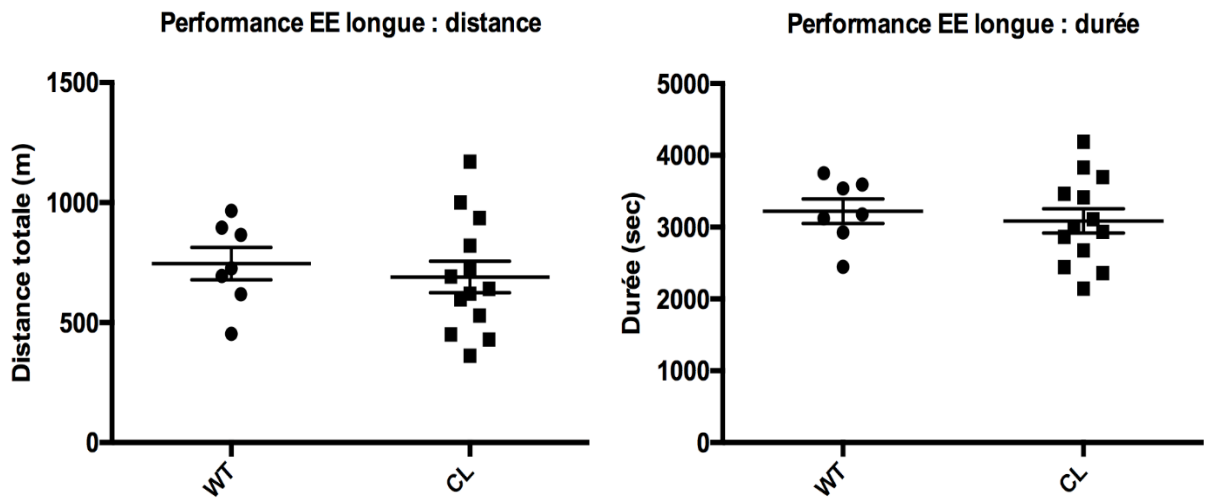


Figure 4 : Distance et durée d'EE longue chez les souris WT et CL

Adaptation cardiovasculaire à l'effort :

- ***Pression artérielle (figure 5) :***

4 souris WT et 2 souris CL ont été soumises à une EE courte et longue avec capteur de télémétrie pour mesure de la PA et de la FC. Aucun calcul statistique n'a été réalisé sur ces effectifs très faibles.

Il semblait exister au niveau basal, avant l'épreuve d'effort, un écart tensionnel entre les deux groupes. Lors de l'EE courte, la hausse de PA semble plus importante chez les souris CL par rapport aux souris WT. La récupération au décours de l'effort semble également altérée chez les souris CL. Lors de l'EE longue, on ne retrouvait pas la hausse de PA plus importante chez les souris CL.

- ***Fréquence cardiaque (figure 6) :***

A nouveau, 4 souris WT et 2 souris CL ont été soumises à une EE courte et longue. La récupération semblait altérée chez les souris CL par rapport aux souris WT au décours de l'EE courte. Il ne semblait pas y avoir de différence avant, pendant ou après l'effort lors de l'EE longue.

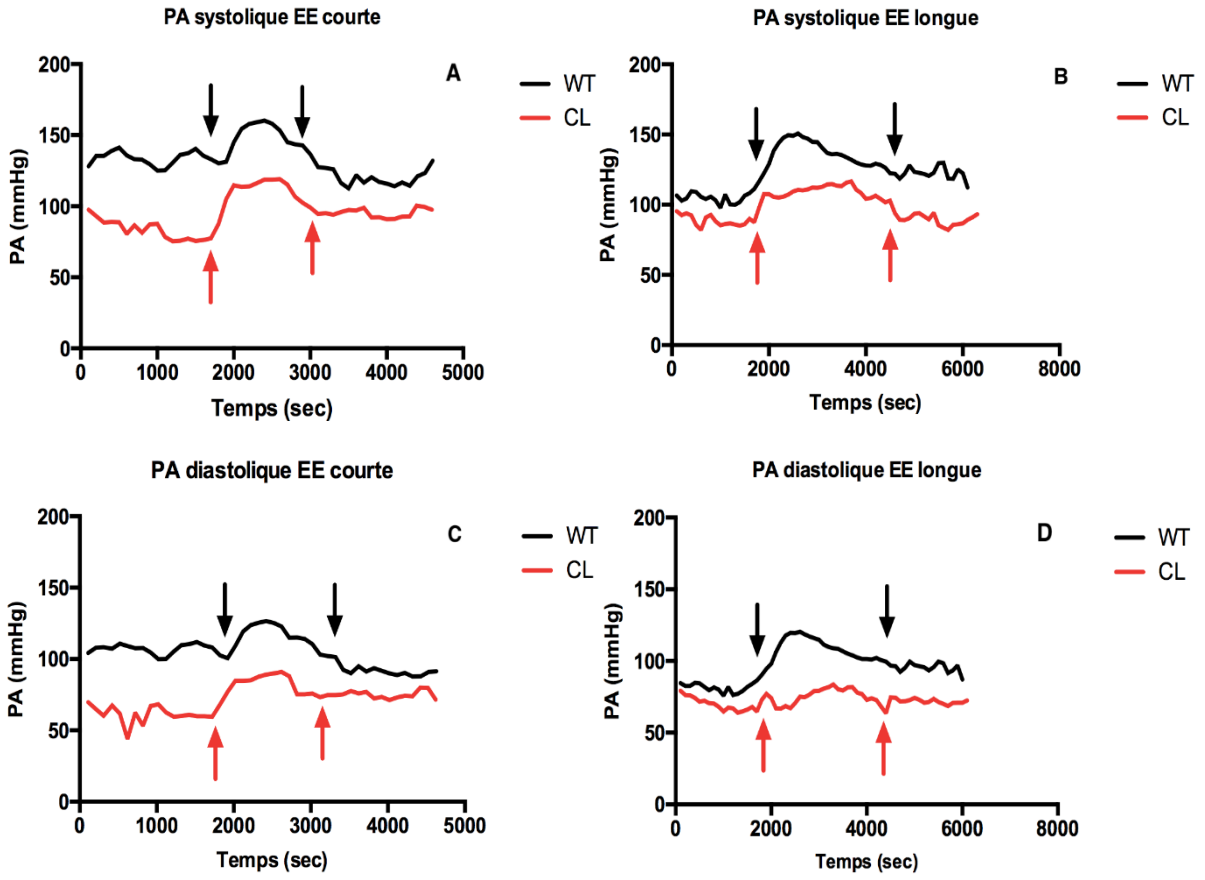


Figure 5 : **A** : PA systolique de l'EE courte. **B** : PA systolique de l'EE longue. **C** : PA diastolique de l'EE courte. **D** : PA diastolique de l'EE longue. Les flèches rouges indiquent le début et la fin des EE des souris CL, les flèches noires le début et la fin des EE des souris WT.

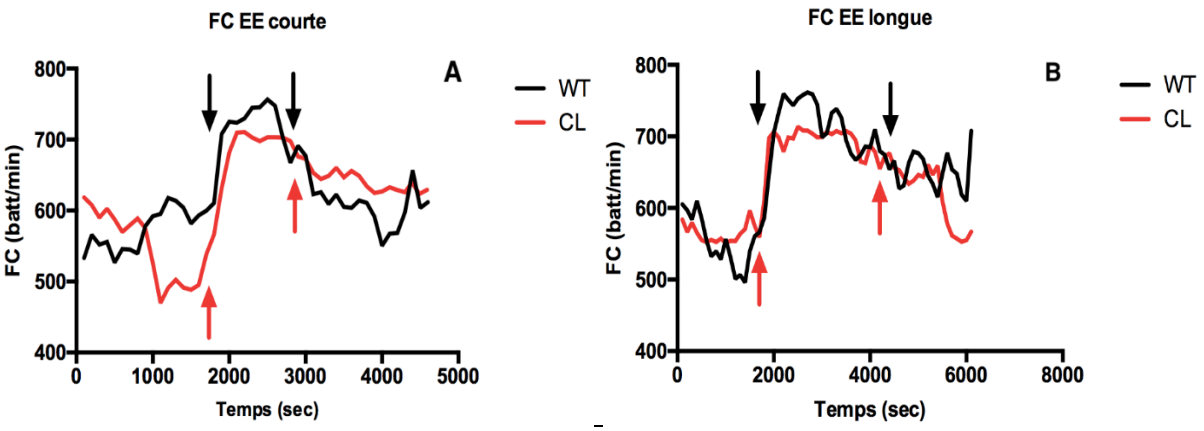


Figure 6 : **A :** FC pendant l'EE courte**. B** : FC pendant l'EE longue. Les flèches rouges indiquent le début et la fin des EE des souris CL, les flèches noires le début et la fin des EE des souris WT.

Discussion :

L'objectif de ce travail était d'étudié le rôle d'une invalidation endothéliale de *Pkd1* dans l'adaptation cardiovasculaire à l'effort. Les résultats préliminaires présentés à ce stade n'ont pas mis en évidence de différence significative entre le groupe CL et le groupe WT concernant les performances aux EE courte et longue et sur leur adaptation cardiovasculaire à l'effort.

L'absence de différence significative entre les groupes CL et WT peut potentiellement être due au faible nombre de souris incluses dans le protocole à ce stade, notamment concernant les données hémodynamiques. Nous disposons déjà de 10 souriceaux CL qui nous permettront d'augmenter prochainement les effectifs.

Par ailleurs, le groupe de souris contrôle présenté ici est un groupe de souris WT. Cela induit un biais puisqu'elles n'ont pas été traitées par Tamoxifène, contrairement aux souris Cre-lox. Elles ne présentent pas non plus le génotype *Pkd1*-loxlox, ce qui peut conduire à des modifications phénotypiques, même en l'absence de Cre-recombinase. Pour s'affranchir de ce biais, nous compléterons l'étude par l'analyse d'un troisième groupe présentant le génotype *Pkd1*-lox, que nous traiterons également par Tamoxifène.

Les deux groupes CL et WT sont différents concernant le poids des souris, avec 3,1grammes de plus dans le groupe WT par rapport au CL. Cela peut avoir une influence directe sur leurs performances aux EE. Par exemple, pour l'EE longue chez les souris WT, la distance moyenne parcourue est de 745 mètres. La distance moyenne parcourue par les quatre plus lourdes (poids moyen de 29,75g) est de 855m contre 599m pour les trois plus légères (poids moyen de 26g).

Le nombre de stimuli reçus avant l'arrêt de l'EE peut influencer le résultat de performance à l'effort. Notre critère d'arrêt (20 stimuli en moins d'une minute) est précoce par rapport à d'autres auteurs (4-5), qui arrêtent l'EE lorsque survient un stimulus prolongé de 5 secondes.

Cette précocité peut masquer des différences de performance et de données hémodynamiques qui seraient apparues en fin d'EE.

Le schéma utilisé pour les EE courte et longue a déjà utilisé par d'autres équipes (6). Ces deux types d'EE ont été imposés aux souris afin d'explorer l'effort anaérobie pour l'EE courte et l'effort aérobie pour l'EE longue. Il a déjà été montré un lien entre le niveau d'effort aérobie et la dysfonction endothéliale chez la souris (7-8). La tendance à la moins bonne performance lors de l'EE longue chez les souris CL par rapport aux WT peut rendre compte de ce phénomène.

Nous n'avons pas analysé les performances des souris lors de leurs secondes EE courte et longue. En effet, la pose du capteur de télémétrie influence la performance qui est moins importante durant les EE après la pose du capteur par rapport aux EE réalisées avant. Cela peut être en rapport avec une gêne mécanique due à la présence du boitier à proximité de l'épaule droite des souris, mais elles ne semblaient pas avoir de symptomatologie en rapport. La ligature de l'artère carotide commune gauche peut également entrainer des lésions cérébrales ischémiques expliquant ces différences, mais elles ne semblaient pas avoir de symptomatologie neurologique en rapport. Il a été montré que les souris bénéficient d'un réseau artériel de suppléance important grâce à un polygone de Willis bien développé (9). Il nous semble que cet écart s'explique donc plus par le poids du dispositif (1,4 grammes) et la proximité avec la pose du capteur.

La pression artérielle avant l'EE semble plus élevée chez les souris WT que chez les CL. Cela est contraire à ce qui était attendu. En effet, les souris CL font déjà l'objet d'études au sein de notre laboratoire et la mesure de leur PA par pléthysmographie est supérieure à celle des souris WT. Cela peut être dû à un niveau d'éveil différent des animaux avant l'EE. Une malposition de l'extrémité du capteur de télémétrie, au sein de ventricule gauche notamment, pourrait également expliquer cette différence (souris CL plus légères). L'altération de la récupération de la PA systolique et diastolique que semblent présenter les souris CL lors de l'EE courte nous

semble tout de même encourageante. Ces résultats méritent donc d'être précisés par les deux techniques sur des effectifs plus larges avant de pouvoir conclure sur un éventuel rôle de l'invalidation endothéliale de Pkd1 dans la régulation basale de la pression artérielle.

Si des différences de performance ou d'adaptation cardiovasculaire à l'effort sont mises en évidence, nous chercherons à confirmer l'imputabilité de la dysfonction endothéliale en étudiant les données du métabolisme du NO dans les deux groupes. Nous avons donc prélevé au moment du sacrifice le plasma des souris pour mesurer la concentration plasmatique en nitrite, reflet de la biodisponibilité du NO (10). Nous mesurerons également la concentration plasmatique en lactates, reflet du métabolisme anaérobie, en L-arginine, un précurseur du NO, ainsi qu'en ADMA, un inhibiteur de sa synthèse. Enfin, nous avons également prélevé au sacrifice l'aorte abdominale des souris pour mesurer par Western Blot l'expression et phosphorylation d'eNOS.

Conclusion :

La poursuite de ce travail permettra de conclure sur l'implication ou non de la dysfonction endothéliale dans l'inadaptation cardiovasculaire à l'effort dans la PKRAD. La compréhension des mécanismes de cette dysfonction est un enjeu important chez les patients polykystiques, chez qui les événements cardiovasculaires représentent une des principales causes de morbi-mortalité.

Bibliographie :

1- Martinez-Vea A, Valero FA, Bardaji A, Gutierrez C, Broch M, Garcia C et al. Left ventricular hypertrophy in hypertensive patients with autosomal dominant polycystic kidney disease: influence of blood pressure and
humoral and neurohormonal factors. Am J Nephrol. 2000 May-Jun;20(3):193-200

2- Orscelik O, Kocyigit I, Baran O, Kaya C, Dogdu O, Zengin H et al.
Impairment of heart rate recovery index in autosomal-dominant polycystic kidney disease patients without hypertension. Blood Press. 2012 Oct;21(5):300-5

3- Reinecke NL, Cunha TM, Heilberg IP, Higa EM, Nishiura JL, Neder JA et al. Exercise capacity in polycystic kidney disease. Am J Kidney Dis.
2014 Aug;64(2):239-46

4- Wojewoda M, Kmiecik K, Ventura-Clapier R, Fortin D, Onopiuk M, Jakubczyk J et al. Running performance at high running velocities is impaired but V'O($_2$max) and peripheral endothelial function are preserved in IL-6^{-}/$^{-}$ mice. PLoS One. 2014 Feb 12;9(2): e88333

5- Liu KL, Canaple L, Del Carmine P, Gauthier K, Beylot M, Lo M. Thyroid hormone receptor-α deletion decreases heart function and exercise performance in apolipoprotein E-deficient mice. Physiol Genomics. 2016 Feb;48(2):73-81

6- Wojewoda M, Przyborowski K, Sitek B, Zakrzewska A, Mateuszuk L, Zoladz JA et al. Effects of chronic nitric oxide synthase inhibition on V'O(2max) and exercise capacity in mice. Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol. 2017
Mar;390(3):235-244

7- Maxwell AJ, Ho HV, Le CQ, Lin PS, Bernstein D, Cooke JP. L-arginine enhances aerobic exercise capacity in association with augmented nitric oxide production. J Appl Physiol (1985). 2001 Mar;90(3):933-8

8- Guizoni DM, Dorighello GG, Oliveira HC, Delbin MA, Krieger MH, Davel AP. Aerobic exercise training protects against endothelial dysfunction by increasing nitric oxide and hydrogen peroxide production in LDL receptor-deficient mice. J Transl Med. 2016 Jul 19;14(1):213

9- Tamaki M, Kidoguchi K, Mizobe T, Koyama J, Kondoh T, Sakurai T et al. Carotid artery occlusion and collateral circulation in C57Black/6J mice detected by synchrotron radiation microangiography. Kobe J Med Sci. 2006;52(5):111-8

10- Castiglione N, Rinaldo S, Giardina G, Stelitano V, Cutruzzolà F. Nitrite and nitrite reductases: from molecular mechanisms to significance in human health and disease. Antioxid Redox Signal. 2012 Aug 15 ;17(4):684-716

PRODUCTION SCIENTIFIQUE ANNEXE

Le **premier article** est une revue de la littérature sur le rôle des acides époxieicostriénoïques sur le système cardio-vasculaire et rénale. Ce travail a été publié dans **Annales de Cardiologie et d'Angéiologie** (Volume 67, Issue 3, June 2018, Pages 141-148).

Disponible en ligne sur
ScienceDirect
www.sciencedirect.com

Elsevier Masson France
EM|consulte
www.em-consulte.com

Annales de Cardiologie et d'Angéiologie 67 (2018) 141–148

Annales de cardiologie et d'angéiologie

Article original

Conséquences cardiovasculaires de l'insuffisance rénale chronique, intérêt d'une modulation des acides époxyeicosatriénoïques

Cardiovascular consequences of chronic kidney disease, impact of modulation of epoxyeicosatrienoic acids

M. Hamzaoui [a,*,b], D. Guerrot [a,b], Z. Djerada [c], T. Duflot [a,d], V. Richard [a,d], J. Bellien [a,d]

[a] *EnVI UMR1096 Inserm-université de Rouen-Normandie, 76000 IRIB, France*
[b] *Service de néphrologie, CHU de Rouen, 76000 Rouen, France*
[c] *Service de pharmacologie clinique, CHU de Reims, 51100 Reims, France*
[d] *Service de pharmacologie clinique, CHU de Rouen, 76000 Rouen, France*

Reçu le 27 avril 2018 ; accepté le 27 avril 2018
Disponible sur Internet le 22 mai 2018

Résumé

Les événements cardiovasculaires sont une complication majeure de l'insuffisance rénale chronique. La physiopathologie expliquant cette association reste à ce jour complexe. Ainsi, la recherche de nouvelles thérapies permettant la prévention des événements cardiovasculaires dans l'insuffisance rénale chronique est un enjeu majeur. Les acides époxyeicosatriénoïques, produits du métabolisme de l'acide arachidonique sont des facteurs hyperpolarisants dérivés de l'endothélium possédant des propriétés vasodilatatrices, anti-inflammatoires, thrombolytiques, pro-angiogéniques et anti-apoptotiques. L'augmentation de l'expression de l'époxyde hydrolase soluble, enzyme dégradant les acides époxyeicosatriénoïques, a été observée dans de nombreuses pathologies cardiovasculaires tel que l'hypertension artérielle, l'infarctus du myocarde ou le diabète, démontrant l'implication de la baisse de la biodisponibilté des acides époxyeicosatriénoïques dans ces pathologies. De plus, les études du polymorphisme génétique de l'époxyde hydrolase soluble chez l'homme ont montré que les variants alléliques en rapport avec une augmentation de son activité et par conséquent la baisse de la biodisponibilité des acides époxyeicosatriénoïques est associée à un surrisque cardiovasculaire. La modulation des acides époxyeicosatriénoïques par les inhibiteurs de l'époxyde hydrolase soluble dans certaines pathologies cardiovasculaires permet une amélioration cardiaque structurelle avec une diminution de l'hypertrophie des cardiomyocytes, une réduction de la fibrose cardiaque interstitielle, une prévention de la dysfonction endothéliale mais aussi une amélioration de l'hémodynamique rénale et la réduction des atteintes rénale induite. De ce fait, l'augmentation de la biodisponibilité des acides époxyeicosatriénoïques parait être une piste thérapeutique intéressante dans la prévention des événements cardiovasculaires secondaires à l'insuffisance rénale chronique.
© 2018 Elsevier Masson SAS. Tous droits réservés.

Mots clés : Evénements cardio-vasculaires ; Insuffisance rénale chronique ; Acides époxyeicosatriénoïques ; Époxyde hydrolase soluble ; Dysfonction endothéliale

Abstract

Cardiovascular events are more prevalent in chronic kidney disease than in the general population, being the main cause of morbi-mortality. The physiopathology explaining this association remains complex. Thus, research for new therapies to prevent cardiovascular events in chronic kidney disease is a major issue. Epoxyeicosatrienoic acids, products of the arachidonic acid metabolism, are endothelium-derived hyperpolarizing factors with vasodilatory, anti-inflammatory, thrombolytic, pro-angiogenic and anti-apoptotic properties. A decrease in the bioavailability of epoxyeicosatrienoic acids has been observed in many cardiovascular diseases such as hypertension, myocardial infarction or diabetes. Moreover,

* Auteur correspondant.
Adresse e-mail : mouad.hamzaoui@gmail.com (M. Hamzaoui).

https://doi.org/10.1016/j.ancard.2018.04.018
0003-3928/© 2018 Elsevier Masson SAS. Tous droits réservés.

human studies of genetic polymorphisms of soluble epoxide hydrolase, the enzyme degrading epoxyeicoatrienoic acids, have shown that allelic variants related to an increase in its activity is associated with higher risk of cardiovascular events. Modulation of epoxyeicosatrienoic acids by soluble epoxide hydrolase inhibitors in some cardiovascular diseases induces structural improvements in the heart, vessels and kidneys, including decrease in cardiomyocyte hypertrophy, reduction in cardiac and renal interstitial fibrosis, improvement in renal hemodynamics, and prevention of endothelial dysfunction. In this context, increasing the bioavailability of epoxyeicosatrienoic acids appears to be an interesting therapeutic option in the prevention of cardiovascular events related to chronic kidney disease.
© 2018 Elsevier Masson SAS. All rights reserved.

Keywords: Cardiovascular events; Chronic kidney disease; Epoxyeicosatrienoic acids; Soluble epoxide hydrolase; Endothelial dysfunction

1. Introduction

L'insuffisance rénale chronique (IRC) représente un problème de santé publique majeur, avec une prévalence mondiale de 13 % [1]. La première cause de mortalité des patients IRC est la mortalité par événement cardiovasculaire (CV) [2–4]. Le risque de développer des complications CV augmente proportionnellement à la dégradation du débit de filtration glomérulaire (DFG), faisant de l'IRC un facteur de risque CV à part entière [5]. Les atteintes CV les plus fréquentes associées à l'IRC sont l'hypertrophie ventriculaire gauche (HVG) et la cardiopathie ischémique. L'HVG, généralement associée à une dysfonction diastolique, est un facteur prédictif indépendant de mortalité chez les patients atteints d'IRC [6] [7]. La cardiopathie ischémique, qui représente l'atteinte principale de l'IRC [4], peut être liée à une atteinte athéromateuse des troncs coronaires et/ou à une atteinte non athéromateuse de la microcirculation. Les facteurs de risques impliqués dans le développement des complications CV de l'IRC sont multiples. Ils sont classiquement divisés en deux groupes : d'une part les facteurs de risque traditionnels que sont l'âge, le diabète sucré, l'hypertension artérielle, le tabagisme, la dyslipidémie, l'obésité et la sédentarité et d'autre part, les facteurs de risque non traditionnels associés à l'IRC, à savoir l'anémie, la surcharge hydrosodée, les troubles métaboliques, l'albuminurie, la malnutrition, le stress oxydatif, l'accumulation de toxines urémiques, l'inflammation et, de façon majeure, la dysfonction endothéliale [8,9]. Ainsi, la recherche de nouvelles thérapies permettant l'amélioration de la fonction endothéliale est un enjeu majeur pour diminuer la mortalité CV des patients atteints d'IRC.

Parmi les cibles pharmacologiques d'intérêt, l'augmentation de la biodisponibilité des acides époxyeicosatriénoïques (EETs) semble particulièrement intéressante. Les EETs, produits du métabolisme de l'acide arachidonique (AA) par les cytochrome P450 (CYP450) de type époxygénase sont des facteurs hyperpolarisants dérivés de l'endothélium possédant des propriétés vasodilatatrices, anti-inflammatoires, thrombolytiques, pro-angiogéniques et anti-apoptotiques [10,11]. Plusieurs études ont démontré un impact cardiovasculaire favorable de l'augmentation de la biodisponibilité des EETs sur des modèles expérimentaux d'ischémie coronarienne, d'hypertension artérielle et de diabète de type 2. Cependant, à ce jour, le bénéfice potentiel de la modulation des EETs dans l'IRC reste mal évalué. L'objectif de cette revue est de proposer une mise au point sur les effets CV des EETs avec un éclairage sur le contexte particulier de l'IRC.

2. Métabolisme et propriétés des EETs

Les EETs sont des lipides actifs endogènes, produits du métabolisme de l'AA par les CYP450, notamment dans l'endothélium vasculaire. L'AA est métabolisé par trois principales voies. Les deux premières aboutissent à la synthèse des leucotriènes, via les lipoxygénases d'une part, et des thromboxanes et prostaglandines via les cyclooxygénases d'autre part. La troisième voie métabolique de l'AA permet la synthèse des EETs via les CYP450 de type époxygénase et des acides hydroxyeicosatétraénoïques (19- et 20-HETEs) via les CYP450 de type ω-oxygénases [12]. Chez l'homme, les CYP450 2J et 2C sont les deux principales isoformes responsables de la synthèse de 4 régio-isomères d'EETs (5,6-, 8–9-, 11,12- et 14,15-EET) sous la forme d'énantiomères S,R- ou R,S- [11]. Chez l'homme, les CYP450 2C sont les principaux cytochromes permettant la synthèse d'EETs dans les reins et le foie, alors que les CYP450 2J sont responsables de la synthèse d'EETs dans le cœur et les cellules endothéliales [10,12,13].

Après leur synthèse, les EETs peuvent être stockés dans des pools lipidiques par acylation puis libérés grâce à l'action directe de la phospholipase A2 lors de certains processus d'activation cellulaire. Les EETs sont rapidement dégradés par l'époxyde hydrolase soluble (sEH) en acides dihydroxyeicosatriénoïques (DHETs) qui sont biologiquement moins actifs. D'autres voies métaboliques de dégradation existent : la β-oxydation, l'élongation des chaînes et le métabolisme de certains régio-isomères par les cyclooxygénases [14]. Le métabolisme des EETs est présenté dans la Fig. 1.

Les propriétés physiologiques des EETs sont multiples. Proctor et al. [15] ont montré chez le rat que l'injection intravasculaire d'EETs augmente le flux sanguin et induit une vasodilatation des artères mésentériques. Les EETs ont été identifiés comme facteurs hyperpolarisants dérivés de l'endothélium en 1996 [16]. William B et al. [16] ont montré que l'effet vasodilatateur des EETs sur des artères coronaires bovines isolées était aboli par un inhibiteur des canaux potassiques calcium-dépendants. Les mécanismes cellulaires vasodilatateurs des EETs sont représentés dans la Fig. 2. Chez l'homme, le rôle des EETs dans la dilatation endothélium-dépendante en réponse à l'augmentation du flux sanguin a été montré in vivo pour la première fois par notre équipe [17]. À l'inverse, au niveau

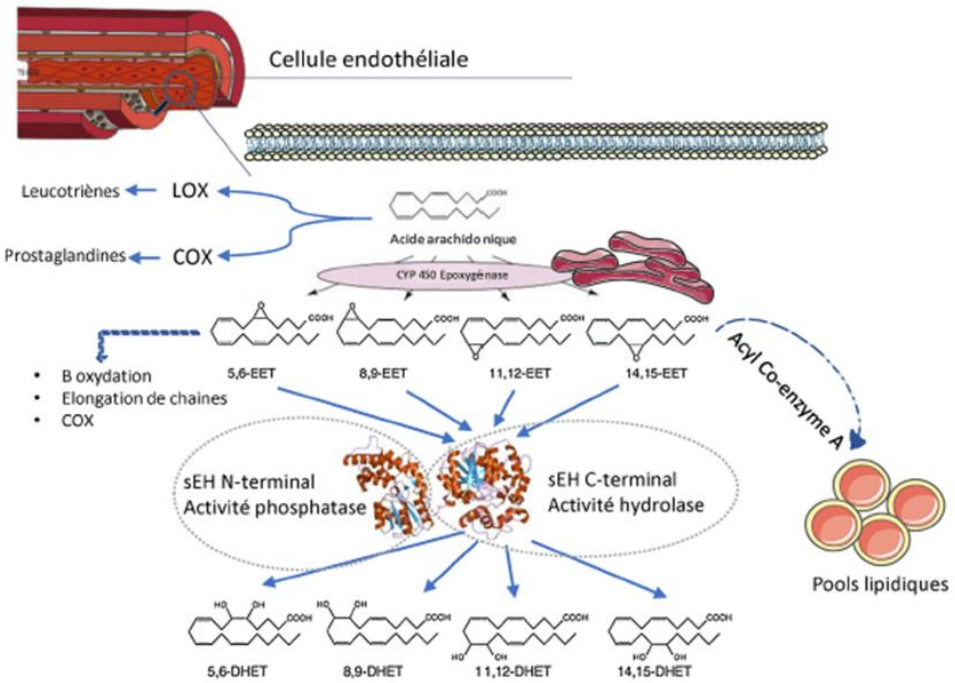


Fig. 1. Métabolisme des EETs. Les CYP450 époxygénases présents dans leréticulum endoplasmique perlettent de métaboliser les AA en différentsrégio-isomères d'EETs, qui seront stockés dans les pools lipidiques soitdégradés en leurs dérivés Diols par la sEH soit métabolisés par d'autres voies :b-oxydation, élongation de chaînes. LOX : lipoxygénase ; COX : cyclooxygénase ; AA : acide arachidonique ; CYP450 : cytochrome P450 ; EET : acides époxyeicosatriénoïques ; sEH : époxyde hydrolase soluble ; DHET : acides dihydroxyeicosatriénoïques.

pulmonaire, les EETs vont induire une vasoconstriction via l'activation des canaux TRPC6 et l'entrée de calcium au niveau des cellules musculaires lisses artérielles [18,19].

Les EETs ont également des effets anti-inflammatoires très puissants. Ils diminuent notamment l'expression de VCAM-1 et réduisent ainsi l'adhésion cellulaire à la paroi vasculaire [20]. De plus, les EETs ont un effet freinateur sur la voie NF-κB [21,22].

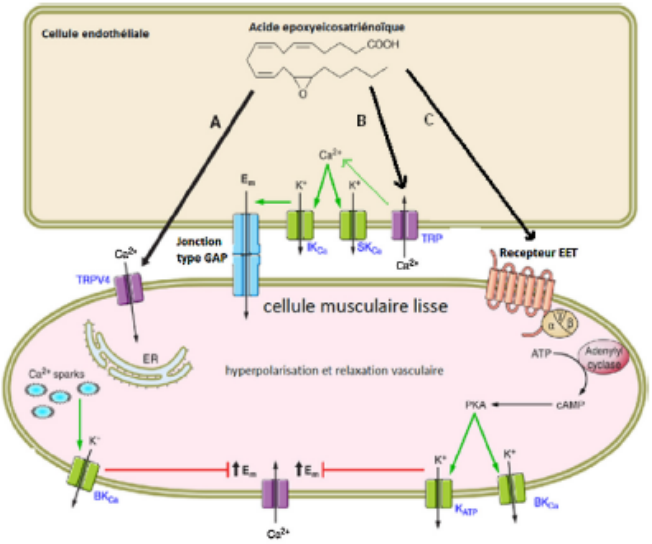
D'autre part, les EETs ont une action pro-angiogénique en favorisant la prolifération des cellules endothéliales par l'induction de l'expression du facteur de croissance vasculaire endothélial VEGF [23,24].

3. L'époxyde hydrolase soluble (sEH)

La sEH, transcrite à partir du gène *EPHX2*, est une enzyme appartenant à la famille des α/β hydrolases. La sEH chez les mammifères est ubiquitaire et est localisée dans le cytosol et les peroxysomes. Elle est constituée de 2 monomères de 62 kDa possédant chacun une activité enzymatique précise : une activité hydrolase et une activité phosphatase. L'activité hydrolase de la sEH chez l'homme se situe dans la partie C-terminale, tandis que l'activité phosphatase est portée par la partie N-terminale [12]. L'activité hydrolase est régio-sélective et permet de convertir les époxydes en leurs dérivés diols correspondants (Fig. 1). Le substrat préférentiel de la sEH est le 14,15-EET suivi du 11,12-, 8,9- et 5,6-EET. Les EETs sont métabolisés en leurs dérivés DHETs, biologiquement moins actifs [10]. À ce jour, plusieurs familles d'inhibiteurs de l'activité hydrolase de la sEH existent mais les molécules ayant un pharmacophore dérivé de l'urée sont les plus puissantes et l'optimisation de leur structure a permis d'obtenir des propriétés pharmacocinétiques favorables pour leur administration orale [25]. Le rôle de l'activité phosphatase de la sEH reste à ce jour inconnu du fait de l'absence d'inhibiteurs spécifiques. In vitro, il a été montré que l'activité phosphatase de la sEH est impliquée dans la déphosphorylation des acides lysophosphatidiques et de certains précurseurs du cholestérol [26].

4. Effets cardiaques des EETs

L'une des complications majeures de l'IRC est l'hypertrophie cardiaque [6]. Ai et al. [27] ont montré chez le rat hypertendu par perfusion d'angiotensine II une surexpression de la sEH au niveau cardiaque. Cette expression de la sEH était associée à une augmentation de son activité enzymatique. L'inhibition de la sEH dans ce modèle a permis de prévenir l'hypertrophie cardiaque induite par l'angiotensine II et de réduire l'expression cardiaque du gène β-MHC. Le traitement par un inhibiteur de la sEH dans un modèle d'hypertrophie cardiaque induite par la constriction de l'aorte thoracique chez la souris C57BL/6J prévient l'hypertrophie cardiaque et diminue l'expression des gènes marqueurs d'hypertrophie cardiaque *β-MHC* et *ANF* [28].



Adapté de Imig JD. Physiol Rev. janv 2012;92(1):101-30.

Fig. 2. Effets des EETs sur la cellule endothéliale et la cellule musculaire lisse. Voie A : les EETs produits par la cellule endothéliale activent le canal TRPV4 sur la cellule musculaire lisse, libérant du calcium intracellulaire par le réticulum endoplasmique et activant ainsi les canaux KCa de grande conductance (BKCa), entraînant l'hyperpolarisation et la relaxation des cellules musculaires lisses. Voie B : par voie autocrine, les EETs activent les canaux TRP permettant l'influx de calcium, celui-ci active les canaux KCa de petite conductance ou de conductance intermédiaire (SKCa ou IKCa respectivement), entraînant l'hyperpolarisation de la cellule endothéliale. Cette hyperpolarisation est alors transmise à la cellule musculaire lisse par l'intermédiaire des jonctions de communication « gap junctions ». Voie C : sur la cellule musculaire lisse, les EETs sefixent sur des récepteurs non définis à ce jour, permettant la synthèse d'AMPc grâce à l'Adenylatecyclase, et de protéine Kinase A, activant par la suite les canaux KCa de grande conductance (BKCa) et les pompes K-ATP, entraînant l'hyperpolarisation et la relaxation des cellules musculaires lisses.

Un travail de notre laboratoire [29] a mis en évidence dans un modèle d'hypertension artérielle réno-vasculaire (2 reins 1 clip) chez des souris FVB/N une surexpression de la sEH au niveau vasculaire. Dans ce modèle, l'inhibition de la sEH a permis de prévenir le développement de l'hypertrophie cardiaque. D'autre part, l'augmentation de la biodisponibilité des EETs par surexpression du CYP450 2J2 au niveau des cardiomyocytes prévient l'hypertrophie cardiaque chez les souris C57BL/6J perfusée par de l'angiotensine II [30].

La réduction de la taille des cardiomyocytes après traitement par un inhibiteur de la sEH a été observée dans les études décrites précédemment [27,28,30]. Nous avons montré une réduction de la fibrose cardiaque après l'inhibition de la sEH par l'AUDA dans un modèle d'insuffisance cardiaque chronique post-infarctus chez des rats Wistar [31]. Cet effet préventif sur le développement de la fibrose myocardique a également été observé chez des rats avec un syndrome métabolique induit par un régime enrichi en graisses saturés [32]. Dans un modèle de souris obèse avec résistance à l'insuline, notre équipe a rapporté une moindre activation de la voie NF-κB après le traitement avec l'inhibiteur de la sEH [33].

La surexpression du CYP450 2J2 prévient également l'hypertrophie cardiaque dans un modèle de cardiopathie liée à l'alcool chez la souris C57BL/6J, [34] via une limitation du stress oxydatif, une activation de l'autophagie et une limitation de l'apoptose. La modulation de l'autophagie au niveau des cardiomyocytes joue probablement un rôle très important dans la prévention du remodelage cardiaque par les EETs [35]. Dans ces études [28,29,31,33], la prévention de l'hypertrophie cardiaque était associée à une amélioration de la fonction cardiaque évaluée par échocardiographie ou par cathétérisme intra-cardiaque.

Chez l'homme, l'analyse des polymorphismes génétiques du gène *EPHX2* a mis en évidence que la présence du variant allélique K55R, qui augmente l'activité de la sEH, était associé à un surrisque d'événements CV (RR 1,45 ; IC 95 % [1,05–2,01], $p = 0{,}026$), suggérant indirectement le rôle protecteur des EETs [36].

5. Effets vasculaires des EETs

5.1. Effets sur la pression artérielle

L'hypertension artérielle (HTA) est l'une des complications majeures de l'IRC [37]. L'effet antihypertenseur des EETs a été largement étudié chez l'animal. Une première étude [38] a montré une réduction de l'HTA chez les rats spontanément hypertendus (SHR) après traitement par un inhibiteur de la sEH. Les souris transgéniques invalidées pour le gène de la *sEH* présentent une pression artérielle réduite [39]. Notre équipe a montré une réduction de l'HTA avec un traitement inhibiteur de la sEH chez des souris 2 reins 1 clip [29]. Cet effet antihypertenseur a également été observé chez le rat soumis à un régime

riche en graisses saturées [40] et chez le rat perfusé avec de l'angiotensine II [41].

5.2. Effets sur la fonction endothéliale

La dysfonction endothéliale, dont l'IRC est une cause établie [42], est associée à la survenue des complications CV de la maladie [9]. Zhang et al. [43] ont montré une prévention de la dysfonction endothéliale lors de l'inhibition de la sEH au niveau de l'artère mésentérique de souris diabétique, d'aorte et d'artère mésentérique de souris obèses et une amélioration de la fonction endothéliale aortique chez les rats hypertendus perfusé avec de l'angiotensine II. Notre équipe [29] a montré une prévention de la dysfonction endothéliale des artères coronaires dans un modèle de souris avec HTA réno-vasculaire traitées par un inhibiteur de la sEH. Dans un modèle d'insuffisance cardiaque post-infarctus chez le rat Wistar, nous avons montré une amélioration de la perfusion myocardique évaluée par IRM, probablement par amélioration de la fonction endothéliale coronaire et par l'effet pro-angiogénique des EETs en diminuant la raréfaction des capillaires [31]. Enfin, dans une population afro-américaine, la présence du polymorphisme R287Q du gène *EPHX2*, qui réduit l'activité hydrolase, est associée à une augmentation de la dilatation endothélium-dépendante [44], suggérant également chez l'homme un effet protecteur des EETs à ce niveau.

5.3. EETs et athérosclérose

L'athérosclérose est la première cause d'infarctus de myocarde et d'accident vasculaire cérébral dans le monde [45] et sa prévalence chez les patients avec une IRC augmente avec l'aggravation de l'atteinte rénale [46]. Les EETs permettraient de prévenir le développement des plaques d'athérosclérose. En effet, l'inhibition de la sEH chez les souris invalidées pour l'apolipoproteine E diminue le nombre de plaques athéromateuses [47]. Ulu et al. ont montré que l'inhibition de la sEH chez des souris perfusées avec de l'angiotensine II, permettait une réduction des plaques athéromateuses et une diminution de taille des anévrysmes aortiques abdominaux [48]. De façon inattendue chez l'homme, l'étude du polymorphisme Arg287Gln du gène *EPHX2*, qui réduit l'activité hydrolase, est associé à un risque plus élevé de calcifications coronaires dans une population noire américaine, mais pas dans une population caucasienne [49]. Une autre étude a montré que le polymorphisme R287Q était associé aux calcifications carotidiennes dans la population caucasienne [50]. Ces résultats pourraient s'expliquer par l'impact de ce polymorphisme sur l'activité phosphatase de la sEH.

6. Effets rénaux des EETs

La néphroprotection est un objectif majeur dans le traitement de l'IRC et des syndromes cardiorénaux en particulier. Au-delà des thérapeutiques actuellement utilisées, telles que les inhibiteurs de l'enzyme de conversion, la modulation de la biodisponibilité des EETs pourrait être particulièrement intéressante.

La sEH s'exprime principalement dans la corticale rénale et la perfusion d'angiotensine II chez le rat augmente cette expression [51,52]. Dans ce modèle, l'angiotensine II a un effet vasoconstricteur sur l'artériole afférente rénale et le traitement par un inhibiteur de la sEH réduit cette vasoconstriction et permet de diminuer les scores histologiques liés aux dommages rénaux, de réduire l'expression du collagène de type IV et de diminuer l'excrétion urinaire d'albumine. Cet effet protecteur rénal des EETs a été démontré dans d'autres modèles expérimentaux d'IRC secondaires à une HTA ou un diabète. En effet, chez le rat spontanément hypertendu, une protéinurie associée à des lésions histologiques rénales est souvent observée. Le traitement par un inhibiteur de la sEH prévient l'apparition des lésions histologiques et réduit de façon significative la protéinurie [53]. Dans notre laboratoire, nous avons montré que l'inhibition de la sEH prévenait les dommages histologiques rénaux, baissait le taux d'albuminurie et diminuait l'inflammation dans un modèle de diabète chez des souris FVB/N [54]. L'un des mécanismes de cette prévention consistait en l'inhibition de la voie NF-κB au niveau rénal.

Dans un modèle expérimental d'obstruction unilatérale d'uretère chez la souris C57BL/6J, l'expression de la sEH rénale augmente après l'induction de la néphropathie. Le traitement par un inhibiteur de la sEH prévient l'inflammation et la fibrose rénale en réduisant le stress oxydatif, en bloquant la voie NF-κB et en activant la voie de PPARγ [55]. Ces mêmes résultats ont été reproduits avec des souris invalidées pour EPHX2.

Cependant, Jung O et al. [56] ont montré sur un modèle d'IRC par néphrectomie subtotale chez des souris 129SV que l'inhibition de la sEH augmentait l'excrétion d'albumine urinaire, aggravait les lésions rénales glomérulaires et augmentait la fibrose interstitielle. L'auteur expliquait les résultats par l'accumulation des EETs orientant la voie du métabolisme de l'AA vers la voie des cyclooxygénases et des lipooxygénases, avec production de métabolites pro-inflammatoires potentiellement néphrotoxiques.

L'expression rénale de la sEH augmente chez l'homme dans les néphropathies, en particulier dans la néphropathie à IgA, les podocytopathies à lésions glomérulaires minimes et la glomérulonéphrite extra-membraneuse [57]. L'expression de la sEH au niveau du tube contourné proximal était corrélée au degré de protéinurie. Le variant allélique rs1042032 du gène *EPHX2*, dont les conséquences sur la fonction de l'enzyme reste à déterminer, est associé à la perte de fonctionnement du greffon rénal [58], soulignant une nouvelle fois l'importance de cette voie à ce niveau.

6.1. Effet natriurétique des EETs

L'effet natriurétique des EETs est bien établi. Le 11,12-EET a un effet natriurétique en inhibant le canal ENaC au niveau du canal collecteur [59]. De plus, l'inhibition des CYP450 chez le rat soumis à un régime riche en sel diminue l'excrétion urinaire des EETs, induit une HTA et diminue l'excrétion urinaire de sodium [60]. Pavlov et al. ont démontré par la suite que les autres régio-isomères des EETs avaient le même effet inhibiteur du canal ENaC [61]. Sporková et al. ont montré dans un modèle

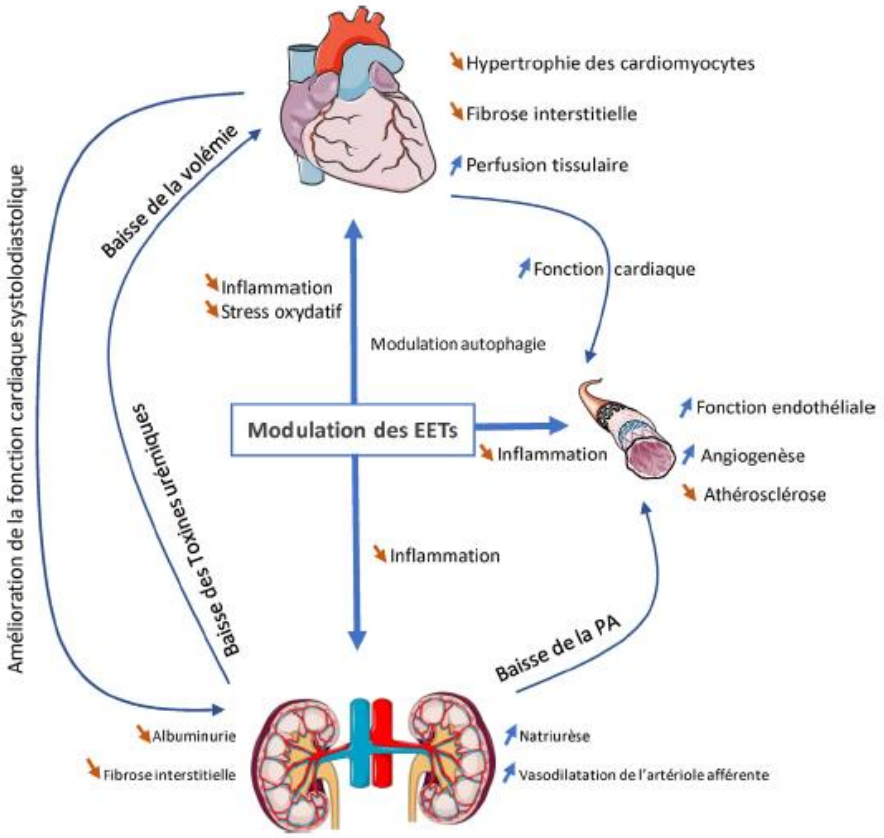


Fig. 3. Modulation des EETs et son impact sur l'axe cœur-vaisseaux-rein. La modulation des EETs dans l'IRC permettrait de réduire l'albuminurie et les dommages rénaux, de diminuer la surcharge hydro-sodée. L'amélioration cardiaque passerait par la réduction de la postcharge, la diminution de l'inflammation et l'augmentation de la perfusion tissulaire ainsi que l'action directe des EETssur le remodelage cardiaque. L'augmentation de la biodisponibilité des EETs permettrait au niveau vasculaire la baisse de la PA et la prévention de la dysfonction endothéliale. EET : acides époxyeicosatriénoïques ; IRC : insuffisance rénale chronique ; PA : pression artérielle.

d'HTA réno-vasculaire chez le rat que le traitement par un inhibiteur de la sEH augmentait la natriurèse par inhibition du canal ENaC, mais aussi par augmentation du débit sanguin rénal, via la vasodilatation de l'AA rénale induite par les EETs [62].

7. Conclusion

L'augmentation de la biodisponibilité des EETs par l'inhibition de la sEH permet dans différentes pathologies cardiovasculaires une amélioration des paramètres cardiaques histologiques et fonctionnels, une prévention vasculaire avec une diminution de l'athérosclérose et une amélioration de la fonction endothéliale ainsi qu'une protection rénale. Ceci est probablement médié par une modulation de l'inflammation, une amélioration de la perfusion tissulaire, une amélioration l'hémodynamique rénale et une réduction de la surcharge hydro-sodée. Ces effets bénéfiques pourraient avoir un impact important sur les événements CV liés à l'IRC (Fig. 3), faisant des EETs une nouvelle piste thérapeutique chez le patient insuffisant rénal chronique.

Déclaration de liens d'intérêts

Les auteurs auteurs déclarent ne pas avoir de liens d'intérêts.

Références

[1] Hill NR, Fatoba ST, Oke JL, Hirst JA, O'Callaghan CA, Lasserson DS, et al. Global prevalence of chronic kidney disease – a systematic review and meta-analysis. PLoS ONE 2016;11(7):e0158765.
[2] Schiffrin EL, Lipman ML, Mann JFE. Chronic kidney disease: effects on the cardiovascular system. Circ 2007;116(1):85–97.
[3] Tonelli M, Wiebe N, Culleton B, House A, Rabbat C, Fok M, et al. Chronic kidney disease and mortality risk: a systematic review. J Am Soc Nephrol 2006;17(7):2034–47.
[4] Foley RN, Parfrey PS, Sarnak MJ. Clinical epidemiology of cardiovascular disease in chronic renal disease. American J Kidney Dis 1998;32(5):S112–9.
[5] Go AS, Chertow GM, Fan D, McCulloch CE, Hsu C. Chronic kidney disease and the risks of death, cardiovascular events, and hospitalization. N Engl J Med 2004;351(13):1296–305.
[6] Park M, Hsu C, Li Y, Mishra RK, Keane M, Rosas SE, et al. Associations between kidney function and subclinical cardiac abnormalities in CKD. J Am Soc Nephrol 2012;23(10):1725–34.

[7] Ronco C, Haapio M, House AA, Anavekar N, Bellomo R. Cardiorenal syndrome. J Am Coll Cardiol 2008;52(19):1527–39.
[8] Richard V, Vercauteren M, Gomez E, Thuillez C. New pharmacological approaches in heart failure: should we treat the endothelium? Therapie 2009;64(2):93–100.
[9] Widlansky ME, Gokce N, Keaney JF, Vita JA. The clinical implications of endothelial dysfunction. J Am Coll Cardiol 2003;42(7):1149–60.
[10] 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 2011;131(1):1–17.
[11] Imig JD. Epoxides and soluble epoxide hydrolase in cardiovascular physiology. Physiol Rev 2012;92(1):101–30.
[12] Duflot T, Roche C, Lamoureux F, Guerrot D, Bellien J. Design and discovery of soluble epoxide hydrolase inhibitors for the treatment of cardiovascular diseases. Expert Opin Drug Discov 2014;9(3):229–43.
[13] Wu S, Moomaw CR, Tomer KB, Falck JR, Zeldin DC. Molecular cloning and expression of CYP2J2, a human cytochrome P450 arachidonic acid epoxygenase highly expressed in heart. J Biol Chem 1996;271(7):3460–8.
[14] Spector AA, Fang X, Snyder GD, Weintraub NL. Epoxyeicosatrienoic acids (EETs): metabolism and biochemical function. Prog Lipid Res 2004;43(1):55–90.
[15] Proctor KG, Falck JR, Capdevila J. Intestinal vasodilation by epoxyeicosatrienoic acids: arachidonic acid metabolites produced by a cytochrome P450 monooxygenase. Circ Res 1987;60(1):50–9.
[16] Campbell WB, Gebremedhin D, Pratt PF, Harder DR. Identification of epoxyeicosatrienoic acids as endothelium-derived hyperpolarizing factors. Circ Res 1996;78(3):415–23.
[17] Bellien J, Iacob M, Remy-Jouet I, Lucas D, Monteil C, Gutierrez L, et al. Epoxyeicosatrienoic acids contribute with altered nitric oxide and endothelin-1 pathways to conduit artery endothelial dysfunction in essential hypertension. Circ 2012;125(10):1266–75.
[18] Loot AE, Moneke I, Keserü B, Oelze M, Syzonenko T, Daiber A, et al. 11,12-EET stimulates the association of BK channel α and β(1) subunits in mitochondria to induce pulmonary vasoconstriction. PLoS ONE 2012;7(9):e46065.
[19] Loot AE, Fleming I. Cytochrome P450-derived epoxyeicosatrienoic acids and pulmonary hypertension: central role of transient receptor potential C6 channels. J Cardiovasc Pharmacol 2011;57(2):140–7.
[20] Node K, Huo Y, Ruan X, Yang B, Spiecker M, Ley K, et al. Anti-inflammatory properties of cytochrome P450 epoxygenase-derived eicosanoids. Science 1999;285(5431):1276–9.
[21] Deng Y, Edin ML, Theken KN, Schuck RN, Flake GP, Kannon MA, et al. Endothelial CYP epoxygenase overexpression and soluble epoxide hydrolase disruption attenuate acute vascular inflammatory responses in mice. FASEB J 2011;25(2):703–13.
[22] Imig JD. Epoxyeicosatrienoic acids and 20-Hydroxyeicosatetraenoic acid on endothelial and vascular function. Adv Pharmacol 2016;77:105–41.
[23] Fleming I. Epoxyeicosatrienoic acids, cell signaling and angiogenesis. Prostaglandins Other Lipid Mediat 2007;82(1–4):60–7.
[24] Webler AC, Michaelis UR, Popp R, Barbosa-Sicard E, Murugan A, Falck JR, et al. Epoxyeicosatrienoic acids are part of the VEGF-activated signaling cascade leading to angiogenesis. Am J Physiol, Cell Physiol 2008;295(5):C1292–301.
[25] Liu J-Y, Tsai H-J, Hwang SH, Jones PD, Morisseau C, Hammock BD. Pharmacokinetic optimization of four soluble epoxide hydrolase inhibitors for use in a murine model of inflammation. Br J Pharmacol 2009;156(2):284–96.
[26] Morisseau C, Schebb NH, Dong H, Ulu A, Aronov PA, Hammock BD. Role of soluble epoxide hydrolase phosphatase activity in the metabolism of lysophosphatidic acids. Biochem Biophys Res Commun 2012;419(4):796–800.
[27] Ai D, Pang W, Li N, Xu M, Jones PD, Yang J, et al. Soluble epoxide hydrolase plays an essential role in angiotensin II-induced cardiac hypertrophy. Proc Natl Acad Sci USA 2009;106(2):564–9.
[28] Xu D, Li N, He Y, Timofeyev V, Lu L, Tsai H-J, et al. Prevention and reversal of cardiac hypertrophy by soluble epoxide hydrolase inhibitors. Proc Natl Acad Sci USA 2006;103(49):18733–8.
[29] Gao J, Bellien J, Gomez E, Henry J-P, Dautreaux B, Bounoure F, et al. Soluble epoxide hydrolase inhibition prevents coronary endothelial dysfunction in mice with renovascular hypertension. J Hypertens 2011;29(6):1128–35.
[30] He Z, Zhang X, Chen C, Wen Z, Hoopes SL, Zeldin DC, et al. Cardiomyocyte-specific expression of CYP2J2 prevents development of cardiac remodelling induced by angiotensin II. Cardiovasc Res 2015;105(3):304–17.
[31] Merabet N, Bellien J, Glevarec E, Nicol L, Lucas D, Remy-Jouet I, et al. Soluble epoxide hydrolase inhibition improves myocardial perfusion and function in experimental heart failure. J Mol Cell Cardiol 2012;52(3):660–6.
[32] Iyer A, Kauter K, Alam MA, Hwang SH, Morisseau C, Hammock BD, et al. Pharmacological inhibition of soluble epoxide hydrolase ameliorates diet-induced metabolic syndrome in rats. Exp Diabetes Res 2012;2012:758614.
[33] Roche C, Besnier M, Cassel R, Harouki N, Coquerel D, Guerrot D, et al. Soluble epoxide hydrolase inhibition improves coronary endothelial function and prevents the development of cardiac alterations in obese insulin-resistant mice. Am J Physiol Heart Circ Physiol 2015;308(9):H1020–9.
[34] Zhou C, Huang J, Li Q, Zhan C, Xu X, Zhang X, et al. CYP2J2-derived EETs attenuated ethanol-induced myocardial dysfunction through inducing autophagy and reducing apoptosis. Free Radic Biol Med 2018;117:168–79.
[35] Samokhvalov V, Alsaleh N, El-Sikhry HE, Jamieson KL, Chen CB, Lopaschuk DG, et al. Epoxyeicosatrienoic acids protect cardiac cells during starvation by modulating an autophagic response. Cell Death Dis 2013;4:e885.
[36] Lee CR, North KE, Bray MS, Fornage M, Seubert JM, Newman JW, et al. Genetic variation in soluble epoxide hydrolase (EPHX2) and risk of coronary heart disease: The Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC) study. Hum Mol Genet 2006;15(10):1640–9.
[37] Thomas G, Drawz PE. BP measurement techniques: what they mean for patients with kidney disease. Clin J Am Soc Nephrol 2018, http://dx.doi.org/10.2215/CJN.12551117 [ePress].
[38] Yu Z, Xu F, Huse LM, Morisseau C, Draper AJ, Newman JW, et al. Soluble epoxide hydrolase regulates hydrolysis of vasoactive epoxyeicosatrienoic acids. Circ Res 2000;87(11):992–8.
[39] Sinal CJ, Miyata M, Tohkin M, Nagata K, Bend JR, Gonzalez FJ. Targeted disruption of soluble epoxide hydrolase reveals a role in blood pressure regulation. J Biol Chem 2000;275(51):40504–10.
[40] Huang H, Morisseau C, Wang J, Yang T, Falck JR, Hammock BD, et al. Increasing or stabilizing renal epoxyeicosatrienoic acid production attenuates abnormal renal function and hypertension in obese rats. Am J Physiol Renal Physiol 2007;293(1):F342–9.
[41] Imig JD, Zhao X, Capdevila JH, Morisseau C, Hammock BD. Soluble epoxide hydrolase inhibition lowers arterial blood pressure in Angiotensin II hypertension. Hypertens 2002;39(2):690–4.
[42] Yilmaz MI, Stenvinkel P, Sonmez A, Saglam M, Yaman H, Kilic S, et al. Vascular health, systemic inflammation and progressive reduction in kidney function; clinical determinants and impact on cardiovascular outcomes. Nephrol Dial Transplant 2011;26(11):3537–43.
[43] Zhang L-N, Vincelette J, Chen D, Gless RD, Anandan S-K, Rubanyi GM, et al. Inhibition of soluble epoxide hydrolase attenuates endothelial dysfunction in animal models of diabetes, obesity and hypertension. Eur J Pharmacol 2011;654(1):68–74.
[44] Lee CR, Pretorius M, Schuck RN, Burch LH, Bartlett J, Williams SM, et al. Genetic variation in soluble epoxide hydrolase (EPHX2) is associated with forearm vasodilator responses in humans. Hypertens 2011;57(1):116–22.
[45] Vinereanu D. Risk factors for atherosclerotic disease: present and future. Herz 2006;31(Suppl 3):5–24.
[46] Betriu A, Martinez-Alonso M, Arcidiacono MV, Cannata-Andia J, Pascual J, Valdivielso JM, et al. Prevalence of subclinical atheromatosis and associated risk factors in chronic kidney disease: the NEFRONA study. Nephrol Dial Transplant 2014;29(7):1415–22.
[47] Ulu A, Davis BB, Tsai H-J, Kim I-H, Morisseau C, Inceoglu B, et al. Soluble epoxide hydrolase inhibitors reduce the development of atherosclerosis in apolipoprotein e-knockout mouse model. J Cardiovasc Pharmacol 2008;52(4):314–23.

[48] Zhang L-N, Vincelette J, Cheng Y, Mehra U, Chen D, Anandan S-K, et al. Inhibition of soluble epoxide hydrolase attenuated atherosclerosis, abdominal aortic aneurysm formation, and dyslipidemia. Arterioscler Thromb Vasc Biol 2009;29(9):1265–70.

[49] Fornage M, Boerwinkle E, Doris PA, Jacobs D, Liu K, Wong ND. Polymorphism of the soluble epoxide hydrolase is associated with coronary artery calcification in African-American subjects: The Coronary Artery Risk Development in Young Adults (CARDIA) study. Circ 2004;109(3):335–9.

[50] Burdon KP, Lehtinen AB, Langefeld CD, Carr JJ, Rich SS, Freedman BI, et al. Genetic analysis of the soluble epoxide hydrolase gene EPHX2, in subclinical cardiovascular disease in the Diabetes Heart Study. Diab Vasc Dis Res 2008;5(2):128–34.

[51] Imig JD. Epoxide hydrolase and epoxygenase metabolites as therapeutic targets for renal diseases. Am J Physiol Renal Physiol 2005;289(3):F496–503.

[52] Zhao X, Yamamoto T, Newman JW, Kim I-H, Watanabe T, Hammock BD, et al. Soluble epoxide hydrolase inhibition protects the kidney from hypertension-induced damage. J Am Soc Nephrol 2004;15(5):1244–53.

[53] Li J, Carroll MA, Chander PN, Falck JR, Sangras B, Stier CT. Soluble epoxide hydrolase inhibitor AUDA, prevents early salt-sensitive hypertension. Front Biosci 2008;13:3480–7.

[54] Roche C, Guerrot D, Harouki N, Duflot T, Besnier M, Rémy-Jouet I, et al. Impact of soluble epoxide hydrolase inhibition on early kidney damage in hyperglycemic overweight mice. Prostaglandins Other Lipid Mediat 2015;120:148–54.

[55] Kim J, Imig JD, Yang J, Hammock BD, Padanilam BJ. Inhibition of soluble epoxide hydrolase prevents renal interstitial fibrosis and inflammation. Am J Physiol Renal Physiol 2014;307(8):F971–80.

[56] Jung O, Jansen F, Mieth A, Barbosa-Sicard E, Pliquett RU, Babelova A, et al. Inhibition of the soluble epoxide hydrolase promotes albuminuria in mice with progressive renal disease. PLoS ONE 2010;5(8):e11979.

[57] Wang Q, Pang W, Cui Z, Shi J, Liu Y, Liu B, et al. Upregulation of soluble epoxide hydrolase in proximal tubular cells mediated proteinuria-induced renal damage. Am J Physiol Renal Physiol 2013;304(2):F168–76.

[58] Lee SH, Lee J, Cha R, Park MH, Ha JW, Kim S, et al. Genetic variations in soluble epoxide hydrolase and graft function in kidney transplantation. Transplant Proc 2008;40(5):1353–6.

[59] Wei Y, Lin D-H, Kemp R, Yaddanapudi GSS, Nasjletti A, Falck JR, et al. Arachidonic acid inhibits epithelial Na channel via cytochrome P450 (CYP) epoxygenase-dependent metabolic pathways. J Gen Physiol 2004;124(6):719–27.

[60] Makita K, Takahashi K, Karara A, Jacobson HR, Falck JR, Capdevila JH. Experimental and/or genetically controlled alterations of the renal microsomal cytochrome P450 epoxygenase induce hypertension in rats fed a high salt diet. J Clin Invest 1994;94(6):2414–20.

[61] Pavlov TS, Ilatovskaya DV, Levchenko V, Mattson DL, Roman RJ, Staruschenko A. Effects of cytochrome P-450 metabolites of arachidonic acid on the epithelial sodium channel (ENaC). Am J Physiol Renal Physiol 2011;301(3):F672–81.

[62] Sporková A, Kopkan L, Varcabová S, Husková Z, Hwang SH, Hammock BD, et al. Role of cytochrome P-450 metabolites in the regulation of renal function and blood pressure in 2-kidney 1-clip hypertensive rats. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol 2011;300(6):R1468–75.

Le **deuxième article** s'intéresse à la modulation des acides époxyeicostrienoïques par l'inhibition de l'époxyde hydrolase soluble dans la MRC. L'étude a été réalisée sur des souris 129/Sv ayant subies une néphrectomie des 5/6ème et s'intitule « Soluble epoxide hydrolase inhibition prevents the cardiac and vascular consequences of 5/6 nephrectomy ». L'article est en cours de soummission.

Soluble epoxide hydrolase inhibition prevents the cardiac and vascular consequences of 5/6 nephrectomy

Soluble epoxide hydrolase inhibition prevents the cardiac and vascular consequences of 5/6 nephrectomy

AUTHORS:

Mouad Hamzaoui [1,2], *MD, MSc*, Clothilde Roche [1], *PhD*, David Coquerel [1], *PhD*, Thomas Duflot [1,3], *MD, PhD*, Valery Brunel [4], *PharmD*, Paul Mulder [1], *PharmD, PhD*, Vincent Richard [1], *PhD*, Jérémy Bellien [1,3], *PharmD, PhD*, Dominique Guerrot [1,2], *MD, PhD.*

AFFILIATIONS:

1. Normandie Univ, UNIROUEN, INSERM U1096, FHU REMOD-VHF, 76000 Rouen, France
2. Nephrology Department, Rouen University Hospital, Rouen, France
3. Pharmacology Department, Rouen University Hospital, Rouen, France
4. Biochemistry Department, Rouen University Hospital, Rouen, France

WORD COUNT: 2702

CORRESPONDING AUTHOR:

Dr. Mouad Hamzaoui

Nephrology Department, Rouen University Hospital, Rouen, France

1 rue de Germont, 76031 Rouen, France

mouad.hamzaoui@chu-rouen.fr

Tel: +33 2 32 88 90 02

Fax: +33 2 32 88 91 15

KEYWORDS:

Cardiorenal syndrome, heart failure, endothelial dysfunction, chronic kidney disease, arachidonic acid, epoxyeicosatrienoic acids.

All authors have read and approved the submission of the manuscript. The manuscript has not been published and is not being considered for publication elsewhere, in whole or in part, in any language, except as an abstract. None of the authors has any conflicting interest related to this work.

ABSTRACT

Objectives: Cardiovascular disease (CVD) is the leading cause of morbi-mortality in patients with chronic kidney disease (CKD). Endothelial dysfunction is considered as a pathogenic factor linking CKD and CVD. The aim of this project is to study the cardiac and endothelial impact of the pharmacological inhibition of soluble epoxide hydrolase (sEH), which metabolizes/inactivates the endothelium-derived vasodilatory and anti-inflammatory epoxyfatty acids, in the 5/6 nephrectomy model. **Methods:** 5/6 Nx mice were treated with the sEH inhibitor t-AUCB or placebo for 3 months. Echocardiography was performed before sacrifice. Hearts were weighed and histologic analyses were performed to evaluate fibrosis. Arterial pressure was mesured by plethysmography. Endothelial function was studied ex vivo using flow mediated dilatation (FMD) on the mesenteric artery. Sequential blood and urine tests were performed to assess kidney function. **Results:** Following 5/6 Nx, mice developed CKD. The CV consequences were heart hypertrophy (heart weight Nx vs. Sham: 185±19 vs.116±6 mg, $p<0.01$), diastolic dysfunction (E/A Nx vs. Sham: 0.93±0.03 vs. 1.31±0.05, $p<0.0001$), systolic dysfunction (LVEF Nx 5/6 vs. Sham: 67±4 vs. 88±2%, $p<0.01$) diffuse cardiac fibrosis (Nx vs. Sham: 13±1 vs. 7±1 %, $p<0.01$) and hypertension (SBP Nx vs. Sham: 165±8 vs. 130±7 mmHg, $p< 0.05$). t-AUCB significantly prevented heart hypertrophy (Nx t-AUCB: 134±6 mg, $p<0.0281$ vs. Nx), diastolic dysfunction (Nx t-AUCB: 1.12±0.04 $p<0.0024$ vs. Nx), systolic dysfunction (Nx t-AUCB: 86±3 %, $p=0.0033$) with significant beneficial effects on cardiac fibrosis (Nx t-AUCB : 9±1 % p:ns vs. Nx). t-AUCB did not prevent hypertension (Nx t-AUCB: 160±8 mmHg, p:ns vs. Nx 5/6). Nx induced endothelial dysfunction, demonstrated by impaired FMD. t-AUCB blunted this alteration. **Conclusion:** Inhibition of sEH reduces the cardiac hypertrophy, and the diastolic and systolic dysfunctions associated with CKD. Our results suggest that these beneficial effects may be mediated by the prevention of endothelial dysfunction, independent from kidney preservation and antihypertensor effect, suggesting that inhibition of sEH holds a therapeutic potential in preventing CKD-associated CVD.

INTRODUCTION

Chronic kidney disease (CKD) is an important health care problem with a worldwide prevalence around 13% (1). CKD is an independent risk factor for cardiovascular (CV) diseases and CV events are the first cause of death in this population (2). The association between CKD and the occurrence of chronic heart disease has been named uremic cardiopathy or type 4 cardiorenal syndrome (3). In this setting, the crosstalk between the diseased kidney and heart is not fully understood. The pathophysiology of type 4 cardiorenal syndrome is predominantly mediated by reciprocal hemodynamic effects, neurohormonal activation, inflammation, anaemia and disturbances in the hydro electrolytic balance (4,5). Abnormalities of the bone-mineral axis also play a role in the pathogenesis of cardiorenal syndrome (6,7). Fibroblast growth factor-23 (FGF-23), secreted by osteocytes, regulates phosphate and vitamin D homeostasis and its plasma concentration rises as the kidney function declines. Several studies have shown that higher levels of FGF-23 are associated with a higher risk of death (8,9). In spite of significant breakthroughs in our understanding and treatment of the CV disease associated with CKD, mortality remains high and identifying new therapeutic targets is of critical importance.

Epoxyeicosatrienoic acids (EETs) are arachidonic acid derivatives synthesized by cytochrome P450 (CYP450) epoxygenases (10). EETs are endothelium-derived hyperpolarizing factors with potent antihypertensive, anti-inflammatory and anti-proliferative properties (11,12). They are rapidly hydrated into the less active dihydroxyeicosatrienoic acids (DHETs), by an enzyme called soluble epoxide hydrolase (sEH). Thus, inhibition of sEH appears as an interesting pharmacological approach to increase the bioavailability of EETs in various diseases. In particular, sEH inhibitors were shown to reduce hypertension and endothelial damage in angiotensin II-dependent models (9,11) and to prevent cardiac dysfunction and remodelling in experimental heart failure (10,12). In human, genetic polymorphisms of *EPHX2*, which encodes sEH, could either increase hydrolase activity which is associated with a higher occurrence of ischemic cardiac events (13), or decrease its activity associated with higher endothelium-dependant dilatation in resistance arteries (16), strengthening the interest of inhibiting sEH in cardiovascular diseases. At the renal level, the beneficial impact of sEH inhibition is less clear (17–20) and no study has evaluated the interest of this strategy in type 4 cardiorenal syndrome.

In this study we analysed the impact of sEH inhibition on the CV consequences induced by 5/6 nephrectomy (5/6 Nx) in mice, a classical model of CKD.

MATERIAL AND METHODS

Animals and treatments

All experiments were carried out in 129/Sv male mice, aged 8 weeks and weighing between 20 and 26 g (January laboratory, Genest Isle), in accordance with the standards and ethical rules (CENOMEXA C2EA-54). The surgical procedures were performed by a single experienced operator in order to ensure reproducibility. Briefly, surgical procedure consisted in ligation of the upper branch of the left kidney artery, followed by a cauterization of the lower pole of the left kidney, leading to 2/3 of non-functioning left kidney. One week later, the right kidney was removed, inducing 5/6 Nx. One week after removal of the right kidney, 5/6 Nx mice were randomized into two groups to receive either the sEH inhibitor *trans*-4-(4-(3-adamantan-1-yl-ureido)-cyclohexyloxy)-benzoic acid (*t*-AUCB: 15 mg/l in drinking water after dilution in 15-mL PEG 400) or vehicle (PEG 400) until sacrifice. A third group of sham-operated mice (surgical laparotomy) served as controls.

Blood and urine analyses

One month after surgery, 100 µl retro-orbital blood samples were collected in anesthetized animals (isoflurane: 1.5%) to quantify plasma creatinine by enzymatic method. At sacrifice, blood samples were collected allowing to measure plasma creatinine, soluble vascular cell adhesion molecule 1 (sVCAM-1) and fibroblast growth factor-23 (FGF-23) were assessed by enzyme-linked immunosorbent assays (ab100750, Abcam and EZMFGF23-43K, EMD Millipore respectively). In addition, the plasma levels of 14,15-EET, the preferential substrate of sEH, its metabolite 14,15-DHET, and hydroxyeicosatetraenoic acids (5-HETE, 12-HETE and 15-HETE), derived from the lipoxygenase (LOX) metabolites of arachidonic acid, were quantified by LC-MS/MS using a previously published method (21,22). The ratio of 14,15-DHET-to-14,15-EET was used as an index of sEH activity.

24-h urine was collected 1 and 3 months after surgical procedure using metabolic cages. Urine albumin and aldosterone were measured at 3 months using enzyme-linked immunosorbent assays (ab108792 and ab136933, respectively; Abcam, Paris, France). Na^+ excretion was quantified using standard procedure.

Systolic blood pressure

Non-invasive measurements of systolic blood pressure were performed by tail cuff plethysmography (CODA, Kent Scientific Corporation) 3 months after surgery. These measurements were performed in conscious and trained mice and consisted in 2 series of 10 cycles of measurements for each animal.

Cardiac function

In mice anesthetized with isoflurane (1.5-2%), left ventricular end-diastolic and end-systolic diameters (LVEDD and LVESD, respectively) were assessed 3 months after surgery, using a Vivid 7 ultrasound device (GE medical). The heart was imaged in the two-dimensional mode in the parasternal short-axis view. Ejection fraction (EF) was calculated from the LV cross-sectional area as EF (%) = ((LVDA – LVSA)/LVDA) x 100 where LVDA and LVSA are LV diastolic and systolic area, estimated from LVEDD and LVESD. In addition, a pulsed Doppler of the LV outflow was performed to obtain heart rate (HR). Doppler measurements were made at the tip of the mitral leaflets for diastolic filling profiles in the apical four-chamber view, allowing to determine peak early (E) and late (A) mitral inflow velocities, and calculation of the E/A ratio, as estimate of diastolic function.

Vascular function

Flow-mediated dilatation (FMD) was assessed on second mesenteric resistance artery segment. Briefly, the mesentery was removed and placed in cold oxygenated Krebs buffer. A 2-3 mm segment of third mesenteric resistance artery segment was isolated and mounted on an arteriograph (DMT, Denmark). Vessels were pre-constricted using 10^{-5} M phenylephrine (Phe) before assessing the dilatory response to stepwise increase in intraluminal flow (3, 6, 10, 15,

20, 25, 50, 75 and 100 µL/min). FMD was assessed in the absence and in the presence of the endothelial NOS inhibitor Nω-nitro-l-arginine (l-NAME; 10−4 M) and the CYP450 epoxygenase inhibitor Fluconazole (10−4 M).

Histology

In 5/6 Nx mice, the remnant kidney was removed at sacrifice. Kidney histological lesions were analysed after Masson's staining as previously described (23). The slides were independently examined on a blinded basis, using a 0 to 4 injury scale for the level of interstitial inflammation, interstitial fibrosis and glomerulosclerosis at magnification x20 (0: no damage; 1: <25% of kidney damaged; 2: 25-50% of kidney damaged; 3: 50-75% of kidney damaged; 4: 75-100% of kidney damaged). Tubular lesions were analysed at magnification x10. Vascular thickening and vascular fibrosis were analysed at magnification x40. The upper half of kidney was not analysed since it was ischemic in 5/6 Nx groups.

The heart was harvested, weighed and a section of the left ventricle was snap-frozen for subsequent determination of LV fibrosis, using 8-µm thick histological slices stained with Sirius Red as previously described (23).

Statistical analyses

Data were expressed as mean values ± SEM. Comparison between groups was performed by one-way ANOVA, followed by Tukey multiple comparison post-tests, For FMD, analysis was performed by two-way ANOVA with Dunnett's multiple comparisons test. A value of $p < 0.05$ was considered statistically significant. Survival was analysed using Log-rank (Mantel-Cox) test. Statistical tests were performed with Prism software version 8 (8.0.2 263).

RESULTS

sEH activity

Compared to sham-operated mice, we observed an increase in 14,15-DHET-to-14,15-EET ratio in 5/6 Nx mice treated with the vehicle (Figures 1A and 1B), demonstrating increased sEH activity. As expected, this increase was reduced by the sEH inhibitor *t*-AUCB. In addition, 5/6 Nx was associated with an increase in HETE plasma levels that was prevented by *t*-AUCB (Supplementary Figure 1A-C).

Body weight, survival

Body weight increased in sham-operated mice from surgery to sacrifice but not in 5/6 Nx mice treated with either vehicle or *t*-AUCB (Figure 1B), without significant change in survival between groups. (Figure 1C).

Kidney parameters

The onset of CKD was demonstrated by a significant increase in plasma creatinine 1 and 3 months after 5/6 Nx (Figure 2A) which was not prevented by *t*-AUCB. In addition, the urine volume 1 and 3 months after surgery and the urine albumin/creatinine ratio at 3 months increased to a similar extent in 5/6 Nx mice treated with vehicle or *t*-AUCB (Figures 2B and 2C). Similarly, the development of glomerulosclerosis, interstitial fibrosis, inflammation, tubular injury and vascular lesions induced by 5/6 Nx was not modified by *t*-AUCB (Figures 3A-E).

Systemic hemodynamics and cardiac parameters

Compared to sham-operated mice, systolic arterial pressure was similarly increased 3 months after surgery in 5/6 Nx mice treated with vehicle or *t*-AUCB (Figure 4A). LVEF and E/A ratio decreased significantly in 5/6 Nx mice treated with vehicle but not in mice treated with *t*-AUCB (Figures 4B and 4C). In addition, *t*-AUCB prevented the increase in heart weight as well as LV

fibrosis induced by 5/6 Nx (Figures 4D and 4E). This was observed while *t*-AUCB was able to prevent the increase in urinary aldosterone but not in plasma FGF-23 (Supplementary Figures 2A and 2B).

Vascular parameters

FMD was abolished in 5/6 Nx mice treated with vehicle and fully prevented by *t*-AUCB (Figure 5A). FMD was decreased by L-NAME in sham-operated mice without significant effect of fluconazole infusion (Figure 5B), demonstrating a predominant role of NO in this response. However, FMD restoration in 5/6 Nx mice treated with *t*-AUCB was mainly due to the potentiation of CYP450-dependent pathway, as shown by the significant decrease induced by the CYP450 epoxygenases inhibitor fluconazole but not by L-NAME. In agreement with the improvement in endothelial function, *t*-AUCB prevented the increase in plasma sVCAM1 (Figure 5C).

DISCUSSION

This study provides the first demonstration that pharmacological inhibition of sEH prevents the development of cardiac and vascular disorders due to CKD, independently of kidney function.

The experimental model of 5/6 Nx used here led to a significant and progressive decrease in kidney function, with increased albuminuria and chronic kidney lesions on histology. As is the case in human CKD, this was associated with the onset of hypertension, diastolic and mild systolic dysfunctions, heart hypertrophy, and endothelial dysfunction. These results are in accordance with previously published studies in rodent models of subtotal nephrectomy and provide a reliable experimental setting to analyse the CV consequences of CKD (24–28).

5/6 Nx was associated with an impaired arachidonic acid metabolism, characterized by an increase in 14,15-DHET-to-14,15-EET, and of pro-inflammatory HETEs. Since EETs have potent vasodilator, anti-inflammatory and anti-fibrotic properties, we hypothesized that promoting a more physiological balance with a pharmacological inhibitor of sEH, the key enzyme of EETs degradation, may have beneficial effects on both the heart and the vessels in this setting. As expected, the administration of *t*-AUCB prevented the increase in the DHETs/EETs ratio in 5/6 Nx mice.

Importantly, *t*-AUCB administered for 3 months did not modify the kidney consequences of 5/6 Nx. 5/6 Nx mice treated with *t*-AUCB presented a similar increase in plasma creatinine, albuminuria and kidney lesions compared to mice treated with vehicle. These results were in accordance with a previous study by Jung O *et al* (29), where no difference in kidney histological damage was observed when mice were treated by *c*-AUCB, the *cis*-isomer of *t*-AUCB which possesses similar potency against sEH activity, during 8 weeks. 5/6 Nx mice treated with *t*-AUCB showed no difference in urine output when compared to vehicle, and no difference in sodium excretion. In contrast, previous studies have reported an increase in sodium excretion, related to a decreased reabsorption of sodium as the consequence of tubular effects of EETs (30–33). The discrepancy with our results could be explained by the predominant impact of severely decreased glomerular filtration rate, reducing the tubular effects of EETs. After 5/6 Nx, no difference in albuminuria was observed between mice treated with *t*-AUCB and vehicle. On the contrary, Jung O *et al* (29) reported increased albuminuria with *c*-AUCB. This difference could be explained by the longer duration of treatment in our study (8

weeks *vs* 3 months) that could allow normalization of arachidonic acid metabolism imbalance induced by short-term inhibition of sEH. In fact, in the previous study, sEH inhibition was shown to potentiate the formation of pro-inflammatory HETEs while in our study, HETEs were reduced by 3-month *t*-AUCB administration. In addition, given that 14,15-DHET-to-14,15-EET remained elevated compared to sham mice, we could hypothesize that only a partial blockade of sEH occurs, allowing to prevent the shift of arachidonic acid from the CYP450 pathway into the LOX pathway. Accordingly, studies performed in hyperglycaemic overweight mice and mice fed a high-fat diet (34,35) even suggest a beneficial effects of *t*-AUCB on albuminuria and kidney lesions.

The analysis of direct effects of treatments on CV disease associated with CKD is frequently limited by a parallel impact of the treatment on the kidney disease. In the present study the fact that *t*-AUCB had no significant impact on kidney function and lesions after 5/6 Nx provides an ideal setting to investigate the direct CV impact of sEH inhibition in type 4 cardio-renal syndrome.

Mice treated with *t*-AUCB showed improving systolic and diastolic heart function induced by 5/6 Nx when compared with vehicle. In addition, the increase in heart weight and the onset of ventricular fibrosis were blunted by *t*-AUCB. In CKD, progressive diffuse myocardial fibrosis and ventricular hypertrophy contribute to impair the relaxation of the cardiac wall (3). sEH inhibition prevents cardiac hypertrophy in experimental models based on Angiotensin II infusion (36), aortic banding (37), renovascular hypertension (two kidney one clip) (38) and metabolic disease related to obesity and insulin resistance (39). This preventive effect was associated with a reduction of myocardial fibrosis, as observed in our study. Experimental and clinical evidences point out a role of FGF-23 in CKD-associated cardiac hypertrophy since FGF-23 increases in patients with CKD and its concentration is correlated to cardiac hypertrophy (40,41). In our study, plasma FGF-23 increased after 5/6 Nx without normalization by *t*-AUCB. This suggests that the beneficial effect of *t*-AUCB on the heart is independent of FGF-23. Cardiac hypertrophy can be an adaptive response to the increased afterload related to arterial hypertension. Inhibition of sEH reduced blood pressure in several studies in mice and rats (38,42,43) but *t*-AUCB had no significant effect on the increase of systolic blood pressure after 5/6 Nx, excluding blood pressure as the mediator of *t*-AUCB beneficial effects in this setting. Similarly, Jung O *et al* (29) reported no reduction of hypertension with an inhibitor of sEH after subtotal nephrectomy. In fact, the anti-hypertensive effect of sEH inhibition is usually

only observed in angiotensin II-dependent hypertension models, which is only partially the case in this setting (44).

FMD of resistance arteries is a gold-standard technique to measure the endothelial function. Complete dilatation of the mesenteric artery after incubation with SNP, a donor of NO, was observed in all groups showing normal smooth muscle cell function. Together, these results clearly demonstrate endothelial dysfunction associated with CKD in our study with a totally abolished FMD after 5/6 Nx treated with vehicle. The inhibition of sEH with *t*-AUCB prevented the endothelial dysfunction induced by 5/6 Nx. As compared to 5/6 Nx mice treated with vehicle, the improved FMD observed with *t*-AUCB was predominantly mediated by EETs since *ex vivo* inhibition of this pathway with fluconazole blunted FMD. Furthermore, plasma soluble VCAM1, a surrogate marker for endothelial dysfunction, was sharply increased after 5/6 Nx and *t*-AUCB prevented this increase. In animal models of hypertension and diabetes Zhang L-N *et al* (45) and Gao J *et al* (38) also reported improved endothelial function associated with inhibition of sEH. In CKD, endothelial dysfunction is multifactorial and considered as an important mediator of CV disease (46). At the organ level, functional and structural alterations of endothelial cells promote inflammation, hypoxia and mesenchymal transition, which are putative mechanisms of cardiac fibrosis in CKD (3,42). Together, our results suggest that protection against microvascular endothelial dysfunction could be a mediator of the beneficial effects elicited by *t*-AUCB after 5/6 Nx on heart and vessels.

CONCLUSION

This study provides the first evidence that inhibiting sEH prevents the endothelial dysfunction and cardiac consequences associated with experimental CKD. These beneficial CV effects were independent of both kidney function and hypertension. Preventing EETs degradation by the blockade of sEH therefore appears as a novel and relevant target for the long-term management of CV disease associated with CKD.

Figure legends

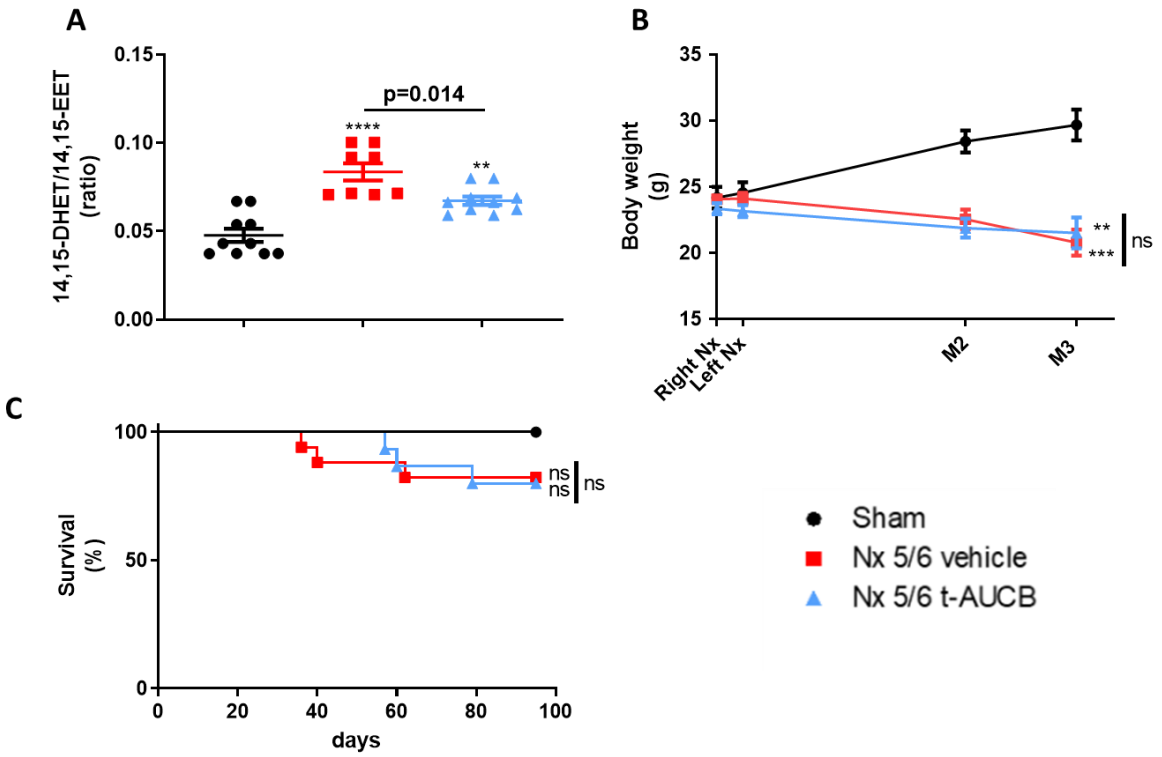


Figure 1. Plasma concentration 14,15-DHET to 14,15-EET ratio (A) at sacrifice (n=8-10 per group). *** p<0.001: Nx 5/6 vehicle *vs* Sham, ** p<0.01: Nx 5/6 *t*-AUCB *vs* Sham. Body weight evolution (C) from right Nx (month 0) to month 3 (n=12-14 per group). *** p<0.001: Nx 5/6 vehicle *vs* Sham, ** p<0.01: Nx 5/6 *t*-AUCB *vs* Sham, ns: not-significant. Survival (D) (n=12-17 per group).

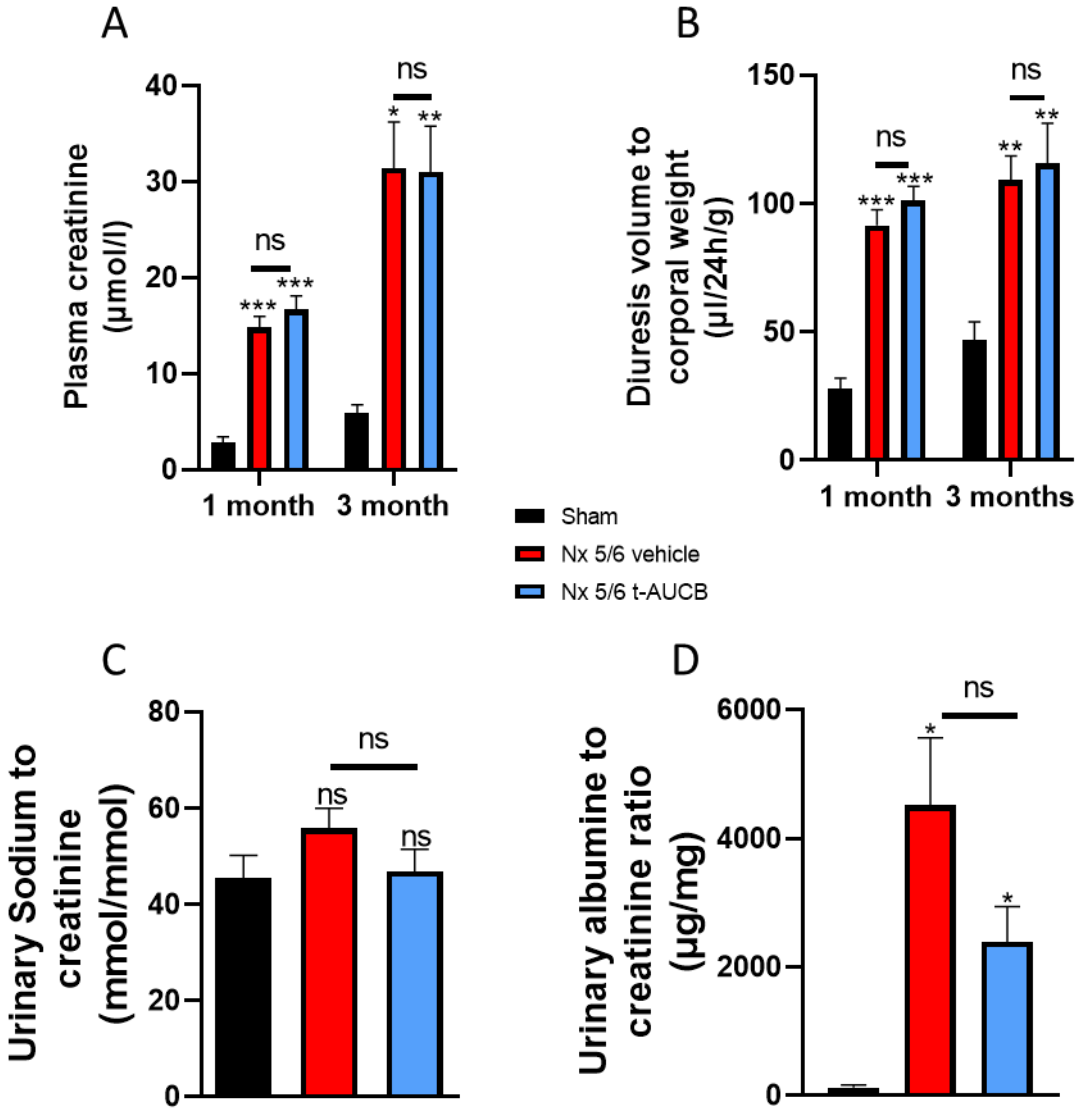


Figure 2. Evolution of plasma (A) creatinine 1 and 3 months after 5/6 Nx (n=7-12 per group). *** p<0.001: Nx 5/6 vehicle *vs* Sham, *** p<0.001: Nx 5/6 *t*-AUCB *vs* Sham, * p<0.05: Nx 5/6 vehicle *vs* Sham, ** p<0.01: Nx 5/6 *t*-AUCB *vs* Sham, ns: not-significant. Diuresis evolution (B) 1 and 3 months after Nx 5/6 (n=8-12 per group). *** p<0.001: Nx 5/6 vehicle *vs* Sham, *** p<0.001: Nx 5/6 *t*-AUCB *vs* Sham, ** p<0.01: Nx 5/6 vehicle *vs* Sham, ** p<0.01: Nx 5/6 *t*-AUCB *vs* Sham, ns: not-significant. Comparison of urinary albumin to creatinine ratio (C) (n=5-7 per group). * p<0.05: Nx 5/6 vehicle *vs* Sham, *** p<0.05: Nx 5/6 *t*-AUCB *vs* Sham, ns: not-significant. Urinary sodium to creatinine ratio (n=8-12 per group). ns: not-significant.

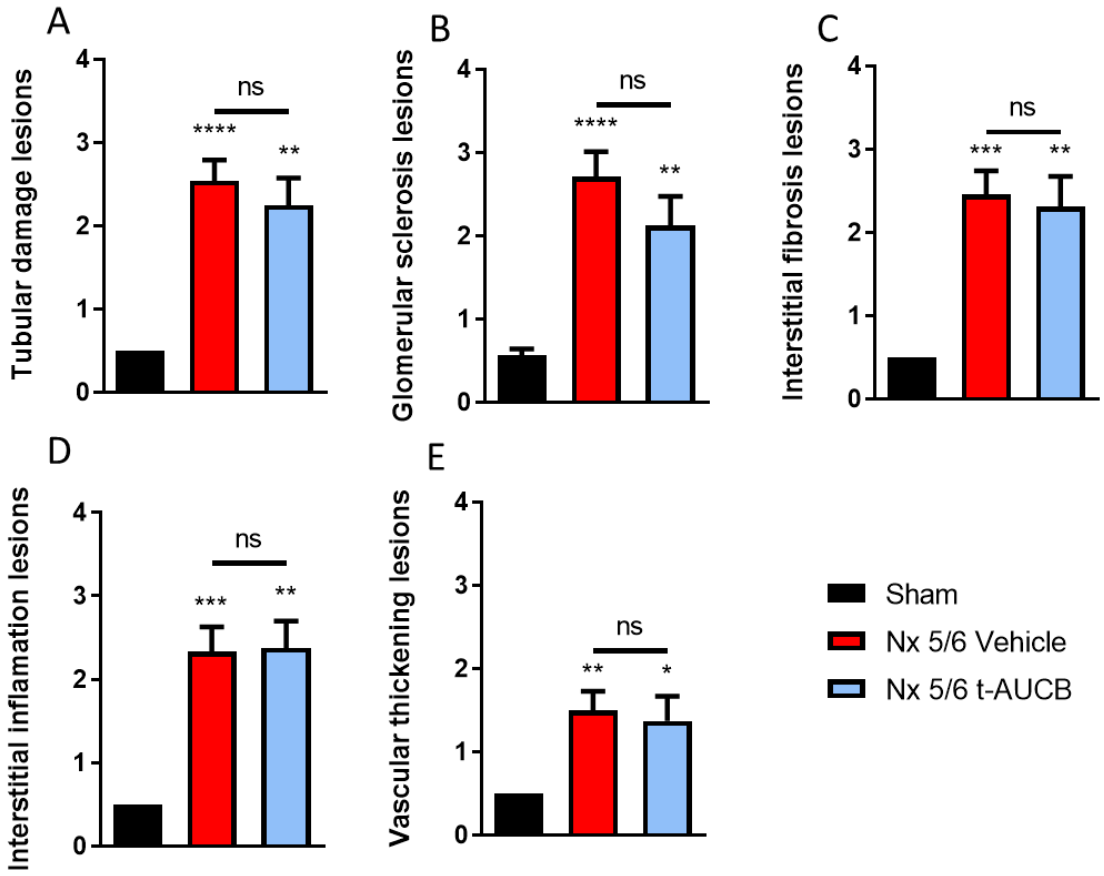


Figure 3. Scoring of kidney lesions at sacrifice (n=7-12 per group). (A) Tubular damage lesions, (B) Glomerular sclerosis lesions, (C) Interstitial fibrosis lesions, (D) Interstitial inflammation lesions, (E) Vascular thickening lesions. **** p<0.0001: Nx 5/6 vehicle *vs* Sham, ** p<0.01: Nx 5/6 *t*-AUCB *vs* Sham, *** p<0.001: Nx 5/6 vehicle *vs* Sham, ** p<0.01: Nx 5/6 vehicle *vs* Sham, * p<0.05: Nx 5/6 *t*-AUCB *vs* Sham, ns: not-significant.

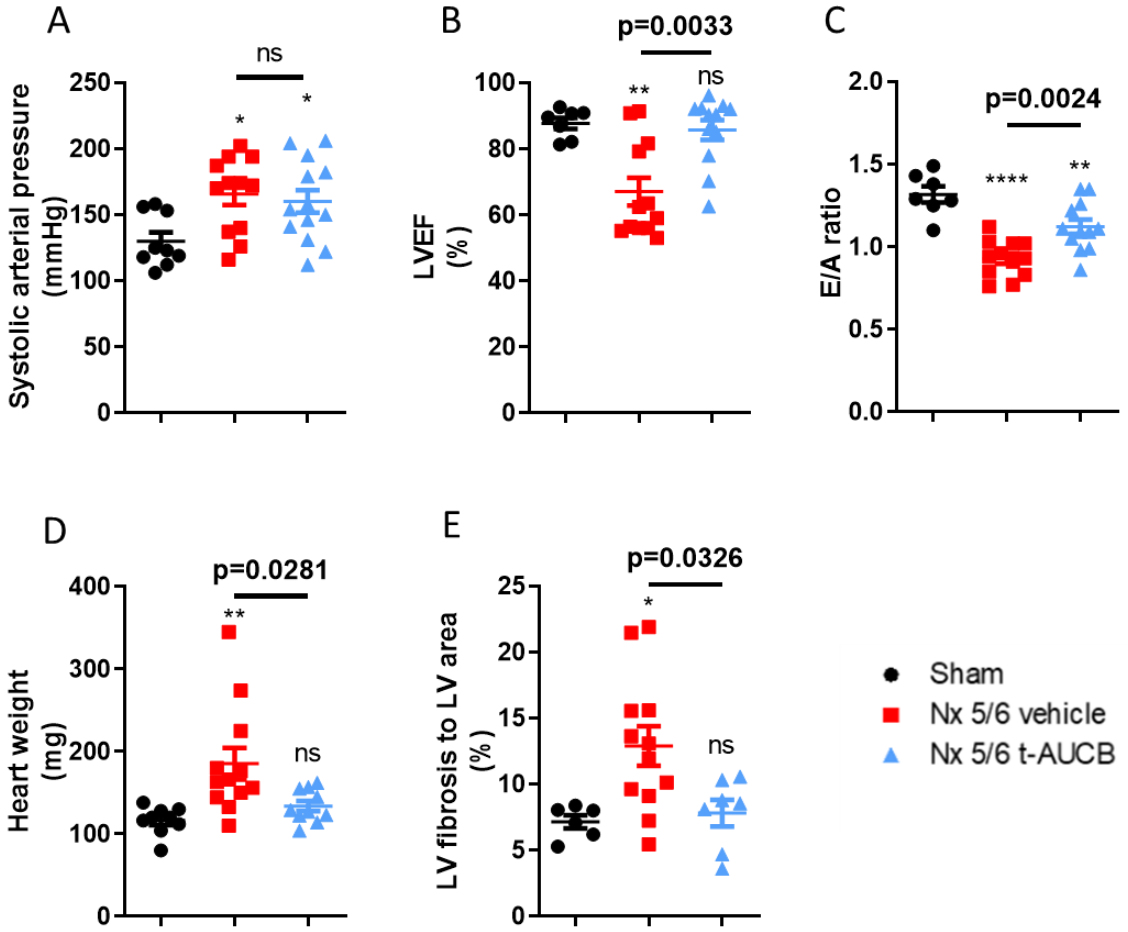


Figure 4. Systolic arterial pressure (A) 3 months after surgery (n=9-12 per group). * p<0.05: Nx 5/6 vehicle *vs* Sham, * p<0.05: Nx 5/6 *t*-AUCB *vs* Sham, ns: not-significant. Systolic cardiac function (B) evaluated by left ventricular ejection fraction (LVEF) in echocardiography (n=7-12 per group). ** p<0.01: Nx 5/6 vehicle *vs* Sham, ns: not-significant Nx 5/6 *t*-AUCB *vs* Sham. Diastolic cardiac function (C) evaluated by E to A ratio measured in echocardiography (n=7-12 per group). **** p<0.0001: Nx 5/6 vehicle *vs* Sham, ** p<0.01: Nx 5/6 *t*-AUCB *vs* Sham. Comparison in heart weight after sacrifice (D) (n=9-12 per group). ** p<0.01: Nx 5/6 vehicle *vs* Sham, ns: not-significant Nx 5/6 *t*-AUCB *vs* Sham. Comparison of left ventricular (LV) fibrosis area to LV area (n= 7-11 per group). * p<0.05: Nx 5/6 vehicle *vs* Sham, ns: not-significant Nx 5/6 *t*-AUCB *vs* Sham.

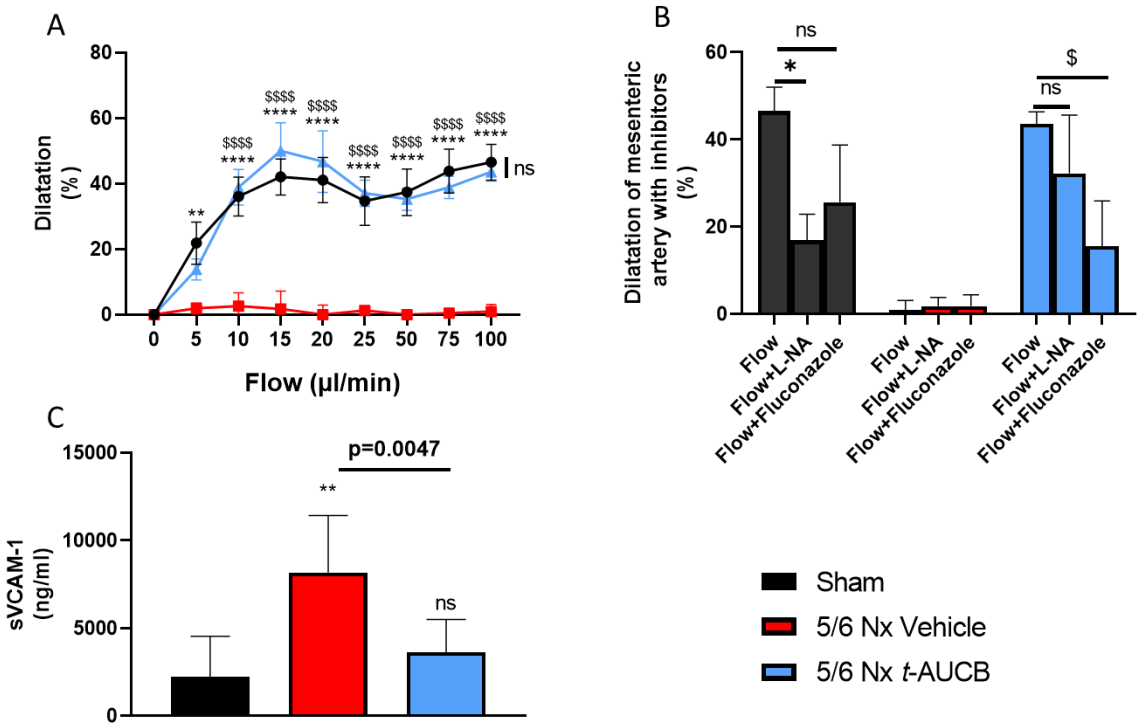


Figure 5. Flow mediated dilatation (FMD) of second mesenteric resistance artery (A) at sacrifice (n=5-8 per group). ** p<0.01: Nx 5/6 vehicle *vs* Sham, **** p<0.0001: Nx 5/6 vehicle *vs* Sham, $$$$ p<0.0001 Nx 5/6 vehicle *vs* Nx 5/6 *t*-AUCB, ns: not-significant Nx 5/6 *t*-AUCB *vs* Sham. FMD in basal condition and after inhibitors (L-NA and Fluconazole) at flow 100µl/min (n=5-8 per group). * p<0.05 flow *vs* Flow + L-NA, $ p<0.05 flow *vs* Flow + Fluconazole. ns: not-significant. Plasma soluble VCAM1 concentration (C) at sacrifice (n=5-10 per group). ** p<0.01: Nx 5/6 vehicle *vs* Sham, ns: not-significant Nx 5/6 *t*-AUCB *vs* Sham.

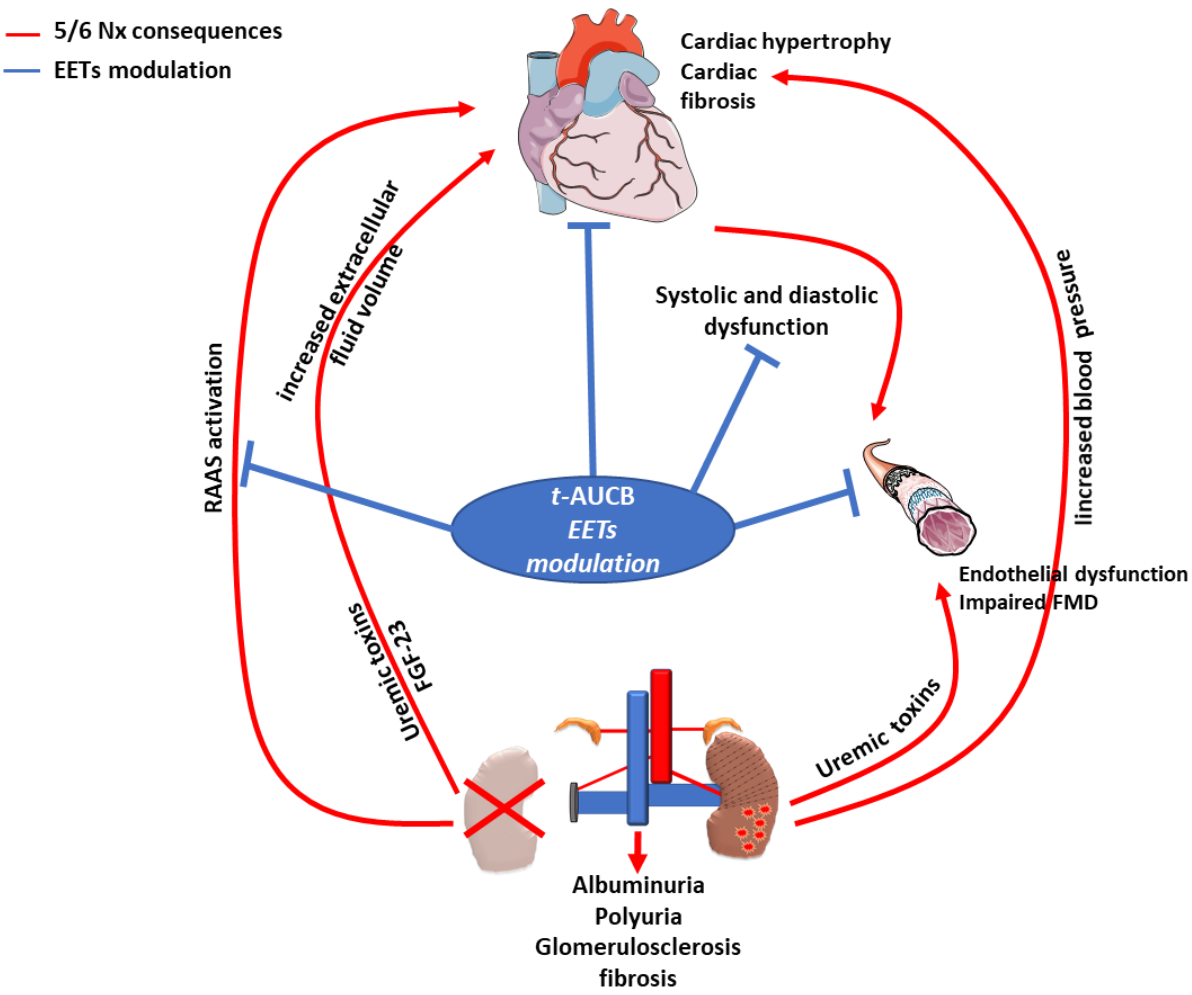
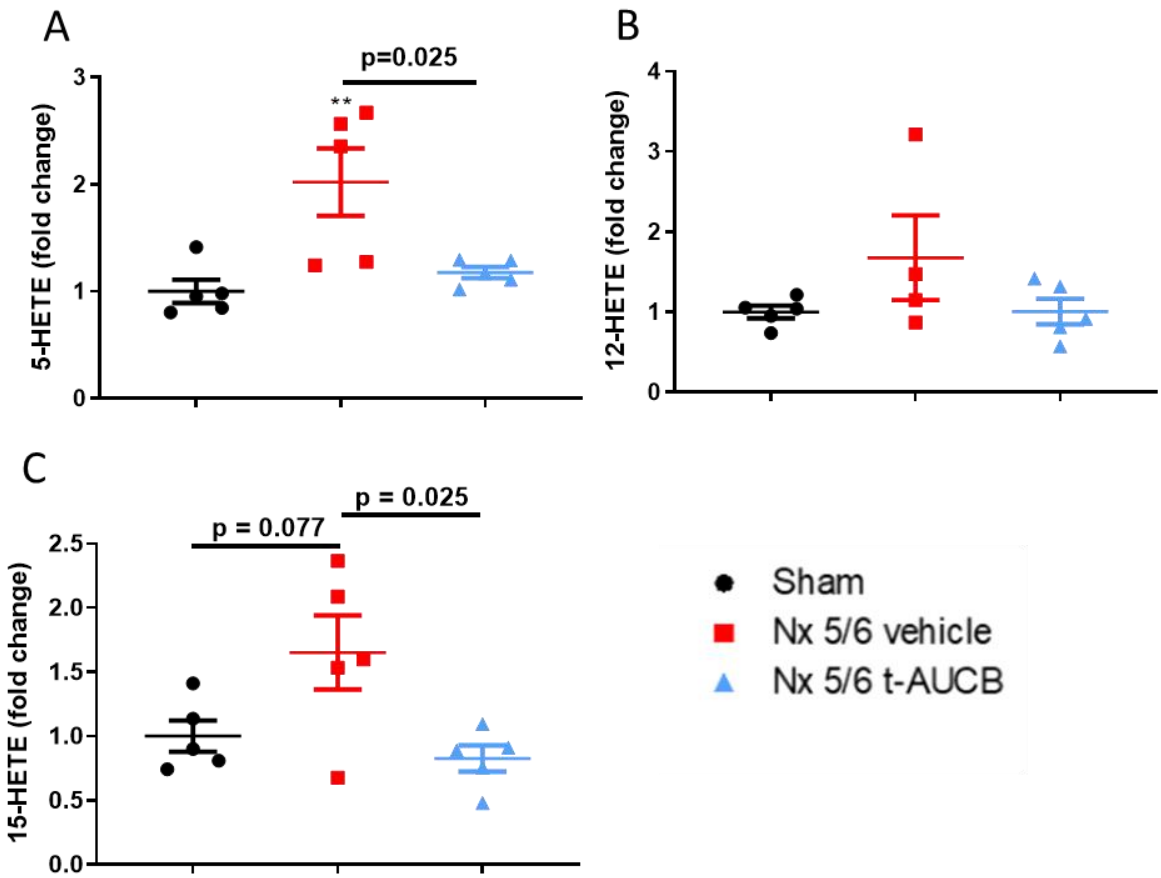
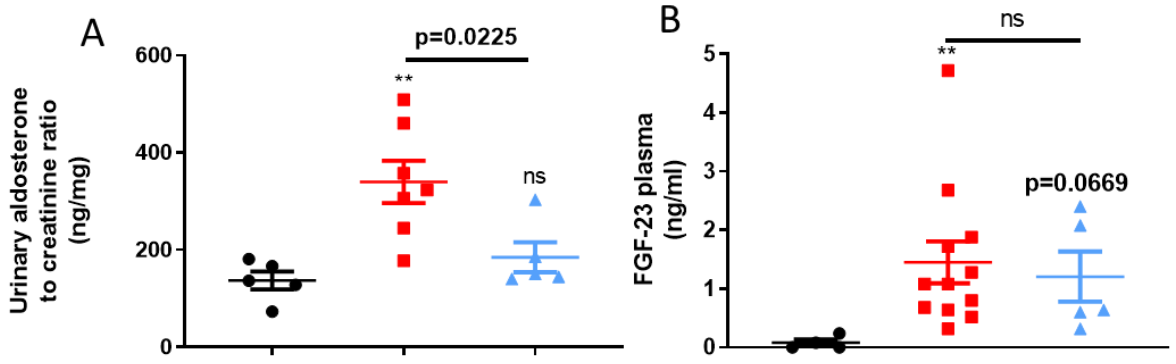


Figure 6. Type 4 cardio-renal syndrome and impact of EETs modulation by *t*-AUCB.

SUPPLEMENATRY DATA



Supplementary Figure 1: Comparison of plsmatic 5-HETE **(A)** at sacrifice. ** p<0.01: Nx 5/6 vehicle *vs* Sham. Plasmatic 12-HETE **(B)** and 15-HETE **(C)** at sacrifice. (n=5 per group).



Supplementary Figure 2: Comparison of 24h urinary aldosteronetone to creatinine ratio **(A)**. ** p<0.01: Nx 5/6 vehicle *vs* Sham. (n= 5-7 per group). Plasmatic FGF-23 at sacrifice (**B**). ** p<0.01: Nx 5/6 vehicle *vs* Sham, ns not significant (n= 5-10 per group)

References

1. Hill NR, Fatoba ST, Oke JL, Hirst JA, O'Callaghan CA, Lasserson DS, et al. Global Prevalence of Chronic Kidney Disease – A Systematic Review and Meta-Analysis. PLOS ONE. 2016 Jul 6;11(7):e0158765.

2. Hatamizadeh P, Fonarow GC, Budoff MJ, Darabian S, Kovesdy CP, Kalantar-Zadeh K. Cardiorenal syndrome: pathophysiology and potential targets for clinical management. Nat Rev Nephrol. 2013 Feb;9(2):99–111.

3. Zannad Faiez, Rossignol Patrick. Cardiorenal Syndrome Revisited. Circulation. 2018 Aug 28;138(9):929–44.

4. Rangaswami Janani, Bhalla Vivek, Blair John E.A., Chang Tara I., Costa Salvatore, Lentine Krista L., et al. Cardiorenal Syndrome: Classification, Pathophysiology, Diagnosis, and Treatment Strategies: A Scientific Statement From the American Heart Association. Circulation. 2019 Apr 16;139(16):e840–78.

5. Maaten JM ter, Damman K, Verhaar MC, Paulus WJ, Duncker DJ, Cheng C, et al. Connecting heart failure with preserved ejection fraction and renal dysfunction: the role of endothelial dysfunction and inflammation. Eur J Heart Fail. 2016;18(6):588–98.

6. Kovesdy CP, Quarles LD. Fibroblast growth factor-23: what we know, what we don't know, and what we need to know. Nephrol Dial Transplant Off Publ Eur Dial Transpl Assoc - Eur Ren Assoc. 2013 Sep;28(9):2228–36.

7. Kovesdy CP, Quarles LD. FGF23 from bench to bedside. Am J Physiol Renal Physiol. 2016 01;310(11):F1168-1174.

8. Scialla JJ, Xie H, Rahman M, Anderson AH, Isakova T, Ojo A, et al. Fibroblast growth factor-23 and cardiovascular events in CKD. J Am Soc Nephrol JASN. 2014 Feb;25(2):349–60.

9. Charytan DM, Fishbane S, Malyszko J, McCullough PA, Goldsmith D. Cardiorenal Syndrome and the Role of the Bone-Mineral Axis and Anemia. Am J Kidney Dis Off J Natl Kidney Found. 2015 Aug;66(2):196–205.

10. Duflot T, Roche C, Lamoureux F, Guerrot D, Bellien J. Design and discovery of soluble epoxide hydrolase inhibitors for the treatment of cardiovascular diseases. Expert Opin Drug Discov. 2014 Mar;9(3):229–43.

11. Hamzaoui M, Guerrot D, Djerada Z, Duflot T, Richard V, Bellien J. [Cardiovascular consequences of chronic kidney disease, impact of modulation of epoxyeicosatrienoic acids]. Ann Cardiol Angeiol (Paris). 2018 Jun;67(3):141–8.

12. Wang Z-H, Davis BB, Jiang D-Q, Zhao T-T, Xu D-Y. Soluble epoxide hydrolase inhibitors and cardiovascular diseases. Curr Vasc Pharmacol. 2013 Jan;11(1):105–11.

13. Imig JD, Zhao X, Capdevila JH, Morisseau C, Hammock BD. Soluble Epoxide Hydrolase Inhibition Lowers Arterial Blood Pressure in Angiotensin II Hypertension. Hypertension. 2002 Feb 1;39(2):690–4.

14. Merabet N, Bellien J, Glevarec E, Nicol L, Lucas D, Remy-Jouet I, et al. Soluble epoxide hydrolase inhibition improves myocardial perfusion and function in experimental heart failure. J Mol Cell Cardiol. 2012 Mar;52(3):660–6.

15. Lee CR, North KE, Bray MS, Fornage M, Seubert JM, Newman JW, et al. Genetic variation in soluble epoxide hydrolase (EPHX2) and risk of coronary heart disease: The Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC) study. Hum Mol Genet. 2006 May 15;15(10):1640–9.

16. Lee CR, Pretorius M, Schuck RN, Burch LH, Bartlett J, Williams SM, et al. Genetic variation in soluble epoxide hydrolase (EPHX2) is associated with forearm vasodilator responses in humans. Hypertens Dallas Tex 1979. 2011 Jan;57(1):116–22.

17. Klocke J, Ulu A, Wu K, Rudolph B, Dragun D, Gollasch M, et al. Prophylactic inhibition of soluble epoxide hydrolase delays onset of nephritis and ameliorates kidney damage in NZB/W F1 mice. Sci Rep [Internet]. 2019 Jun 20 [cited 2019 Aug 26];9. Available from: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6586931/

18. Vacková Š, Kopkan L, Kikerlová S, Husková Z, Sadowski J, Kompanowska-Jezierska E, et al. Pharmacological Blockade of Soluble Epoxide Hydrolase Attenuates the Progression of Congestive Heart Failure Combined With Chronic Kidney Disease: Insights From Studies With Fawn-Hooded Hypertensive Rats. Front Pharmacol. 2019;10:18.

19. Liu J-Y. Inhibition of Soluble Epoxide Hydrolase for Renal Health. Front Pharmacol. 2018;9:1551.

20. Kujal P, Čertíková Chábová V, Škaroupková P, Husková Z, Vernerová Z, Kramer HJ, et al. Inhibition of soluble epoxide hydrolase is renoprotective in 5/6 nephrectomized Ren-2 transgenic hypertensive rats. Clin Exp Pharmacol Physiol. 2014 Mar;41(3):227–37.

21. Duflot T, Pereira T, Roche C, Iacob M, Cardinael P, Hamza NE-G, et al. A sensitive LC-MS/MS method for the quantification of regioisomers of epoxyeicosatrienoic and dihydroxyeicosatrienoic acids in human plasma during endothelial stimulation. Anal Bioanal Chem. 2017 Mar;409(7):1845–55.

22. Duflot T, Moreau-Grangé L, Roche C, Iacob M, Wils J, Rémy-Jouet I, et al. Altered bioavailability of epoxyeicosatrienoic acids is associated with conduit artery endothelial dysfunction in type 2 diabetic patients. Cardiovasc Diabetol. 2019 18;18(1):35.

23. Guerrot D, Kerroch M, Placier S, Vandermeersch S, Trivin C, Mael-Ainin M, et al. Discoidin domain receptor 1 is a major mediator of inflammation and fibrosis in obstructive nephropathy. Am J Pathol. 2011 Jul;179(1):83–91.

24. Neuburg S, Dussold C, Gerber C, Wang X, Francis C, Qi L, et al. Genetic background influences cardiac phenotype in murine chronic kidney disease. Nephrol Dial Transplant Off Publ Eur Dial Transpl Assoc - Eur Ren Assoc. 2018 01;33(7):1129–37.

25. Neuburg S, Dussold C, Gerber C, Wang X, Francis C, Qi L, et al. Genetic background influences cardiac phenotype in murine chronic kidney disease. Nephrol Dial Transplant. 2018 Jul 1;33(7):1129–37.

26. Ma L-J, Fogo AB. Model of robust induction of glomerulosclerosis in mice: importance of genetic background. Kidney Int. 2003 Jul;64(1):350–5.

27. Siedlecki AM, Jin X, Muslin AJ. Uremic cardiac hypertrophy is reversed by rapamycin but not by lowering of blood pressure. Kidney Int. 2009 Apr;75(8):800–8.

28. Winterberg PD, Jiang R, Maxwell JT, Wang B, Wagner MB. Myocardial dysfunction occurs prior to changes in ventricular geometry in mice with chronic kidney disease (CKD). Physiol Rep. 2016 Mar;4(5).

29. Jung O, Jansen F, Mieth A, Barbosa-Sicard E, Pliquett RU, Babelova A, et al. Inhibition of the soluble epoxide hydrolase promotes albuminuria in mice with progressive renal disease. PloS One. 2010 Aug 4;5(8):e11979.

30. Schragenheim J, Bellner L, Cao J, Singh SP, Bamshad D, McClung JA, et al. EET enhances renal function in obese mice resulting in restoration of HO-1-Mfn1/2 signaling, and decrease in hypertension through inhibition of sodium chloride co-transporter. Prostaglandins Other Lipid Mediat. 2018;137:30–9.

31. Wang W-H, Zhang C, Lin D-H, Wang L, Graves JP, Zeldin DC, et al. Cyp2c44 epoxygenase in the collecting duct is essential for the high K+ intake-induced antihypertensive effect. Am J Physiol Renal Physiol. 2014 Aug 15;307(4):F453-460.

32. Wang Q, Pang W, Cui Z, Shi J, Liu Y, Liu B, et al. Upregulation of soluble epoxide hydrolase in proximal tubular cells mediated proteinuria-induced renal damage. Am J Physiol Renal Physiol. 2013 Jan 15;304(2):F168-176.

33. Pavlov TS, Ilatovskaya DV, Levchenko V, Mattson DL, Roman RJ, Staruschenko A. Effects of cytochrome P-450 metabolites of arachidonic acid on the epithelial sodium channel (ENaC). Am J Physiol Renal Physiol. 2011 Sep;301(3):F672-681.

34. Roche C, Guerrot D, Harouki N, Duflot T, Besnier M, Rémy-Jouet I, et al. Impact of soluble epoxide hydrolase inhibition on early kidney damage in hyperglycemic overweight mice. Prostaglandins Other Lipid Mediat. 2015 Jul;120:148–54.

35. Luo Y, Wu M-Y, Deng B-Q, Huang J, Hwang SH, Li M-Y, et al. Inhibition of soluble epoxide hydrolase attenuates a high-fat diet-mediated renal injury by activating PAX2 and AMPK. Proc Natl Acad Sci U S A. 2019 12;116(11):5154–9.

36. Ai D, Pang W, Li N, Xu M, Jones PD, Yang J, et al. Soluble epoxide hydrolase plays an essential role in angiotensin II-induced cardiac hypertrophy. Proc Natl Acad Sci U S A. 2009 Jan 13;106(2):564–9.

37. Xu D, Li N, He Y, Timofeyev V, Lu L, Tsai H-J, et al. Prevention and reversal of cardiac hypertrophy by soluble epoxide hydrolase inhibitors. Proc Natl Acad Sci U S A. 2006 Dec 5;103(49):18733–8.

38. Gao J, Bellien J, Gomez E, Henry J-P, Dautreaux B, Bounoure F, et al. Soluble epoxide hydrolase inhibition prevents coronary endothelial dysfunction in mice with renovascular hypertension. J Hypertens. 2011 Jun;29(6):1128–35.

39. Roche C, Besnier M, Cassel R, Harouki N, Coquerel D, Guerrot D, et al. Soluble epoxide hydrolase inhibition improves coronary endothelial function and prevents the development of cardiac alterations in obese insulin-resistant mice. Am J Physiol - Heart Circ Physiol. 2015 May 1;308(9):H1020–9.

40. Isakova T, Wahl P, Vargas GS, Gutiérrez OM, Scialla J, Xie H, et al. Fibroblast growth factor 23 is elevated before parathyroid hormone and phosphate in chronic kidney disease. Kidney Int. 2011 Jun;79(12):1370–8.

41. Faul C, Amaral AP, Oskouei B, Hu M-C, Sloan A, Isakova T, et al. FGF23 induces left ventricular hypertrophy. J Clin Invest. 2011 Nov 1;121(11):4393–408.

42. Yu Z, Xu F, Huse LM, Morisseau C, Draper AJ, Newman JW, et al. Soluble epoxide hydrolase regulates hydrolysis of vasoactive epoxyeicosatrienoic acids. Circ Res. 2000 Nov 24;87(11):992–8.

43. Huang H, Morisseau C, Wang J, Yang T, Falck JR, Hammock BD, et al. Increasing or stabilizing renal epoxyeicosatrienoic acid production attenuates abnormal renal function and hypertension in obese rats. Am J Physiol Renal Physiol. 2007 Jul;293(1):F342-349.

44. Jung O, Brandes RP, Kim I-H, Schweda F, Schmidt R, Hammock BD, et al. Soluble epoxide hydrolase is a main effector of angiotensin II-induced hypertension. Hypertens Dallas Tex 1979. 2005 Apr;45(4):759–65.

45. Zhang L-N, Vincelette J, Chen D, Gless RD, Anandan S-K, Rubanyi GM, et al. Inhibition of soluble epoxide hydrolase attenuates endothelial dysfunction in animal models of diabetes, obesity and hypertension. Eur J Pharmacol. 2011 Mar 1;654(1):68–74.

46. Jourde-Chiche N, Fakhouri F, Dou L, Bellien J, Burtey S, Frimat M, et al. Endothelium structure and function in kidney health and disease. Nat Rev Nephrol. 2019 Feb;15(2):87–108.

Un **troisième article** concerne un travail réalisé au sein de notre laboratoire INSERM U1096 avec le thésard J.Selim, s'intéressant à la fonction endothéliale dans un modèle d'ischémie reperfusion pulmonaire chez le rat, une approche fondamentale de la transplantation pulmonaire. Dans ce travail, j'ai mis en place l'exploration de la fonction endothéliale de l'artère pulmonaire chez le rat, une première dans notre laboratoire. L'article est actuellement en cours de soumission.

CARDIOPULMONARY BYPASS INCREASES ENDOTHELIAL DYSFUNCTION AFTER PULMONARY ISCHEMIA-REPERFUSION IN RATS

Short title: Endothelial dysfunction profiling after pulmonary ischemia-reperfusion

Jean Selim, MD,[a,b] **Mouad Hamzaoui,** MD,[a] Inès Boukhalfa, PhD,[a] Zoubir Djerada, MD, PhD,[a] Laurence Chevalier, PhD,[c] Nicolas Piton, MD,[d] Damien Gentil, BS,[d] Emmanuel Besnier, MD,[a,b] Thomas Clavier, MD,[a,b] Anaïs Dumesnil, BS,[a] Sylvanie Renet, BS,[a] Paul Mulder, PhD,[a] Fabienne Tamion, MD, PhD,[a] Benoît Veber, MD, PhD,[b] Vincent Richard, MD, PhD,[a] and Jean-Marc Baste, MD, PhD,[a,e]

[a]Normandie Univ, UNIVROUEN, INSERM U1096, 76000 Rouen, France; [b]Rouen University Hospital, Department of Anesthesia and Critical Care, 76000, Rouen, France; [c]Normandie Univ, UNIROUEN, CNRS, GPM-UMR 6634, 76000 Rouen, France; [d]Rouen University Hospital, Department of Pathology, 76000, Rouen, France; [e]Rouen University Hospital, Department of Thoracic Surgery, F-76000, Rouen, France

ABSTRACT

Background: Endothelial dysfunction during ischemia reperfusion (IR) is a major cause of primary graft dysfunction (PGD) during lung transplantation (LTx). The routine use of cardiopulmonary bypass (CPB) during LTx remains controversial. However, the contribution of CPB to pulmonary endothelial dysfunction remains unclear. We hypothesize that CPB increases endothelial dysfunction. Therefore, we investigated the impact of CPB on pulmonary artery function in a lung IR rat model.

Methods: We evaluated pulmonary vascular reactivity, glycocalyx degradation and both systemic and pulmonary inflammation status in 4 groups: (1) Sham, (2) IR, (3) CPB and (4) IR-CPB rats by wire myograph, electron microscopy, ELISA and immunohistochemistry. Rats were exposed to 45 min of CPB and IR.

Results: We showed that CPB alone and IR alone lead to similar pulmonary endothelial dysfunction. CBP associated with IR further impaired endothelial function. This relaxation process was mainly mediated by nitric oxide (NO), since the inhibition of the NO synthase in all groups led to the abolition of pulmonary vasorelaxation. We observed higher syndecan-1 plasma levels in the IR-CPB group in comparison with the other groups, reflecting an increased degradation of glycocalyx. Moreover, CPB increased the effects of IR on systemic inflammation as shown by the increased plasma levels of IL-1β, IL-10.

Conclusions: CPB significantly increases the IR-mediated effects on pulmonary endothelial dysfunction, glycocalyx degradation and systemic inflammation. Therefore, it seems that the routine use of CPB during LTx could be deleterious, leading to higher PGD and postoperative morbimortality.

Un **quatrième article** a été réalisé au sein de notre laboratoire INSERM U1096 concernant le travail d'une thésarde M.Lachaux. L'étude explorait l'effet de l'Imeglimine ; un nouvel antidiabétique oral, sur les atteintes cardiovasculaires et rénales liées au syndrome métabolique dans un modèle de rats obèses. J'ai pu participer à l'exploration de la fonction endothéliale dans ce modèle ainsi que l'analyse histologique des atteintes rénales. L'article a été soumis.

Short- And Long-Term Administration of Imeglimin Counters Metabolic Syndrome-Related Cardiorenal Dysfunction

Marianne Lachaux[1] BS, Matthieu Soulié[1] BS, **Mouad Hamzaoui[1]** BS, Anaëlle Bailly[1], Lionel Nicol[1] PhD, Isabelle Rémy-Jouet[1] PhD, Sylvanie Renet[1], Cathy Vendeville[2], Pascale Gluais-Dagorn[3] PhD, Sophie Hallakou-Bozec[3] PhD, Christelle Monteil[2] PhD, Vincent Richard[1] PhD, Paul Mulder[1] PhD**.**

Short title: Imeglimin counters metabolic syndrome-related cardiorenal dysfunction

[1] Normandie Univ, UNIROUEN, Inserm U1096, FHU- REMOD-VHF, 76000 Rouen, France

[2]Normandie Univ, UNIROUEN, UNICAEN, ABTE, 14000 Caen et 76000 Rouen, France

[3]Poxel S.A., Lyon France

ABSTRACT

Introduction. Imeglimin, a glucose-lowering agent targeting mitochondrial bio-energetics, decreases reactive oxygen species (ROS) overproduction and improves glucose homeostasis. We investigated whether this is associated with protective effects on metabolic syndrome-related left ventricular (LV) and vascular dysfunctions. **Methods.** We used Zucker *fa/fa* rats to assess the effects on LV function, LV tissue perfusion, LV oxidative stress and vascular function induced by imeglimin administered orally for 9 (short-term) or 90 days (long-term) at a dose of 150 mg/kg twice daily. **Results.** Compared to untreated animals, short- and long-term imeglimin decreased LV end-diastolic pressure and LV end-diastolic pressure volume-relation, increased LV tissue perfusion and decreased LV ROS production. Simultaneously, imeglimin restored acetylcholine-mediated coronary relaxation and mesenteric flow-mediated dilation. One hour after imeglimin administration, when glucose plasma levels were not yet modified, imeglimin reduced LV mitochondrial ROS production and improved LV function. Long-term imeglimin reduced related LV and kidney fibrosis and improved kidney function. **Conclusion.** In a rat model mimicking human metabolic syndrome, imeglimin immediately countered metabolic syndrome-related cardiac diastolic and vascular dysfunction by reducing oxidative stress/increased NO-bioavailability and improving myocardial perfusion, and over the long-term by countering myocardial and kidney structural modifications, effects that are at least in part, independent from glucose control.

BIBLIOGRAPHIE:

1. Iglesias CG, Torres VE, Offord KP, Holley KE, Beard CM, Kurland LT. Epidemiology of adult polycystic kidney disease, Olmsted County, Minnesota: 1935-1980. Am J Kidney Dis. mai 1983;2(6):630-9.

2. Neumann HPH, Jilg C, Bacher J, Nabulsi Z, Malinoc A, Hummel B, et al. Epidemiology of autosomal-dominant polycystic kidney disease: an in-depth clinical study for south-western Germany. Nephrol Dial Transplant. juin 2013;28(6):1472-87.

3. Willey CJ, Blais JD, Hall AK, Krasa HB, Makin AJ, Czerwiec FS. Prevalence of autosomal dominant polycystic kidney disease in the European Union. Nephrol Dial Transplant. 1 août 2017;32(8):1356-63.

4. Willey C, Kamat S, Stellhorn R, Blais J. Analysis of Nationwide Data to Determine the Incidence and Diagnosed Prevalence of Autosomal Dominant Polycystic Kidney Disease in the USA: 2013–2015. Kidney Diseases. 2019;5(2):107-17.

5. Spithoven EM, Kramer A, Meijer E, Orskov B, Wanner C, Abad JM, et al. Renal replacement therapy for autosomal dominant polycystic kidney disease (ADPKD) in Europe: prevalence and survival--an analysis of data from the ERA-EDTA Registry. Nephrology Dialysis Transplantation. 1 sept 2014;29(suppl 4):iv15-25.

6. Torres VE, Harris PC, Pirson Y. Autosomal dominant polycystic kidney disease. 2007;369:15.

7. Porath B, Gainullin VG, Cornec-Le Gall E, Dillinger EK, Heyer CM, Hopp K, et al. Mutations in GANAB , Encoding the Glucosidase IIα Subunit, Cause Autosomal-Dominant Polycystic Kidney and Liver Disease. The American Journal of Human Genetics. juin 2016;98(6):1193-207.

8. Fedeles SV, Tian X, Gallagher A-R, Mitobe M, Nishio S, Lee SH, et al. A genetic interaction network of five genes for human polycystic kidney and liver diseases defines polycystin-1 as the central determinant of cyst formation. Nat Genet. 19 juin 2011;43(7):639-47.

9. Cornec-Le Gall E, Olson RJ, Besse W, Heyer CM, Gainullin VG, Smith JM, et al. Monoallelic Mutations to DNAJB11 Cause Atypical Autosomal-Dominant Polycystic Kidney Disease. The American Journal of Human Genetics. mai 2018;102(5):832-44.

10. Cornec-Le Gall E, Audrézet M-P, Chen J-M, Hourmant M, Morin M-P, Perrichot R, et al. Type of *PKD1* Mutation Influences Renal Outcome in ADPKD. Journal of the American Society of Nephrology. juin 2013;24(6):1006-13.

11. Hateboer N, v Dijk MA, Bogdanova N, Coto E, Saggar-Malik AK, San Millan JL, et al. Comparison of phenotypes of polycystic kidney disease types 1 and 2. European PKD1-PKD2 Study Group. Lancet. 9 janv 1999;353(9147):103-7.

12. Stayner C, Iglesias DM, Goodyer PR, Ellis L, Germino G, Zhou J, et al. Pax2 gene dosage influences cystogenesis in autosomal dominant polycystic kidney disease. Human Molecular Genetics. 15 déc 2006;15(24):3520-8.

13. STAYNER C, SHIELDS J, SLOBBE L, SHILLINGFORD JM, WEIMBS T, ECCLES MR. Rapamycin-mediated suppression of renal cyst expansion in del34 Pkd1−/− mutant mouse embryos: An investigation of the feasibility of renal cyst prevention in the foetus. Nephrology (Carlton). nov 2012;17(8):739-47.

14. Wu G, D'Agati V, Cai Y, Markowitz G, Park JH, Reynolds DM, et al. Somatic inactivation of Pkd2 results in polycystic kidney disease. Cell. 17 avr 1998;93(2):177-88.

15. Paterson AD, Wang KR, Lupea D, St George-Hyslop P, Pei Y. Recurrent fetal loss associated with bilineal inheritance of type 1 autosomal dominant polycystic kidney disease. Am J Kidney Dis. juill 2002;40(1):16-20.

16. Peces R, Peces C, Coto E, Selgas R. Bilineal inheritance of type 1 autosomal dominant polycystic kidney disease (ADPKD) and recurrent fetal loss. NDT Plus. oct 2008;1(5):289-91.

17. Rossetti S, Kubly VJ, Consugar MB, Hopp K, Roy S, Horsley SW, et al. Incompletely penetrant PKD1 alleles suggest a role for gene dosage in cyst initiation in polycystic kidney disease. Kidney Int. avr 2009;75(8):848-55.

18. Vujic M, Heyer CM, Ars E, Hopp K, Markoff A, Orndal C, et al. Incompletely penetrant PKD1 alleles mimic the renal manifestations of ARPKD. J Am Soc Nephrol. juill 2010;21(7):1097-102.

19. Losekoot M, Ruivenkamp C a. L, Tholens AP, Grimbergen JEMA, Vijfhuizen L, Vermeer S, et al. Neonatal onset autosomal dominant polycystic kidney disease (ADPKD) in a patient homozygous for a PKD2 missense mutation due to uniparental disomy. J Med Genet. janv 2012;49(1):37-40.

20. Gargalionis AN, Basdra EK, Papavassiliou AG. Polycystins and Mechanotransduction in Human Disease. International Journal of Molecular Sciences. 2 mai 2019;20(9):2182.

21. Geng L, Segal Y, Peissel B, Deng N, Pei Y, Carone F, et al. Identification and localization of polycystin, the PKD1 gene product. J Clin Invest. 15 déc 1996;98(12):2674-82.

22. Qian F, Boletta A, Bhunia AK, Xu H, Liu L, Ahrabi AK, et al. Cleavage of polycystin-1 requires the receptor for egg jelly domain and is disrupted by human autosomal-dominant polycystic kidney disease 1-associated mutations. Proc Natl Acad Sci USA. 24 déc 2002;99(26):16981-6.

23. Wei W, Hackmann K, Xu H, Germino G, Qian F. Characterization of cis-autoproteolysis of polycystin-1, the product of human polycystic kidney disease 1 gene. J Biol Chem. 27 juill 2007;282(30):21729-37.

24. Piontek KB, Huso DL, Grinberg A, Liu L, Bedja D, Zhao H, et al. A functional floxed allele of Pkd1 that can be conditionally inactivated in vivo. J Am Soc Nephrol. déc 2004;15(12):3035-43.

25. Yu S, Hackmann K, Gao J, He X, Piontek K, García González MA, et al. Essential role of cleavage of Polycystin-1 at G protein-coupled receptor proteolytic site for kidney tubular structure. Proc Natl Acad Sci U S A. 20 nov 2007;104(47):18688-93.

26. Gainullin VG, Hopp K, Ward CJ, Hommerding CJ, Harris PC. Polycystin-1 maturation requires polycystin-2 in a dose-dependent manner. J Clin Invest. févr 2015;125(2):607-20.

27. Chapin HC, Rajendran V, Caplan MJ. Polycystin-1 surface localization is stimulated by polycystin-2 and cleavage at the G protein-coupled receptor proteolytic site. Mol Biol Cell. déc 2010;21(24):4338-48.

28. Su X, Wu M, Yao G, El-Jouni W, Luo C, Tabari A, et al. Regulation of Polycystin-1 Ciliary Trafficking by Motifs at Its C-Terminus and Polycystin-2 but Not Cleavage at GPS Site. Journal of Cell Science. :31.

29. Chauvet V, Tian X, Husson H, Grimm DH, Wang T, Hieseberger T, et al. Mechanical stimuli induce cleavage and nuclear translocation of the polycystin-1 C terminus. J Clin Invest. 15 nov 2004;114(10):1433-43.

30. Bertuccio CA, Caplan MJ. POLYCYSTIN-1 C TERMINUS CLEAVAGE AND ITS RELATION WITH POLYCYSTIN-2, TWO PROTEINS INVOLVED IN POLYCYSTIC KIDNEY DISEASE. 2013;8.

31. Merrick D, Bertuccio CA, Chapin HC, Lal M, Chauvet V, Caplan MJ. Polycystin-1 cleavage and the regulation of transcriptional pathways. Pediatr Nephrol. avr 2014;29(4):505-11.

32. Liu X, Vien T, Duan J, Sheu S-H, DeCaen PG, Clapham DE. Polycystin-2 is an essential ion channel subunit in the primary cilium of the renal collecting duct epithelium. eLife [Internet]. 14 févr 2018 [cité 14 mai 2019];7. Disponible sur: https://elifesciences.org/articles/33183

33. Kleene SJ, Siroky BJ, Landero-Figueroa JA, Dixon BP, Pachciarz NW, Lu L, et al. The TRPP2-dependent channel of renal primary cilia also requires TRPM3. PLoS ONE. 2019;14(3):e0214053.

34. Kleene SJ, Kleene NK. The native TRPP2-dependent channel of murine renal primary cilia. Am J Physiol Renal Physiol. 01 2017;312(1):F96-108.

35. Walker RV, Keynton JL, Grimes DT, Sreekumar V, Williams DJ, Esapa C, et al. Ciliary exclusion of Polycystin-2 promotes kidney cystogenesis in an autosomal dominant polycystic kidney disease model. Nat Commun [Internet]. 6 sept 2019 [cité 25 sept 2019];10. Disponible sur: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6731238/

36. Nauli SM, Alenghat FJ, Luo Y, Williams E, Vassilev P, Li X, et al. Polycystins 1 and 2 mediate mechanosensation in the primary cilium of kidney cells. Nat Genet. févr 2003;33(2):129-37.

37. Su Q, Hu F, Ge X, Lei J, Yu S, Wang T, et al. Structure of the human PKD1-PKD2 complex. Science. 7 sept 2018;361(6406):eaat9819.

38. Wang Z, Ng C, Liu X, Wang Y, Li B, Kashyap P, et al. The ion channel function of polycystin-1 in the polycystin-1/polycystin-2 complex. EMBO reports. 22 août 2019;0(0):e48336.

39. Caplan MJ. Holding open the door reveals a new view of polycystin channel function. EMBO reports. 26 sept 2019;0(0):e49156.

40. Xiao Z, Baudry J, Cao L, Huang J, Chen H, Yates CR, et al. Polycystin-1 interacts with TAZ to stimulate osteoblastogenesis and inhibit adipogenesis. J Clin Invest. 02 2018;128(1):157-74.

41. Abdul-Majeed S, Nauli SM. Dopamine Receptor Type 5 in the Primary Cilia Has Dual Chemo- and Mechano-Sensory Roles. Hypertension. août 2011;58(2):325-31.

42. Delling M, Indzhykulian AA, Liu X, Li Y, Xie T, Corey DP, et al. Primary cilia are not calcium-responsive mechanosensors. Nature. mars 2016;531(7596):656-60.

43. Hofherr A, Köttgen M. Polycystic kidney disease: Cilia and mechanosensation revisited. Nat Rev Nephrol. 2016;12(6):318-9.

44. Fischer E, Legue E, Doyen A, Nato F, Nicolas J-F, Torres V, et al. Defective planar cell polarity in polycystic kidney disease. Nat Genet. janv 2006;38(1):21-3.

45. Bergmann C, Guay-Woodford LM, Harris PC, Horie S, Peters DJM, Torres VE. Polycystic kidney disease. Nature Reviews Disease Primers [Internet]. déc 2018 [cité 14 mai 2019];4(1). Disponible sur: http://www.nature.com/articles/s41572-018-0047-y

46. Cornec-Le Gall E, Audrézet M-P, Le Meur Y, Chen J-M, Férec C. Genetics and Pathogenesis of Autosomal Dominant Polycystic Kidney Disease: 20 Years On. Human Mutation. déc 2014;35(12):1393-406.

47. Higashihara E, Horie S, Muto S, Mochizuki T, Nishio S, Nutahara K. Renal disease progression in autosomal dominant polycystic kidney disease. Clin Exp Nephrol. 1 août 2012;16(4):622-8.

48. Irazabal MV, Rangel LJ, Bergstralh EJ, Osborn SL, Harmon AJ, Sundsbak JL, et al. Imaging Classification of Autosomal Dominant Polycystic Kidney Disease: A Simple Model for Selecting Patients for Clinical Trials. Journal of the American Society of Nephrology. janv 2015;26(1):160-72.

49. Yu ASL, Shen C, Landsittel DP, Grantham JJ, Cook LT, Torres VE, et al. Long-term trajectory of kidney function in autosomal-dominant polycystic kidney disease. Kidney International. 1 mai 2019;95(5):1253-61.

50. Hanssen O, Lovinfosse P, Weekers L, Hustinx R, Jouret F. La tomographie par émission de positons au 18F-FDG en pathologie rénale non oncologique : indications actuelles et perspectives. Néphrologie & Thérapeutique [Internet]. avr 2019 [cité 5 juin 2019]; Disponible sur: https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1769725519300124

51. Idrizi A, Barbullushi M, Koroshi A, Dibra M, Bolleku E, Bajrami V, et al. Urinary tract infections in polycystic kidney disease. Med Arh. 2011;65(4):213-5.

52. Sallée M, Rafat C, Zahar J-R, Paulmier B, Grünfeld J-P, Knebelmann B, et al. Cyst Infections in Patients with Autosomal Dominant Polycystic Kidney Disease. Clinical Journal of the American Society of Nephrology. juill 2009;4(7):1183-9.

53. Meng J, Xu Y, Li A, Fan S, Shen X, Ma D, et al. Clinical Features of 167 Inpatients with Autosomal Dominant Polycystic Kidney Disease at a Single Center in China. Med Sci Monit. 16 sept 2018;24:6498-505.

54. Lantinga MA, Casteleijn NF, Geudens A, de Sévaux RGL, van Assen S, Leliveld AM, et al. Management of renal cyst infection in patients with autosomal dominant polycystic kidney disease: a systematic review. Nephrology Dialysis Transplantation. 29 janv 2016;gfv452.

55. Casteleijn NF, Blais JD, Chapman AB, Czerwiec FS, Devuyst O, Higashihara E, et al. Tolvaptan and Kidney Pain in Patients With Autosomal Dominant Polycystic Kidney Disease: Secondary Analysis From a Randomized Controlled Trial. Am J Kidney Dis. févr 2017;69(2):210-9.

56. Miskulin DC, Abebe KZ, Chapman AB, Perrone RD, Steinman TI, Torres VE, et al. Health-Related Quality of Life in Patients With Autosomal Dominant Polycystic Kidney Disease and CKD Stages 1–4: A Cross-sectional Study. Am J Kidney Dis. févr 2014;63(2):214-26.

57. Cornec-Le Gall E, Alam A, Perrone RD. Autosomal dominant polycystic kidney disease. Lancet. 02 2019;393(10174):919-35.

58. van Aerts RMM, Kievit W, D'Agnolo HMA, Blijdorp CJ, Casteleijn NF, Dekker SEI, et al. Lanreotide Reduces Liver Growth In Patients With Autosomal Dominant Polycystic Liver and Kidney Disease. Gastroenterology [Internet]. avr 2019 [cité 12 juin 2019]; Disponible sur: https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0016508519367113

59. Kim JA, Blumenfeld JD, Chhabra S, Dutruel SP, Thimmappa ND, Bobb WO, et al. Pancreatic Cysts in Autosomal Dominant Polycystic Kidney Disease: Prevalence and Association with PKD2 Gene Mutations. Radiology. sept 2016;280(3):762-70.

60. McNicholas BA, Kotaro Y, Martin W, Sharma A, Kamath PS, Edwards ME, et al. Pancreatic Cysts and Intraductal Papillary Mucinous Neoplasm in Autosomal Dominant Polycystic Kidney Disease. Pancreas. juin 2019;48(5):698-705.

61. Belet U, Danaci M, Sarikaya S, Odabaş F, Utaş C, Tokgöz B, et al. Prevalence of epididymal, seminal vesicle, prostate, and testicular cysts in autosomal dominant polycystic kidney disease. Urology. juill 2002;60(1):138-41.

62. Zhang W, Stephens CJ, Blumenfeld JD, Behzadi AH, Donahue S, Bobb WO, et al. Relationship of Seminal Megavesicles, Prostate Median Cysts, and Genotype in Autosomal Dominant Polycystic Kidney Disease. Journal of Magnetic Resonance Imaging. 1 mars 2019;49(3):894-903.

63. Torra R, Sarquella J, Calabia J, Martí J, Ars E, Fernández-Llama P, et al. Prevalence of cysts in seminal tract and abnormal semen parameters in patients with autosomal dominant polycystic kidney disease. Clin J Am Soc Nephrol. mai 2008;3(3):790-3.

64. Kim JA, Blumenfeld JD, Prince MR. Seminal Vesicles in Autosomal Dominant Polycystic Kidney Disease. In: Li X, éditeur. Polycystic Kidney Disease [Internet]. Brisbane (AU): Codon Publications; 2015 [cité 12 juin 2019]. Disponible sur: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK373378/

65. Sharp CK, Zeligman BE, Johnson AM, Duley I, Gabow PA. Evaluation of colonic diverticular disease in autosomal dominant polycystic kidney disease without end-stage renal disease. Am J Kidney Dis. nov 1999;34(5):863-8.

66. Judge PK, Harper CHS, Storey BC, Haynes R, Wilcock MJ, Staplin N, et al. Biliary Tract and Liver Complications in Polycystic Kidney Disease. J Am Soc Nephrol. sept 2017;28(9):2738-48.

67. Morris-Stiff G, Coles G, Moore R, Jurewicz A, Lord R. Abdominal wall hernia in autosomal dominant polycystic kidney disease. Br J Surg. mai 1997;84(5):615-7.

68. Sigogne M, Kanagaratnam L, Dupont V, Couchoud C, Verger C, Maheut H, et al. Outcome of autosomal dominant polycystic kidney disease patients on peritoneal dialysis: a national retrospective study based on two French registries (the French Language Peritoneal Dialysis Registry and the French Renal Epidemiology and Information Network). Nephrol Dial Transplant. 1 nov 2018;33(11):2020-6.

69. Pei Y, Obaji J, Dupuis A, Paterson AD, Magistroni R, Dicks E, et al. Unified criteria for ultrasonographic diagnosis of ADPKD. J Am Soc Nephrol. janv 2009;20(1):205-12.

70. Gimpel C, Bergmann C, Bockenhauer D, Breysem L, Cadnapaphornchai MA, Cetiner M, et al. International consensus statement on the diagnosis and management of autosomal dominant polycystic kidney disease in children and young people. Nat Rev Nephrol. 22 mai 2019;1-14.

71. Pei Y. Practical Genetics for Autosomal Dominant Polycystic Kidney Disease. NEC. 2011;118(1):c19-30.

72. Pei Y, Hwang Y-H, Conklin J, Sundsbak JL, Heyer CM, Chan W, et al. Imaging-Based Diagnosis of Autosomal Dominant Polycystic Kidney Disease. J Am Soc Nephrol. mars 2015;26(3):746-53.

73. Iliuta I-A, Kalatharan V, Wang K, Cornec-Le Gall E, Conklin J, Pourafkari M, et al. Polycystic Kidney Disease without an Apparent Family History. J Am Soc Nephrol. sept 2017;28(9):2768-76.

74. Patel C, Tchan M, Savige J, Mallett A, Tong A, Tunnicliffe DJ, et al. KHA-CARI Autosomal Dominant Polycystic Kidney Disease Guideline: Genetics and Genetic Counseling. Seminars in Nephrology. 1 nov 2015;35(6):550-556.e1.

75. Murphy EL, Droher ML, DiMaio MS, Dahl NK. Preimplantation Genetic Diagnosis Counseling in Autosomal Dominant Polycystic Kidney Disease. American Journal of Kidney Diseases. 1 déc 2018;72(6):866-72.

76. Torres VE, Chapman AB, Devuyst O, Gansevoort RT, Grantham JJ, Higashihara E, et al. Tolvaptan in Patients with Autosomal Dominant Polycystic Kidney Disease. New England Journal of Medicine. 20 déc 2012;367(25):2407-18.

77. Devuyst O, Chapman AB, Gansevoort RT, Higashihara E, Perrone RD, Torres VE, et al. Urine Osmolality, Response to Tolvaptan, and Outcome in Autosomal Dominant Polycystic Kidney Disease: Results from the TEMPO 3:4 Trial. J Am Soc Nephrol. mai 2017;28(5):1592-602.

78. Torres VE, Higashihara E, Devuyst O, Chapman AB, Gansevoort RT, Grantham JJ, et al. Effect of Tolvaptan in Autosomal Dominant Polycystic Kidney Disease by CKD Stage: Results from the TEMPO 3:4 Trial. Clin J Am Soc Nephrol. 06 2016;11(5):803-11.

79. Torres VE, Chapman AB, Devuyst O, Gansevoort RT, Perrone RD, Dandurand A, et al. Multicenter, open-label, extension trial to evaluate the long-term efficacy and safety of early versus delayed treatment with tolvaptan in autosomal dominant polycystic kidney disease: the TEMPO 4:4 Trial. Nephrol Dial Transplant. 01 2018;33(3):477-89.

80. Torres VE, Chapman AB, Perrone RD, Bae KT, Abebe KZ, Bost JE, et al. Analysis of baseline parameters in the HALT polycystic kidney disease trials. Kidney Int. mars 2012;81(6):577-85.

81. Caroli A, Perico N, Perna A, Antiga L, Brambilla P, Pisani A, et al. Effect of longacting somatostatin analogue on kidney and cyst growth in autosomal dominant polycystic kidney disease (ALADIN): a randomised, placebo-controlled, multicentre trial. The Lancet. 2 nov 2013;382(9903):1485-95.

82. Perico N, Ruggenenti P, Perna A, Caroli A, Trillini M, Sironi S, et al. Octreotide-LAR in later-stage autosomal dominant polycystic kidney disease (ALADIN 2): A randomized, double-blind, placebo-controlled, multicenter trial. PLoS Med. avr 2019;16(4):e1002777.

83. Meijer E, Visser FW, van Aerts RMM, Blijdorp CJ, Casteleijn NF, D'Agnolo HMA, et al. Effect of Lanreotide on Kidney Function in Patients With Autosomal Dominant Polycystic Kidney Disease. JAMA. 20 nov 2018;320(19):2010-9.

84. Serra AL, Poster D, Kistler AD, Krauer F, Raina S, Young J, et al. Sirolimus and kidney growth in autosomal dominant polycystic kidney disease. N Engl J Med. 26 août 2010;363(9):820-9.

85. Walz G, Budde K, Mannaa M, Nürnberger J, Wanner C, Sommerer C, et al. Everolimus in patients with autosomal dominant polycystic kidney disease. N Engl J Med. 26 août 2010;363(9):830-40.

86. Cadnapaphornchai MA, George DM, McFann K, Wang W, Gitomer B, Strain JD, et al. Effect of pravastatin on total kidney volume, left ventricular mass index, and microalbuminuria in pediatric autosomal dominant polycystic kidney disease. Clin J Am Soc Nephrol. mai 2014;9(5):889-96.

87. Tesar V, Ciechanowski K, Pei Y, Barash I, Shannon M, Li R, et al. Bosutinib versus Placebo for Autosomal Dominant Polycystic Kidney Disease. J Am Soc Nephrol. nov 2017;28(11):3404-13.

88. Runegaard AH, Fitzpatrick CM, Woldbye DPD, Andreasen JT, Sørensen AT, Gether U. Modulating Dopamine Signaling and Behavior with Chemogenetics: Concepts, Progress, and Challenges. Pharmacol Rev. 1 avr 2019;71(2):123-56.

89. Chen J, Shi S, Cai X, Li H, Wang L, Li H, et al. DR1 activation reduces the proliferation of vascular smooth muscle cells by JNK/c-Jun dependent increasing of Prx3. Mol Cell Biochem. mars 2018;440(1-2):157-65.

90. Zeng C, Zhang M, Asico LD, Eisner GM, Jose PA. The dopaminergic system in hypertension. Clin Sci. juin 2007;112(12):583-97.

91. Atkinson KF, Kathem SH, Jin X, Muntean BS, Abou-Alaiwi WA, Nauli AM, et al. Dopaminergic signaling within the primary cilia in the renovascular system. Front Physiol. 2015;6:103.

92. Fu J, Han Y, Wang H, Wang Z, Liu Y, Chen X, et al. Impaired dopamine D1 receptor-mediated vasorelaxation of mesenteric arteries in obese Zucker rats. Cardiovasc Diabetol. 22 févr 2014;13:50.

93. Barendregt JN, Florijn KW, Muizert Y, Chang PC. Borderline hypertensive autosomal dominant polycystic kidney disease patients have enhanced production of renal dopamine. Normalization of renal haemodynamics by DOPA infusion. Nephrol Dial Transplant. 1995;10(8):1332-41.

94. Lorthioir A, Joannidès R, Rémy-Jouet I, Fréguin-Bouilland C, Iacob M, Roche C, et al. Polycystin deficiency induces dopamine-reversible alterations in flow-mediated dilatation and vascular nitric oxide release in humans. Kidney International. févr 2015;87(2):465-72.

REMERCIEMENTS

Au Professeur **Dominique GUERROT…** celui dont les mots ne vont pas suffir. A la fin de mon externat, les néphrologues de l'hôpital Tenon m'ont orienté vers la néphrologie à Rouen en me promettant la présence d'un jeune chef sympathique et intelligent … j'ai finalement découvert qu'ils m'avaient trompé. Je suis tombé sur la PERSONNE la plus SYMPATHIQUE, la plus INTELLIGENTE, la plus HUMAINE que j'ai pu croiser durant mon cursus médical. Tu as été plus qu'un chef, un frère, un modèle à suivre dans ma vie professionnelle et personnelle. Quoi que je dise ne pourrait exprimer ma gratitude, mon respect, mon amitié pour toi. Pour tous ce que tu fais, pour tous ce que tu es … MERCI

Au Professeur **Michel GODIN**, votre accueil et votre bienveillance au sein du service de néphrologie m'ont touché énormément. Votre charisme, votre sympathie et votre naturel sont un exemple pour moi. Vous m'avez permis de diversifier mon parcours médical, de faire de la recherche scientifique. Vos mots plein de bienveillance lors de mon choix du cursus scientifique ont été pour moi un moteur au cours de ces années, j'espère avoir été à la hauteur.

Au Professeur **Vincent RICHARD,** merci de m'avoir accueilli dans votre laboratoire. Je vous exprime ma profonde gratitude, sans votre soutien indéfectible je n'aurais pas pu réaliser ma thèse de science. Je n'ai manqué de rien, cinq années de bonheur, de plaisir, de passion. Mille merci pour ce parcours scientifique, pour ces rencontres aux seins du laboratoire. Votre rigueur ainsi que votre souci de détail concernant tous les projets aux seins de l'unité m'ont toujours fasciné. J'espère pouvoir continuer à faire partie de cette famille. Merci.

Au Professeur **Jérémy BELLIEN**, merci m'avoir accueilli, encadré, toujours avec la bonne humeur. Toujours disponible, j'espère avoir été à la hauteur (au moins au café). Pour ta confiance en moi, merci.

Au Docteur **Laurent MESNARD**, merci pour votre suivi au cours de mon cursus. Vos conseils et vos encouragements ont été porécieux.

Au Docteur **Marie FRIMAT**, merci pour vos conseils avisés au cours de mon cursus. Votre bienviellance m'a profondément touché.

A **Zoubir,** mon pharmacologue statisticien préféré (en même temps vous ne devez pas être nombreux), ton amitié a dépassé le cadre de notre collaboration, un plaisir de te connaitre.

A **Sylvain,** pour être disponible, pour ta bonne humeur et biiiiiiiiiiiiiiiim.

A **Paul**, travailler avec les hollandais est un plaisir, ton amitié m'honore.

A **Antoine**, un plaisir de discuter avec toi, tu rends tes étudiants conformes à ton non-conformisme et ça c'est fort.

A **Ebba**, la plus algérienne des suédoises, toujours à la pointe de la science, merci pour ces années.

A **Marianne**, ma sœur d'arme, tu as osé finir avant moi, ces années avec toi en été un bonheur, je te souhaite le meilleur pour la suite

A **Bérénice**, la thésarde la plus sportive de France ! s'il y a bien une personne qui ne calcifiera pas ces vaisseaux c'est bien toi ! bon courage pour la fin de la thèse, ne quitte pas la lumière des yeux !

A **Nico,** le plus chef des chefs, n'est-ce pas chef ? toujours un plaisir de discuter avec toi !

A **Julie**, thésarde acharnée du travail, maintenant il est 22h00, part du labo !!!

A **Matthieu**, mon co-thésard, mon voisin de bureau et de la vie, un peu geek un peu fou mais beaucoup de gentillesse, le meilleur pour la suite dans ta vie professionnelle et personnelle.

A **Math,** Un brillant chercheur. Ta gentillesse et ta bonne humeur m'ont touché (ou bien c'est ton frère jumeau je ne sais plus !!!) je te souhaite le meilleur pour la suite sur le plan personnel et professionnel.

A Marie, Parcours non conforme = encadrant non conforme, ton abnégation et ton travail t'amèneront loin je suis persuadé, le meilleur pour la suite !

A **Manu et Thomas**, les anésth/réa de CHOC, un exemple à suivre pour moi.

A **Gaspard**, un co-interne et un master 2 génial, toujours la pèche, toujours la forme, le meilleur pour la suite dans ta vie personnelle et professionnelle.

A **Dorian**, un excellent Master 2 et un très bon interne (je suis persuadé), je te souhaite la réussite pour la suite de ton parcours

A **Déborah**, la relève puissance mille, rigueur et sérieux, tu as été pour moi un énorme soutien, ton aide au cours de ma dernière année a été immense, je te souhaite le meilleur pour la suite, mais c'est bien parti…. Mayenne Power !!!

A **Jean SELIM**, mon co-thésard, mon ami, mon frère. Simple et généreux, tu t'es laissé emporter par la recherche telle la vague emportant le surfeur dans l'océan de la science !

A **Inès** et à nos discussions philosophiques sans fin, j'ai adoré bosser avec toi !

A Mister **DUFLOT**, le seigneur du Babyfoot, des EETs et bien d'autre molécules que seul toi connait, un plaisir de bosser avec toi.

A **Paul,** le seul, l'unique hémostasien qui ne coagule jamais, toujours en train de bosser, bonne continuation mon ami !

A **Clothilde**, ma première encadrante au labo, un plaisir de collaborer avec toi, j'espère avoir été the Best !

A **Najah, Julie, Eugénie, PAT, Mahmoud**, mes anciens co-thésards, mes ainées, vous avez été un exemple à suivre.

A Sébastien, Maelle, Delphine, Céline, Louise, Guillaume et Antoine.

A **Alexandre** et **Benjamin**, ceux avec qui tous a commencé au labo.

A **khédi,** tu as été bienveillante et bien plus. Je n'ai manqué de rien, merci pour tout.

A **Anaïs et Sylvanie**, travailler avec vous est un pur bonheur, efficacité et bonne humeur, notre collaboration continuera encore. A **Marine**, mon étudiante sérieuse, le meilleur est à venir pour toi.

A **Lionel**, A **Jean Paul**, comment bien vieillir…ou bien rajeunir, je ne sais plus.

A tous ceux avec qui j'ai collaboré dans l'animalerie du labo, Yann, Tony et Ronald, un plaisir de travailler avec vous.

Au Docteur **Marie-Sophie GAVARD**, tu as été ma première encadrante, ma formation avec toi a été un bonheur. Tu t'es toujours soucié de ma vie personnelle, ta bienveillance m'a énormément touché, MERCI

Au Docteur **Steven GRANGE,** Le premier CCA, Le premier semi-marathon, Le premier mariage que j'ai vu en France (et le plus beaux !), travailler avec toi était plus qu'un plaisir, je n'ai pas pu te rejoindre en réa mais le cœur y est ! Merci pour ta gentillesse et ta bienveillance.

Au Docteur **Dominique BERTRAND**, ta passion pour la greffe est un exemple, travailler avec toi a été un énorme plaisir,

Au Docteur **Mélanie HANOY**, tes cours en dialyse m'ont toujours fasciné, notre travail débuté il y a 7 ans n'a toujours pas abouti mais je ne désespère pas, je suis persuadé que le résultat final ne sera que meilleur ! A **Dom et Mélanie** (oui encore), merci pour votre accueil et votre bienveillance … se sentir aimé ça n'a pas de prix ! Merci.

Au Docteur **Franck LEROY**, ton souci du détail, ta recherche de la perfection dans ton travail sont un exemple pour moi, un plaisir d'avoir été ton « chouchou ».

Au Docteur **Ludivine LEBOURG**, co-interne puis chef, j'ai travaillé un peu avec toi, ce fut un plaisir.

Au Docteur **Charlotte LAURENT**, co-interne puis chef, pour ta gentillesse et ta bienveillance au travail.

A **Anne-laure et julien**, mes ainés.

A **Marie-charlotte**, first co-interne de néphro ever, semestre de fou, le meilleur pour la suite.

A mes co-interne de ma promo : **Audrey et Lise**, vous avez grandit plus rapidement que moi…

A **Mathilde…** je compte sur toi pour les astuces du CCA.

A **Anaïs**, merci pour ton soutien et ton encouragement son faille, nous n'avons jamais eu l'occasion de travailler ensemble mais je suis persuadé que tu vas hisser la croix rouge au sommet !

Aux co-internes arrivés après moi et partis avant moi !!! **Maxime** (futur collègue) et **Alexandre** (double thèses), le meilleur pour la suite.

A **Tristan**, qui eu l'amabilité de finir après moi

A **Margaux**, la seule interne qui a le podocyte dans le sang

A **Mélanie**, ancienne externe et co-interne, l'infectiologie t'a retourné le cerveau, mais tu reviendras en néphro un jour…

A **Marine,** co-interne au top, bon courage pour la suite du cursus.

A **Jonathan,** parcours du combattant, le meilleur à venir

A **Rachna et Grégoire,** le meilleur pour la suite, on se recroisera en néphro.

A **Pierre**, interne de néphro un jour interne de néphro toujours, je te souhaite le meilleur pour la suite.

A mes **co-internes récents**, Vincent, Sidney, Guillaume et Florian, j'ai passé un semestre magnifique, un pur bonheur de vous avoir cotoyé. A mes **co-internes lillois**, Linh, Anne-so, Marie-flore et Vincent, merci pour ces 6 mois magnifiques.

Aux **IDE de néphrologie**, un plaisir de travailler avec vous.

Aux **secrétaires de néphrologie**, un plaisir de travailler avec vous

A **Philippe THOREL**, externe (que je n'ai pas croisé), co-interne (que j'ai accueilli), puis chef (que j'ai adoré). Un plaisir de travailler avec toi,

A mes **amis parisiens**, avec qui j'ai passé un externat de rêve, MERCI !

A **Thiziri** et **Houssam**, vous avez été toujours présents, vous méritez le meilleurs pour vos vies personnelles et professionnelles, vos encouragements m'ont toujours portés.

Au Docteur **Éric POSTEC**, mon premier stage d'interne dans votre service a été très formateur, dans une équipe chaleureuse et bienveillante, merci pour votre accueil.

Au Docteur **Éric FRESNOY** et son équipe, mon semestre en réanimation a été un pur bonheur et une expérience humaine unique.

Au Docteur **Robinson JOANNIDES**, merci de m'avoir accueilli dans votre service, de m'avoir libéré du temps et de m'avoir encouragé pendant ce semestre.

Au professeur **François CARON** et son équipe d'infectiologie, mon semestre dans votre service a été extrêmement formateur.

Au Professeur **Marc HAZZAN**, merci de m'avoir accueilli dans votre service en inter-chu, cette expérience lilloise a été pour moi très enrichissante, professionnellement et humainement.

Au Professeur **BENSMAN**, pour m'avoir encouragé en néphrologie.

A mon oncle **Abderrahime**, ton soutien, tes encouragements et ta bienveillance m'ont suivi depuis mon enfance, j'espère avoir été à la hauteur.

A mon cousin **Riyadh**, tu as été toujours présents, en Algérie comme en France, je te souhaite le meilleur pour ta vie personnelle et professionnelle.

A ma **belle-famille, Hadja MALIKA, Hadj AHMED, abderezak, fatima et sidimohammed** pour votre encouragement continu, pour votre bienveillance, pour votre soutien, Merci pour tous.

A mon grand frère **Anas**, ce n'est pas la fin qui compte c'est le chemin qui prévaut, ton endurance est un exemple pour moi.

A mon frère **Selmane**, tu as accompli tant de choses. Ta force tranquille est un exemple pour moi.

A ma petite sœur **Rouzia**, nous t'avons laissé jeune quand nous sommes partis en France, je sais que ça n'a pas été facile pour toi (habituée à avoir 3 frères qui t'embêtent tout le temps) mais tu as été à la hauteur de tout. Je suis fière de ma petite sœur, de sa famille et de tous ce que tu as accomplie.

A mes belles sœurs **Imane** et **Ismahan**, votre soutien indéfectible m'a profondément touché. Vous m'avez gâté, Merci.

A mes neveux et nièces, **Yousra, Taha**, **Afnene**, **Assia**, **Yacine**, **Bayane** et **Nawfel.**

A mes parents **mama** et **abi** pour tous ce que vous nous avez donné comme amour, de nous avoir transmis tant de valeurs humaines, j'espère que nous vous rendons fiers…et que je resterais toujours votre mazozéééééé.

A Ma **Amina**, pour ce que tu fais tous les jours, de me porter, de m'emporter, de me supporter … je t'aime.

A Mon **Youcef,** mon petit à moi, ma vie.